



Institut für Biotechnologie

**Untersuchung von *in vivo*-Wechselwirkungen
zwischen sekretorischen Vorläuferproteinen
und Komponenten des Proteinexportapparates
Gram-positiver Bakterien**

Dietmar Tüppe

**Untersuchung von *in vivo*-Wechselwirkungen
zwischen sekretorischen Vorläuferproteinen
und Komponenten des Proteinexportapparates
Gram-positiver Bakterien**

Dietmar Tippe

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3877

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-3877

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2001)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-52 20 · Telefax: 02461/61-61 03 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Investigations of *in vivo*-interactions between secretory precursor proteins and components of the protein export machinery of Gram-positive bacteria

Trials to secrete heterologous proteins using Gram-positive bacteria as host organisms have shown problems with regard to the translocation step across the cytoplasmic membrane. The reason for this are presumably non optimal interactions between the subunits of the translocase (Sec-components) and the precursor proteins. In order to analyse the interactions between Sec-components and heterologous precursor proteins, *Bacillus subtilis* / *Staphylococcus carnosus* hybrid translocases were used. The starting point of this thesis was a *secA*-replacement mutant of *B. subtilis* (RMA). In this mutant, the *B. subtilis secA* gene is chromosomally replaced by the *secA* of *S. carnosus*. The gene replacement results in disturbed interactions between the *S. carnosus* SecA protein (SecA(Sc)) and at least one translocase subunit of *B. subtilis* (SecX(Bs)). As a result of this perturbation the RMA-mutant shows a conditional protein export defect leading to cold-sensitive growth. In addition a heterologous protein (pre-OmpA of *Escherichia coli*) is selectively discriminated from protein export. The aim of this thesis was to identify the disturbing SecA(Sc)-SecX(Bs) interactions in the RMA. To reach this goal additional translocase subunits (SecX(Sc)) of *S. carnosus* should be specifically introduced into the RMA-mutant.

For the project it was necessary to clone the missing *S. carnosus secG* gene. Using the *B. subtilis secG* gene as probe a hybridizing DNA-fragment of *S. carnosus* was identified and subsequently cloned. Sequence analysis revealed that this fragment encodes a protein showing homology to the SecG proteins of *B. subtilis* and *E. coli*. The protein characterization revealed that it is necessary for an efficient protein export *in vivo* and *in vitro*.

The characterisation of a *secG* replacement mutant of *B. subtilis* (RMG), in which the *B. subtilis secG* gene is chromosomally replaced by *secG* of *S. carnosus* showed that the *S. carnosus* SecG protein optimally interacts with the remaining translocase subunits of *B. subtilis*. The RMG behaves as the *B. subtilis* wildtype in contrast to the above mentioned RMA-mutant, in which an interaction between the *S. carnosus* SecA and a so far unknown *B. subtilis* Sec-component is disturbed. Additional replacement of the *B. subtilis secG*-gene on the chromosome of the RMA by the corresponding gene of *S. carnosus* (RMA/G) did not change the RMA phenotypes. The replacement mutant RMA/G behaved like the RMA. This result and the behaviour of the RMG clearly show that the SecA(Sc)-SecG(Bs)-interaction in the RMA is functional.

In contrast to the *S. carnosus* SecG, introduction of the *S. carnosus* SecY protein into the RMA abolished the cold sensitive phenotype and the selective discrimination of the heterologous OmpA precursor from protein export. This clearly shows that the SecA(Sc)-SecY(Bs)-interaction is disturbed in the RMA. In addition, these results indicate that the pre-OmpA (as probably all secretory proteins) interacts simultaneously with SecA and SecY at an early step of protein translocation. Hence, the precursor is an equivalent part of an at least trimeric complex formed by precursor, SecA, and SecY. Apart from this it was shown in comparable investigations that besides an optimal SecA-SecY-interaction, an optimal interaction between the SecE and the SecY protein is also important for an efficient protein translocation.

The results of this thesis suggest, that the often observed, inefficient or even entirely prevented membrane translocation of heterologous proteins using Gram-positive bacteria as hosts is due to an inefficient or unproductive formation of a translocation initiation complex of precursor, SecA, SecY, and (most likely) SecE.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1.	Proteintranslokation bei Bakterien	1
1.1.1.	N-terminale-Exportsignale	1
1.1.2.	Die Komponenten der <i>E. coli</i> Translokase	2
1.1.2.1.	Die zentralen und akzessorischen Komponenten der <i>E. coli</i> Sec-Translokase	4
1.1.2.2.	Protein-“Targeting“	5
1.2.	Ein Model zum Mechanismus der Sec-abhängigen Proteintranslokation in <i>E. coli</i>	6
1.3.	Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den Translokase-Untereinheiten während des Translokationsvorgangs	8
1.4.	Gram-positive Bakterien als Wirtsorganismen für die Gewinnung heterologer Proteine	11
1.5.	Eine <i>B. subtilis</i> / <i>S. carnosus</i> -Hybridtranslokase als Einstieg für die <i>in vivo</i> -Untersuchungen von Protein-Protein-Wechselwirkungen bei der Proteintranslokation in <i>B. subtilis</i>	12
1.6.	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	14
2.	Material und Methoden	
2.1.	Bakterienstämme, Phagen, Plasmide und Oligonukleotide	16
2.2.	Medien und Lösungen	19
2.3.	Verwendete Reagenzien und Bezugsquellen	22
2.4.	Mikrobiologische Methoden	22
2.4.1.	Kultivierung von Bakterien	22
2.4.2.	Stammhaltung	23
2.4.3.	Transformation von Bakterien	23
2.5.	Gentechnische Methoden	24
2.5.1.	Präparation chromosomaler DNA	25
2.5.2.	Präparation von Plasmid-DNA	25
2.5.3.	Allgemeine gentechnische Methoden	26
2.5.3.1.	Agarose-Gelelektrophorese	26
2.5.3.2.	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	26
2.5.3.3.	Behandlung mit alkalischer Phosphatase	26
2.5.3.4.	Umwandlung von überhängenden 5'-Enden in glatte Enden	26
2.5.3.5.	Ligation von DNA-Fragmenten	27
2.5.3.6.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen und Entsalzung von DNA-Lösungen	27
2.5.3.7.	Herstellung und Aufreinigung synthetischer Oligonukleotide	27
2.5.3.8.	Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.5.3.9.	DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode	27
2.5.3.10.	DNA-DNA-Hybridisierung nach Southern	29
2.5.3.11.	Phagenhybridisierung	30
2.5.3.12.	Genaustausch in <i>B. subtilis</i> mit pORI-System	30
2.6.	Proteinchemische Methoden	31
2.6.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
2.6.2.	Coomassie-Färbung von Proteingelen	32
2.6.3.	Herstellung von Gesamtzellextrakten und Zellfraktionierung	32
2.6.4.	Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern (Western Blot)	32
2.6.5.	Pulse Chase-Experiment mit <i>B. subtilis</i>	33
2.6.6.	Pulse Chase-Experiment mit <i>S. carnosus</i>	34

3. Ergebnisse

3.1.	Klonierung und Charakterisierung des <i>secG</i> Gens von <i>Staphylococcus carnosus</i>	35
3.1.1.	Isolierung und Sequenzierung des <i>secG</i> -Gens von <i>S. carnosus</i>	35
3.1.2.	Sequenzanalyse auf DNA- und Proteinebene	40
3.1.3.	Herstellung eines Peptidantikörpers gegen das SecG-Protein von <i>S. carnosus</i> und Expression des <i>S. carnosus</i> SecG-Proteins in der <i>E. coli</i> <i>secG</i> -Deletionsmutante KN370	41
3.1.3.1.	Das <i>S. carnosus</i> SecG-Protein kann das kältesensitive Wachstum der <i>secG</i> -Deletionsmutante KN370 von <i>E. coli</i> nicht komplementieren	43
3.1.4.	Konstruktion einer <i>secG</i> -Deletionsmutante von <i>S. carnosus</i>	44
3.1.4.1.	Die <i>secG</i> -Deletionsmutante von <i>S. carnosus</i> ist auch bei niedrigen Temperaturen lebensfähig	47
3.1.4.2.	Die Überexpression eines Exportproteins in der <i>secG</i> -Deletionsmutante von <i>S. carnosus</i> führt zu einem verzögertem Wachstum bei 20 °C	47
3.1.4.3.	Die <i>secG</i> -Deletionsmutante von <i>S. carnosus</i> weist einen Prozessierungsdefekt auf	49
3.1.4.4.	Der Import der Präpro-Lipase in Membranvesikel der <i>secG</i> -Deletionsmutante von <i>S. carnosus</i> ist massiv beeinträchtigt	51
3.1.5.	Konstruktion einer <i>secG</i> -Austauschmutante von <i>B. subtilis</i>	53
3.1.5.1.	Nachweis des <i>S. carnosus</i> <i>secG</i> -Genproduktes in der RMG	55
3.1.5.2.	Die RMG ist bei niedrigen Temperaturen lebensfähig	56
3.1.5.3.	Das <i>S. carnosus</i> SecG-Protein kann den unter Sekretionsstreß ausgeprägten Wachstumsdefekt der <i>secG</i> -Deletionsmutante von <i>B. subtilis</i> komplementieren	56
3.1.5.4.	Die RMG zeigt im Gegensatz zur <i>secG</i> -Deletionsmutante von <i>B. subtilis</i> keine Exportdefekte der Amylase bzw. der Lipase	58
3.2.	<i>B. subtilis</i> / <i>S. carnosus</i> Hybridtranslokasen als Methode für die <i>in vivo</i> -Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen bei der Proteintranslokation in <i>B. subtilis</i>	61
3.2.1.	Konstruktion einer <i>secA/G</i> -Austauschmutante von <i>B. subtilis</i>	62
3.2.1.1.	Die RMA/G ist ebenso wie die RMA bei 37 °C lebensfähig und zeigt ein kältesensitives Wachstum	64
3.2.1.2.	Das Prä-OmpA-Protein von <i>E. coli</i> wird in der RMA/G ineffizient transloziert	66
3.2.2.	Konstruktion einer Hybridtranslokase in <i>B. subtilis</i> , die das <i>S. carnosus</i> SecA und SecY-Protein enthält	68
3.2.2.1.	Die RMA/Y ist bei der für die RMA nicht permissiven Temperatur lebensfähig	69
3.2.2.2.	Der Protein-Exportdefekt der RMA bei der nicht permissiven Temperatur wird durch das Einbringen des <i>secY</i> -Gens von <i>S. carnosus</i> aufgehoben	70
3.2.2.3.	Der OmpA-Exportdefekt in der RMA wird durch das <i>secY</i> -Gen von <i>S. carnosus</i> aufgehoben	73
3.2.2.4.	Der Kompetenz- und Sporulationsdefekt der RMA wird durch das <i>secY</i> -Gen von <i>S. carnosus</i> aufgehoben	75
3.2.3.	Konstruktion einer <i>secE</i> -Austauschmutante von <i>B. subtilis</i>	77
3.2.3.1.	Die RME zeigt bereits bei 37 °C einen Wachstumsdefekt, der sich bei niedrigeren Temperaturen weiter verstärkt	78
3.2.3.2.	Der Wachstumsdefekt der RME wird durch Einbringen des <i>secY</i> -Gens von <i>S. carnosus</i> teilweise aufgehoben	80
3.2.3.3.	Die RME zeigt einen Defekt in der Sporenbildung und Kompetenzentwicklung, der im Falle der Kompetenz durch das <i>S. carnosus</i> <i>secY</i> -Gen zum Teil kompensiert wird	84

4.	Diskussion	
4.1.	Klonierung und Charakterisierung des <i>secG</i> -Gens von <i>Staphylococcus carnosus</i>	86
4.1.1.	Isolierung des <i>secG</i> -Gens von <i>S. carnosus</i> und Sequenzanalyse auf DNA und Proteinebene	86
4.1.2.	Funktionelle Expression des <i>S. carnosus</i> SecG-Proteins in der <i>E. coli</i> <i>secG</i> -Deletionsmutante KN370	87
4.1.3.	Konstruktion und Charakterisierung einer <i>secG</i> -Deletionsmutante von <i>S. carnosus</i>	88
4.1.4.	Das <i>S. carnosus</i> SecG-Protein kann optimal mit den Translokase-Untereinheiten von <i>B. subtilis</i> wechselwirken	90
4.2.	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>Staphylococcus carnosus</i> Hybridtranslokasen als Methode für die <i>in vivo</i> -Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen bei der Proteintranslokation	91
4.2.1.	Die SecA-SecG-Wechselwirkung ist für den Wachstums- und Proteintranslokationsdefekt der RMA nicht verantwortlich	94
4.2.2.	Eine gestörte Wechselwirkung zwischen dem <i>S. carnosus</i> SecA und dem SecY-Protein von <i>B. subtilis</i> bedingt in der RMA Export- und Wachstumsdefekte	94
4.2.3.	Die Ausbildung eines funktionellen Translokations-Initiationskomplexes, bestehend aus SecA, SecY und Vorläuferprotein, ist für eine effiziente Proteintranslokation essentiell	98
4.2.4.	Die Funktion der Sec-Translokase ist für die Sporenbildung und Kompetenzentwicklung von <i>B. subtilis</i> essentiell	99
4.2.5.	Auch eine funktionelle SecE-SecY-Wechselwirkung ist in <i>B. subtilis</i> für die Membrantranslokation von Vorläuferproteinen von Bedeutung	100
4.2.6.	Biotechnologische Bedeutung der erzielten Ergebnisse	104
5.	Zusammenfassung	105
6.	Literatur	106

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
pfu	"plaque forming unit"
Ci	Curie
CSPD	(Na ₂ 3-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetane-3,2'-(5'-chloro)Tricyclo[3.3.1.1]Decan}-4-yl) Phenylphosphat
Da	Dalton
Dig	Digoxygenin
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat (N steht für eines der Nukleoside A: Adenosin, C: Cytidin, G: Guanosin, T: Thymidin)
ddNTP	Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dUTP	2'-Desoxy-Uridin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylen-diamino-tetra acid
<i>et al.</i>	et alteri (und andere)
h	Stunden
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
kB	Kilobasen (=1000 Basenpaare Bp)
kDa	Kilo Dalton
mA	Milliampère
min	Minuten
μl/ml	Microliter/Milliliter
μg/ml	Microgramm/Milliliter
NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid
OD600	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Flourid
RSA	Rinderserum-Albumin
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunden
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Laemmli
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
Taq	Thermophilus aquaticus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
ü.N.	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
w/v	Masse pro Volumen
V	Volt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chloro-2-Indolyl-Galaktopyranosid
X-Posphat	5-Brom-4-Chloro-2-Indolyl-Phosphat

Ein-Buchstaben Code der Aminosäuren

Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Asparaginsäure	D
Cystein	C
Glutamin	Q
Glutaminsäure	E
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

1. Einleitung

Zellen sind generell von einer Membran umgeben. Diese Membran stellt eine Permeabilitätsschranke für geladene und große Moleküle dar und ermöglicht einen kontrollierten Stoffaustausch mit ihrer Umgebung. Ein weiteres gemeinsames Merkmal aller Zellen ist die Kompartimentierung, was die Aufteilung der Zelle in funktionell unterschiedliche Reaktionsräume bedeutet. Eukaryontische Zellen sind komplex aufgebaut. So findet man eine Vielzahl intrazellulärer, membranumschlossener Organellen, die jeweils eine spezielle Funktion ausüben (Zellkern, Endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi-Apparat, Mitochondrien, Peroxisomen etc.). Im Gegensatz zur eukaryontischen Zelle mit ihrer komplexen Kompartimentierung sind Prokaryonten vergleichsweise einfach aufgebaut. Bei Gram-positiven Bakterien ist das Cytoplasma nur durch die Cytoplasmamembran (CM) und die außen aufgelagerte Zellwand von der Umgebung abgetrennt. Gram-negative Bakterien besitzen zusätzlich zur CM eine äußere Membran sowie das zwischen beiden Membranen liegende Periplasma.

Die Proteinbiosynthese findet mit Ausnahme einiger Proteine der Mitochondrien und Chloroplasten im Cytoplasma statt. Befindet sich der Wirkort eines Proteins nicht im Cytoplasma sondern in einem Organell, einer bestimmten Membran oder gar außerhalb der Zelle (sekretorische Proteine), so muß dieses Protein dorthin transportiert werden. Daraus ergibt sich für die Zelle zum einen die Notwendigkeit der Proteinsortierung (**“Targeting“**), die durch **“targeting“**-Signale innerhalb der Primärsequenz des jeweiligen Proteins sichergestellt wird. Zum anderen muß beim Transport mindestens eine Membran überwunden werden, ohne deren Semipermeabilität zu beeinträchtigen. Der Transport (Translokation) wird durch Multiprotein-Komplexe, sogenannte **“Translokasen“**, die in der jeweiligen Membran lokalisiert sind, ermöglicht.

1.1. Proteintranslokation bei Bakterien

1.1.1. N-terminale-Exportsignale

Vieles was im Hinblick auf die Proteintranslokation in Prokaryonten bekannt ist, stammt von Studien am Gram-negativen Modellorganismus *Escherichia coli* (Driessen, 1998; Manting & Driessen, 2000). Periplasmatische und Außenmembran-Proteine werden mit einer N-terminalen Verlängerung, dem Signalpeptid, synthetisiert. Dieses Signalpeptid (**“targeting“**-Signal) unterscheidet die zu exportierenden Proteine von den cytosolischen Proteinen und ermöglicht der Zelle die Proteinsortierung. Trotz des gemeinsamen Funktionsprinzips (siehe unten) weisen die bakteriellen Signalpeptide keinerlei Homologien auf Ebene der Primärsequenz auf. Allerdings ist ein konserviertes Bauprinzip feststellbar (von Heijne, 1985). Alle Signalsequenzen besitzen eine N-terminale Region, die zwischen 1 und 3 positiv geladene Reste beinhaltet (n-

Domäne), eine hydrophobe Region bestehend aus 10 - 15 hydrophoben Resten (h-Domäne) und eine polare C-terminale Region (c-Domäne). Die c-Domäne enthält eine proteolytische Spaltstelle für eine Signalpeptidase, die das Signalpeptid nach der Translokation abtrennt (**“prozessiert“**). Das Exportprotein wird vor diesem Prozessierungsschritt als **“Vorläufer“** und im Anschluß daran als **“reifes“** Protein bezeichnet.

Die Signalpeptide unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Länge und der positiven Nettoladung der n-Domäne. Die Durchschnittslänge beträgt bei Gram-negativen Bakterien 24 Aminosäuren mit einer durchschnittlichen Nettoladung von +2. Im Vergleich dazu ist bei Gram-positiven Bakterien die Signalsequenz mit einem Durchschnitt von 29 - 31 Aminosäuren etwas länger und die durchschnittliche Nettoladung der n-Region um eins auf +3 erhöht (von Heine & Abrahmsen, 1989). Obwohl diese Unterschiede wahrscheinlich eine Anpassung der Vorläuferproteine an den jeweiligen Exportapparat widerspiegeln, können jedoch Exportsignale unterschiedlicher Herkunft prinzipiell den Export auch im heterologen System vermitteln (Breitling *et al.*, 1989; Nakamura *et al.*, 1989; Meens *et al.*, 1993).

Die Funktion des Signalpeptids ist im *E. coli*-System gut untersucht: Im Anschluß an die Translation verzögert es zunächst die Faltung des neu synthetisierten Polypeptids in eine stabile Tertiärstruktur (Hardy & Randall, 1991) und erlaubt hierdurch eine Wechselwirkung mit dem exportspezifischen Chaperon SecB (Thom & Randall, 1988; Altmann *et al.*, 1990; Watanabe & Blobel, 1989a, b) (Kapitel 1.1.2.2.). Durch biophysikalische Studien wurde eine Wechselwirkung zwischen der positiv-geladenen n-Region und den anionischen Phospholipiden in der CM gezeigt (Kusters, 1991). Desweiteren wurde gefunden, dass die h-Region des Signalpeptids eine α -helikale Struktur ausbilden und dieser Bereich spontan in Biomembranen inserieren kann (Briggs *et al.*, 1986). Hierbei ist die Orientierung des Signalpeptids klar festgelegt: Entsprechend der **“positive inside rule“** (von Heijne, 1989) verbleibt der positiv geladene N-Terminus im Cytoplasma. Die Signalsequenz ist also insbesondere zu einem frühen Zeitpunkt der Proteintranslokation mit den Lipiden in Kontakt (Driessen, 1994). Durch seine Wechselwirkung mit der zentralen Exportkomponente SecA (Kapitel 1.1.2.1.) (Akita *et al.*, 1990) leitet das Signalpeptid den Translokationsprozeß des reifen Polypeptids ein.

1.1.2. Die Komponenten der *E. coli* Translokase

Zwei generelle Strategien wurden eingesetzt um die Gene zu identifizieren, welche für die Komponenten des Protein-Exportapparates kodieren (Bieker *et al.*, 1990): Ein Ansatz beruhte auf der Expression eines Fusionsproteins, das aus dem N-terminalen Bereich eines sekretorischen Proteins (z. B. LamB, MalE, PhoA) und dem cytoplasmatischen β -Galaktosidase Protein bestand. Die Expression dieser Fusionsproteine führte zur Blockierung der Exportstellen und war für die Zelle lethal. Klone, die diese Selektionsbedingungen überlebten, wiesen einen pleiotropen Defekt im Protein-Export auf, d. h., dass unter nicht-permissiven Bedingungen die Vorläufer

verschiedener sekretorischer Proteine akkumulierten. Die über diesen Ansatz gefundenen Gene wurden als *sec* bezeichnet (*sec* steht für "secretion").

Der andere Ansatz war die Expression von sekretorischen Proteinen, deren Signalsequenz durch Mutationen verändert war und den Export des Proteins blockierten. Dies führte zur Identifizierung von dominanten Suppressoren (*prl*-Mutanten, *prl* steht für "protein localization"), die den Export der Signalsequenzmutante wieder erlaubten.

Die Charakterisierung der *sec*- und *prl*-Mutanten zeigte, dass letztlich in drei Fällen, *prlA/secY* (Emr *et al.*, 1981; Ito *et al.*, 1983), *prlD/secA* (Fikes & Bassford, 1989; Oliver & Beckwith, 1981) und *prlG/secE* (Stader *et al.*, 1989; Riggs *et al.*, 1988) beide Ansätze zu Mutationen innerhalb des gleichen Strukturgens führten. Hieraus wurde geschlossen, dass diese Genprodukte direkt am Protein-Exportprozeß beteiligt sind. Desweiteren wurden über den erst genannten Ansatz drei weitere Komponenten des Protein-Exportapparates, SecD, SecF (Gardel *et al.*, 1987 & 1990) und SecB (Kumamoto & Beckwith, 1983) gefunden. Biochemische Ansätze führten zur Isolierung des SecG-Proteins (Nishiyama *et al.*, 1993). Auch im *secG*-Gen konnten Signalsequenz-Suppressor-Mutationen (*prlH*) identifiziert werden (Bost & Belin, 1997).

Das im Cytoplasma vorkommende exportspezifische Chaperon SecB besitzt ein Molekulargewicht von 16 kDa und bildet in seiner funktionellen Form ein Homotetramer (Watanabe & Blobel, 1989b).

Das SecA hat ein Molekulargewicht von 102 kDa und kann in der Zelle sowohl als lösliches, membranassoziertes oder auch membraneingelagertes Protein auftreten (Cabelli *et al.*, 1991). Es ist als Homodimer aktiv und besitzt die Fähigkeit ATP zu binden und zu hydrolysieren.

Im Gegensatz zu SecA und SecB sind SecY, SecE, SecG, SecD und SecF membranintegrale Proteine (Abb. 1), die die CM jeweils mehrmals durchspannen. Der heterotrimere SecYEG-Komplex bildet die strukturelle Basis für einen wässrigen Kanal durch die CM. Es konnte gezeigt werden, dass die Innenseite dieses Kanals nicht in Kontakt mit der umgebenen Lipid-Doppelschicht steht (Joly & Wickner, 1993). Kontrovers ist jedoch bisher die Frage, ob die aktive Translokationspore als SecYEG-Monomer (Yahr & Wickner, 2000) oder gar als Tetramer vorliegt (Manting *et al.*, 2000). Nach Manting *et al.* (2000) besteht die aktive Translokase aus zwei SecYEG-Dimeren, also einem Tetramer, die durch die hohe Affinität zu membrangebundenem SecA zusammengebracht werden. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der *E. coli* SecYEG-Dimere ähneln denen, die vom SecY/E von *B. subtilis* (Meyer *et al.*, 1999) und vom eukaryontischen Sec61p-Komplex (Hanaein *et al.*, 1996) erhalten wurden. Der Sec61p-Komplex besteht analog zur bakteriellen "Core"-Translokase aus drei Komponenten: Sec61 α , - β , - γ .

SecD und SecF sowie ein weiteres Protein, YajC, dessen Funktion unbekannt ist (Gardel *et al.*, 1990), bilden ebenfalls einen heterotrimeren Komplex, der unter besonders schonenden Bedingungen mit SecYEG aufgereinigt werden kann (Duong & Wickner, 1997a).

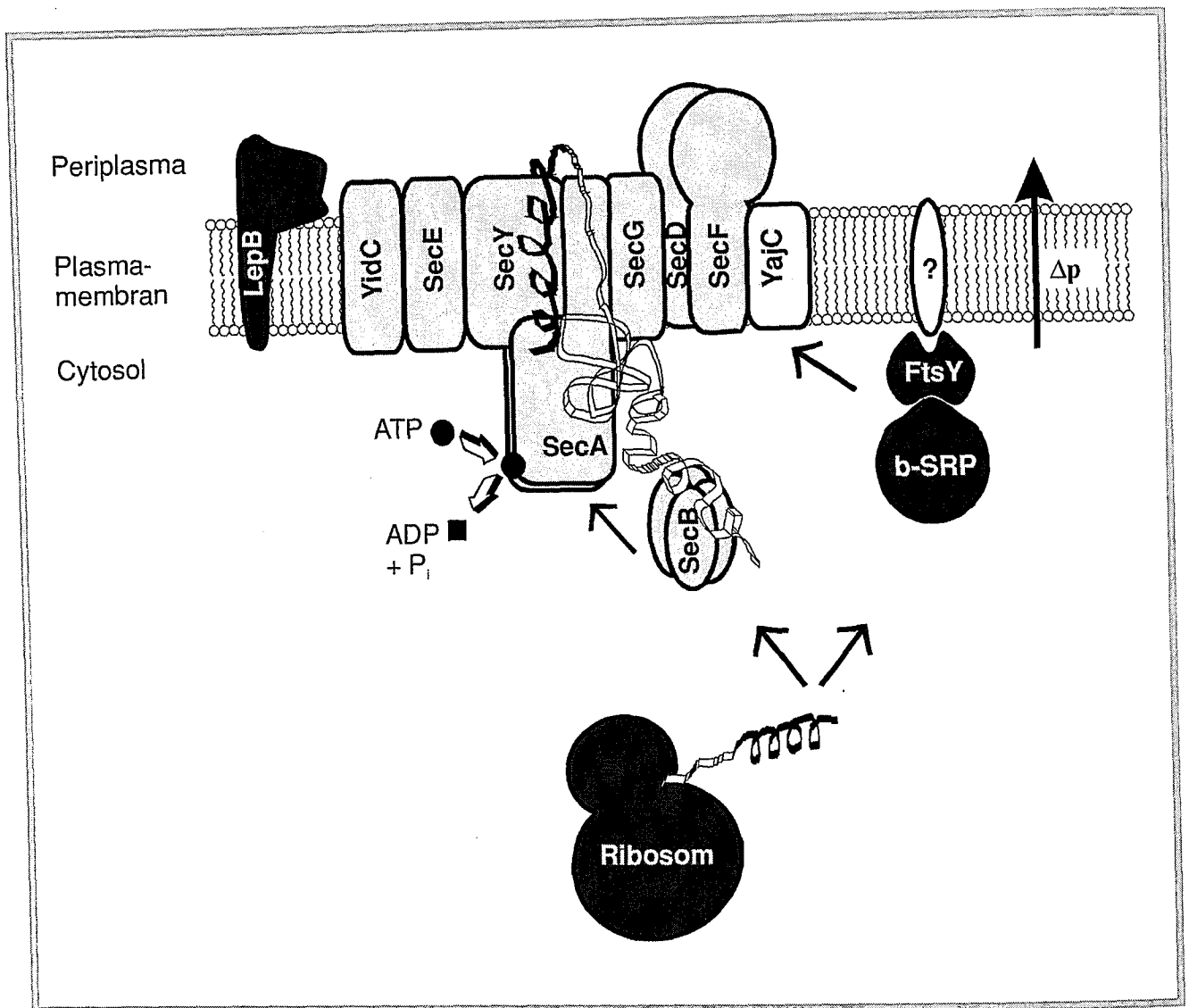


Abb. 1: Schematische Darstellung der Sec-Translokase von *E. coli*. b-SRP: Bakterieller Signalerkennungspartikel; FtsY: Bakterieller SRP-Rezeptor; LepB: Typ I Signalpeptidase; Δp : Elektrochemischer Gradient; Der reife Teil des sekretorischen Proteins ist weiß dargestellt, das Signalpeptid schwarz. ?: Potentieller FtsY-Rezeptor.

1.1.2.1. Die zentralen und akzessorischen Komponenten der *E. coli* Sec-Translokase

SecA, SecY und SecE sind die zentralen Komponenten der *E. coli*-Translokase. Die Rekonstitution von SecYE in Liposomen ermöglichte die SecA- und ATP-abhängige Translokation eines Vorläuferproteins (*in vitro*-Proteintranslokation) (Brundage *et al.*, 1990).

Wenngleich auch der SecYE-A-Komplex eine funktionelle Einheit darstellt, sind an der Protein-Translokation noch weitere Membranproteine beteiligt. Die *in vitro*-Proteintranslokation wird durch SecG (Nishiyama *et al.*, 1993) sowie durch SecD und SecF (Duong & Wickner, 1997a) stimuliert. Ein Antikörper, der gegen die große periplasmatische Domäne des SecD-Proteins gerichtet war, verhinderte die Freisetzung eines translozierten Vorläuferproteins von der *E. coli* CM (Matsuyama *et al.*, 1993). Diese Beobachtung sowie der Befund, dass keine *prl*-Mutationen im SecD und SecF-Protein identifiziert worden sind, lässt vermuten, dass die beiden Proteine an einem späten Schritt

der Translokationsreaktion beteiligt sind. Möglicherweise wird der durch SecYEG gebildete hydrophile Kanal nach Beendigung der Translokation durch SecDFYajC auf der Außenseite der Membran verschlossen, um den unspezifischen Durchfluß wie z. B. Ionen zu verhindern.

Um die Freisetzung des translozierten Vorläuferproteins von der Membran zu ermöglichen, wird das Signalpeptid durch eine membranständige Signalpeptidase (LepB) vom reifen Protein proteolytisch getrennt (Dalbey *et al.*, 1997). Das Abspalten des Signalpeptids ist für die eigentliche Translokation eines Vorläuferproteins allerdings nicht notwendig (Dalbey & Wickner, 1985).

Eine neue Komponente des Protein-Exportapparates ist das YidC-Protein (Scotti *et al.*, 2000; Samuelson *et al.*, 2000). Es ist ein Homologes des Oxa1p, welches in der inneren Membran von Mitochondrien vorkommt und an der Biogenese einiger Proteine der inneren Membran beteiligt ist. Dabei handelt es sich um Proteine, die einen langen N-terminalen Teil in den Intermembranraum exponieren (Hell *et al.*, 1998). YidC wurde mit SecYEG zusammen aufgereinigt und man fand, dass sich seine Menge bei der Überproduktion von SecYEG oder SecDFYajC erhöhte (Scotti *et al.*, 2000). YidC ist für das Überleben der Zelle essentiell (Samuelson *et al.*, 2000). Die Beobachtung, dass YidC mit Transmembransegmenten (TMS) von integralen Membranproteinen chemisch vernetzbar ist sowie die Beobachtung, dass die Insertion von Sec-abhängigen Membranproteinen in Abwesenheit von YidC gestört ist, lassen vermuten, dass YidC als Rezeptor für TMS fungiert, wenn sie den Translokationskanal seitlich in die Membranebene verlassen (Samuelson *et al.*, 2000).

1.1.2.2. Protein-“Targeting“

Zwei unterschiedliche “Targeting“-Wege dirigieren sekretorische und Membran-Proteine zur CM von *E. coli* (Abb. 1). Der sogenannte SecB-Weg benutzt das cytosolische Chaperon SecB, welches post-translational oder zu einem späten co-translationalen Zeitpunkt an die reife Region des sekretorischen Proteins bindet. Auf diese Weise wird das neu synthetisierte Protein in einem nicht gefalteten Zustand gehalten, der für die Translokation eine wichtige Voraussetzung darstellt (Lecker *et al.*, 1989). Die Signalsequenz wird für die SecB-Interaktion nicht benötigt (Watanabe & Blobel, 1989b), so dass die SecB-Bindungsspezifität vermutlich durch die Faltungsgeschwindigkeit eines neu synthetisierten Proteins bestimmt wird (“kinetic partitioning”) (Hardy & Randall, 1991). Dies bedeutet, dass ein schnell faltendes Protein von der Interaktion mit SecB ausgeschlossen ist. Da die Signalsequenz eines neu synthetisierten Vorläufers die Faltung in seine Tertiärstruktur verzögert (Hardy & Randall, 1991), bindet SecB nun diese Proteine. Der SecB-Vorläufer-Komplex gelangt anschließend an die Membran durch die spezifische Bindung des SecB-Proteins an den C-Terminus von SecA (Abb. 3A) (Hartl *et al.*, 1990; Fekkes *et al.*, 1997). Nach dem “Targeting“ wird das SecB-Protein nicht mehr benötigt und wird nach Initiation der Translokation (Kapitel 1.2.) wieder ins Cytosol freigesetzt, um für einen neuen Zyklus zur Verfügung zu stehen.

Ein alternativer "Targeting"-Weg wird in *E. coli* durch das bakterielle Signalerkennungspartikel (b-SRP) vermittelt. Dieser Weg ähnelt dem eukaryontischen Protein-"Targeting" (Luiring & Dobberstein, 1994). Das Ribonukleoprotein b-SRP besteht aus einer 4,5S RNA und dem Ffh-Protein, welche der 7S RNA bzw. der 54 kDa-Untereinheit des eukaryotischen SRP entsprechen (De Gier *et al.*, 1997). Das b-SRP bindet bevorzugt an wachsende Polypeptidketten mit einem besonders hydrophoben "targeting"-Signal. Es wurde gezeigt, dass der SRP-Weg vorwiegend für das "Targeting" und die Biogenese von Membranproteinen benötigt wird (Ulbrandt *et al.*, 1997; Seluanov & Bibi, 1997). Der Komplex aus Ribosom-naszierender Polypeptidkette und b-SRP wird von dem peripheren Membranprotein FtsY erkannt. Das FtsY-Protein ist ein Homologes der α -Untereinheit des eukaryotischen SRP-Rezeptors. FtsY, GTP und die CM werden für die Freisetzung des b-SRP von der naszierenden Polypeptidkette und dem Ribosom benötigt (Valent *et al.*, 1998). Anschließend inseriert die wachsende Polypeptidkette in die SecYEG-Translokase, um co-translational die CM zu überqueren.

1.2. Ein Model zum Mechanismus der Sec-abhängigen Proteintranslokation in *E. coli*

SecA ist ein sehr dynamisches Protein. Es liegt in einer kompakten ADP-gebundenen und mehr ausgedehnten ATP-gebundenen Form vor (den Blaauwen *et al.*, 1996). Während der Translokation inseriert SecA vermutlich mit einer 30 kDa und 65 kDa-Domäne, die dem C- bzw. N-Terminus des Proteins entsprechen (Abb. 3A), in die CM (Economou & Wickner, 1994; Eichler & Wickner, 1997).

Folgendes Modell wurde entwickelt, dass einen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Konformationen des SecA-Proteins und der Translokation des Vorläuferproteins herstellt (Driessen *et al.*, 1998, Manting & Driessen, 2000) (Abb. 2): Assoziiert an den SecYEG-Komplex bindet das SecA-Protein mit hoher Affinität den SecB-Vorläuferprotein-Komplex (in Abb. 2 nicht dargestellt). Das SecA wechselwirkt sowohl mit der Signalsequenz als auch mit dem reifen Teil des Vorläuferproteins. Dies führt zu einer Translokation eines 2 – 2,5 kDa großen Abschnitts des Vorläuferproteins (Abb. 2, Punkt 1). SecA enthält zwei Nukleotid-Bindestellen (NBS-I und NBS-II) (Abb. 3A). NBS-I besitzt eine hohe Affinität für ATP während NBS-II eine niedrigere Affinität für ATP aufweist. Das Vorhandensein von sauren Phospholipiden, SecYEG und Vorläuferprotein stimuliert die sogenannte Translokations-ATPase-Aktivität des SecA-Proteins. Dies bedeutet, dass die Affinität an der NBS-I für ADP sinkt und für ATP erhöht wird, so dass es letztlich zum Nukleotidaustausch kommt. Die durch den Austausch hervorgerufene Konformationsänderung des SecA-Proteins von der ADP-bindenden kompakten Form in die nun ATP-bindende mehr ausgedehnte Konformation bewirkt eine Insertion des SecA-Proteins in die Membranebene am SecYEG-Komplex (**Initiation der Translokation**) und die Translokation des Vorläuferproteins um weitere 2 – 2,5 kDa (Abb. 2, Punkt 2). Die Membran-inserierte Form von SecA wird durch SecD und SecF stabilisiert (Kim *et al.*, 1994; Economou *et al.*, 1995; Duong & Wickner, 1997a, b)

während das SecB-Protein zu diesem Zeitpunkt vom Komplex freigesetzt wird (in Abb. 2 nicht dargestellt). Die Hydrolyse von ATP an NBS-I führt dann wieder zu einer kompakteren Konformation des SecA-Proteins. SecA verliert dadurch die Affinität zum Vorläuferprotein und es kommt zur Deinsertion aus der Membran (Abb. 2, Punkt 3). Es kann nun durch ein anderes cytosolisches SecA-Molekül ersetzt werden, welches erneut an den teil-translozierten Vorläufer bindet und einen neuen Translokationszyklus einleitet (Abb. 2, Punkt 1a). Zusätzlich wird nach der Initiation durch das SecA die Energie des Membranpotentials ($\Delta\mu H^+$) genutzt, um die Translokation des Polypeptids über die Membran weiter voranzutreiben. Wie dies erreicht wird ist nicht vollständig verstanden. Bekannt ist, dass das Membranpotential für eine effiziente Proteintranslokation benötigt wird und zudem die unidirektionale Translokationsrichtung des Polypeptids sichert (Driessen, 1992). Darüber hinaus erleichtert es die Deinsertion des SecA-Proteins aus der Membran (Nishiyama *et al.*, 1999).

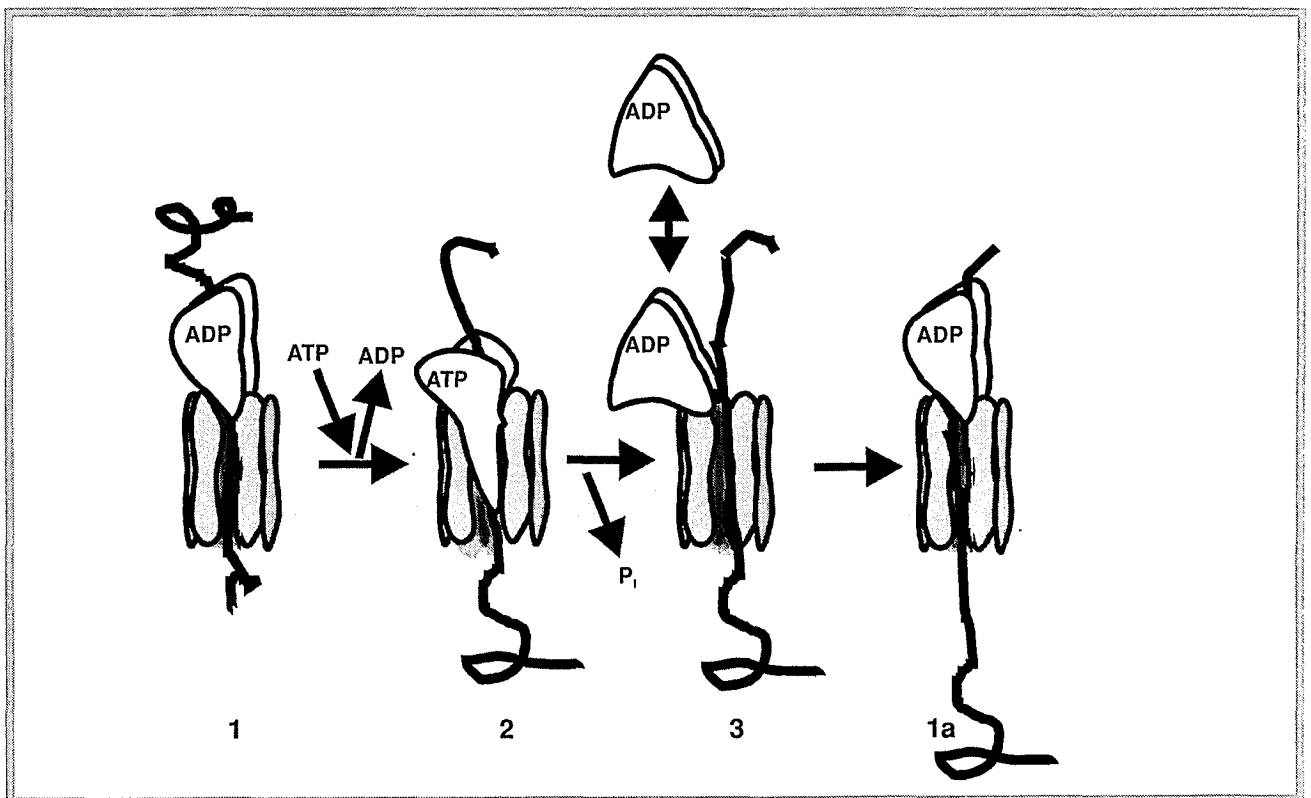


Abb. 2: Schematische Darstellung der Proteintranslokation in *E. coli*. Weiß: SecA; Schwarz: SecYEG-Komplex; Schwarzer Faden: Vorläuferprotein.

1.3. Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den Translokase-Untereinheiten während des Translokationsvorgangs

Das eben vorgestellte Modell der Proteintranslokation setzt eine Vielzahl verschiedener Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten des Exportapparates mit dem

Vorläuferprotein voraus. Wie die einzelnen Komponenten untereinander sowie mit dem Vorläuferprotein mechanistisch wechselwirken, ist jedoch nach wie vor größtenteils unklar. Insgesamt scheint die Proteintranslokation ein sehr dynamischer Vorgang zu sein. So ist die Membraninsertion und -deinsertion des SecA-Proteins mit einer Inversion der Membrantopologie des SecE-Proteins gekoppelt (Nishiyama *et al.*, 1996). Durch das Einführen von Cysteinresten wurden Disulfidbindungen zwischen zwei SecE-Molekülen erhalten (Abb. 3B). Die Cysteinmutagenese-Technik, erlaubt Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Membranproteinen. Dabei werden gezielt Aminosäurenreste im Protein gegen Cystein ausgetauscht. Durch die Kombination verschiedener Cystein-Mutagenese kann, wenn die Reste nahe genug beieinander liegen, eine Disulfidverbrückung, also eine direkte Wechselwirkung nachgewiesen werden. Das genannte vernetzte SecE-Dimer durchlief die Topologie-Inversion und unterstützte trotz der Vernetzung die Translokation eines Vorläuferproteins (Nagamori *et al.*, 2000). Es wird vermutet, dass SecE wie "molekulare Schmiere" die Insertions- und Deinsertionszyklen des SecA-Proteins in die CM erleichtert und so die Effizienz der Proteintranslokation erhöht (Matsumoto *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1998). Das SecE-Protein (12 kDa) durchspannt die Membran zweimal, wobei im nicht aktiven Zustand N- und C-Terminus im Periplasma lokalisiert sind (Abb. 3B). Das cytosolische Segment ist reich an Glycinresten und besitzt eine Nettoladung von +1 (Nishiyama *et al.*, 1996). *In vitro*-Studien haben gezeigt, dass das SecE-Protein zwischen verschiedenen SecYEG-Komplexen ausgetauscht wird (Joly *et al.*, 1994) und es mit SecY (Homma *et al.*, 1997) assoziiert ist. Ein genetischer Hinweis auf SecY-SecE-Wechselwirkungen wurde von Bost & Berlin (1995) erhalten, die Suppressor-Mutationen von secE-Mutanten im secY-Gen identifizierten. Die Beobachtung, dass überproduziertes SecE ein ebenfalls überproduziertes labiles SecA-Derivat stabilisieren konnte, deutet darüber hinaus auf eine SecE-SecA-Wechselwirkung hin (Nishiyama *et al.*, 1995).

Vergleichbar zum SecE wurde auch vom SecA-Protein durch die Cystein-Mutagenese-Technik eine direkte Wechselwirkung mit einem benachbarten SecA-Protein nachgewiesen (Kaufmann *et al.*, 1999) (Abb. 3B). Die Vernetzung der SecA-Proteine blockierte die Proteintranslokation und wurde nur beobachtet, wenn das SecA-Protein in die Membran inseriert war. Die Beobachtung, dass die membraninserierte Form des SecA-Proteins mit einer Umkehr der Membrantopologie des SecE-Proteins und einer Konfigurationsänderung von SecA verbunden ist, läßt vermuten, dass SecE und SecA mit SecA wechselwirken.

"SecA-SecY-Wechselwirkungen:" Das SecA-Dimer dient sowohl als Rezeptor für den SecY-Vorläuferprotein-Komplex als auch als ATP-getriebener molekularer Motor der Translokase (Kapitel 1.2.). Es bindet an den SecYEG-Komplex durch eine direkte Wechselwirkung mit SecY. Diese Interaktion wurde durch *in vivo*-Vernetzungsexperimente demonstriert (Manting *et al.*, 1997) und umfaßt die ersten 107 Reste (entspricht der ersten periplasmatischen Domäne (P1) und der ersten und zweiten cytoplasmatischen Region (C1 und C2)) des 48 kDa großen SecY-Proteins

(Snyders *et al.*, 1997). Weitere Kontaktstellen zwischen SecY und SecA sind vermutlich die C5 bzw. C6-Domäne des SecY-Proteins (Abb. 3B) (Matsumoto *et al.*, 1997; Taura *et al.*, 1997). Mutationen in diesen Domänen führten zu einem kältesensitiven Wachstum. Die Mutation in der C6-Domäne (*secY205*-Mutante, Tyr429Asp) erlaubte keine produktive SecA-Insertion in Anwesenheit von ATP und Vorläuferprotein, jedoch eine Insertion ohne den Vorläufer. Demnach scheint die Mutation in C6 von SecY die Struktur des SecYEG-Komplexes so zu verändern, dass der SecA-Vorläuferprotein-Komplex als Wechselwirkungspartner nicht mehr akzeptiert wird. Unter Ausnutzung des kältesensitiven Wachstums der *secY205*-Mutante wurden Suppressor-Mutationen isoliert, die im *secA*-Gen lokalisiert sind (*secA31*, *secA36*). Diese Daten zeigten, dass SecY eine entscheidende Rolle bei der SecA-Insertion in Gegenwart von Vorläuferprotein und ATP spielt (Matsumoto *et al.*, 1997).

Ein einzelner Aminosäureaustausch im Transmembransegment (TMS) 7 von SecY erhöhte die SecA-Affinität zu SecYEG (Manting *et al.*, 1999). Zusätzlich bewirkte die Mutation eine effizientere Translokation von Vorläuferproteinen sowie eine erhöhte Aktivität der SecA-Translokations-ATPase. Darüber hinaus erlaubte die Mutante im Gegensatz zum Wildtyp SecY den Export eines Vorläuferproteins mit einer defekten Signalsequenz. Dies bedeutete, dass die Mutante ihre Signalsequenz-Selektivität verloren hatte. Eine verbesserte Bindung von SecA an SecY ist auch für die erniedrigte Signalsequenz-Spezifität einer *prlA4*-Mutante verantwortlich (van der Wolk *et al.*, 1998). Das SecY(*PrlA4*)-Protein trägt Mutationen in TMS 7 und TMS 10 und gestattet hierdurch wieder (im Gegensatz zum Wildtyp SecY) den Export von Vorläuferproteinen, die eine defekte Signalsequenz besitzen. Die Mutation im TMS 10 ist für den *Prl*-Phänotyp verantwortlich, während die Mutation im TMS 7 die Stabilität des SecYEG-Komplexes erhöht (Duong & Wickner, 1999). Demnach scheint die verbesserte SecA Bindung an das SecY-Protein der Grund dafür zu sein, dass der die sogenannte "proof-reading"-Aktivität (Überprüfungsmechanismus) der Translokase umgangen und der Export eines Vorläuferproteins mit einer defekten Signalsequenz wieder ermöglicht wird. Vermutlich wird das Zeitfenster für eine produktive SecY-SecA-Vorläuferprotein Wechselwirkung vergrößert und die Wahrscheinlichkeit hierdurch einen funktionellen Initiationskomplex auszubilden, der für eine erfolgreiche Membrantranslokation des Vorläufers essentiell ist, erhöht.

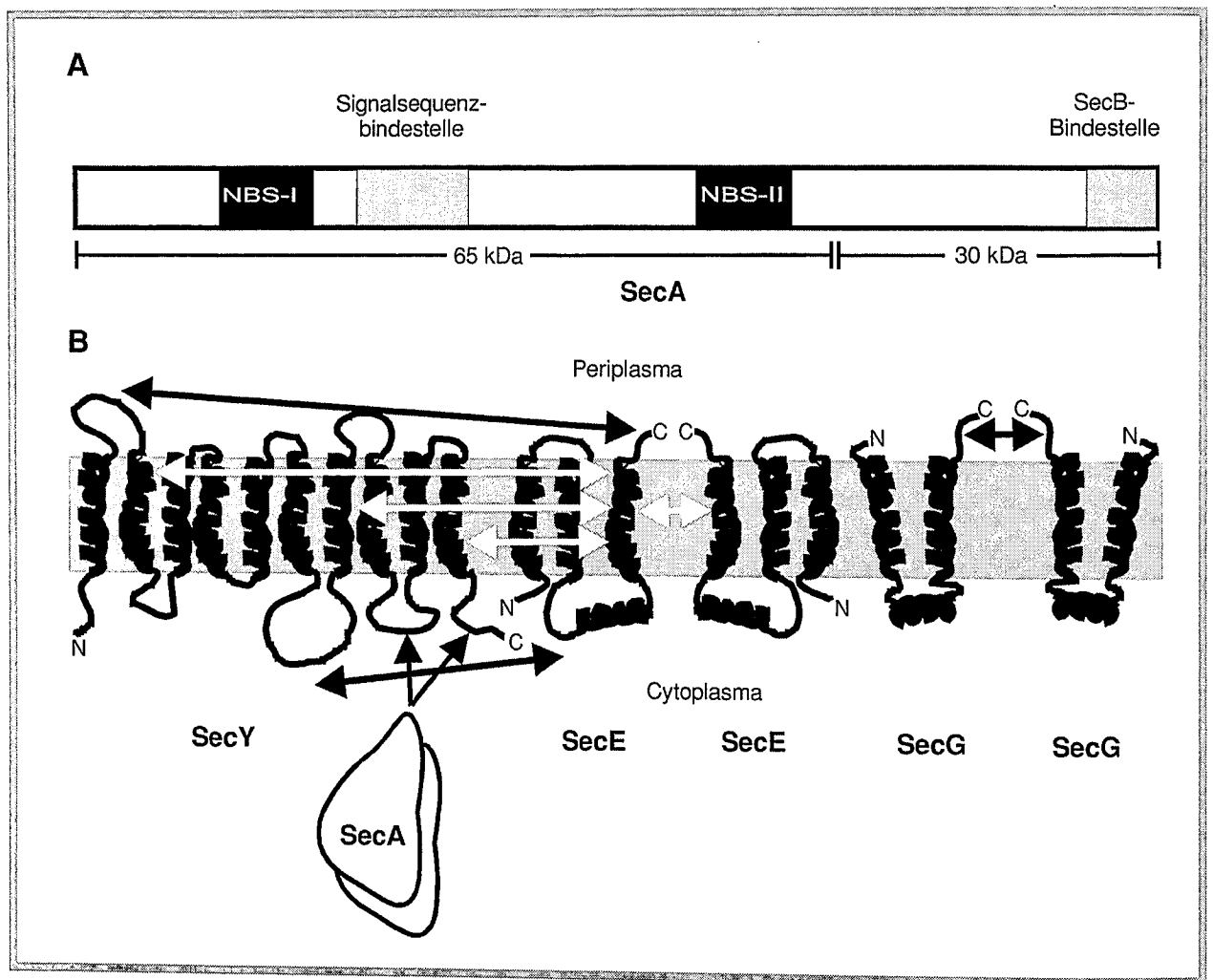


Abb. 3: **A Primärstruktur des SecA-Proteins.** Angezeigt sind die Nukleotidbindestellen (NBS I und NBS II), die Bindestellen der Signalsequenz und des SecB-Proteins sowie das N-terminale 65 kDa- und C-terminale 30 kDa-Fragment. **B Topologie der Translokase-Untereinheiten in der CM.** Identifizierte Kontaktstellen zwischen den Translokase-Untereinheiten sind durch Pfeile markiert. N und C: N- bzw. C-Terminus der Proteine.

Bezüglich der Wechselwirkungen zwischen den Komponenten SecY und SecE ist folgendes bekannt: Das SecY-Protein ist mit seinen 10 TMS die größte Untereinheit des SecYEG-Heterotrimer (Abb. 3B). SecE (14 kDa) besitzt drei TMS, wobei für die Funktion des Proteins nur der dritte Transmembranbereich mit der davor liegenden cytoplasmatischen Domäne essentiell ist (Schatz *et al.*, 1991). SecY wird durch äquimolare Mengen des SecE-Proteins stabilisiert und ein Überschuss von SecY sehr schnell durch die Membran-gebundene Protease FtsH abgebaut (Taura *et al.*, 1993; Kihara *et al.*, 1995). Beide Proteine formen einen stabilen Komplex, der durch Behandlung mit Detergenzien nicht dissoziiert (Brundage *et al.*, 1990; Joly *et al.*, 1994). Durch genetische Analysen wurden mehrere mögliche Kontaktstellen zwischen dem SecY und dem SecE-Protein identifiziert (Abb. 3B). Mutationen in C4 des SecY (Baba *et al.*, 1994) und der hoch konservierten C2-Domäne des SecE-Proteins (Murphy & Beckwith, 1994; Pohlschröder *et al.*, 1996) störten eine stabile SecY-SecE-Wechselwirkung. Die synthetische Lethalität, die beim Kombinieren bestimmter *prlA* (*secY*) und *prlG* (*secE*)-Allele auftritt (Flowers *et al.*, 1994), ließ eine

Wechselwirkung zwischen dem TMS 3 des SecE-Proteins mit den TMS 7 und 10 des SecY-Proteins und zwischen P1 von SecY und P2 von SecE vermuten. Der letztere Kontakt wurde direkt mit Hilfe der Cystein-Mutagenese-Technik durch eine *in vivo*-Vernetzung gezeigt (Harris & Silhavy, 1999). Mit Hilfe der gleichen Technik konnte das TMS 3 des SecE-Proteins mit dem TMS 2 des SecY-Proteins spezifisch vernetzt werden (Kaufmann *et al.*, 1999).

Obwohl Signalsequenz-Suppressor (*prf*)-Mutationen in allen Untereinheiten des SecYEG-A-Komplexes identifiziert worden sind, konnte eine direkte Wechselwirkung mit einem translozierenden Vorläuferprotein nur für das SecA und das SecY-Protein gezeigt werden (Joly & Wickner, 1993). Die Tatsache, dass bislang keine Vernetzung von Translokations-Intermediaten mit Phospholipiden beobachtet wurde, läßt vermuten, dass sich der Vorläufer während seiner Passage über die CM in einem von den Sec-Komponenten gebildeten Wasser-gefüllten Kanal, der von den Phospholipiden abgeschirmt ist, befindet.

1.4. Gram-positive Bakterien als Wirtsorganismen für die Gewinnung heterologer Proteine

Gram-positive Bakterien der Gattung *Bacillus* werden schon seit Jahrzehnten für die kommerzielle Gewinnung technischer Enzyme eingesetzt (Ferrari *et al.*, 1993). Diese Enzyme (vorwiegend Protasen, Amylasen und Lipasen) werden von diesen Bakterien in großen Mengen in die Umgebung ausgeschieden und stammen zum Großteil aus dem zelleigenen Protein-Repertoire (homologe Proteine). Mit Hilfe von *Bacillus subtilis* werden im industriellen Maßstab die Enzyme α -Amylase, alkalische Protease und β -Glucanase hergestellt, deren Ausbeuten im g/l-Bereich liegen (Harwood, 1992). Die hohe Sekretionsleistung, gute Zugänglichkeit für molekulargenetische Methoden (Harwood, 1992) sowie das Vorliegen der Genomsequenz (Kunst *et al.*, 1997) machen den Gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis* zu einem potentiell guten Wirtsorganismus für die sekretorische Gewinnung von technischen und pharmazeutisch interessanten Proteinen und Peptiden. Gegenüber der sekretorischen Expression von Proteinen in *E. coli* weist *B. subtilis* im Hinblick auf die Produkt-Aufarbeitung zahlreiche Vorteile auf: Aufgrund des Fehlens einer äußeren Membran werden die Proteine nach der Translokation löslich und potentiell korrekt gefaltet ins umgebende Medium freigesetzt. Der Zellaufschluß und eine aufwendige Renaturierung rekombinanter Proteine aus cytosolischen "Inclusion-Bodies" ist nicht erforderlich und somit ist die Aufarbeitung des Produktes erheblich vereinfacht. Zudem besitzt *B. subtilis* keine Lipopolysaccharide (LPS), die Bestandteil der Außenmembran in *E. coli* sind. Eine Kontamination des Produktes mit LPS ist insbesondere für pharmazeutische Proteine und Peptide problematisch, da LPS als Endotoxin unter anderem Fieber auslösen kann.

Versuche, die Sekretionskapazität von *B. subtilis* für die Produktion heterologer Proteine auszunutzen, verliefen jedoch oft enttäuschend. Limitierend waren hier zum einen die von *B.*

subtilis ins Kulturmedium sekretierten Proteasen, die das sekretierte Produkt sofort wieder abbauten (Simonen & Palva, 1993). Beim Export heterologer Proteine kann es weiterhin vorkommen, dass die Wechselwirkung der Vorläufer mit der Translokase der Wirtszelle nicht optimal funktionieren und somit das Vorläuferprotein als Substrat nicht akzeptiert wird. Dies kann zu einem eingeschränkten Export oder gar wie im Falle einiger eukaryontischer Proteine zum Ausschluß vom Export führen (Simonen & Palva, 1993). Zur Umgehung der identifizierten Engpässe ist es notwendig, ein detailliertes Bild vom Ablauf der Proteintranslokation bei Gram-positiven Bakterien zu erhalten. Da das erste Hindernis, wie erwähnt, die Überwindung der CM ist, macht es folglich Sinn, genauer zu untersuchen, welche Wechselwirkungen zwischen Vorläuferprotein und der Translokase dafür verantwortlich sind, dass eine erfolgreiche Membrantranslokation stattfinden kann.

Staphylococcus carnosus ist ebenfalls ein interessanter Wirtsorganismus für die sekretorische Gewinnung von heterologen Proteinen und Peptiden. Er ist ein Gram-positiver Mikroorganismus, der schon seit langem als Startkultur für die Herstellung von Fisch- und Fleischprodukten eingesetzt wird (Liepe, 1982). Im Gegensatz zu *B. subtilis* sekretiert *S. carnosus* wenig Proteasen in den Kulturüberstand (Meens *et al.*, 1997), was die Stabilität insbesondere Protease-labiler Proteine und Peptide gewährleistet. Beispielsweise konnte die Ausbeute eines heterologen Modellproteins (Lipase-Calcitonin-Fusionsprotein) unter optimierten Fermentationsbedingungen auf über 2 g/l gesteigert werden (Dilsen *et al.*, 2000). Zudem ist *S. carnosus*, wie *B. subtilis*, von der amerikanischen Gesundheitsbehörde als GRAS-("general regarded as safe") Organismus eingestuft worden.

Bis auf das exportspezifische Chaperone SecB wurden in *B. subtilis* und *S. carnosus* Homologe aller Komponenten der *E. coli* Sec-Translokase identifiziert (Suh *et al.*, 1990; Overhoff *et al.*, 1991; Tschander *et al.*, 1992; Joeng *et al.*, 1993; Meens *et al.*, 1994; Klein *et al.*, 1995; Bolhuis *et al.*, 1998; van Wely *et al.*, 1999). Dies läßt vermuten, dass die Proteintranslokation in Gram-positiven Bakterien nach einem ähnlichen Mechanismus verläuft wie in *E. coli*.

1.5. Eine *B. subtilis* / *S. carnosus*-Hybridtranslokase als Einstieg für die *in vivo*-Untersuchungen von Protein-Protein-Wechselwirkungen bei der Proteintranslokation in *B. subtilis*

Die häufige gemachte Beobachtung, dass heterologe Proteine von *Bacillus*-Arten ineffizient oder überhaupt nicht sekretiert werden (Simonen & Palva, 1993), liegt vermutlich in nicht optimalen Wechselwirkungen zwischen dem Vorläuferprotein und den Translokase-Untereinheiten der Wirtszelle. Dies bedeutet, dass für einen effizienten Protein-Export die offensichtlich komplexen Wechselwirkungen funktionell aufeinander abgestimmt sein müssen. Welche Wechselwirkungen dies sind, ist praktisch unbekannt.

Das SecA-Protein als zentrale Exportkomponente steht in Kontakt mit dem Signalpeptid und dem reifen Teil des Vorläuferproteins sowie mit einigen oder sogar allen membranintegralen Untereinheiten der Sec-Translokase. Diese Oberflächenkontakte sind im Verlauf der Evolution in jedem Organismus optimal aufeinander abgestimmt worden und ermöglichen eine effiziente Membrantranslokation des Vorläuferproteins. Im Falle einer Wechselwirkung zwischen dem *E. coli* SecA-Protein und der *B. subtilis*-Translokase trifft dies natürlich nicht zu. So konnte der Wachstumsdefekt einer kältesensitiven *B. subtilis* *secA*-Mutante durch das SecA-Protein von *E. coli* nicht komplementiert werden (Klein *et al.*, 1995). Da die SecA-Proteine von *E. coli* und *B. subtilis* eine vergleichbare Domänenstruktur, Ladungsverteilung und Hydrophobizitätskurve besitzen, zeigt dieses Ergebnis, dass sich vermutlich die Oberflächenstrukturen beider SecA-Proteine zumindestens geringfügig unterscheiden. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde eine *secA*-Austauschmutante von *B. subtilis* konstruiert, in der das *B. subtilis* *secA*-Gen auf dem Chromosom gegen das *secA*-Gen von *S. carnosus* ausgetauscht ist (replacement mutant *secA*, RMA). Die Analyse der RMA von *B. subtilis* zeigte ein vergleichbares Wachstum zum *B. subtilis* Wildtyp bei 37 °C. Da ein funktioneller Protein-Export in *B. subtilis* für das Wachstum essentiell ist, kann demnach das heterologe SecA mit den restlichen Exportkomponenten und den Vorläuferproteinen von *B. subtilis* im Prinzip produktiv wechselwirken. Im Gegensatz dazu wurde ein Wachstumsdefekt der RMA bei 25 °C festgestellt. Dies zeigte, dass sehr wahrscheinlich bereits bei 37 °C bestehende Störungen der Wechselwirkungen zwischen dem *S. carnosus* SecA (SecA(Sc)) und den restlichen Transportkomponenten von *B. subtilis* bei niedrigeren Temperaturen verstärkt werden und bei 25 °C wachstumslimitierend sind. Welche Wechselwirkungen gestört sind, ist unbekannt.

Weiterhin zeigten Exportstudien, dass die *B. subtilis* / *S. carnosus*-Hybridtranslokase bestimmte Vorläuferproteine als Substrat akzeptiert, andere hingegen nicht. So fand in der RMA die Membrantranslokation der *S. hyicus* Präpro-Lipase, die ein typisches Exportprotein Gram-positiver Bakterien ist, bei 37 °C problemlos statt, während das Außenmembranprotein A aus *E. coli* (OmpA) sehr ineffizient transloziert wurde (Klein & Freudl, in Vorbereitung). Darüber hinaus war bereits bei 37 °C die Sporenbildung sowie die Kompetenzentwicklung der RMA defekt. Man weiß, dass für die Initiation dieser post-exponentiellen Phänomene in *B. subtilis* membranständige- und extrazelluläre Proteine benötigt werden. Diese Kenntnis sowie der Befund, dass die *B. subtilis* / *S. carnosus*-Hybridtranslokase zwischen unterschiedlichen Vorläuferproteinen selektioniert, führte zu der Annahme, dass die Defekte der Sporenbildung und Kompetenzentwicklung der RMA aus dem Unvermögen der Hybridtranslokase resultiert, ein oder mehrere Proteine korrekt zu lokalisieren, welche für diese Prozesse wichtig sind.

Die Beobachtung, dass in der RMA offensichtlich nur ganz bestimmte Proteine vom Export ausgeschlossen sind, deutet darauf hin, dass spezifische Eigenschaften des Vorläuferproteins einen erheblichen Einfluß darauf haben, ob es in der RMA-Situation exportiert wird oder nicht.

Desweiteren wies die effiziente OmpA-Membrantranslokation im *S. carnosus*-Wildtyp darauf hin (Meens *et al.*, 1993 & 1997), dass die Wechselwirkungen zwischen dem OmpA-Vorläufer (PräOmpA) und der Translokase von *S. carnosus* Wildtyp produktiv sind, d. h. eine Membrantranslokation von OmpA erlauben. Hieraus kann man weiterhin schließen, dass nicht das *S. carnosus* SecA-Protein *per se* für den Protein-Exportdefekt in der RMA verantwortlich ist. Stattdessen kann man folgern, dass es sich in der RMA um eine Störung einer komplexen Wechselwirkung handeln muß, bei der mindestens drei Komponenten beteiligt sind: (a) SecA(Sc), (b) PräOmpA und (c) mindestens eine unbekannte Komponente des Exportapparates von *B. subtilis* (SecX(Bs)). Gelingt es die gestörte SecA(Sc)-SecX(Bs)-Wechselwirkung zu optimieren, indem SecX(Bs) durch SecX(Sc) ersetzt wird, kann man daraus folgern, dass SecA(Sc), SecX(Sc) miteinander sowie mit dem Vorläuferprotein wechselwirken (und dies auch in einem *B. subtilis* bzw. *S. carnosus* Wildtypstamm) und dass diese Tri- oder sogar mutimeren Wechselwirkungen für einen effizienten Export notwendig sind.

1.6. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Dissertation sollten primär die störenden Wechselwirkungen in der RMA-Hybridtranslokase durch das gezielte Einbringen weiterer *S. carnosus* Translokase-Untereinheiten in die RMA identifiziert werden. Dieser Ansatz beruht, wie oben erwähnt, auf dem Prinzip, durch Einbringen weiterer Sec-Komponenten aus *S. carnosus* die gestörte SecA(Sc)-SecX(Bs)-Wechselwirkung in der RMA durch eine optimale SecA(Sc)-SecX(Sc)-Wechselwirkung zu ersetzen.

Die Arbeit teilte sich in zwei Themenkomplexe:

1. Um die störende SecA(Sc)-SecX(Bs)-Wechselwirkung in der RMA durch eine optimale SecA(Sc)-SecX(Sc)-Wechselwirkungen zu ersetzen, war es notwendig alle in Frage kommenden *S. carnosus* Translokase-Untereinheiten zur Verfügung zu haben. Da bis auf das *S. carnosus* SecG alle übrigen Sec-Komponenten bereits bekannt waren, sollte im ersten Teil der Dissertation zunächst das bislang noch fehlende *secG*-Gen von *S. carnosus* kloniert und das zugehörige Protein funktionell charakterisiert werden. Aus einer Phagenbank sollte mit Hilfe einer heterologen Gensonde das *secG*-Gen isoliert und anschließend sequenziert werden. Durch Komplementationsexperimente einer konditionalen *E. coli* *secG*-Mutante mit dem *S. carnosus* *secG*-Gen sollte ein Hinweis auf die Funktion erhalten werden. Weiterhin sollte der Einfluß des SecG-Proteins auf den Protein-Export in *S. carnosus* untersucht werden. Zu diesem Zweck sollte eine *secG*-Deletionsmutante von *S. carnosus* konstruiert und der Protein-Export der Mutante sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht werden. Darüber hinaus sollte eine SecG-

Austauschmutante von *B. subtilis* (RMG) konstruiert werden, in der nur das *secG* von *B. subtilis* auf dem Chromosom gegen das entsprechende Gen von *S. carnosus* ausgetauscht ist. Die RMG sollte Aufschluß darüber geben, ob das *S. carnosus* SecG-Protein den Wachstums- und Exportdefekt einer *secG*-Deletionsmutante von *B. subtilis* kompensieren kann.

2. Im zweiten Teil der Arbeit sollten die störende SecA(Sc)-SecX(Bs)-Wechselwirkung in der RMA durch eine optimale SecA(Sc)-SecX(Sc)-Wechselwirkung ersetzt werden. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die SecA(Sc)-SecG(Bs)- bzw. SecA(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkungen in der RMA gestört sind, sollten das SecG(Bs) durch SecG(Sc) bzw. das SecY(Bs) durch SecY(Sc) ersetzt werden. Wachstumsexperimente, Protein-Exportstudien sowie die Untersuchung der Sporenbildung und Kompetenzentwicklung der resultierenden Mutanten sollten klären, ob durch die optimalen SecA(Sc)-SecG(Sc) bzw. SecA(Sc)-SecY(Sc)-Kombinationen die beschriebenen Defekte der RMA verschwinden.

Weil bereits ein einzelner *sec*-Austausch in *B. subtilis*, wie die RMA zeigte, zu einem Protein-Exportdefekt führen kann, dessen Auswirkungen (kältesensitives Wachstumsverhalten, Defekte in den post-exponentiellen Phänomenen) einen experimentellen Ansatz bieten, um *in vivo*-Wechselwirkungen in der Translokase im Detail untersuchen zu können, sollte eine SecE-Austauschmutante von *B. subtilis* (RME), in der das *B. subtilis* *secE*-Gen durch das entsprechende Gen von *S. carnosus* ersetzt ist, konstruiert werden. Die RME sollte in Hinblick auf das Wachstum, den Protein-Export sowie die post-exponentiellen Phänomene charakterisiert werden. Ein eventuell durch den *secE*-Austausch resultierender Phänotyp kann dann analog zur RMA genutzt werden, um die Wechselwirkungen zwischen den Exportkomponenten und dem SecE-Protein zu charakterisieren.

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme, Phagen, Plasmide und Oligonukleotide

Die mit "*" gekennzeichneten Stämme und Plasmide wurden in dieser Arbeit konstruiert.

Tab. 1: Bakterienstämme

Art	Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Staphylococcus carnosus</i> (Sc)	TM300	Wildtyp	Schleifer u. Fischer (1982)
	TM300 Δ secG	Δ secG::erm	*
<i>Bacillus subtilis</i> (Bs)	DB104	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3</i>	Kawamura u. Doi (1984)
	MKL1	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3, cm</i>	M. Klein, pers. Mitteilung
	RMA	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3, cm, ΔsecA::secASc</i>	M. Klein, pers. Mitteilung
	DB Δ secG	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3 ΔsecG::cm</i>	Van Wely <i>et al.</i> , 1999
	RME	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3, ΔsecE::secESc</i>	*
	RMG	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3, ΔsecG::secGSc</i>	*
	RMA/G	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3, cm, ΔsecA::secASc, ΔsecG::secGSc</i>	*
	DB104::pLKA2 (pSCY3)	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3, ΔsecY::kan</i>	R. Breitling, pers. Mitteilung
	RMA/Y	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3, ΔsecY::kan, cm, ΔsecA::secASc</i>	*
<i>Escherichia coli</i> (Ec)	DH5 α	F λ supE44 Δ (argF-lac)U169 Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
	EC1000	RepA ⁺ MC1000, <i>kan</i>	Leenhouts <i>et al.</i> , 1996
	KN370	(C600 <i>recD1009, ΔsecG::kan</i>	Nishiyama <i>et al.</i> , 1994
	Y1090	F', Δ (<i>lacU169</i>), <i>proA</i> ⁺ , Δ (<i>lon</i>), <i>araD139</i> , <i>strA</i> , <i>supF</i> , [<i>trpC22:Tn(tet^r)</i>], (pMC9), <i>hsdR</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺)	Promega
Phage	Lambda gt11		Promega

Tab. 2: Plasmide

Plasmid	Resistenz	klonierte Gene	Referenz
pDel6	Amp ^R , Cm ^R	Austauschplasmid, trägt den stromaufwärts liegenden Bereich des <i>B. subtilis</i> <i>secA</i> -Gens (<i>orf189</i>), eine Cm ^R -Kassette, das <i>S. carnosus</i> <i>secA</i> -Gen und den stromabwärts liegenden Bereich des <i>B. subtilis</i> <i>secA</i> -Gens (<i>prfB</i>)	Klein, M. & Freudl, R. in Vorbereitung
pDG646	Erm ^R	Erythromycin-Resistenzgen	Guerout-Fleury <i>et al.</i> , 1995
pHSG576	Cm ^R	-	Takeshita <i>et al.</i> (1987)
pHSG6,3EcoRI	Cm ^R	Trägt das aus der λ gt11-EcoRI Genbank von <i>S. carnosus</i> isolierte 6,3 kB große EcoRI-Fragment	*
pHSG850HindIII	Cm ^R	Trägt das aus der λ gt11-EcoRI Genbank von <i>S. carnosus</i> isolierte 850 Bp große HindIII-Fragment)	*
pHSG Δ HindIII::erm	Cm ^R , Erm ^R	pHSG850HindIII-Derivat, trägt Erm ^R -Kassette an der Stelle des deletierten (<i>Clal/SphI</i> -Verdau) <i>S. carnosus</i> <i>secG</i> -Bereiches	*
pLipPS1kan	Kan ^R	pLipPS1-Derivat, trägt statt Cm ^R -Kassette eine Kan ^R -Kassette; Lipase aus <i>S. hyicus</i>)	J. Meens, persönliche Mitteilung
pORI240	Amp ^R , Tet ^R	Shuttle-Plasmid für <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	Leenhouts <i>et al.</i> , 1996
pORIsecG	Amp ^R , Tet ^R	pORI240-Derivat (Austauschplasmid), trägt den 5'-Bereich des <i>B. subtilis</i> <i>secG</i> (<i>yvaM</i>), das <i>S. carnosus</i> <i>secG</i> und den 3'-Bereich des <i>B. subtilis</i> <i>secG</i> -Gens (<i>yvaK</i>)	*
pORIsecE	Amp ^R , Tet ^R	pORI240-Derivat (Austauschplasmid), trägt den 5'-Bereich des <i>B. subtilis</i> <i>secE</i> (<i>rpmG</i>), das <i>S. carnosus</i> <i>secE</i> und den 3'-Bereich des <i>B. subtilis</i> <i>secE</i> -Gens (<i>nusG</i>)	*
pUC18	Amp ^R	-	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pSecGEc	Amp ^R	pUC-Derivat, trägt das <i>E. coli</i> <i>secG</i> -Gen, RBS <i>E. coli</i>	*
pSecGSc	Amp ^R	pUC-Derivat, trägt das <i>S. carnosus</i> <i>secG</i> -Gen, RBS <i>S. carnosus</i>	*
pSCY3	Phleo ^R	<i>secY</i> -Gen von <i>S. carnosus</i>	R. Breitling, persönliche Mitteilung
pSX63kan	Kan ^R	Amylase aus <i>B. licheniformis</i>	M. Klein, persönliche Mitteilung

pWH1520	Amp ^R , Tet ^R	Shuttle-Plasmid für <i>E. coli</i> und Rygus & Hillen, 1991 <i>B. subtilis</i>	
pWHYSc	Amp ^R , Tet ^R	pWH1520-Derivat, trägt das <i>S. carnosus</i> <i>secY</i> -Gen	*

Amp^R: Ampicillin, Cm^R: Chloramphenicol, Erm^R: Erythromycin, Kan^R: Kanamycin, Tet^R: Tetrazyklin,
Phleo^R: Phleomycin

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→ 3')	Verwendung
BsnusGBgIII	CTTAGATCTTTCTGCTTCCCCCGGAAGAAGC	Konstruktion von pORlsecE
BsnusGEcoRI	CCGGAATTCTGATCAGCAATACGTGCTATAA	""
BsrpmGBamHI	CGCGGATCCGACCTCCACAATTTAAACGCC	""
BsrpmGXbal	TGCTCTAGAGAGGAAATGATCATTAATCAGG	""
BssecG1	CGCTCTAGAGTAATGTAGCCAGTGAGTCTGG	Herstellung der <i>yvaL</i> -Sonde
BssecG2	TGCGGATCCCCTATAGGATATAAGCAAGCGC	""
BssecE1	ATGCGTATTATGAAATTCTTT	Nachweis des <i>B. subtilis</i> <i>secE</i> -Gens
BssecE2	TAATTCAACTATTAAACGAATT	""
EcsecG1	CCGGAATTCACCTCCGCAAGGAACAGGTTG	Konstruktion von pSecGEc
EcsecG2	GATGTCGACAGGTCGACTCTAGAGGATCC	""
MAT19	GAAATCGGCTCAGGAAAAGGCC	Nachweis des <i>ery</i> -Gens
MAT20	CAAACGTAATATTGTTTAAATCG	""
RMsecGScBamHI	CGCGGATCCATGCACACTTTATTGACAGT	Konstruktion von pORlsecG
RMsecGScEcoRI	GGCGAATTCTTACATATTGAAATAAGTAA	""
RMyvaKBgIII	CCTAGATCTAGAACGCCTTGATACATGAC	""
RMyvaKEcoRI	CCGGAATTCGGCAATGTTTGTATAAGGTC	""
RMllyvaMBamHI	CGCGGATCCCACCTCCAGACTCACTGGCTACATTAC T	""
RMllyvaMXbal	TGCTCTAGAAGGCGCCGGACAGAATAAGGTGTGACA C	""
ScSecE1	CGCGGATCCATGGCTGAAGATAAGAAAAAGC	Konstruktion von pORlsecE und Nachweis des <i>S. carnosus</i> <i>secE</i> -Gens
ScsecE2	GGCGAATTCTTAACTAATTAATTCTATTCAATT	""
ScsecG1	CCGGAATTCAGTATATTATGAATGGAGG	Konstruktion von pSecGSc
ScsecG2	GTGAAGCTTGCCCGACTTTTACATTGTGC	""

2.2. Medien und Lösungen

LB (Luria Broth-) Medium (Miller, 1972):
pro l:
10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl

PH-Medium (Liebl, 1986):
pro l:
10 g Pepton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
1 g Glukose
1 g K_2HPO_4
pH 7,2

SPI-Medium zur Transformation von *B.subtilis* (Hardy, 1985)

4 x SP-Medium: pro l:
56 g K_2HPO_4
24 g KH_2PO_4
8 g $(NH_4)_2SO_4$
4 g Na_3 -Citrat x $2H_2O$
4 g Hefeextrakt
0,8 g $MgSO_4 \times 7H_2O$
0,8 g Casamino Acids
pH 7,2
(15 min autoklaviert)

SPI-Medium: pro l:
250 ml 4 x SP-Medium
12,5 ml Histidin (4 mg/ml)
50 ml Tryptophan (1 mg/ml)
2,5 ml 1M $MgCl_2$
500 μ l 1M $CaCl_2$

Je nach Bedarf wurden weitere Aminosäuren (50 μ g/ml), Vitamine und andere Wachstumsfaktoren (50 μ g/ml) sowie eine geeignete Kohlenstoffquelle zugesetzt. Das fertige Medium wurde sterilfiltriert.

Sporulationsmedium (Schaeffer *et al.*, 1965):

pro l: 10g Trypton
5g Hefeextrakt
5g NaCl
pH 7,0

getrennt autoklaviert und steril zugesetzt:
10 ml 100 mM $Ca(NO_3)_2$
1 ml 10 mM $MnCl_2$
1 ml $FeSO_4$

Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli* (variiert nach D. Hanahan, 1985)

RF1: pro l:
 12 g RbCl
 9,9 g MnCl₂
 1,5 g CaCl₂ x 2 H₂O
 2,9 g Kaliumacetat
 121 ml Glycerin (87%)
 pH 5,8 mit 0,2 N Essigsäure eingestellt
 (sterilfiltriert)

RF2: pro l:
 2,1 g MOPS
 1,2 g RbCl
 11 g CaCl₂ x 2 H₂O
 121 ml Glycerin (87%)
 pH 6,8 mit 1M Natronlauge eingestellt
 (sterilfiltriert)

Medien für die Protoplastentransformation von *Staphylococcus carnosus*

2 x SMM-Lösung:

1 M Saccharose
 40 mM Maleinsäure
 40 mM MgCl₂

Mit NaOH auf pH 6,5 eingestellt und 15 min autoklaviert.

4 x PAB-Lösung

7% (w/v) Difco Antibiotic No. 3, 15 min autoklaviert

5% BSA-Lösung

5% (w/v) Rinderserumalbumin, steril filtriert

SMMP-Medium

25 ml 2 x SMM
 6,25 ml 4 x PAB
 1,56 ml 5% BSA

DM3-Medium

Folgende Lösungen wurden einzeln angesetzt und autoklaviert:

1. 1 M Na-Succinat: 135 g in 500 ml H₂O, pH 7,3 mit Bernsteinsäure eingestellt
2. 10 g Agar in 200 ml H₂O
3. 5 g Casamino Acids und 5 g Hefeextrakt in 150 ml H₂O
4. 3,5 g K₂HPO₄ und 1,5 g KH₂PO₄ in 100 ml H₂O

Nach dem Autoklavieren wurden die Lösungen steril gemischt und steril versetzt mit:

20 ml 1 M MgCl₂
 10 ml 50% (w/v) Glukose
 10 ml 5% (w/v) BSA

40% PEG/SMM-Lösung:

40 g PEG 6000 gelöst in 50 ml 2 x SMM, mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt, 15 min autoklaviert.

CY3-Softagar

CY-Agar: (pro l)

25 g Hefeextrakt
 25 g Casamino Acids
 14,75 g NaCl
 8 g Agar

Bei Gebrauch werden gemischt: (pro l)
 25 ml CY-Agar (50°C)
 25 ml 1 M Na-Succinat, pH 7,3
 2 ml 1,5 M Natriumglycerophosphat
 1 ml 1 M MgCl_2
 0,5 ml 5% (w/v) BSA
 0,5 ml 50% (w/v) Glukose

S7-Medium zur radioaktiven Markierung von *B.subtilis*
 (modifiziert nach van Dijl *et al.* 1991)

100 x Metallmix: pro 100 ml:
 20 ml 1M MgCl_2
 7 ml 1M CaCl_2
 5 ml 10 mM FeCl_3
 1 ml 10 mM ZnCl_2
 5 ml 100 mM MnCl_2

20 x Aminosäuremix: Sämtliche Aminosäuren außer Methionin und Tryptophan wurden zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml eingewogen und in 0,1 N HCl bei 60°C in Lösung gebracht.

S7 Minimalmedium: pro l:
 20 ml 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0
 10 ml 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 1 ml 100 x Metallmix
 1 ml Thiamin (50 mg/ml)
 20 ml 1M Natriumglutamat pH 7,0
 50 ml 20 x Aminosäuremix
 4 ml Riboflavin (100 µg/ml)
 2,8 ml Uridin (10 mg/ml)
 50 ml Tryptophan (1 mg/ml)
 25 ml Methionin (1 mg/ml)
 0,05% Hefeextrakt

Je nach Bedarf wurde geeignete Kohlenstoffquelle zugesetzt. Das fertige Medium wurde sterilfiltriert.

Minimalmedium zur radioaktiven Markierung von *S. carnosus* (MMSc)

10 x Aminosäurenmix (AS 1): T, S, A, P, V, L, I, F, N, Q, K, R, H, G je 1,2% in H_2O

20 x Aminosäurenmix (AS 2): D, E, Y je 1% in 0,5M NaOH

100 x Aminosäure (AS3): W 1% in 0,2M HCl

4 x Salzlösung: pro l:
 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 2 g Na-Citrat x $2\text{H}_2\text{O}$
 8 g KH_2PO_4
 8 g Na_2HPO_4

0,4 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
 0,04 g $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

500 x Vitaminlösung: pro 100 ml:
 500 mg Nicotinsäure
 25 mg Thiamin/HCl

MMSc: pro 100 ml:
 10 ml AS 1 (10 x)
 5 ml AS 2 (20 x)
 1 ml AS 3 (100 x)
 25 ml Salzlösung (4 x)
 0,2 ml Vitaminlösung (500 x)
 0,2 ml Riboflavin (100 µg/ml)
 0,28 ml Uridine (10 mg/ml)
 2,5 ml Hefeextrakt (2%)
 1,148 ml Glycerin (87%)
 5 ml Cystein (25 mg/ml)
 1 ml *B. subtilis* Metallmix (100 x)

In eine 5 ml Übernachtskultur wurden 5 µl Met (25 mg/ml) zugesetzt. Das fertige Medium wurde sterilfiltriert.

2.3. Verwendete Reagenzien und Bezugsquellen

Biochemikalien incl. Puffer:	- Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim .
Analysenreine Chemikalien:	- Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
	- Merck AG, Darmstadt
	- Serva GmbH & Co. KG, Heidelberg
	- Bethesda Research Laboratories, Bethesda, USA
	- Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
-	
radioaktive Nukleotide:	- Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig
radioaktives ^{35}S -L-Methionin	- NEN DuPont (Deutschland), Bad Homburg
Fertigmedien/Medienkomponenten:	- Difco Laboratories, Detroit, USA.
Nitrocellulose-/Nylonmembranen:	- Schleicher und Schüll, Dassel

2.4. Mikrobiologische Methoden

2.4.1. Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung aller verwendeten Stämme erfolgte, wenn nicht gesondert aufgeführt, in LB-Vollmedium. Die für die Selektion auf Antibiotikaresistenz verwendeten Konzentration lagen für Ampicillin bei 100 µg/ml, für Tetracyclin bei 10 µg/ml, für Kanamycin bei 10 µg/ml (*E. coli*) bzw. 15 µg/ml (*B. subtilis*) und für Chloramphenicol bei 30 µg/ml (*E. coli*) bzw. 15 µg/ml (*B. subtilis* und *S. carnosus*). Die Inkubation in Flüssigmedium wurde bei einem Volumen bis zu 5 ml in einem Reagenzglasschüttler bei 180 upm, bei einem Volumen über 10 ml auf einem Schüttler in Erlenmeyerkolben bei 140 upm durchgeführt.

2.4.2. Stammhaltung

Die langfristige Stammhaltung erfolgte in Form von Glycerinflüssigkulturen. ÜNK wurden auf 20% (*E. coli*, *B. subtilis* und *S. carnosus*) Glycerin eingestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 bzw. -70°C gelagert.

2.4.3. Transformation von Bakterien

2.4.3.1. Transformation von *E.coli* Stämmen (D. Hanahan, 1985)

Der jeweilige Stamm wurde unter geeigneten Bedingungen in 50 ml LB-Vollmedium bis zu einer OD von 0,15 herangezogen. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und 15 min bei 4°C und 3500 upm in einer Minifuge (Heraeus) sedimentiert. Das Pellet wurde zunächst mit 17 ml eiskaltem RF1-Puffer gewaschen und anschließend in 4ml eiskaltem RF2-Puffer resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden in 200µl-Aliquots in vorgekühlte 1,5ml Röhrchen (Eppendorf) pipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, je Aliquot mit 10-100ng Plasmid-DNA (oder max. 20µl Ligationsansatz) versetzt und für weitere 30min auf Eis gehalten. Es folgte eine 90sec andauernde Hitzeschockbehandlung bei 42°C. Zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz wurde der Ansatz nach Zugabe von 800µl LB-Medium (+ 0,5% Glukose) für 45min bei 37 °C geschüttelt. Aliquots (50 - 100µl) wurden auf Selektionsagarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert.

2.4.3.2. Transformation von *B.subtilis* Stämmen (variiert nach Sadaie & Kada, 1983)

5 ml SPI-Medium in einem Reagenzröhrchen wurden mit einer frischen Kolonie des zu transformierenden Stammes beimpft und bei 200 upm und bei 37 °C inkubiert. Am Ende der logarithmischen Phase wurde 1 ml Kultur mit 100-500 ng Plasmid-DNA (oder max. 20 µl Ligationsansatz) versetzt und für weitere 60 min mit 100 upm geschüttelt. Anschließend wurden 3 ml LB-Vollmedium sowie 0,5% Glucose zugegeben und die Kultur zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz für weitere 60 min bei 180 upm inkubiert. Aliquots (50-100 µl) wurden auf Selektionsagarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert.

2.4.3.3. *B. subtilis* Sporulationstest

Sämtliche verwendete Gefäße wurden vor Gebrauch mit Aqua bidest autoklaviert.

2 ml einer *B. subtilis* Übernachtskultur wurden in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen 10 min mit 13.000 upm bei 4 °C abzentrifugiert, mit 2 ml Sporulationsmedium gewaschen und anschließend in 1 ml Sporulationsmedium 1:100 mit der gewaschenen *B. subtilis* Kultur beimpft und bei 37 °C mindestens 24 h geschüttelt. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl der Kultur wurden geeignete Verdünnungen (10^{-4} bis 10^{-6}) in einem Gesamtvolumen von 1 ml hergestellt, 100µl auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung der Sporenzahl in der Kultur wurden 100 µl der Zellsuspension im 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 100 µl Chloroform versetzt (Eppendorf-Gefäße mit Parafilm sichern) und im Wasserbad bei 80 °C 30 min inkubiert. Dabei wurden die vegetativen Zellen abgetötet. Anschließend wurden 10 µl der oberen wässrigen Phase, welche die Sporen enthält, in mehreren geeigneten Verdünnungen auf Agarplatten ausplattiert. Für gut sporulierende Stämme (Wildtyp) wurden Verdünnungen von 10^{-4} bis 10^{-6} hergestellt. Für schlecht sporulierende Stämme (RMA und RME) wurden Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-4} in einem Gesamtvolumen von 1 ml hergestellt, 100 µl auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4.3.4. Transformation von *S. carnosus*-Protoplasten (Götz & Schumacher, 1987)

Zur Transformation von *S. carnosus* wurden protoplastierte Zellen verwendet, die folgendermaßen hergestellt wurden: 2 l PH-Medium wurden mit 10 ml einer ÜNK von *S. carnosus* angeimpft und bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min 8000 upm JA20, Beckmann), in 150 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung gewaschen und in 180 ml SMMP aufgenommen. Je 30 ml dieser Zellsuspension wurden in sterilen 100 ml-Kolben mit 30 µl Lysostaphin (0,5 mg/ml) versetzt und 16 - 18 h bei 30°C stehen gelassen. Die so hergestellten Protoplasten wurden abzentrifugiert (30 min, 4000 upm, 20°C, Hereus Minifuge), in SMMP gewaschen und in 9 ml SMMP aufgenommen. Aliquots von je 300 µl wurden schockgefroren und konnten so für 8 bis 10 Monate bei -70°C aufbewahrt werden.

Die Transformation erfolgte durch Mischen der zu transformierenden DNA (1 - 2 µg) mit 300 µl Protoplasten-Suspension und anschließender Zugabe von 2 ml 40%-iger PEG/SMM-Lösung. Nach 2 min wurden 7 ml SMMP zugegeben und der Ansatz 30 min bei 3000 upm abzentrifugiert (Hereus Minifuge, RT). Die Protoplasten wurden in 1 ml SMMP aufgenommen, auf DM3-Platten ausplattiert und 3 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde mit 3 ml CY-Softagar, der das gewünschte Antibiotikum in 10-facher Konzentration enthielt, überschichtet und 2 - 4 Tage bei 37°C inkubiert.

2.5. Gentechnische Methoden

2.5.1. Präparation chromosomaler DNA

2.5.1.1 Präparation chromosomaler DNA aus *S. carnosus* TM300

500 ml PH-Medium im Erlemeyerkolben (ohne Schikane) wurden mit 3 ml ÜNK beimpft und bei 37°C bis zu einer OD von ~0,6 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (15 min 6000 upm bei 4°C, Beckmann JA10), einmal mit 200 ml Puffer (50 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA pH 7,8) gewaschen und in 100 ml Puffer resuspendiert. Zum Aufschluß wurde Lysostaphin (20 µg/ml) und Lysozym (500 µg/ml) zugesetzt. Nach 2h bei 37°C erfolgte die Zugabe von autolyseierter Pronase (1 mg/ml) sowie 10 ml 10% SDS, und die Inkubation wurde für weitere 2 h fortgesetzt. Das Lysat wurde einmal mit einem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) und zweimal mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Der Überstand wurde mit 0,25 Volumen 2 M LiCl₂-Lösung versetzt, mit 2 Volumen Ethanol (-20°C) überschichtet und die ausfallende DNA mit einem Glasstab der Lösung entnommen. Die DNA wurde mit 70% Ethanol (-20°C) gewaschen, die überschüssige Flüssigkeit im Vakuum entfernt (nicht vollkommen getrocknet) und der Niederschlag wurde vorsichtig in 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,8; 1 mM EDTA) bei 4°C gelöst. Die Konzentration der DNA und deren Reinheit wurde über die Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt.

2.5.1.2. Präparation chromosomaler DNA aus *E.coli* (Kaiser & Murray, 1979)

Die Zellen von 100 ml ÜNK in LB-Medium wurden geerntet (Heraeus, 4°C, 5000 upm, 15 min), mit 100 ml TES-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA/Na₂, 50 mM NaCl) gewaschen und zum Aufschluß in 3 ml 25% Saccharose, 50 mM Tris/HCl pH 8, 3 mg/ml Lysozym resuspendiert. Nach 30 min bei 37°C erfolgte die Lyse der Zellen durch Zusatz von 800 µl 250 mM EDTA/Na₂ pH 8 und 15 min Inkubation auf Eis sowie nachfolgender Zugabe von 2 ml Lysis-Mix (2% Triton X-100, 60 mM EDTA/Na₂, 50 mM Tris/HCl pH 8). Der Abbau von Proteinen erfolgte mit Pronase (100 µg/ml) bei 37°C für 3h. Phenolextraktion, Fällung und weitere Aufarbeitung erfolgte wie in 2.5.1.1. beschrieben.

2.5.1.3. Präparation chromosomaler DNA aus *B. subtilis*

Die Isolierung der chromsomalen DNA aus *B. subtilis* fand mit Hilfe des DNAeasy Kits statt und erfolgte wie in der Produktinformation angegeben (Qiagen).

2.5.2. Präparation von Plasmid-DNA

verwendete Lösungen und Puffer:

Lösung A:

100 µg/ml RNaseA
50 mM Glukose
25 mM Tris/HCl pH 8
10 mM EDTA/Na₂

Lösung B (stets frisch angesetzt): 0,2N NaOH
1% SDS

Lösung C: 3 M Kaliumcetat pH 4,8

2.5.2.1. Fällung von Plasmid-DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Fällung von DNA erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in 70% Ethanol, 300 mM Kaliumacetat pH 4,8 bei -20°C für 60min. Anschließend wurde die Lösung 15 min zentrifugiert (Eppendorf, 14000 upm, 4°C), der Niederschlag mit 1ml 70% Ethanol (-20°C) überschichtet, noch einmal zentrifugiert (Eppendorf, 14000 upm, 4°C) und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die DNA wurde in TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

2.5.2.2. Minilysat aus *E. coli* (Birnboim & Doly, 1979)

Die Zellen aus 2 ml ÜNK wurden für 5 min bei 13000 upm (Eppendorf, 4°C) abzentrifugiert, in 200 µl eiskalter Lösung A resuspendiert und durch Zugabe von 400 µl Lösung B 2 min bei RT lysiert. Durch Zugabe von 300 µl eiskalter Lösung C wurden chromosomale DNA und Proteine gefällt und anschließend das Lysat 10 min (Eppendorf, 14000 upm, 4°C) zentrifugiert. Vom plasmidhaltigen Überstand wurden 500 µl abgenommen und die DNA mit 1 ml Ethanol gefällt, mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde die DNA je nach Kopienzahl des isolierten Plasmids in 20-100 µl Wasser gelöst.

2.5.2.3. Minilysat aus *B. subtilis* ("protoplast alkaline lysis" Voskuil & Chambliss, 1993)

Die Zellen aus 2 ml ÜNK wurden für 5 min bei 13000 upm (Eppendorf, 4°C) abzentrifugiert, in 200 µl SET-Puffer (100 µg/ml RNaseA, 25% Saccharose, 50 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert und in Anwesenheit von 5 mg/ml Lysozym 30 min bei 37°C protoplastiert. Zur Zellyse wurden 350 µl Puffer B zugesetzt. Durch Zugabe von 350 µl eiskalter Lösung C wurden chromosomale DNA und Proteine gefällt und anschließend das Lysat 10 min (Eppendorf, 14000 upm, 4°C) zentrifugiert. Vom plasmidhaltigen Überstand wurden 750 µl abgenommen, mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) gründlich gemischt und zur Phasentrennung 10 min zentrifugiert (Eppendorf, RT). Von der leichteren wässrigen Phase wurden 620 µl in ein neues Gefäß überführt, gründlich mit 620 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) vermischt und 5 min zentrifugiert (Eppendorf, RT). 550 µl der wässrigen Phase wurden mit dem gleichen Volumen eiskaltem Isopropanol gefällt, die DNA mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und in 20 µl H₂O gelöst.

2.5.2.4. Plasmid-Isolierung im präoperativen Maßstab

Zur Isolierung größerer Mengen (50-500 µg) hochreiner Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde das Nucleobond-Kit (Macherey und Nagel) gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt. *Bacillus subtilis*- und *Staphylococcus carnosus*-Zellen wurden vor Verwendung des Kits mit TSE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 mM EDTA) bzw. 150 mM EDTA gewaschen und anschließend nach Resuspension in Puffer S1 (Macherey und Nagel) 30 min enzymatisch mit 5 mg/ml Lysozym bzw. 12,5 µg/ml Lysostaphin aufgeschlossen.

2.5.3. Allgemeine gentechnische Methoden (Sambrook *et al.*, 1989)

2.5.3.1. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe im elektrischen Feld wurden für Fragmente bis 1,5 kB Gele von 1,5-2% Agarose, bis 7 kB Gele von 1-1,5% Agarose und für Fragmente über 7 kB Gele von 0,6-1% Agarose angefertigt. Hierzu wurde die Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen (55-60°C) auf Gelträger gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10 x Probenpuffer versetzt und die Elektrophorese in TAE-Puffer durchgeführt. Zum Anfärben der DNA wurde eine 1% Ethidiumbromidlösung verwendet.

10 x TAE-Puffer:

pro l:
48,4 g Tris
11,42 ml Essigsäure (96%)
7,44 g EDTA/Na₂

10 x Probenpuffer:

0,05% Bromphenolblau
0,05% Xylencyanol
50% Glycerin

2.5.3.2. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die DNA wurde in den vom Enzymhersteller mitgelieferten Puffern unter den angegebenen Bedingungen verdaut.

2.5.3.3. Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Zur Verhinderung von Religierungen der linearisierten Vektoren wurden vor der Ligation die 5'-Phosphatreste mit alkalischer Phosphatase entfernt. Hierzu wurden nach erfolgtem Verdau in den Restriktionsansatz 2 Einheiten "Shrimp alkaline phosphatase" (SAP; USB) gegeben und 1 h lang bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wurde anschließend durch eine 15-minütige Inkubation bei 70°C inaktivieren.

2.5.3.4. Umwandlung von überhängenden 5'-Enden in glatte Enden

Zum Auffüllen von überhängenden 5'-Enden wurde die Klenow-DNA Polymerase (Boehringer Mannheim) benutzt. Die DNA wurde hierzu im Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 7 mM

MgCl₂, 20 µM dNTPs) aufgenommen und mit 1,0 Einheiten Klenow-Enzym pro µg DNA 15 min bei 25°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Hitze inaktiviert (15 min 70°C).

2.5.3.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Im Ligationsansatz wurde ein molares Verhältnis von Fragment zu Vektor von 3:1 eingestellt. Für die Ligation kohäsiver Enden enthielt der Ansatz 1/10 Volumen 10 x Ligationspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,6, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 6 mM ATP), glatte Enden wurden unter Verwendung eines 5 x Puffers (150 mM Tris/HCl pH 7,6; 50 mM MgCl₂; 5 mM ATP; 50 mM DTT; 200 mg/ml PEG 8000; 50 µg/ml RSA) ligiert. Die Ligation erfolgte in beiden Fällen ü.N. bei 16°C mit 1,0 Einheiten T4-DNA-Ligase in einem Volumen von 10 µl.

2.5.3.6. Isolierung von DNA aus Agarosegelen und Entsalzung von DNA-Lösungen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen sowie das Entsalzen von DNA-Lösungen (z.B. nach PCR oder Restriktionsverdau) mit Hilfe des Quiaex II-Kits erfolgte wie in der Produktinformation angegeben (Qiagen), allerdings mit folgenden Abweichungen: Im Anschluß an den finalen Waschschritt wurde die an die Glasmilch gebundene DNA für 2 min im Vakuum getrocknet. Die Elution der DNA von der Glasmilch erfolgte stets in Wasser bei 55°C.

2.5.3.7. Herstellung und Aufreinigung synthetischer Oligonukleotide

Die zur Durchführung der Polymerasekettenreaktion und zur Sequenzierung benötigten Oligonukleotide (Primer) wurden bei der Firma MWG (Ebersberg) bestellt

2.5.3.8. Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988)

Die Reaktion erfolgte im DNA-Thermal-Cycler (Cetus/Perkin-Elmer). Der Reaktionsansatz (100 µl oder 50 µl) enthielt 1/10 Volumen 10 x PCR-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,3, 15 mM MgCl₂, 500mM KCl, 1mg/ml Gelatine; vom Enzymhersteller mitgeliefert), 1/50 Volumen Nukleotid-Mix (dATP, dGTP, dTTP, dCTP je 0,2 mM), je 0,4 µM der beiden Oligonukleotide, 2,5 Einheiten der Taq-DNA-Polymerase und von der zu amplifizierenden DNA 5-10 ng bei Plasmiden bzw. 300 ng bei chromosomaler DNA. Durch die Zugabe des Enzyms wurde die Reaktion gestartet und der Ansatz zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten mit Mineralöl (Sigma) überschichtet. Bei der Synthese wurden 35 Zyklen durchlaufen, die jeweils mit der Denaturierung der Ziel-DNA bei 94°C für 4 min begannen, worauf das Anlagern der Primer bei 50-55°C für 1 min erfolgte. Die Synthese der DNA wurde bei 72°C je nach Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments (1000 Bp etwa 1 min Synthesezeit) zwischen 1 – 2 min durchgeführt. Nach Beendigung der Amplifikation wurde das Öl abgenommen und die DNA mit Hilfe des Quiaex II-Kits (s. 2.5.3.6.) aufgereinigt. Um die hohe Fehlerrate der Taq-Polymerase zu umgehen, wurde in bestimmten Fällen das "High Fidelity-PCR-System" verwendet. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim) vorgegangen.

2.5.3.9. DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger, 1977)

Bei dieser Methode wird der Abbruch der DNA-Polymerasereaktion beim Einbau von Didesoxynukleotiden genutzt. Hierzu wurde die Ziel-DNA denaturiert, ein Oligonukleotid zum Start der Polymerasereaktion an die DNA gebunden und der neu synthetisierte Strang mit α-³⁵S-ATP markiert. Die Synthese der DNA erfolgte in vier Ansätzen, die außer den vier Desoxynukleotiden (dNTPs) zusätzlich ein Didesoxynukleotid (ddNTP) enthielten. Der statistische Einbau des ddNTP

führt zum Syntheseabbruch und durch Bestimmung der Kettenlänge kann die Position des Nukleotids bestimmt werden.

Denaturierung der DNA und Anlagerung des Primers

Zur Sequenzierung wurde doppelsträngige, zirkuläre Plasmid-DNA benutzt. 1,5-2 µg Ziel-DNA (max. Volumen 8 µl) wurden mit 40 µl Denaturierungslösung (200 mM NaOH, 200 mM EDTA/Na₂) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die denaturierte DNA wurde nach Zugabe von 4 µl Neutralisierungslösung (2 M Ammoniumacetat pH 4,8) und 100 µl Ethanol (100%, -20°C) bei -70°C 10 min gefällt. Danach wurde der Ansatz zentrifugiert (Eppendorf, 13000 upm, 10 min, 0°C) und der Niederschlag mit 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde dann in der vorgewärmten Vakuumzentrifuge max. 2 min getrocknet.

Zu der getrockneten DNA wurden 2,5 ng Primer (17mer) und 2 µl 5 x Reaktionspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl) gegeben, auf 10 µl mit H₂O aufgefüllt und 30 min bei 37°C inkubiert.

Sequenzreaktion: Markierung und Termination

Dem Primer-DNA-Gemisch wurde 1 µl 0,1 M DTT, 2 µl verdünnter Labeling-Mix (s.u.) und 0,5 µl α-³⁵S-ATP (10 µM, 10 µCi/µl) zugesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl Sequenase (Version 2.0, 1:8 verdünnt) gestartet und für 2-5 min bei RT fortgesetzt. Der Labeling-Mix enthielt in konzentrierter Form je 7,5 µM der Nukleotide dGTP, dTTP und dCTP und wurde bis 1:15 verdünnt (s. Herstellerhinweise). Die Sequenase (T7-DNA-Polymerase) wurde im Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 5mM DTT, 0,5 mg/ml RSA) verdünnt. Zur Termination der Reaktion wurde 2,5 µl des A-, G-, T- oder C-Terminations-Mixes (s.u.) in vier Reaktionsgefäße gegeben und 1 min bei 37°C vorgewärmt. Je 3,5 µl des Markierungsansatzes wurden zu jedem Terminations-Mix hinzugegeben, gemischt und 3-5 min bei 37°C inkubiert. Die Terminations-Mixe enthielten 50 mM NaCl, 80 µM jedes Desoxy-nukleotides und 8 µM des angegebenen Didesoxynukleotides. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl Stop-Puffer (95% Formamid, 20 mM EDTA/Na₂, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol FF) beendet. Vor dem Auftragen von 3 µl Probe auf das Sequenzgel wurde der Ansatz für 1 min bei 95°C erhitzt und anschließend im Eisbad abgekühlt. Bis auf die Denaturierungs- und Neutralisierungslösung sowie die radioaktiven Nukleotide waren alle Reagenzien im Sequenase-Kit Version 2.0 von USB, Cleveland, enthalten.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Apparatur zur Durchführung der Elektrophorese wurde von Gibco/BRL GmbH, Eggenstein, geliefert. Vor dem Probenauftrag wurde das Gel im Vorlauf bei 1500 V für ca. 1 h auf 50°C vortemperiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde über 1,5-3 h in 1xTBE durchgeführt. Der Harnstoff wurde durch zehnmütiges Inkubieren in 10% Essigsäure entfernt und das Gel anschließend 5 min unter fließendem Wasser gespült. Danach wurde das Gel bei 80°C getrocknet (1,5-2 h) und die Autoradiografie bei -70°C ü.N. durchgeführt (X-Ray, Fuji).

Zusammensetzung des Sequenzgels:

pro 60 ml:
 25,2 g Harnstoff,
 6 ml 10 x TBE-Puffer
 27,2 ml H₂O
 0,3 ml 10% APS
 9 ml Acrylamid:Bisacrylamid (19:1)
 60 µl TEMED

10 x TBE-Puffer: pro l:
 108 g Tris
 55 g Borsäure
 40 ml 0,5 M EDTA pH 8

2.5.3.10. DNA-DNA-Hybridisierung nach Southern

Die Hybridisierung wurde entsprechend einer Vorschrift, die in der Produktbeschreibung des Chemilumineszenz-Substrates CSPD (Boehringer Mannheim) enthalten war, durchgeführt. Den Anweisungen liegt die Methode von Southern *et al.* (1975) zugrunde.

Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde durch PCR

Das zu markierende DNA-Fragment wurde nach Möglichkeit ohne flankierende Fremdsequenzen, die zu falsch positiven Hybridisierungssignalen führen können, mit geeigneten Restriktionsenzymen aus einem Vektor herausgeschnitten. Um eine Verunreinigung durch die Vektor-DNA zu vermeiden, wurde die verdaut DNA durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das gewünschte Fragment mit Hilfe des Quiaex II-Systems (s. 2.5.3.6.) isoliert und gereinigt. Die anschließende Markierungs-PCR wurde im Prinzip wie oben beschrieben durchgeführt, allerdings mit einem Unterschied: Zusätzlich zu den bereits vorhandenen dNTPs (je 200 μ M) wurde 200 μ M alkalistabiles Digoxigenin-gekoppeltes dUTP (Boehringer Mannheim) zugesetzt, das von der Taq-Polymerase als Substrat erkannt und statistisch an Stelle von dTTP in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird. Der Erfolg der Markierung wurde anhand des langsameren Laufverhaltens des markierten PCR-Fragments im Vergleich zum nicht markierten Fragment in der Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Transfer der DNA auf Nylonmembranen

Die mit Restriktionsenzymen verdaut DNA wurde in einem 1,0%-igen Agarosegel aufgetrennt und mit einer Vakuum-Blot-Apparatur (LKB 2016 VacuGene, Pharmacia/LKB) auf Nylonmembranen übertragen. Dabei wurde das Gel jeweils 30min mit Depurinisierungslösung (0,25 N HCl), Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und Neutralisierungslösung (1 M Tris/HCl, 2 M NaCl; pH 5) überschichtet. Die Übertragung der DNA auf die Membran erfolgte für 1 h mit 20 x SSC (17,5% NaCl, 8,82% Na-Citrat, pH 7). Die DNA wurde zur Fixierung auf der Membran mit UV-Licht von 300 nm für 3 min bestrahlt.

Hybridisierung der Ziel-DNA mit der Dig-markierten Sonde

Das Abdecken unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Prähybridisierung der Membranen für 3 h bei 42°C in Prähybridisierungslösung (5 x SSC, 20-30% Formamid, 0,1% N-Lauryl-sarkosinat, 0,02% SDS, 1% Blocking Reagenz [Boehringer Mannheim]). Zur Hybridisierung wurden die Membranen in Hybridisierungslösung (5 x SSC, 20-50% Formamid, 0,1% N-Laurylsarkosinat, 0,02% SDS, 1% Blocking Reagenz, 5ng-10ng DNA-Sonde pro ml) ü.N. bei 42°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Sonde wurde vor der Zugabe in die Hybridisierungslösung 10 min bei 95°C denaturiert und in Eiswasser abgekühlt. Um ungebundene Sonde zu entfernen, wurden die Membranen zweimal 5 min bei RT in 2 x SSC, 0,1% SDS und zweimal 15 min bei 42°C mit 0,1 x SSC, 0,1% SDS gewaschen.

Nachweis der Sonde durch ein Chemilumineszenz-Verfahren

Die Membranen wurden für 5 min in Waschpuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl pH 7,5; 0,3% Tween 20) äquilibriert und 30 min in Blockierungspuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl pH 7,5; 1% Blocking Reagenz) unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und durch Blockierungspuffer, der Anti-Digoxigenin-Antikörper gekoppelt an alkalische Phosphatase (1:10000, Boehringer) enthielt, ersetzt und die Membranen 90 min unter vorsichtigem Schwenken bei RT inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimal 15-minütiges Waschen mit Waschpuffer bei RT entfernt. Nach 2 min Äquilibration in Detektionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$) wurden die Membranen mit Substratlösung (das Substrat CSPD [Boehringer Mannheim] 1:100 in Detektionspuffer verdünnt) beschichtet, in Folie eingeschweißt und 30 min bei 37°C vorinkubiert. Die von den Hybridisierungssignalen ausgehende Chemilumineszenz wurde mit Hilfe eines Röntgenfilms (Fuji) detektiert.

2.5.3.11. Phagenhybridisierung (Promega, Technical Bulletin)

Top-Agar: 0,5 g Bacto Tryptone
 0,5 g NaCl
 0,6 g Agarose
 ad 100ml H₂O, 20 min autoklaviert,
 abkühlen auf 45 °C, Zugabe von: 1 ml 1M MgSO₄
 700 µl (50 mg/ml) X-Gal
 700 µl (20 mg/ml) IPTG

100 µl einer frischen *E. coli* Y1090 Kultur (LB, 10mM MgSO₄, 0,2% Maltose) wurden mit dem gleichen Volumen einer verdünnten λgt11-*Eco*RI-Bank von *S. carnosus* (Phagenpuffer: 20 mM Tris 7,4; 100 mM NaCl; 10 mM MgSO₄) gemischt, so dass 1000 Plaques/Platte erhalten wurden. Die Zellen wurden für 20 min bei 37 °C inkubiert. Zu den infizierten Zellen wurden anschließend 3,5 ml vortemperierter (45 °C) Top-Agar gegeben, kurz gevortext und der Ansatz auf vorgewärmte LB-Agarplatten gleichmäßig verteilt. Nachdem der Agar fest geworden war, wurden die Platten so lange bei 37 °C inkubiert, bis die Plaques deutlich erkennbar waren (ca. 9 – 14h). Eine positiv geladene Nylon-Membran (Hybond-N⁺; Amersham Buchler) wurde für 1 min auf die Plaques gelegt und zur späteren Orientierung an drei Stellen markiert. Nach dem Transfer des Plaquematerials wurde die Membran für 7 min mit der Plaquesseite nach oben auf ein mit Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) getränktes Filterpapier (Whatmann 3MM) gelegt, zum Trocknen auf ein Papiertuch (Cleenex) transferiert (dieser Schritt wurde nach jeder Inkubation wiederholt) und dann 2 x 3 min auf einem mit Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris/HCl pH 7,5) gesättigten Filterpapier neutralisiert. Die Plaques wurden anschließend vorsichtig durch eine Waschlösung (0,2 M Tris 7,5; 2 x SSC) gezogen. Die Fixierung der einzelsträngigen DNA wurde durch UV-Strahlung (3 min) erreicht. Vorhybridisierung, Hybridisierung sowie die Detektion der Hybridisierungssignale wurden wie oben für den Southern Blot (2.5.3.10.) beschrieben durchgeführt.

2.5.3.12. Genaustausch in *B. subtilis* mit pORI240-System (Leenhouts *et al.*, 1996)

Mit Hilfe der pORI-Vektoren wird ein Genaustausch ermöglicht ohne dass ein Antibiotikamarker im rekombinanten Stamm verbleibt. Das Plasmid pORI240 trägt eine Tetrazyklin-Resistenzkassette sowie das *lacZ*-Gen, welches für die β-Galaktosidase kodiert und eine Blau-Weiß-Selektion auf X-Gal enthaltenen Agarplatten (100 µg/ml) ermöglicht. Für den Genaustausch wurde die Zelle mit dem entsprechenden pORI240-Derivat transformiert. Tetrazyklin-resistente Transformanten wurden isoliert, die nur aufgrund eines homologen Rekombinationseignisses ins *B. subtilis* Chromosom erhalten werden können. Darüber hinaus werden diese Stämme auf X-Gal Agarplatten blau. 5 ml LB-Flüssigmedium ohne Tetrazyklin wurden mit 1 – 10 Zellen/ml beimpft und die Zellen für mindestens 30 Generationen kultiviert. Auf diese Weise sollte das integrierte Plasmid wieder aus dem Chromosom rekombinieren. Hierbei kann die Rekombination entweder über den gleichen homologen DNA-Bereich erfolgen wie bei der ersten Integration, man hätte dann wieder die Ausgangssituation, oder aber über den zweiten homologen Abschnitt, was den gewünschten Genaustausch zur Folge hätte. Die Selektion des Genaustausches erfolgte auf X-Gal-Agarplatten. Nach 12 – 48 h wurden weiße und Tetrazyklin-sensitive Kolonien für weitere Analysen isoliert.

2.6. Proteinchemische Methoden

2.6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Lämmli *et al.*, 1970)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte elektrophoretisch in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen. Die Konzentration an Acrylamid im Trenngel betrug zwischen 10 und 15%. Das Trenngel wurde mit einem 5%-igen Sammelgel überschichtet.

4 x "Lower Tris": pro 200 ml:
36,34 g Tris-Base
8 ml 10% SDS
pH 8,8

4 x "Upper Tris": pro 200 ml:
12,11 g Tris-Base
8 ml 10% SDS
pH 6,8

Trenngel (12,5%): pro 30 ml:
12,5 ml Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8; Roth)
7,8 ml 4 x "Lower Tris"
9,4 ml 30% Glyzerin
0,3 ml 10% APS
20 µl TEMED
(45 min polymerisiert)

Sammelgel (5%): pro 15ml:
2,5 ml Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)
9,75 ml 4 x "Upper Tris"
8,45 ml H₂O
0,187 ml 10% APS
22,5 µl TEMED
(20 min polymerisiert)

Die Elektrophorese wurde bei 10 mA pro Gel über Nacht in Laufpuffer (pro 2 l: 12,1 g Tris-Base, 57,64 g Glycin; 20 ml 10% SDS) durchgeführt.

2.6.2. Coomassie-Färbung von Proteingelen

Das zu färbende Gel wurde 45 min in Coomassieblau-Lösung (pro l: 1,75 g Serva Blau R, 454 ml Methanol, 92 ml Eisessig) geschwenkt und der überschüssige Farbstoff mit Entfärber (30% Ethanol, 10% Eisessig) entfernt

2.6.3. Herstellung von Gesamtzellextrakten und Zellfraktionierung

2.6.3.1. Gesamtzellextrakte von *E.coli* (Lämmli *et al.*, 1970)

2 ml einer Kultur wurden 5 min zentrifugiert (Eppendorf, 13000 upm, 4°C) und der Überstand gründlich entfernt. Die Zellen wurden in einer geeigneten Menge Probenpuffer nach Lämmli (pro 30 ml: 3 ml 87% Glycerin; 1,5 ml β-Mercaptoethanol; 1,25 ml 4 x "Upper Tris"; 0,9 g SDS; 1 Spatelspitze Bromphenolblau) sorgfältig resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen und die Denaturierung der Proteine erfolgte durch 10 min Inkubation bei 95°C.

2.6.3.2. Gesamtzellextrakt von *B. subtilis*

2 ml einer Kultur wurden 5 min zentrifugiert (Eppendorf, 13000 upm, 4°C) und der Kulturüberstand (s. 2.6.3.3.) gründlich entfernt. Die Zellen wurden in einer geeigneten Menge Lysepuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 25 mM MgCl₂; 200 mM NaCl; 5 mg/ml Lysozym) resuspendiert und in Anwesenheit des Protease-Inhibitormixes "Complete" (1 x konzentriert; Boehringer Mannheim) 30 min lang bei 37°C aufgeschlossen. 3 x konzentrierter Probenpuffer nach Laemmli wurde zugegeben (Endkonzentration: 1 x) und der Ansatz 10 min bei 95°C inkubiert.

2.6.3.3. Aufarbeitung von Kulturüberständen (Bensadoun & Weinstein, 1976)

Die Zellen wurden durch Zentrifugieren (s. 2.6.3.2.) vom Kulturüberstand getrennt und die Proteine des Kulturüberstandes in 7% TCA 1h auf Eis oder über Nacht bei 4°C gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, das Pellet zweimal mit 80% Azeton gewaschen und in einer geeigneten Menge Lämmli-Puffer resuspendiert. Die Proteine wurden vor dem Auftragen 10min bei 95°C denaturiert.

2.6.3.4. Zellfraktionierung von *E. coli*, *B. subtilis* und *S. carnosus*

500 ml LB wurden mit 10 ml einer Vorkultur beimpft und bei 37°C bis zu einer OD von 1,0 geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4°C, 7000 upm, Beckmann-JA10) und in 1 ml/mg Pellet Lösung A (250 mM Saccharose; 50 mM Triethanolamin-Acetat pH 7,5; 1 mM DTT; 50 µM PMSF; 5 mM EDTA) resuspendiert und mit einer „French pressure cell press“ (SIM-AMINCO) aufgeschlossen. Zur Entfernung der Zelltrümmer wurde 5 min zentrifugiert (RT, 5000 upm, Beckmann-JA20). Der Überstand wurde in ein UZ-Röhrchen überführt und 2 h zentrifugiert (45000 upm; 4°C; Ti 50; Beckmann Ultrazentrifuge). Der Überstand (= cytoplasmatische Fraktion) wurde mit 8% TCA gefällt, zweimal mit 80% Aceton gewaschen, das Proteinpellet in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 95°C inkubiert. Das Pellet (= Gesamtmembran) wurde ebenfalls in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 95°C inkubiert.

2.6.4. Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern (Western Blot)

Die zu untersuchenden Proteine wurden vor der Übertragung auf Nitrocellulosemembranen im denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt (2.6.1.). Der Transfer im SemiDry-Blotting-Verfahren erfolgte mit der Apparatur von Pharmacia/LKB. Sämtliche Filterpapiere (Whatmann 3MM) sowie die Nitrocellulosemembran wurden zu Beginn in Transferpuffer (pro l: 3 g Tris-Base; 14,4 g Glycin; 100 ml Methanol) eingelegt. Der Aufbau des Blottes wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Transfervorgang erfolgte für 2 h bei 0,8 mA pro cm² Gelfläche. Anschließend wurde die Membran zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen in Lösung I (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,9% NaCl, 3% RSA, 0,05% Tween 20) 1 h bei 37°C geschwenkt. Danach wurde die Membran in Blot-Lösung II (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,9% NaCl, 0,3% RSA) mit dem primären Antiserum (in der Regel 1:1000 verdünnt) gegen das Zielprotein überführt und noch einmal 1 h bei 37°C inkubiert. Die nicht bzw. unspezifisch gebundenen Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen (je 15 min bei 37°C) mit Blot-Lösung II entfernt. Der Nachweis der primären Antikörper (aus Kaninchen) erfolgte mit Hilfe eines gegen Kaninchen-IgG gerichteten Phosphatase-Antikörperkonjugats (= sekundärer Antikörper; Sigma). Dazu wurden die Membranen 1 h bei 37°C in Blot-Lösung II mit den sekundären Antikörpern (1:10000) inkubiert. Nun wurden die Membranen erneut zweimal gewaschen (s.o.) und für 5min in Blot-Lösung III (100 mM Tris/HCl pH 9,5; 5 mM MgCl₂; 100 mM NaCl) äquibriert. Zur Farbentwicklung wurde die Membran mit Substratlösung (pro 10 ml Lösung III: 66 µl NBT [50 mg/ml in 70% Dimethylformamid]; 66 µl X-Phosphat [das Natriumsalz zu 25 mg/ml in Wasser gelöst] überschichtet. Die Farbreaktion wurde durch gründliches Spülen mit Wasser abgestoppt.

2.6.5. "Pulse chase"-Experiment mit *B. subtilis* (variiert nach van Dijl, 1991)

"Pulse-chase" Experimente dienen zur Untersuchung der Kinetik, mit der ein Vorläuferprotein in die reife Form überführt wird. Hierzu wurden alle Zellproteine mit ^{35}S -Methionin markiert und nach dem Zellaufschluß die Proteine von Interesse über Immunfällung isoliert. Die Darstellung der Proteine erfolgte nach Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Autoradiographie oder mit Hilfe eines Phosphoimagers.

Markierung

5 ml S7-Medium im Reagenzröhrchen incl. geeignetem Antibiotikum wurden mit einer frischen Kolonie beimpft und bis zu einer OD600 von 0,6 - 0,8 bei geeigneter Temperatur mit 200 upm geschüttelt. 2,5 ml Kultur wurden 5 min bei RT mit 5000 upm pelletiert (Heraeus), zweimal mit 5 ml S7-Medium ohne Methionin gewaschen, in 2,5 ml S7-Medium ohne Methionin und ohne Antibiotikum resuspendiert und für 30 – 40 min bei geeigneter Temperatur geschüttelt. Die Markierung erfolgte mit 100 μCi ^{35}S -Methionin für 1 min (Markierungen bei 25 °C erfolgten in der Regel mit 200 μCi ^{35}S -Methionin für 1 min). Danach wurde 100 μl "Chase"-Lösung zugesetzt (45 mg/ml Methionin; 2,5 mg/ml Puromycin) und zu verschiedenen Zeitpunkten 600 μl Probe genommen, die sofort mit 150 μl eiskaltem TCA (40%) vermischt (Vortex) wurden. Die Fällung wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt.

Immunfällung

Das TCA-Pellet wurde abzentrifugiert (Eppendorf, 13000 upm, 20 min, RT), dreimal gründlich mit 80% Azeton gewaschen und das Pellet 5 min bei 45°C im Ofen getrocknet. Für den Zellaufschluß wurde das Pellet in 100 μl Lysepuffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 25 mM MgCl_2 , 200 mM NaCl, 5 mg/ml Lysozym) resuspendiert und 30-60 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 10-15 μl 10% SDS wurden die Zellen 10 min bei 95°C aufgeschlossen. Das Volumen wurde mit STD-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,2, 0,9% NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% Na-Desoxycholat) auf 1 ml erhöht, unlösliche Bestandteile durch Zentrifugieren (Eppendorf, 20 min, 13000 upm, RT) entfernt und 900 μl Überstand zur Immunfällung in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Die Fällung der Proteine von Interesse erfolgte mit 10 μl spezifischer Antikörper unter leichtem Schütteln für 1 h bei 30°C. Zur Isolierung des Protein-Antikörperkomplexes wurden nun 100-150 μl Pansorbinzellen (10%, fixierte *Staphylococcus aureus* Zellen; Calbiochem) zugegeben und 30 min bei 30°C leicht geschwenkt. Die Pansorbinzellen mit dem nun gebundenem Antigen wurden 1 min abzentrifugiert (Eppendorf, 13000 upm, RT) und mit je 1 ml Waschlösung I (50 mM Tris/HCl pH 8, 1 M NaCl, 1% Triton X-100), Waschlösung II (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 M LiCl, 0,1% SDS) und 50 mM Tris/HCl pH 7,5 gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 2 x Lämmli-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden 10 min bei 95°C erhitzt und in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (2.6.1.).

Gelaufarbeitung

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im Gel 30 min fixiert (45% Methanol; 10% Essigsäure) und zur späteren Fluorografie mit Amplify (Amersham Buchler) oder Enhance (Dupont) unter Schwenken 30 min imprägniert. Nach der Behandlung mit Enhance mußte das Gel vor dem Trocknen 3 x 10 min gewässert werden. Danach wurde das Gel mit Hilfe einer Vakuum-Trocknungsapparatur auf Filterpapier (Whatmann 3MM) getrocknet.

Nachweis

Der Nachweis erfolgte entweder durch Exposition eines Röntgenfilms (X-Ray, Fuji) für ein bis mehrere Tage bei -70°C oder mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fuji BAS1800 Bio Image Analyser). Im letzteren Fall wurde für einige Stunden bis über mehrere Tage bei RT ein "Screen" (Fuji BAS-MP Imaging Plate) exponiert. Dieser wurde anschließend in den Phosphoimager eingelesen, wodurch letztlich die von den Proteinbanden ausgegangene radioaktive Strahlung digitalisiert

vorlag. Mit Hilfe der zugehörigen Software (Raytest "Advanced Image Date Analyser" AIDA) konnten die Pulse Chase-Experimente quantitativ ausgewertet werden.

2.6.6. "Pulse Chase"-Experiment mit *S. carnosus*

Die Arbeitskultur wurde auf eine OD600 von 0,2 in MMSc (2.2.) mit einer über Nachtkultur eingestellt und bis zu einer OD600 von 0,6 – 0,8 bei 37 °C mit 180 upm geschüttelt. Die Markierung der Zellen wurden wie unter 2.6.5. beschrieben durchgeführt allerdings mit folgenden Abweichungen: Zugabe von 200µl "Chase" (Met 10mg/ml, 5 % Casaminoacid). Der Zellaufschluß erfolgte anstelle von Lysozym mit Lysostaphin (0,5 mg/ml). Alle weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung und Charakterisierung des *secG* Gens von *Staphylococcus carnosus*

Im Rahmen meiner Promotion sollte untersucht werden, ob die beobachteten Phänotypen der RMA auf eine nicht optimale Wechselwirkung des *S. carnosus* SecA mit den übrigen Sec-Komponenten von *B. subtilis* beruhte. Hierfür sollten in der RMA weitere *sec*-Gene von *B. subtilis* durch homologe Gene von *S. carnosus* chromosomal ausgetauscht werden. Das Verschwinden der RMA-Phänotypen durch Einbringen weiterer *S. carnosus* Sec-Komponenten wäre ein Hinweis auf eine direkte Wechselwirkung zwischen dem *S. carnosus* SecA Protein der jeweils zusätzlich vorhandenen Sec-Komponente und dem Vorläuferprotein.

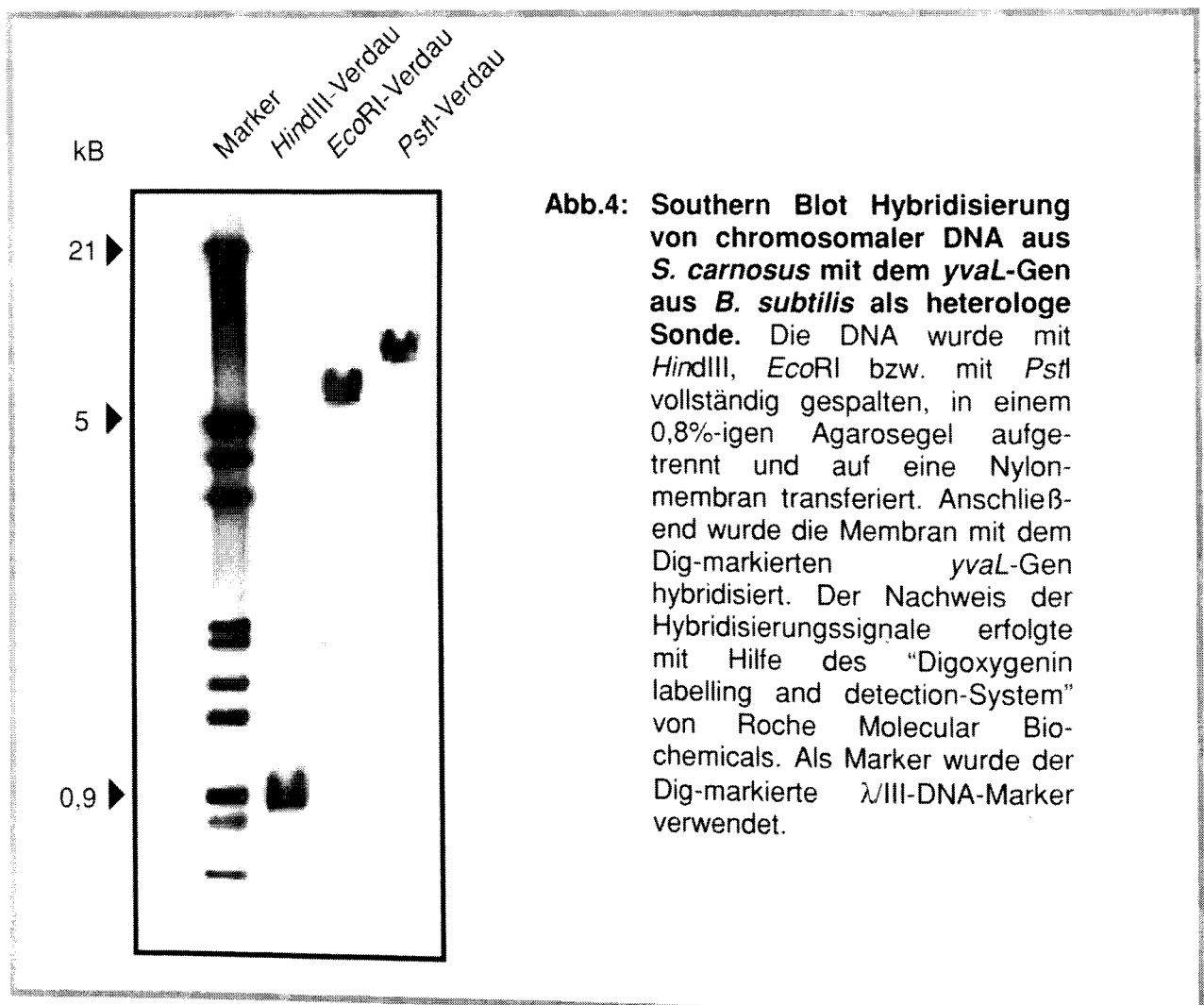
Von *E. coli* war bekannt (Nishiyama *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1998), dass die Funktion des SecA-Proteins während der Translokation eng mit einer weiteren Sec-Komponente, dem SecG-Protein, verknüpft ist. Es bestand daher die Möglichkeit, dass in der RMA die SecA-SecG-Wechselwirkung nicht optimal ist, was letztlich die Phänotypen der RMA hervorruft. Um dieser Vermutung nachzugehen, sollte in der RMA zusätzlich zum *secA*-Gen auch das *secG*-Gen durch die entsprechende Komponente von *S. carnosus* chromosomal ausgetauscht werden. Zu diesem Zweck mußte jedoch zunächst das bislang noch fehlende *secG*-Gen von *S. carnosus* kloniert werden.

3.1.1. Isolierung und Sequenzierung des *secG*-Gens von *S. carnosus*

Die Identifizierung des *secG*-Gens im Genom von *S. carnosus* sollte mit Hilfe von Southern Blot Experimenten erfolgen. Da bereits vergeblich versucht worden war, mit Hilfe einer *E. coli* *secG*-Gensonde ein *secG* homologes Gen von *S. carnosus* zu klonieren (M. Klein, persönliche Mitteilung) und zu dem damaligen Zeitpunkt kein weiteres Gram-positives *secG*-Gen bekannt war, wurde das *yvaL*-Gen von *B. subtilis* als heterologe Gensonde eingesetzt. Das *yvaL*-Gen wurde im Zuge des Sequenzierungsprojektes von *B. subtilis* (Kunst *et al.*, 1997) gefunden. Das *yvaL*-Genprodukt besitzt auf Proteinebene Homologien zum *E. coli* SecG (33% Identität und 57% Gesamthomologie), ist jedoch um 34 AS am C-Terminus verkürzt. Von Nishiyama *et al.* (1996) konnte allerdings gezeigt werden, dass der C-Terminus des *E. coli* SecG für die Funktionen des Proteins nicht essentiell ist.

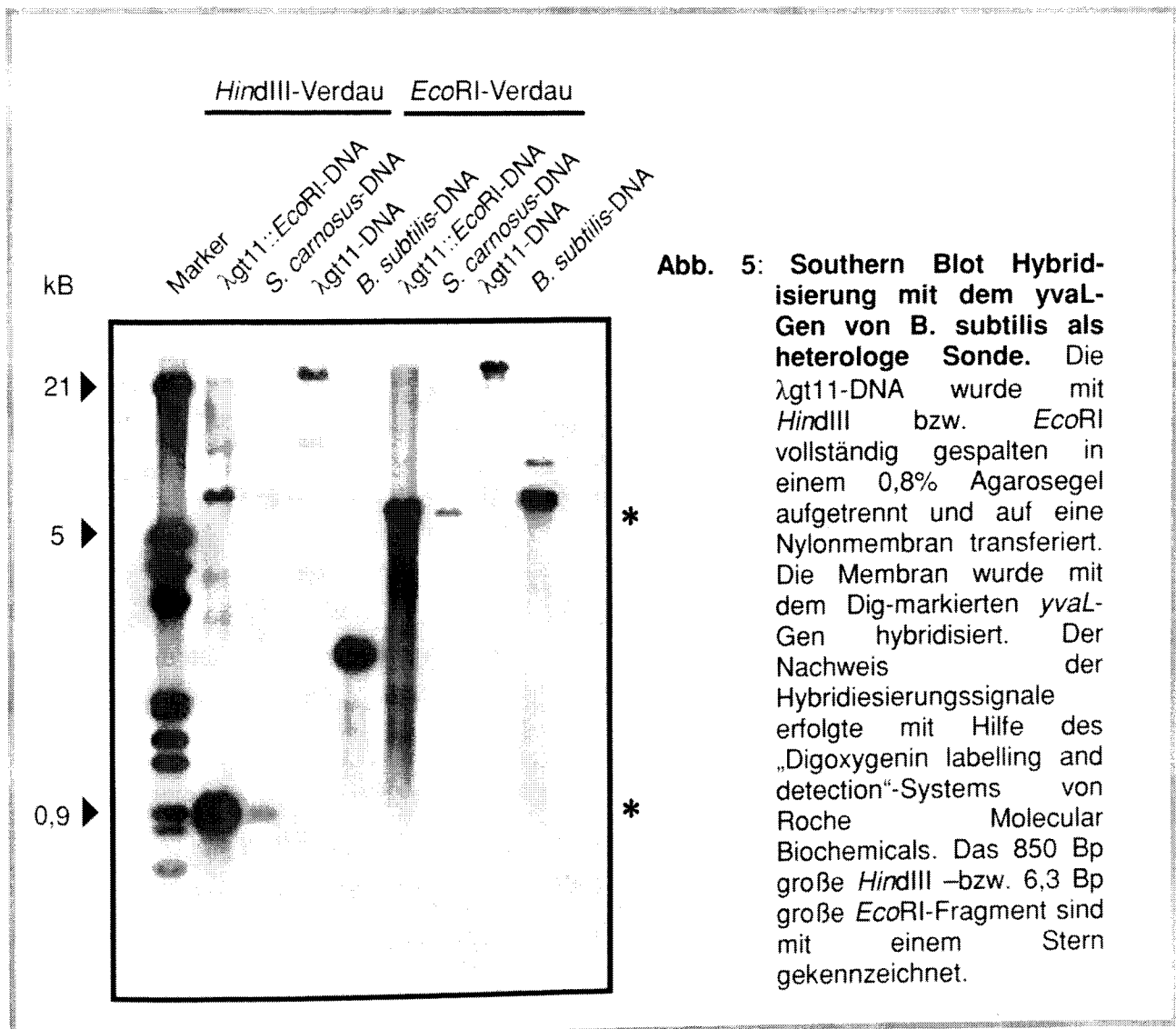
Zur Herstellung einer *yvaL*-Gensonde wurde das Gen einschließlich seiner Ribosomenbindestelle in einer PCR mit den Primern BssecG1 und BssecG2 amplifiziert und mit Digoxigenin (Dig) markiert. Als Template diente chromosomale DNA von *B. subtilis*.

Für den Southern Blot wurde chromosomale DNA von *S. carnosus* Wildtyp (TM300) mit verschiedenen Restriktionsenzymen (*Hind*III, *Eco*RI und *Pst*I) vollständig gespalten, in einem Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membranen mit der Dig-markierten *yvaL*-Sonde bei verschiedenen Formamidkonzentrationen (20%, 25% und 30%). Unter allen Bedingungen konnten spezifische Hybridisierungssignale erhalten werden. Diese wurden einem 850 Bp großen *Hind*III-Fragment, einem 6,3 kB großen *Eco*RI-Fragment und einem 10 kB großen *Pst*I-Fragment zugeordnet (Abb. 4).



Um das *Eco*RI-Fragment zu klonieren, wurde eine λ gt11-*Eco*RI-Genbank von *S. carnosus* (R. Kappes, persönliche Mitteilung) mit der *yvaL*-Sonde durchsucht. Hierzu wurde der *E. coli* Stamm Y1090 mit der Phagenbank ($2,8 \times 10^6$ pfu/ml) infiziert und die Zellen so ausplattiert, dass etwa 1000 Phagenplaques pro Platte erhalten wurden. Etwa 120000 Phagenplaques wurden auf diese Weise mit Hilfe der Plaque-Hybridisierungstechnik mit der *yvaL*-Sonde hybridisiert, wovon 8 ein positives Signal zeigten. Die 8 Plaques wurden von der Platte isoliert und anschließend für eine erneute Infektion des *E. coli* Stammes Y1090 eingesetzt. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt, wodurch eine Reinigung der Phagen erzielt wurde, welche mit der *yvaL*-Sonde ein positives Hybridisierungssignal zeigten. Zwei Phagenplaques, die nach dem dritten Zyklus nach

wie vor ein positives Signal mit der *yvaL*-Sonde zeigten, wurden dann im größeren Maßstab in dem *E. coli* Stamm Y1090 vermehrt und aus dem gewonnenen präparativen Lysat die Phagen-DNA isoliert. Um zu klären, ob das gesuchte *EcoRI*-Fragment tatsächlich aus der λ gt11-*EcoRI*-Genbank von *S. carnosus* isoliert werden konnte, wurde die isolierte Phagen-DNA sowohl mit *EcoRI* als auch mit *HindIII* vollständig gespalten und erneut in einem Southern Blot-Experiment untersucht (Abb. 5).



Das Ergebnis des Southern Blot Experiments in Abbildung 5 zeigt, dass das gesuchte 6,3 kB *EcoRI*-Fragment aus der λ gt11-*EcoRI* Genbank von *S. carnosus*, isoliert werden konnte. Zudem verdeutlicht der Verdau mit *HindIII*, dass sich das 850 Bp große *HindIII*-Fragment innerhalb des 6,3 kB *EcoRI*-Fragments befindet.

Die isolierten *EcoRI*- und *HindIII*-Fragmente wurden, nachdem eine Subklonierung in den „high-copy“ *E. coli* Vektor pUC18 (180 - 200 Kopien/Zelle) erfolglos blieb, in den „low-copy“ Vektor pHSG576 (10 - 15 Kopien/Zelle) kloniert (pHSG850*HindIII* und pHSG6,3*EcoRI*). Mit Hilfe der Standardprimer wurde nun das *HindIII*-Fragment von beiden Seiten ansequenziert

(Abb. 6).

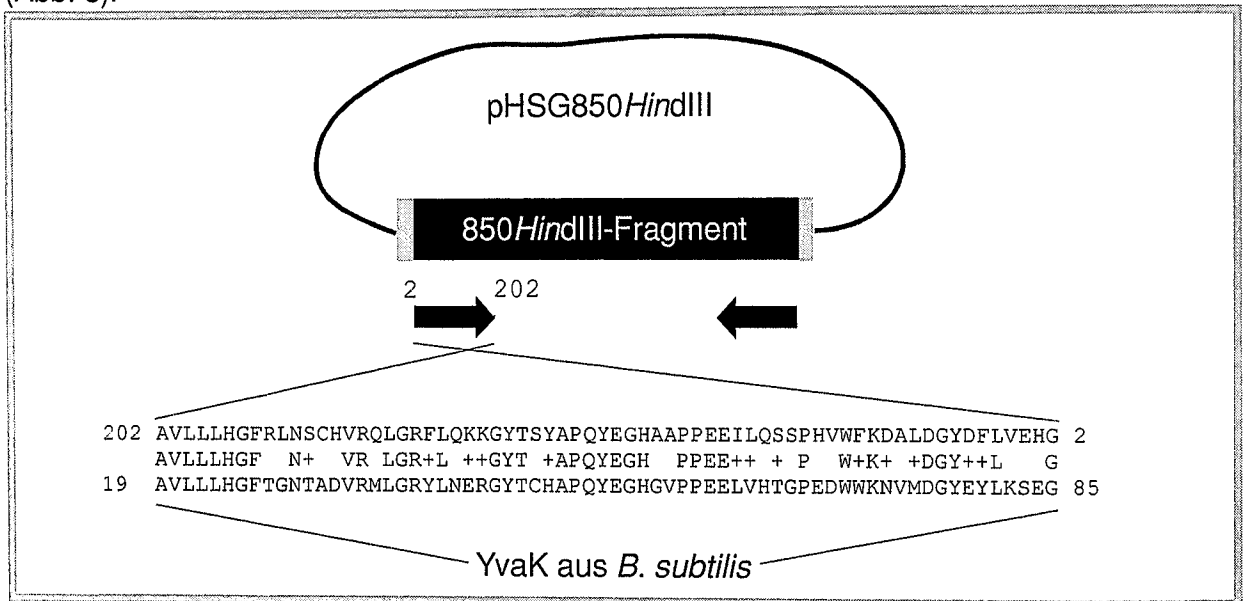


Abb. 6: Aminosäurevergleich zwischen dem abgeleiteten Bereich des *HindIII*-Fragments und dem YvaK-Protein von *B. subtilis*. Das Plasmid pHSG850HindIII wurde mit den universellen Primern des M13/pUC-Systems ansequenziert. Gezeigt ist die abgeleitete Aminosäuresequenz des 5'-Bereiches (Nukleotide 2 – 202), der Homologien zum YvaK-Protein von *B. subtilis* (im Bereich der Reste 19 – 85) besitzt. Aminosäuren sind im Einbuchstabenkode angegeben, konservierte Aminosäureaustausche mit einem "+" gekennzeichnet.

Die Aminosäurenabfolge, welche vom 5'-Ende des subklonierten *HindIII*-Fragments abgeleitet wurde, zeigte eine Homologie von 74% zu dem YvaK-Protein von *B. subtilis* im Bereich der Reste von 19 bis 85. Die vom 3'-Ende abgeleitete Aminosäuresequenz wies dagegen keine Homologie zu *B. subtilis* Proteinen auf.

Auf dem *B. subtilis* Chromosom befindet sich das *yvaK*-Gen stromabwärts vom *yvaL*-Gen (Abb. 7). Die Wahrscheinlichkeit, dass das gesuchte *yvaL*-Gen von *S. carnosus* ebenfalls auf dem klonierten *HindIII*-Fragment lokalisiert ist, war deshalb groß. Das vollständige *HindIII*-Fragment wurde daraufhin doppelsträngig nach der Methode von Sanger sequenziert. Die erhaltene Sequenz ist in Abbildung 8 gezeigt.

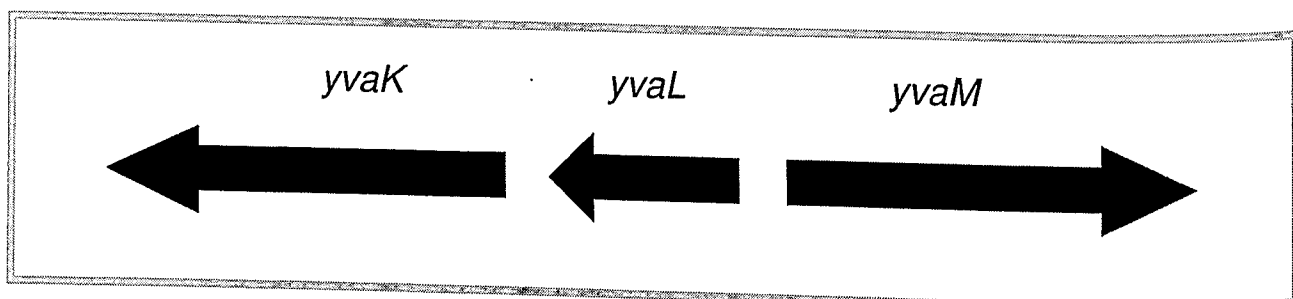


Abb. 7: Chromosomale Anordnung des *yvaL*-Gens im *B. subtilis* Genom (schematisch dargestellt sind nur die beiden vom *yvaL* stromab- bzw. stromaufwärts gelegenen Gene). Das *yvaK*-Genprodukt zeigt Ähnlichkeiten zu Carboxylesterasen, *yvaM* zeigt keine Ähnlichkeit zu bekannten Genen.

tgattatcca aagtattaat cacgtgaaat caggtttcat gactttacct ⁻³⁵

ttatggatta caattatcgg ttcacttgcc ttagcagttt atatgctagt ⁻¹⁰

gatctcaatt aaacgtaaaa gtacatttaa tcgctagagc atatgggaac

aagttagacc aaatgttgat aaactacatt gaaatatgtt acacttgtag

agtatattat gaatggagga ctaacgc**atg** ^{secG} cacactttat tgacagtttt
RBS M H T L L T V

attagttata gactgtatcg ctttaatcac agttgtgtta ctccaagaaa
 L L V I D C I A L I T V V L L Q E

gcaaaagtaa cggcctttca ggagcaatca gcggcgggtgc tgaacagctc
 S K S N G L S G A I S G G A E Q L

ttcgggtggaa aacaaaagca acgcgggtgtt gacttattct taaaccgtgt
 F G G K Q K Q R G V D L F L N R

aacaattggt ttatcgattg catttttcgt gttaatgtta gcaattactt
 V T I G L S I A F F V L M L A I T

atttcaatat gtaaggtccg acaatgtaaa agtcgggctt ttttctttat ⁻³⁵ ⁻¹⁰
 Y F N M -

aatggaacta tgagtaaatt tgattaaatg ggaatcatga aaggattgaa RBS

orf2
 agac**atg**cag attaaattgc caaagccgtt cttttttgaa gaaggaaaaa
 M Q I K L P K P F F F E E G K

gagcagtatt attgttacat ggttttactg gaaactcttc cgatgtaaga
 R A V L L L H G F T G N S S D V R

caactcgggc gctttttaca gaaaaaagggt tacacatctt atgcgcctca
 Q L G R F L Q K K G Y T S Y A P

atatgaaggc catgcagcgc caccggaaga aattttgcaa tccagcccgc
 Q Y E G H A A P P E E I L Q S S P

atgtctgggt taaagatgcg ttagatgggt acgacttttt agtggaacat
 H V W F K D A L D G Y D F L V E H

ggatatgatg aaattgtggt agccggctta tcttttaggtg gagatttttg
 G Y D E I V V A G L S L G G D F

Abb. 8: Nukleotidsequenz des klonierten 850 Bp großen *HindIII*-Fragmentes aus *S. carnosus* und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz für das YvaL-Protein sowie der N-terminalen Teilsequenz des YvaK. RBS: Ribosomenbindestelle. Start und Stopkodons sind fett gedruckt, potentielle Transmembranbereiche grau unterlegt und potentielle Promotorregionen ebenso wie Ribosomenbindestellen unterstrichen. Die Teilsequenz des YvaK zeigt Homologien zu einer Carboxylesterase von *B. subtilis*.

3.1.2. Sequenzanalyse auf DNA- und Proteinebene

Wie in Abbildung 8 dargestellt, beinhaltet das 850 Bp große *HindIII*-Fragment einen 234 Bp großen ORF (*yvaL*), der für ein 78 Aminosäuren langes YvaL-homologes Membranprotein kodiert. 90 Nukleotide stromabwärts gelegen beginnt ein weiterer offener Leserahmen (*yvaK*), der jedoch unvollständig auf dem *HindIII*-Fragment lokalisiert ist. Diese Teilsequenz kodiert für 98 Aminosäuren, die eine signifikante Ähnlichkeit zum N-Terminus des bislang noch nicht charakterisierten Proteins YvaK von *B. subtilis* zeigt. Beide Proteine besitzen mit GGAGGA bzw. AGGATTG funktionelle Shine-Dalgarno-Sequenzen, die sich 7 bzw. 6 Nukleotide vor den postulierten ATG-Startcodons befinden. Die -35 und -10 Regionen der potentiellen Promotoren sind, wie in Tabelle 1 dargestellt, durch 18 Nukleotide getrennt und weisen Homologien zur Konsensussequenz für eubakterielle σ^{70} -Promotoren auf (Wösten, 1998). Eine Terminationssequenz konnte nicht ausgemacht werden.

	-35	"Spacer"	-10
Konsensus	TTGACA	16 - 18	TATAAT
P _{yvaL}	TTCATG	18	TACAAT
P _{yvaK}	ATGTAA	18	TATAAT

Abb. 9: Die Nukleotidsequenzen der potentiellen Promotoren von *yvaL* (P_{yvaL}) und *yvaK* (P_{yvaK}). In der oberen Zeile ist die Konsensussequenz der -10 und -35-Regionen für bakterielle σ^{70} -Promotoren angegeben. Übereinstimmende Nukleotide in P_{yvaL} und P_{yvaK} sind fett gedruckt. Die Zahlen in der Mitte geben die nicht konservierten "Spacer"-Regionen in Nukleotiden an.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des *S. carnosus* YvaL-Proteins weist eine Gesamthomologie von 82% (67% Identität) zum YvaL-Protein von *B. subtilis* auf. Die Homologie zum *E. coli* SecG-Protein beträgt 23% (Abb. 10). In Topologievorhersagen durchspannt das *S. carnosus* YvaL-Protein in Analogie zum *E. coli* SecG und zum *B. subtilis* YvaL, die Membran zweimal (nicht gezeigt). Die Teilsequenz des *S. carnosus* YvaK-Proteins zeigt eine Homologie von 74% zum YvaK von *B. subtilis*, welches wiederum Ähnlichkeiten zu Carboxylesterasen aufweist.

SC	MHTLLTVLLVIDCIALITVVLQESKSNGLSGAISGGAEQ-LFGGKQKQR	49
BS	MHAVLITLLVIVSIALIIVVLQSSKSAGLSGAISGGAEQ-LFG-KQKAR	48
EC	MYEALLVVFLIVAIGLVGLIMLQOGKGADMGASFGAGASATLFGS----S	46
	* . . * * * . * * *	
SC	GVDLFLNRVTIGLSIAFFVLMMLAITYFNM-----	78
BS	GLDLILHRITVVLAVLFFVLTIALAYI-L-----	76
EC	GSGNFMTRMTALLATLFFIISLVLGNINSNKTNGSEWENLSAPAKTEQT	96
	* . . . * . * * . . *	
SC	-----	78
BS	-----	76
EC	QPAAPAKPTSDIPN	110

Abb. 10: Sequenzvergleich der YvaL-Proteine von *S. carnosus* (SC) und *B. subtilis* (BS) sowie dem SecG von *E. coli* (EC). Die mit einem Stern gekennzeichneten Aminosäuren sind identisch. Die Punkte zeigen die konservativen Aminosäureaustausche an. Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe des Programmes PALIGN (Myers & Miller, 1988) durchgeführt.

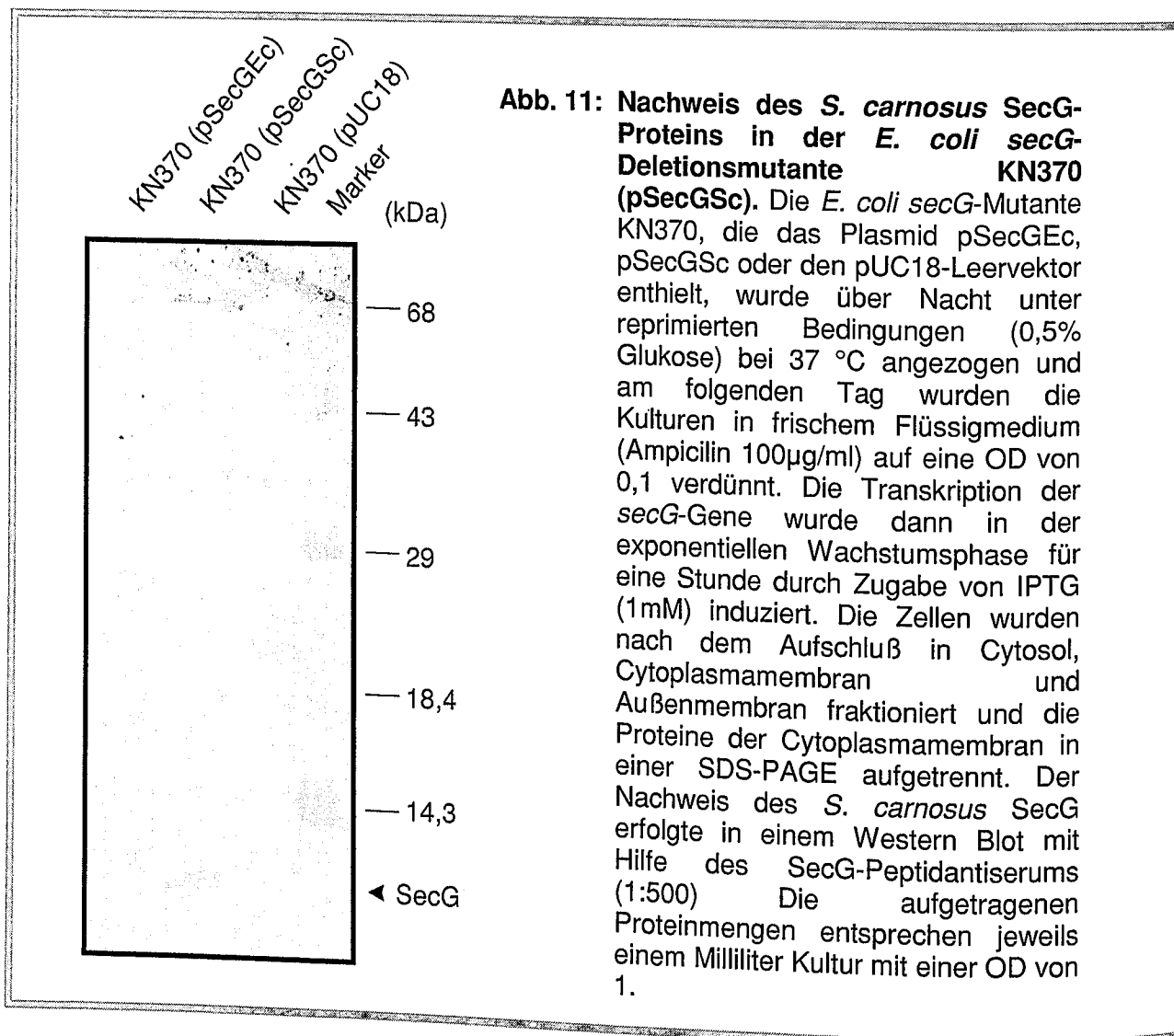
In der Zwischenzeit wurde für das *yvaL*-Genprodukt von *B. subtilis* gezeigt, dass es tatsächlich eine dem SecG von *E. coli* vergleichbare Funktion bei der Proteintranslokation besitzt (van Wely *et al.*, 1999) und wird daher als SecG-Homologes angesehen. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zum SecG-Protein von *B. subtilis* läßt sich daher mit hoher Wahrscheinlichkeit vermuten, dass das klonierte *S. carnosus yvaL*-Gen ebenfalls für ein SecG-Homologes kodiert.

3.1.3. Herstellung eines Peptidantikörpers gegen das SecG-Protein von *S. carnosus* und Expression des *S. carnosus* SecG-Proteins in der *E. coli secG*-Deletionsmutante KN370

Um herauszufinden, ob das *S. carnosus* SecG-Protein die Funktion des SecG von *E. coli* übernehmen kann, sollte zunächst versucht werden, mit Hilfe des *S. carnosus* Gens das kältesensitive Wachstum einer *secG*-Deletionsmutante von *E. coli* (zur Verfügung gestellt von H. Tokuda, Universität von Tokyo) zu komplementieren. Hierzu wurden das *secG*-Gen von *E. coli* und das *secG*-Gen von *S. carnosus* aus den entsprechenden Genomen einschließlich ihrer Ribosomenbindestellen mittels der PCR-Technik amplifiziert und in den pUC18-Vektor kloniert (pSecGEc bzw. pSecGSc). In den resultierenden Konstrukten unterliegt die Expression der *secG*-Gene der Kontrolle des mit Glukose reprimierbaren bzw. mit IPTG induzierbaren *lac*-Promotor/Operators. Die *E. coli secG*-Deletionsmutante KN370 wurde mit den Plasmiden pSecGEc (Positivkontrolle), pSecGSc und pUC18 (Negativkontrolle) transformiert (KN370 (pSecGEc), KN370 (pSecGSc) und KN370 (pUC18)). Um zunächst die Expression und korrekte Lokalisation des *S. carnosus* SecG-Proteins im Stamm KN370 (pSecGSc) sicherzustellen, wurde die Cytoplasmamembran der Stämme KN370 (pSecGSc), KN370 (pSecGEc) und KN370 (pUC18)

isoliert, die Proteine der Membranen anschließend in einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Das *S. carnosus* SecG-Protein konnte in diesem Ansatz jedoch nicht detektiert werden (nicht gezeigt). Sehr wahrscheinlich war der Nachweis des Proteins mit dieser Methode nicht sensitiv genug. Aus diesem Grund wurde daraufhin ein Peptidantikörper gegen das SecG-Protein von *S. carnosus* hergestellt. Die hydrophile und dadurch wahrscheinlich auch immunogene Peptidsequenz QLFGGKQKQRGVDL wurde ausgewählt, das Peptid synthetisiert und an das "Carrier"-Protein "keyhole limpet hemocyanin" (KLH) gekoppelt und zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet. Peptidsynthese, Kopplung und Immunisierung wurden von der Firma EUROAGENTEC in Belgien durchgeführt.

Der Nachweis des *S. carnosus* SecG-Proteins im Stamm KN370 (pSecGSc) sollte nun mit Hilfe des Peptidantikörpers in einem Western Blot-Experiment erfolgen (Abb. 11).



Dabei zeigte sich, daß die Cytoplasmamembran-Fraktion von KN370 (pSecGSc) eindeutig eine Proteinbande aufwies, die spezifisch mit dem *S. carnosus* SecG-Peptidantikörper reagiert. Die durch Vergleich mit Markerproteinen bekannter Masse geschätzte Masse dieser Proteinbande

beträgt etwa 9 kDa, was mit der theoretisch berechneten molaren Masse des 78 AS langen *S. carnosus* SecG-Proteins von 8,1 kDa sehr gut übereinstimmt.

Mit Hilfe des Peptidantiserums konnte somit festgestellt werden, dass das *S. carnosus* SecG-Protein in KN370 stabil exprimiert und offensichtlich korrekt in die Plasmamembran inseriert wird. Damit waren die Voraussetzungen für die funktionelle Charakterisierung des *S. carnosus* SecG in *E. coli* gegeben.

3.1.3.1. Das *S. carnosus* SecG-Protein kann das kältesensitive Wachstum der *secG*-Deletionsmutante KN370 von *E. coli* nicht komplementieren

Der für die Aminosäuren 4 - 107 kodierende Bereich des 110 Aminosäuren langen *E. coli* SecG-Proteins wurde im Chromosom von KN370 durch eine Kanamycinkassette ersetzt. Die Mutante kann auf Festmedium bei 20 °C keine Einzelkolonien ausbilden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Wachstumsstörung auf einem Translokationsdefekt beruht (Nishiyama *et al.*, 1994).

Das Komplementationsexperiment wurde mit den Stämmen KN370 (pSecGEc), KN370 (pSecGSc) und KN370 (pUC18) auf Festmedium bei 37 °C und 20 °C durchgeführt (Abb. 12).

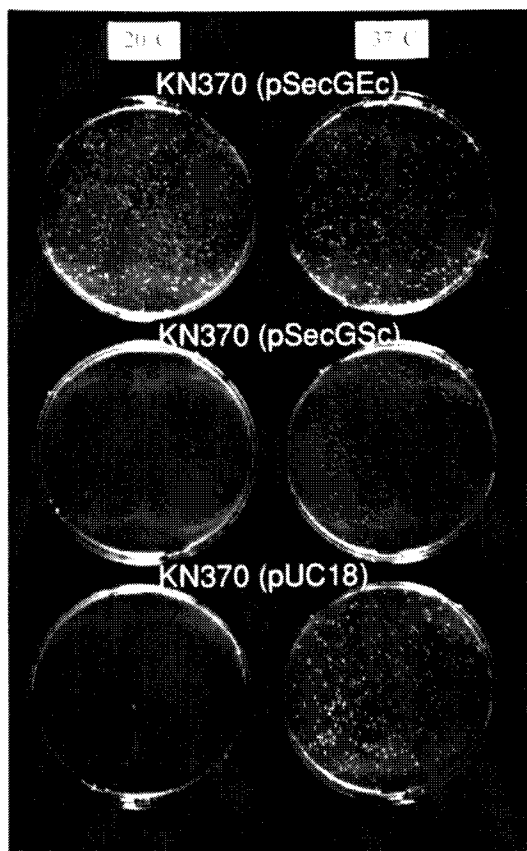


Abb. 12: Komplementationsversuch des Wachstumsdefektes der *E. coli* *secG*-Deletionsmutante KN370 bei 20 °C durch das SecG-Protein von *S. carnosus*. Der *E. coli* *secG*-Deletionsstamm KN370 wurde mit den Plasmiden pSecGEc (Positivkontrolle), pSecGSc und pUC18 (Negativkontrolle) frisch transformiert und erhaltene Transformanten bei 37 °C in Flüssigmedium angezogen (100 mg/ml Ampicillin, 0,5% Glukose). Die Zellen wurden dann auf Festmedium (100 mg/ml Ampicillin; 1 mM IPTG) so ausplattiert, dass etwa 600 Kolonien/Platte erhalten werden sollten. Ein Ansatz wurde, wie dargestellt, bei der nicht permissiven Temperatur von 20 °C für 72 Stunden inkubiert, der zweite Ansatz bei 37 °C für 16 Stunden.

Das Komplementationsexperiment ergab, daß im Gegensatz zum *E. coli* *secG*-Gen, die Anwesenheit des *secG*-Gens von *S. carnosus* das Wachstum von KN370 bei der nicht permissiven Temperatur nicht wieder herstellen kann. Die funktionellen Wechselwirkungen, welche

das SecG-Protein von *E. coli* mit den restlichen Sec-Komponenten unter diesen Bedingungen eingeht, konnten von dem *S. carnosus* SecG Homologen somit offensichtlich nicht übernommen werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Resultaten von van Wely *et al.* (1999), wonach auch das SecG-Protein von *B. subtilis* das kältesensitive Wachstum von KN370 nicht komplementieren kann. Demnach sind die Wechselwirkungen zwischen dem SecG und den restlichen Komponenten der Translokase in *E. coli* sehr spezifisch.

3.1.4. Konstruktion einer *secG*-Deletionsmutante von *S. carnosus*

Um untersuchen zu können, welchen Einfluss das SecG-Protein auf den Protein-Export in *S. carnosus* hat, sollte eine *secG*-Deletionsmutante von *S. carnosus* konstruiert werden. Hierbei sollte das *secG*-Gen auf dem Chromosom von *S. carnosus* durch einen Erythromycin-Resistenzmarker ausgetauscht werden.

Die Konstruktion der *secG*-Deletionsmutante von *S. carnosus* sollte unter Verwendung des Plasmids pHSG Δ HindIII::erm erfolgen, welches über homologe Rekombination das *secG*-Gen gegen den Resistenzmarker ersetzt. Die Konstruktion von pHSG Δ HindIII::erm ist im Folgenden beschrieben. Auf dem subklonierten und sequenzierten 850 Bp großen HindIII-Fragment (Plasmid pHSG850HindIII) liegen stromaufwärts des *secG* Gens etwa 230 Bp und stromabwärts etwa 400 Bp, wovon 296 Nukleotide für den N-Terminus des YvaK-Proteins kodieren (Siehe Kapitel 3.1.2.). Aus diesem HindIII-Fragment wurde nun ein 184 Bp großes SphI/ClaI-Fragment herausgeschnitten, welches für die Aminosäuren 1 - 62 des *S. carnosus* SecG-Proteins (Gesamtlänge 78 Aminosäuren) kodiert. In den verbleibenden Vektor, der nach wie vor den 230 Bp langen stromaufwärts gelegenden Bereich, das verbleibende 50 Bp lange 3'-Ende des *secG*-Gens und den 400 Bp langen stromabwärts liegenden Bereich enthielt, wurde nun an die Stelle des deletierten *secG*-Bereiches eine Erythromycinkassette (1,6 kB) eingefügt (Abb. 13). Die Resistenzkassette wurde durch den Verdau des Vektors pDG646 (Guerout-Fleury *et al.*, 1995) mit SphI und ClaI erhalten.

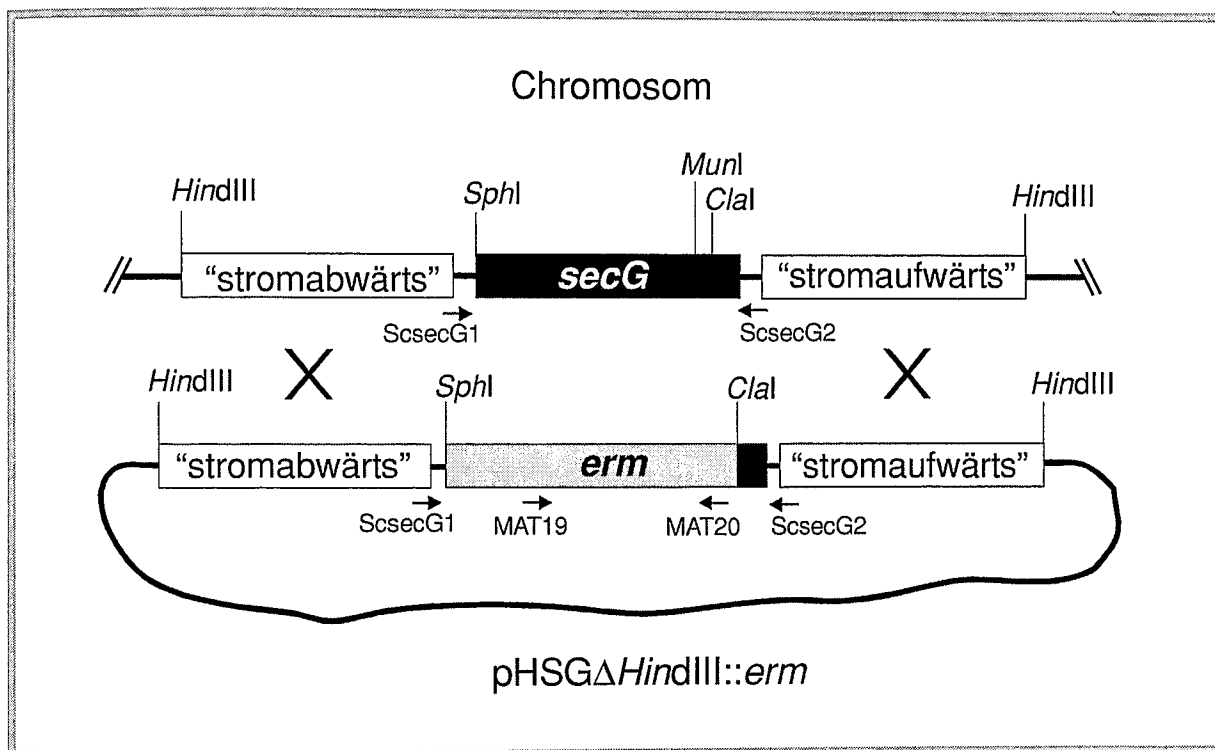


Abb. 13: Strategie zur Konstruktion einer *secG*-Deletionsmutante von *S. carnosus*: Schematische Darstellung des doppelten Rekombinationsereignisses zwischen dem Plasmid pHSGΔHindIII::erm und dem Chromosom von *S. carnosus*. *erm*: Erythromycin-Resistensgen; ScsecG1/ScsecG2; MAT19/MAT20: Oligonucleotide, die an den durch die Pfeile angedeuteten Stellen binden.

7 µg des zirkulären Plasmids pHSGΔHindIII::erm wurden mit frischer 1 M NaOH einzelsträngig gemacht. Durch Zugabe eines gleichen Volumens 1 M HCl wurde der Denaturierungsansatz neutralisiert. Frisch hergestellte *S. carnosus* Protoplasten wurden mit dem denaturierten Plasmid transformiert. Transformanten, die nur aufgrund eines homologen Rekombinationsereignisses in Anwesenheit von 1 µg/ml Erythromycin wachsen können (das Plasmid pHSGΔHindIII::erm kann in *S. carnosus* nicht replizieren), wurden isoliert. Um festzustellen, ob die erworbene Resistenz der Transformanten auf eine einfache- oder eine doppelte Rekombination des Markers in das *S. carnosus* Chromosom zurückzuführen war, wurde die chromosomale DNA der isolierten Transformanten präpariert und mit Hilfe der PCR-Technik analysiert.

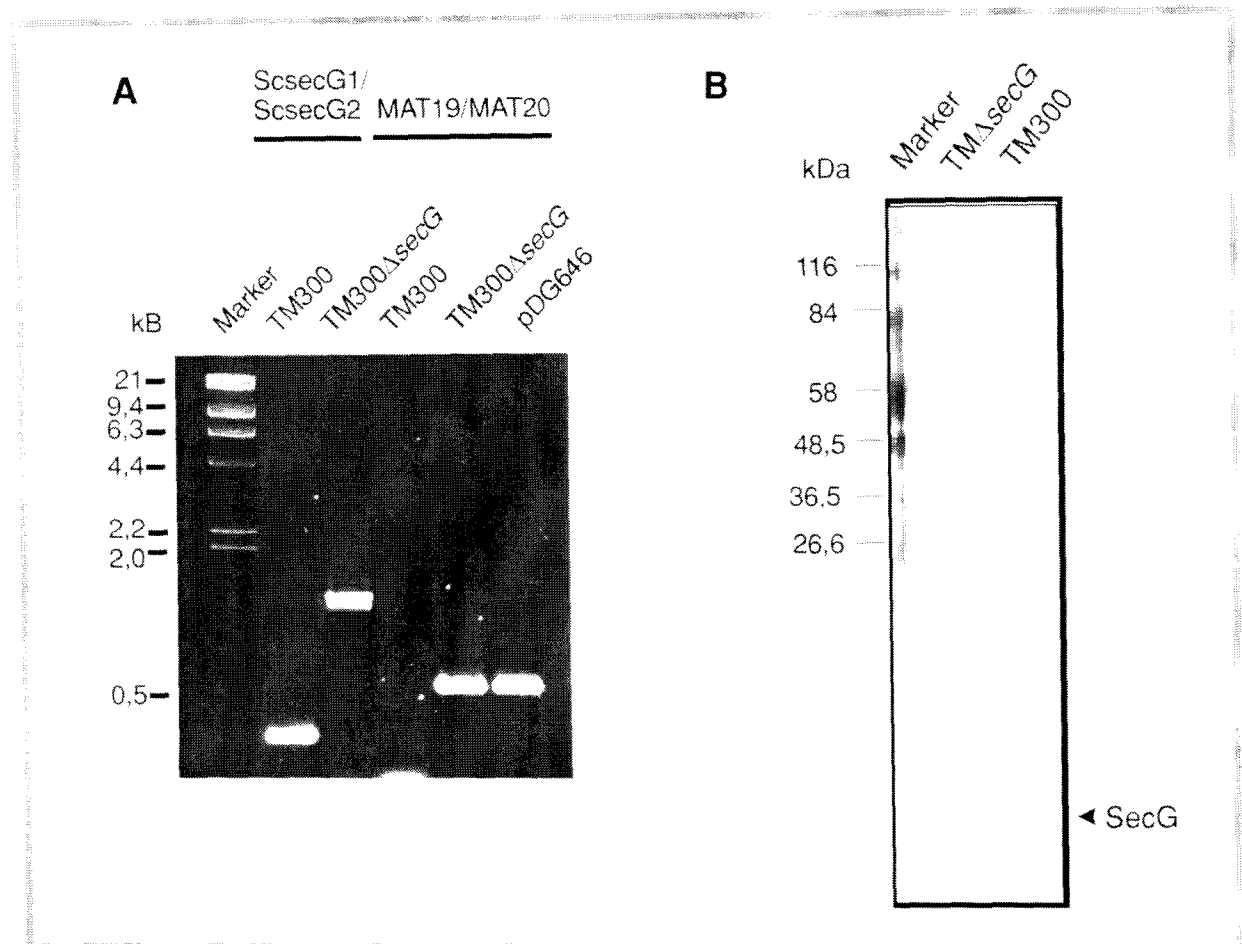


Abb. 14: Nachweis der secG-Deletion in *S. carnosus*. **A** Chromosomale DNA des *S. carnosus* Wildtyps (TM300) und der secG-Deletionsmutante von *S. carnosus* (TM300ΔsecG) wurden als Template in einer PCR eingesetzt unter Verwendung der Oligonucleotide ScsecG1/ScsecG2 bzw. MAT19/MAT20. 1/20 des PCR-Ansatzes wurde in einem 0,8%-iges Agarosegel aufgetrennt und die Fragmente mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. pDG646 (Positivkontrolle): Plasmid, mit Erythromycin-Resistenzgen. **B** Membranvesikel von TM300ΔsecG bzw. von TM300 (zur Verfügung gestellt durch K.-L. Schimz) wurden in einem 15%-igen SDS-Gel aufgetrennt. In einem anschließend durchgeführten Western Blot wurde ein spezifischer *S. carnosus* SecG Peptidantikörper (1:500) eingesetzt.

Bei einem doppeltem Rekombinationsereignis über den homologen stromaufwärts sowie stromabwärts liegenden Bereich sollte das secG-Gen bis auf den 50 Bp langen 3'-terminalen Rest vom Chromosom deletiert sein und an dessen Stelle das 1,6 kB große Markergen liegen. Für die PCR-Analyse wurden die Primer ScsecG1 und ScsecG2 eingesetzt (Abb. 13; Primer ScsecG1 bindet in der 5'-Region vor dem ATG-Startkodon des secG-Gens; Primer ScsecG2 bindet in der 3'-Region nach dem TAA-Stop-Kodon des secG-Gens). Von zwei unabhängigen Transformationen wurde unter allen getesteten Erythromycin-resistenten Transformanten ein Klon gefunden, dessen chromosomale DNA als Template, wie in Abbildung 14A gezeigt, nach der PCR mit den Primern ScsecG1/ScsecG2 zur Amplifikation eines 1,7 kB-Fragmentes führte, während in der Kontroll-PCR mit der chromosomalen DNA des Wildtyps das 234 Bp große secG-Gen amplifiziert wurde. Die PCR mit den Primern MAT19/MAT20 ergab mit der chromosomalen DNA des isolierten Klon, genauso wie mit der Plasmid-DNA von pDGD646 als Template (Positivkontrolle), ein 550 Bp

großes internes Fragment des Erythromycingens. Demnach konnte mit Hilfe des Plasmids pHSGΔ*HindIII::erm* das *secG*-Gen auf dem Chromosom von *S. carnosus* deletiert und gegen eine Erythromycin-Resistenzkassette ersetzt werden. Bei allen anderen Transformanten wurde wie im *S. carnosus* Wildtyp TM300 das 234 Bp große *secG*-Gen nachgewiesen (nicht gezeigt). Da diese Stämme eine stabile Resistenz in Anwesenheit des Antibiotikums aufwiesen, ist demnach das Plasmid pHSGΔ*HindIII::erm* nur durch eine einfache Rekombination über den stromaufwärts- oder den stromabwärts liegenden Bereich des *secG*-Gens ins Chromosom von *S. carnosus* integriert.

Die auf genetischer Ebene überprüfte *secG*-Deletion des einen Isolats wurde mit Hilfe des *S. carnosus* *secG*-Peptidantikörpers mit Membranvesikeln, welche einmal von der Mutante und zum anderen vom Wildtyp präpariert wurden, im Western Blot biochemisch überprüft (Abb. 14B). Während das SecG-Protein mit den TM300 Membranvesikeln eindeutig nachgewiesen werden kann, fehlt die entsprechende Bande in den Membranvesikeln der Deletionsmutante. Damit war auch biochemisch die *secG*-Deletion gezeigt.

3.1.4.1. Die *secG*-Deletionsmutante von *S. carnosus* ist auch bei niedrigen Temperaturen lebensfähig

Die *secG*-Deletion bei *E. coli* (Nishiyama *et al.*, 1994) und *B. subtilis* (van Wely *et al.*, 1999) führt zu einem kältesensitiven Wachstumsverhalten. Allerdings ist diese Kältesensitivität im Falle von *E. coli* stammspezifisch (Flower *et al.*, 2000) und in *B. subtilis* nur unter Sekretionsstreß ausgeprägt. Um zu untersuchen, ob das SecG in *S. carnosus* eine essentielle Bedeutung bei niedrigen Temperaturen besitzt, wurde das Wachstum des Wildtyps mit dem der *secG*-Deletionsmutante bei 37 °C, 30 °C, 25 °C und 20 °C auf Festmedium verglichen (nicht gezeigt). Bei allen getesteten Temperaturen war kein signifikanter Unterschied zwischen den Koloniegrößen von Wildtyp und der Mutante feststellbar. Dies zeigte, dass unter den gewählten Bedingungen das SecG-Protein von *S. carnosus* offensichtlich nicht essentiell ist.

3.1.4.2. Die Überexpression eines Exportproteins in der *secG*-Deletionsmutante von *S. carnosus* führt zu einem verzögertem Wachstum bei 20 °C

In einer *secG*-Deletionsmutante von *B. subtilis* wird die leichte Kältesensitivität des Wachstums durch die Überproduktion eines Exportproteins stärker ausgeprägt (van Wely *et al.*, 1999). Während also ein Basisniveau der Proteinsekretion auch bei niedrigen Temperaturen in der *secG*-Deletionsmutante von *B. subtilis* aufrechterhalten werden kann, wird dies, so die Autoren, bei der Überexpression eines sekretorischen Proteins nicht ausreichend gewährleistet. Um in der *secG*-Deletionsmutante von *S. carnosus* TM300Δ*secG* das Wachstum unter Sekretionsstreß im Vergleich zum *S. carnosus* Wildtyp TM300 untersuchen zu können, wurden die beiden Stämme

mit dem Plasmid pXRppLip2hCT transformiert. Dieses Plasmid ermöglicht die sekretorische Expression eines Fusionsproteins, das aus dem Präpro-Anteil der Lipase (ppLip) von *S. hyicus* und 2 aufeinanderfolgenden humanen Calcitoninpeptiden (2hCT) besteht (Dilsen *et al.*, 2000). Die Transkription des Fusionsgens befindet sich unter der Kontrolle eines mit Xylose induzierbaren xyl-Promotor/Operators. Das Wachstum der Stämme TM300 Δ secG und TM300, die das Plasmid pXRppLip2hCT enthielten, wurde zunächst unter reprimierten (0,5% Glukose) und induzierten (0,5% Xylose) Bedingungen bei 37 °C, 25 °C und 20 °C auf Festmedium verglichen (Tab. 4).

Tab. 4: Wachstum von TM300 Δ secG (pXRppLip2hCT) bei Sekretionsstreß auf Festmedium.

Stamm	Glukose			Xylose		
	20 °C	25 °C	37 °C	20 °C	25 °C	37 °C
TM300 (pXRppLip2hCT)	++	++	++	++	++	++
TM300 Δ secG (pXRppLip2hCT)	++	++	++	+/-	++	++

Flüssigkulturen (10 µg/ml Chloramphenicol, 0,5% Glukose) von pXRppLip2hCT enthaltenen Zellen von TM300 und von TM300 Δ secG wurden auf Festmedium (10 µg/ml Chloramphenicol und 0,5% Glukose bzw. 0,5% Xylose) ausplattiert und die Größe der Kolonien bei 37 °C, 25 °C und 20 °C nach 14 Stunden, bzw. 2 - und 3 -Tagen kontrolliert. ++, Koloniedurchmesser $\geq$ 1mm; +/-, Koloniedurchmesser < 1mm.

Wie in Tabelle 4 dokumentiert, wird das Wachstum der pXRppLip2hCT enthaltenen Zellen von TM300 Δ secG im Vergleich zum Wildtyp unter Sekretionsstreß bei 20 °C leicht verzögert.

Um den auf Festmedium gefundenen Wachstumsunterschied unter Sekretionsstreß-Bedingungen zwischen der Mutante und dem Wildtyp genauer quantifizieren zu können, wurden vergleichbare Experimente in Flüssigmedium durchgeführt (Abb. 15).

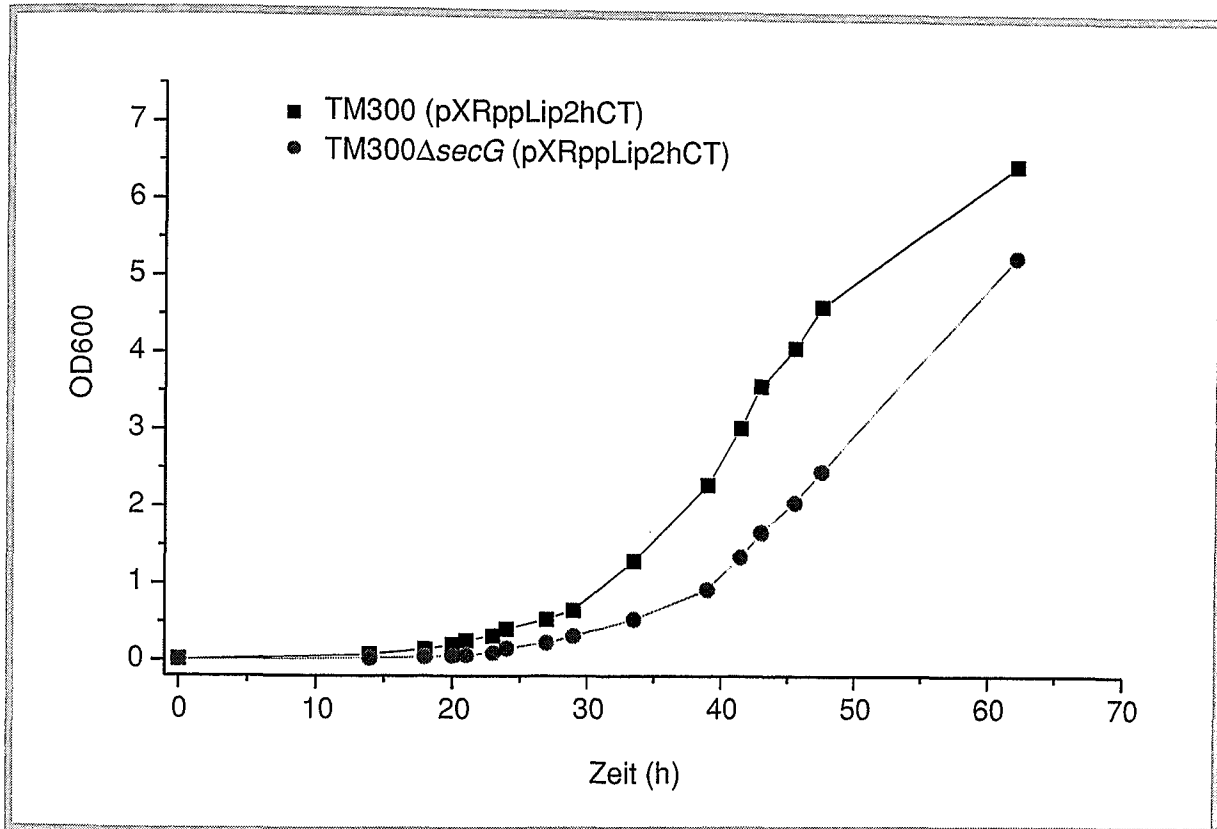


Abb. 15: Wachstum der Stämme TM300 (pXRppLip2hCT) und TM300ΔsecG (pXRppLip2hCT) bei 20 °C in Flüssigmedium. Die Stämme wurden unter reprimierten Bedingungen (0,5% Glukose) bei 37 °C angezogen und anschließend in Flüssigmedium auf eine OD von 0,01 (10 µg/ml Chloramphenicol, 0,5% Xylose) eingestellt und das Wachstum der Zellen bei 20 °C über 2,5 Tage verfolgt.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, ist das Wachstum von TM300ΔsecG (pXRppLip2hCT), im Vergleich zum Wildtyp, in der Anfangsphase ("lag"-Phase) leicht verzögert. In der exponentiellen Wachstumsphase erreicht die Mutante jedoch eine ähnliche Teilungsrate wie der Wildtyp.

Die *secG*-Deletionsmutante von *S. carnosus* ohne pXRppLip2hCT wächst bei 20 °C auf Platte vergleichbar wie der *S. carnosus* Wildtyp (Kapitel 3.1.4.1.). Dieser Befund deutet darauf hin, dass trotz der *secG*-Deletion der Protein-Export bei der niedrigen Temperatur auf einem für das Wachstum der Zellen ausreichenden Niveau möglich ist. Bei Überexpression eines Exportproteins ist bei 20 °C offensichtlich der Export mindestens eines essentiellen Exportproteins beeinträchtigt, was, wie in Abbildung 15 gezeigt, ähnlich wie in *B. subtilis* zu einer Wachstumsverzögerung führt.

3.1.4.3. Die *secG*-Deletionsmutante von *S. carnosus* weist einen Prozessierungsdefekt auf

Um den Effekt der *secG*-Deletion auf den Protein-Export zu untersuchen, wurde der Export zwischen dem *S. carnosus* Wildtyp und der *secG*-Deletionsmutante bei 37 °C mit Hilfe der Pulse Chase-Technik verglichen (Abb. 16A). Als Modellprotein wurde hierbei das Lipase-Calcitonin-Fusionsprotein eingesetzt. Mit Hilfe eines Pulse Chase-Experimentes kann man die Kinetik, mit der

ein Vorläuferprotein in die reife Form überführt wird (dieses entspricht der Prozessierung oder Translokation) bestimmen. Hierzu werden alle neusynthetisierten Zellproteine mit ^{35}S -Met markiert. Nach Zellaufschluß werden die Proteine von Interesse über Immunfällung mit einem spezifischen Antiserum isoliert und nach SDS-PAGE autoradiographisch oder mit Hilfe eines Phosphorimagers dargestellt.

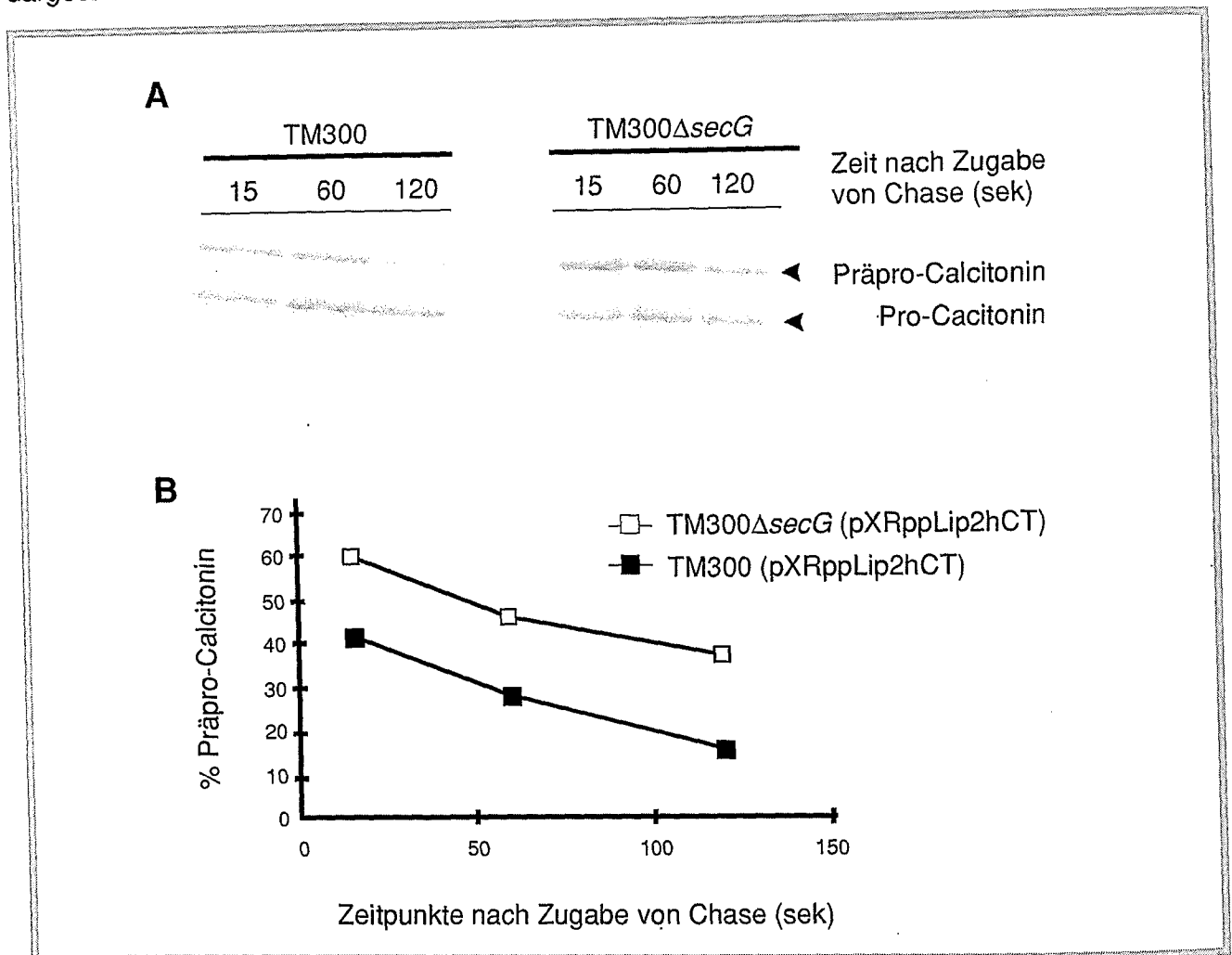


Abb. 16 : *In vivo*-Sekretionsverhalten des Präpro-Calcitonins in *S. carnosus* TM300 (pXRppLip2hCT) bzw. TM300 Δ secG (pXRppLip2hCT) bei 37 °C. Die Stämme wurden über-Nacht in Minimalmedium bei 37 °C angezogen und am nächsten Morgen frisches Medium mit einer OD von 0,2 angeimpft. Nach weiterer Kultivierung bei 37 °C wurden die Zellen bei einer OD zwischen 0,6 - 0,8 geerntet und anschließend mit Minimalmedium (ohne Methionin, mit 0,5% Xylose) gewaschen. Die Zellen wurden in frischem Medium (ohne Methionin, mit 0,5% Xylose) resuspendiert und für weitere 30 - 40 min bei 37 °C inkubiert ("ausgehungert"). Anschließend wurden die Zellen mit radioaktivem ^{35}S -Met markiert (Pulse) und nach Zugabe eines Überschuß nicht radioaktiven Methionins (Chase) wurden nach 15 -, 60 - und 120 Sekunden Proben entnommen und die Zellen mit TCA (8%) abgetötet. Nach dem Zellaufschluß wurde das Fusionsprotein mit Lipaseantikörpern (der polyklonale Lipaseantikörper reagiert auch mit dem Pro-Anteil der Lipase von *S. hyicus*) immunopräzipitiert, in einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Hilfe eines Phosphorimagers sichtbar gemacht und mit dem Programm AIDA (RAYTEST) ausgewertet. **A** Pulse Chase-Experiment mit den oben erwähnten Stämmen. **B** Kinetik der Präpro-Calcitonin Translokation. Um die Quantifizierung der in Abb. 16A dargestellten Pulse Chase-Autoradiographie vorzunehmen, mußte die Anzahl der in den einzelnen Lipase-Calcitonin-Spezies

(Präpro-Calcitonin bzw. Pro-Calcitonin) enthaltenen Methioninreste (Präpro-Calcitonin: 6 Met; Pro-Calcitonin: 4 Met) berücksichtigt werden, welche letztlich die Signalintensität der Banden in der Autoradiographie bestimmt. Die Signalintensität der einzelnen Banden wurde deshalb bezüglich der Methioninreste normiert, indem der jeweilige Meßwert mit einem "Normierungsfaktor" (Präpro-Calcitonin Normierungsfaktor 1, Pro-Calcitonin Normierungsfaktor 1,5) multipliziert wurde. Dadurch wurden die Signalintensitäten der beiden Lipase-Calcitonin-Spezies in der Autoradiographie direkt miteinander vergleichbar. Die Signalstärke der beiden Banden wurde mit Hilfe des Programmes AIDA (RAYTEST) errechnet. Um die Effizienz der Translokation/Prozessierung des Lipase-Calcitonin-Fusionsproteins zu messen, wurde für jeden Zeitpunkt der prozentuale Anteil des unprozessierten Vorläufers am insgesamt in einer Gelspur enthaltenen Lipase-Calcitonin-Fusionsproteins bestimmt. Als Gesamtmenge an Lipase-Calcitonin-Fusionsprotein pro Spur wurde die Summe der normierten Signalstärken von Präpro-Calcitonin und Pro-Calcitonin angesehen. Diese wurde für jeden Zeitpunkt als 100% angesetzt. Um die Prozessierungskinetik des Präpro-Calcitonins zu beschreiben, wurde für jeden Zeitpunkt der Anteil an Präpro-Calcitonin bezogen auf die Gesamtmenge gegen die Zeit nach Zugabe von Chase aufgetragen.

Wie in Abbildung 16A zu erkennen ist, ist die Prozessierung des Präpro-Calcitonins in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp leicht verzögert. Die quantitative Auswertung ergab, dass zu allen Zeitpunkten nach Zugabe des Chase zwischen 15% und 20% mehr Präpro-Calcitonin in den Zellen von TM300 Δ secG im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden kann (Abb. 16B).

Die höhere *in vivo*-Translokationsaktivität von TM300 im Vergleich zu TM300 Δ secG, zeigt, dass das SecG-Protein am effizienten Export von Vorläuferproteinen in *S. carnosus* beteiligt ist.

3.1.4.4. Der Import der Präpro-Lipase in Membranvesikel der secG-Deletionsmutante von *S. carnosus* ist massiv beeinträchtigt

Im *E.coli*-System ist die Rekonstitution der gereinigten Sec-Komponenten Y und E in Proteoliposomen für eine SecA abhängige Proteintranslokation ausreichend (Brundage *et al.*, 1990). Allerdings führt die zusätzliche Anwesenheit des SecG-Proteins zu einer Stimulation der Proteintranslokation. SecE, SecY, SecA und ATP sind für diese SecG-abhängige Stimulation essentiell (Nishiyama *et al.*, 1993). Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass das SecG-Protein von *S. carnosus* am Protein-Export *in vivo* beteiligt ist. Um zu untersuchen, ob das *S. carnosus* SecG-Protein bei der *in vitro*-Translokation eine ähnliche Rolle spielt wie das *E. coli* SecG, wurde die posttranslationale Translokation der Präpro-Lipase aus *S. hyicus* in invertierte Membranvesikel (IMVs) von *S. carnosus* Wildtyp TM300 und der *S. carnosus* secG-Deletionsmutante TM300 Δ secG untersucht (Abb. 17). Im *in vitro*-System werden Membranvesikel eingesetzt, bei denen die Orientierung der Plasmamembran und somit auch die der darin lokalisierten Membranproteine im Vergleich zur *in vivo*-Situation invertiert ist (inside-out Cytoplasmamembranvesikel). Dies bedeutet, dass die ursprüngliche cis-Seite der Cytoplasmamembran in diesen Vesikeln nach außen weist während die trans-Seite nun in das

Lumen weist. Zugabe von SecA, ATP und einem Vorläuferprotein (Siehe Text in Legende 17) zu den IMVs bewirken den Import des Vorläuferproteins in das Lumen. Die Signalsequenz des Vorläuferproteins wird auch im *in vitro*-System während oder kurz nach dem Import durch eine Signalpeptidase abgetrennt. Der Import des Proteins kann durch einen anschließenden Verdau der IMVs mit z. B. Proteinase K bestimmt werden. Proteinase K spaltet alle Proteine außerhalb der Membranvesikel, während die Proteine im Lumen für das Enzym nicht zugänglich sind. Setzt man für die Translokation ein radioaktiv markiertes Vorläuferprotein ein, kann dessen Import nach Proteinase-Verdau und SDS-PAGE in einer Autoradiographie leicht nachgewiesen werden.

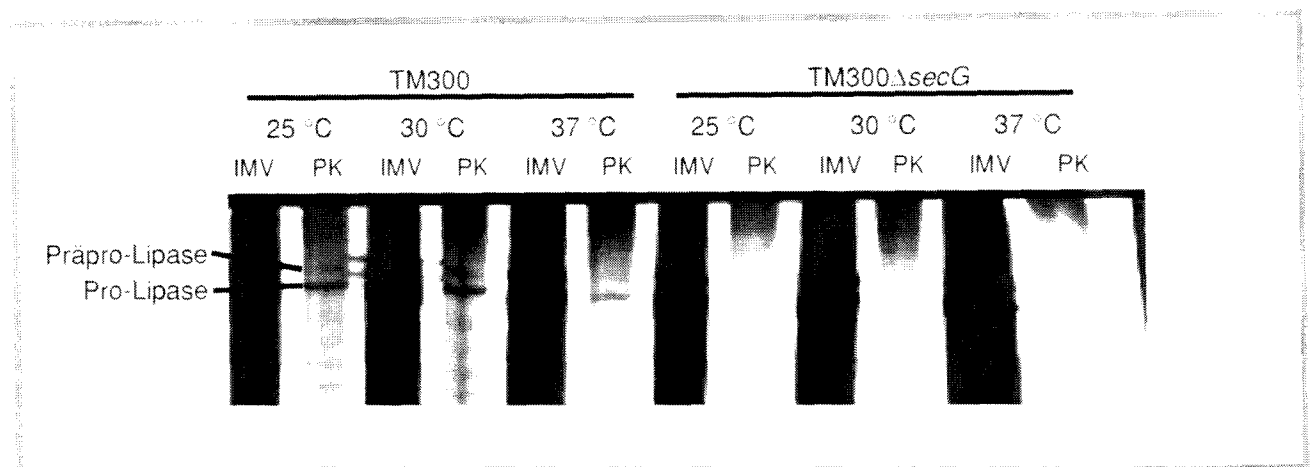


Abb. 17: Posttranslationale Translokation der Präpro-Lipase in IMVs von *S. carnosus* TM300 und *S. carnosus* TM300 Δ secG. Die Synthese der Präpro-Lipase im zellfreien System (Schimz *et al.*, 1995) erfolgte während 2 Stunden bei 30 °C. Nach der Beendigung der Translation (durch 20 μ M Puromycin) wurde die Translokation durch Zugabe von *S. carnosus* SecA, IMVs, ATP, NADH₂ sowie Puffer und Ionen (Schimz *et al.*, 1995) für 1 Stunde bei den angegebenen Temperaturen durchgeführt. Die Ansätze wurden dann halbiert; eine Hälfte wurde mit eiskalter Trichloressigsäure (15% w/v) im Verhältnis 1:1 gemischt und im Eisbad über Nacht inkubiert (IMV). Die andere Hälfte wurde vor der TCA-Fällung mit 250 μ g/ml Proteinase K (PK) versetzt und für 30 min bei 25 °C inkubiert. Die TCA-Pellets wurden in Gel-Loading-Puffer gelöst, für 5 min bei 96 °C erhitzt und anschließend im SDS-Gel aufgetrennt und die Banden autoradiographisch dargestellt.

Es zeigte sich, dass unabhängig von der gewählten Translokationstemperatur (25 °C, 30 °C und 37 °C) ein um den Faktor 20 erhöhter Import der Präpro-Lipase in die IMVs von *S. carnosus* TM300 (Wildtyp), im Vergleich zu den IMVs von TM300 Δ secG, erfolgte. Erkennbar ist dieses durch die Proteinase K-resistenten Banden (siehe dazu Text in Legende 17), die nach Translokationsreaktion und anschließender Inkubation mit Proteinase K nur mit den IMVs des Wildtyps erhalten wurden. Auch nach Inkubation mit Proteinase K kann die Präpro-Lipase nachgewiesen werden (Abb. 17, Gelspuren PK von TM300). Der Lipase-Vorläufer liegt demnach entweder in einer Proteinase K resistenten Konformation außerhalb der IMVs vor oder er befindet sich noch im Translokator und ist dadurch vor der proteolytischen Aktivität des Enzyms geschützt.

Die dramatisch höhere Translokationsaktivität der Wildtyp-IMVs im Vergleich zu den IMVs der Mutante zeigte, dass ähnlich wie in *E. coli* auch das *S. carnosus* SecG-Protein die SecA-abhängige Proteintranslokation an der SecYE-Translokationspore massiv stimuliert.

3.1.5. Konstruktion einer *secG*-Austauschmutante von *B. subtilis*

Um zu untersuchen, ob das *S. carnosus* SecG-Protein die Funktionen des SecG in *B. subtilis* übernehmen kann, wurde eine *secG*-Austauschmutante von *B. subtilis* konstruiert. In dieser Mutante ist das *secG*-Gen von *B. subtilis* auf dem Chromosom von *B. subtilis* gegen das *secG*-Gen von *S. carnosus* ersetzt ist (replacement mutant *secG*, RMG). Erreicht wurde dies mit dem Austauschplasmid pORlsecGSc. Für die Konstruktion von pORlsecGSc, wurden nacheinander ein zum *B. subtilis* *secG* stromaufwärtsliegendes Fragment (*yvaM*), das *S. carnosus* *secG* und ein zum *B. subtilis* *secG* stromabwärtsliegendes Fragment (*yvaK*) in das Plasmid pORl240 (Leenhouts *et al.*, 1996) kloniert. Der *B. subtilis* Wildtyp DB104 wurde mit dem Austauschplasmid transformiert und die erhaltenen Transformanten, wie im Material und Methodenteil (Kapitel 2.5.3.12.) ausführlich beschrieben, weiterbehandelt. Von drei unabhängigen Experimenten wurden acht potentielle RMG-Mutanten isoliert. Repräsentativ für die acht Isolate wurde der *secG*-Austausch in einem Southern Blot-Experiment überprüft (Abb. 18).

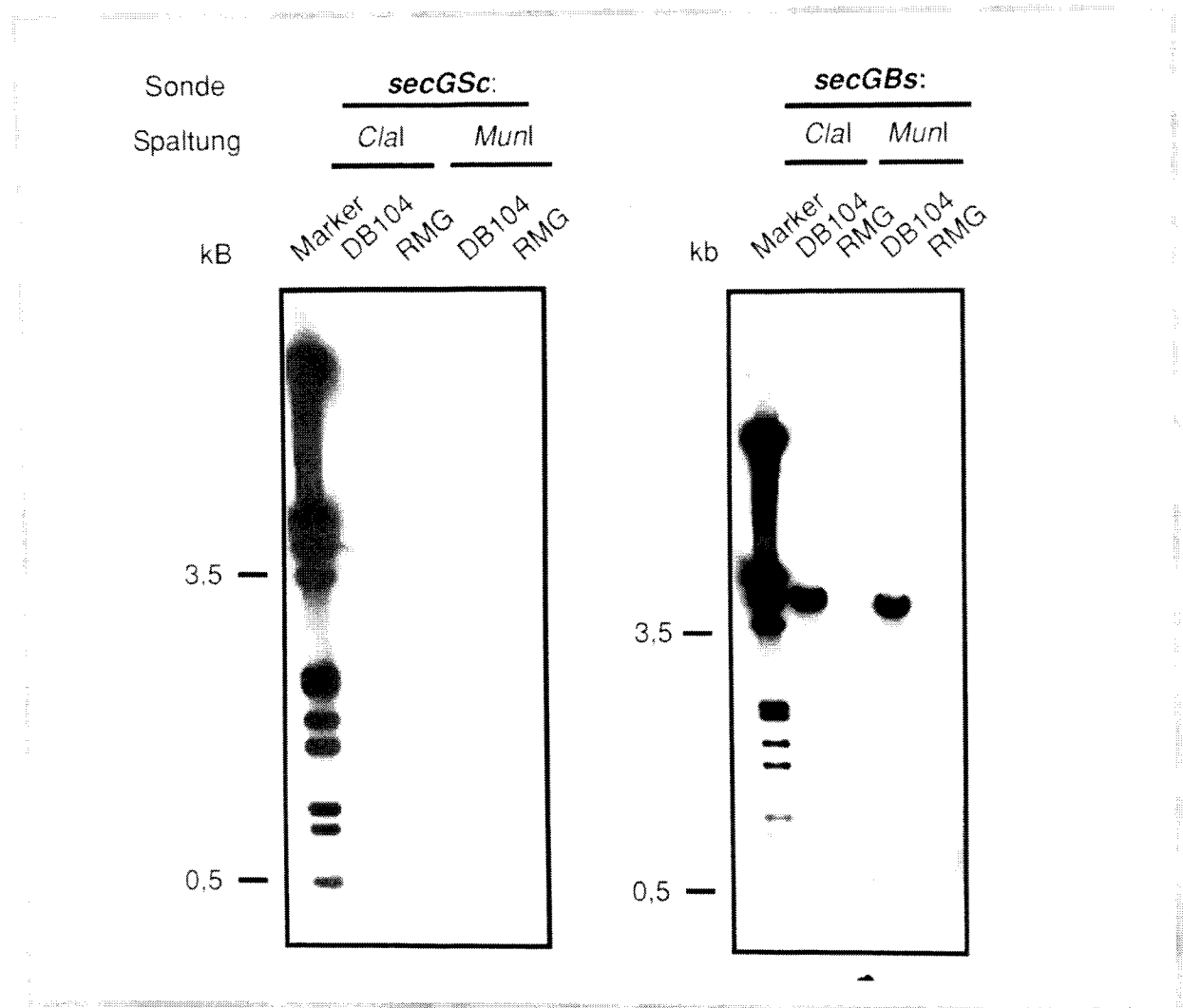


Abb. 18: Genetische Überprüfung der *secG*-Austauschmutante von *B. subtilis* (RMG). Die chromosomale DNA des *B. subtilis* Wildtyps DB104 und der RMG, wurden mit *Clal* und mit *MunI* vollständig gespalten, in einem 0,8%-igem Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung der Membranen wurde mit einer Dig-markierten *secG*-Sonde von *S. carnosus* bzw. von *B. subtilis* durchgeführt. Marker: Dig-markierter λ /III.

Eine *Clal* bzw. *MunI*-Schnittstelle, die nur im *secG*-Gen von *S. carnosus* vorkommt (Abb. 13), führt, wie in Abbildung 18 gezeigt, nach Verdau der chromosomalen DNA der RMG mit *Clal* bzw. *MunI* und Hybridisierung mit der *S. carnosus* *secG*-Sonde zu zwei Signalen. Hybridisierungssignale, mit chromosomal verdauter DNA von DB104 wurden unter diesen Bedingungen (30% Formamid) nicht detektiert. Hybridisierung mit der *B. subtilis* *secG*-Sonde führte nach Spaltung mit *Clal* bzw. *MunI* zu jeweils einem starken Signal mit chromosomaler DNA von DB104 und im Falle des *Clal*-Verdaus zu zwei schwächeren Signalen mit der chromosomalen DNA der RMG.

Die Ergebnisse der Southern Blot-Analysen zeigen eindeutig den Austausch des *secG*-Gens von *B. subtilis* auf dem Chromosom von *B. subtilis* DB104 durch das entsprechende Gen von *S. carnosus*. Der Genaustausch ist in *B. subtilis* demnach nicht lethal.

3.1.5.1. Nachweis des *S. carnosus* secG-Genproduktes in der RMG

Um die *S. carnosus* secG-Expression in der RMG sicherzustellen, sollte das Genprodukt mit Hilfe des *S. carnosus* SecG-Antikörpers in einem Western Blot-Experiment nachgewiesen werden. Hierfür wurden die Proteine der Membranvesikel von DB104, einer secG-Deletionsmutante von *B. subtilis* (DB Δ secG) (zur Verfügung gestellt durch van Wely, Universität Groningen) und der RMG in einem SDS-Gel aufgetrennt und das Western Blot-Experiment durchgeführt (Abb. 19). In den Membranvesikel der RMG wurde eindeutig eine Bande detektiert, die auf Grund ihrer Größe (9 kDa) dem *S. carnosus* SecG-Protein zugeordnet werden konnte. Das *S. carnosus* SecG-Antiserum zeigt eine hohe Spezifität für das *S. carnosus* SecG-Protein, da keine kreuzreaktive Bande mit dem *B. subtilis* SecG-Protein in der Gelspur DB104 erkennbar war.

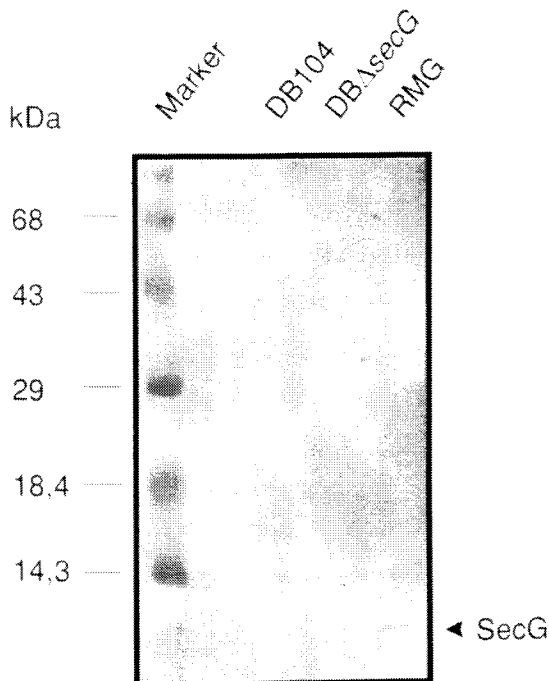


Abb. 19: Nachweis des SecG-Austausches in *B. subtilis* durch Western Blotting. Die Proteine der Membranvesikel von DB104, DB Δ secG und der RMG von *B. subtilis* wurden in einem SDS-Gel (15%) aufgetrennt und anschließend ein Western Blot-Experiment durchgeführt, bei dem der Peptidantikörper des *S. carnosus* SecG-Proteins eingesetzt wurde (1:500). Die aufgetragenen Proteinmengen entsprachen jeweils einem Milliliter einer Kultur mit einer OD600 von 1.

3.1.5.2. Die RMG ist bei niedrigen Temperaturen lebensfähig

Das Wachstum der Zellen der RMG, DB104 und von DB Δ secG wurde bei 20 °C und 15 °C auf Festmedium verglichen (Tab. 5).

Tab. 5: Wachstum von DB104, DB Δ secG und der RMG auf Festmedium. Die Stämme wurden in Flüssigmedium bei 37 °C angezogen und die Zellen anschließend auf Festmedium ausgestrichen. Das Wachstum der Zellen wurde bei 20 °C und 15 °C nach 2- bzw. 4-Tagen kontrolliert. +: Koloniedurchmesser $\geq$ 1mm; +/-: Koloniedurchmesser < 1mm.		
Stamm	15 °C	20 °C
DB104	+	+
DB Δ secG	+/-	+
RMG	+	+

Wie in Tabelle 5 dokumentiert, wird bei 15 °C eine Wachstumsverzögerung bei der Δ secG-Mutante, im Vergleich zum Wildtyp und der RMG beobachtet. Dies zeigte, dass das *S. carnosus* SecG-Protein die Funktionen in *B. subtilis* übernehmen kann.

3.1.5.3. Das *S. carnosus* SecG-Protein kann den unter Sekretionsstreß ausgeprägten Wachstumsdefekt der secG-Deletionsmutante von *B. subtilis* komplementieren

Die in Tabelle 5 dargestellte Kältesensitivität des Wachstums von DB Δ secG wird durch die Überproduktion eines Exportproteins (Amylase von *B. amyloliquefaciens*) weiter ausgeprägt (van Wely *et al.*, 1999). Dies bedeutet, dass der effiziente Protein-Export von mindestens einem essentiellen Vorläuferprotein durch die Überproduktion des Amylasevorläufers nicht gewährleistet und somit wachstumslimitierend wird. Um vergleichbare Sekretionsstreß-Bedingungen zu erreichen, wurden die Zellen von DB104, von DB Δ secG und der RMG mit dem Plasmid pSX63 transformiert. Das Plasmid trägt das *amyL*-Gen von *B. licheniformis* und kodiert für die Amylase. Die Transkription des Gens in den resultierenden Stämmen DB104 (pSX63), DB Δ secG (pSX63) und RMG (pSX63) befindet sich unter der Kontrolle des mit Xylose induzierbaren bzw. mit Glukose reprimierbaren *xyl*-Promotor/Operators. Um einen weiteren Hinweis zu erhalten, ob das *S. carnosus* SecG die Funktionen des *B. subtilis* SecG-Proteins beim Protein-Export übernehmen kann, wurde das Wachstum von DB104 (pSX63), DB Δ secG (pSX63) und der RMG (pSX63) unter induzierten Bedingungen zunächst auf Festmedium bei verschiedenen Temperaturen verglichen (Tab. 6).

Tab. 6: Wachstum von DB104 (pSX63), RMG (pSX63) und von DB Δ secG (pSX63) auf Festmedium.

Stamm	Expression	20 °C	25 °C	30 °C	37 °C
DB104 (pSX63)	Prä-AmyL	+++	+++	+++	+++
RMG (pSX63)	Prä-AmyL	+++	+++	+++	+++
DB Δ secG (pSX63)	Prä-AmyL	+/-	+/-	++	++

Die Stämme wurden unter reprimierten Bedingungen in Flüssigkulturen (15 µg/ml Kanamycin, 0,5% Glukose) bei 37 °C angezogen, auf Festmedium (15 µg/ml Kanamycin, 0,5% Xylose) ausgestrichen und bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde täglich kontrolliert. +++: wächst wie DB104 (pSX63), ++: wächst verzögert im Vergleich zu DB104 (pSX63), +/-: geringes Wachstum/sehr kleine Kolonien im Vergleich zu DB104 (pSX63).

Es zeigte sich, daß bereits bei 37 °C eine Wachstumsverzögerung der pSX63 enthaltenden Zellen von DB Δ secG im Vergleich zu den pSX63 enthaltenden Zellen von DB104 und der RMG beobachtet wird. Dieser Wachstumsdefekt von DB Δ secG (pSX63) ist im Vergleich zu DB104 (pSX63) und RMG (pSX63) bei 25 °C bzw. 20 °C noch weiter ausgeprägt. Um das auf Festmedium beobachtete Wachstum bei 37 °C genauer zu untersuchen, wurde das Wachstum der Stämme unter reprimierten (Abb. 20A) und unter induzierten (Abb. 20B) Bedingungen in Flüssigmedium bei 37 °C verglichen.

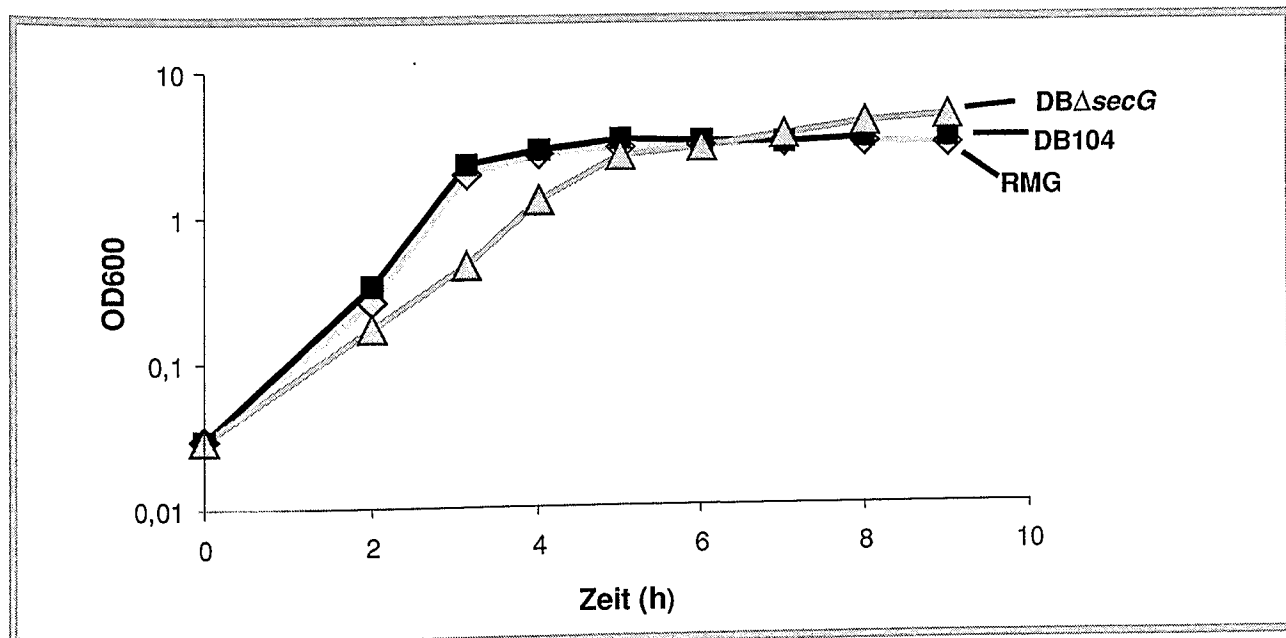


Abb. 20A: Wachstum von DB104 (pSX63), RMG (pSX63) und DB Δ secG (pSX63) in Flüssigmedium unter reprimierten Bedingungen bei 37 °C. Die Stämme wurden in Flüssigmedium bei 37 °C angezogen (15µg/ml Kanamycin, 0,5% Glukose), in frischem Flüssigmedium (15µg/ml Kanamycin, 0,5% Glukose) auf eine OD von 0,03 eingestellt und das Wachstum der Zellen photometrisch verfolgt.

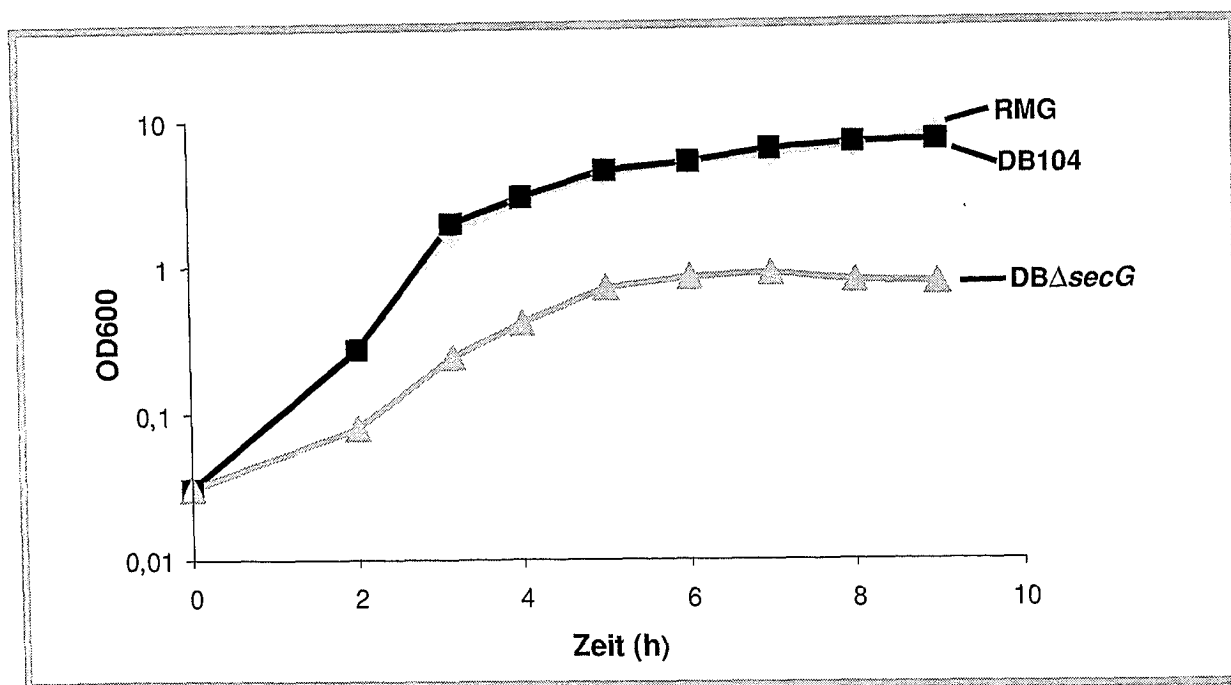


Abb. 20B: Wachstum von DB104 (pSX63), RMG (pSX63) und DBΔsecG (pSX63) in Flüssigmedium unter induzierten Bedingungen bei 37 °C. Die Vorgehensweise in diesem Experiment war die Gleiche wie in Legende 20A beschrieben. Allerdings wurde das Flüssigmedium in diesem Experiment anstatt mit Glukose mit Xylose supplementiert (0,5%).

Wie in Abbildung 20A dargestellt, verläuft das Wachstum der pSX63 enthaltenden Zellen von *B. subtilis* Wildtyp DB104 und der RMG unter reprimierten Bedingungen nahezu identisch, während die Zellen von DBΔsecG (pSX63) im Vergleich dazu in der exponentiellen Wachstumsphase etwas verzögert wachsen. Die optische Dichte der Flüssigkulturen von DB104 (pSX63) und RMG (pSX63) wird jedoch von DBΔsecG (pSX63) am Ende der exponentiellen Wachstumsphase ebenfalls erreicht. Signifikanter ist der Wachstumsdefekt von DBΔsecG (pSX63) unter induzierten Bedingungen. Wie in Abbildung 20B gezeigt, ist sowohl die Teilungsrate als auch die maximal erreichte optische Dichte von DBΔsecG (pSX63) im Vergleich zu DB104 (pSX63) und RMG (pSX63) deutlich geringer. Dies zeigte, dass das *S. carnosus* SecG-Protein den von DBΔsecG beobachteten Wachstumsdefekt verhindert.

3.1.5.4. Die RMG zeigt im Gegensatz zur secG-Deletionsmutante von *B. subtilis* keine Exportdefekte der Amylase bzw. der Lipase

In *B. subtilis* ist ein funktioneller Protein-Export für das Wachstum essentiell. Aus den Resultaten in Kapitel 3.1.5.3. kann man demnach vermuten, dass das *S. carnosus* SecG-Protein die Funktionen des SecG in *B. subtilis* während des Protein-Exports übernehmen kann. Um dieses direkt zu untersuchen, wurde der Protein-Export der Amylase in den Stämmen DB104 (pSX63), RMG (pSX63) und DBΔsecG (pSX63) (Abb. 21 und 22) und der Export der durch pLipPS1kan kodierten

Präpro-Lipase von *S. hyicus* in den Stämmen DB104 (pLipPS1kan), RMG (pLipPS1kan) und DB Δ secG (pLipPS1kan) (Abb. 23) bei 37 °C verglichen.

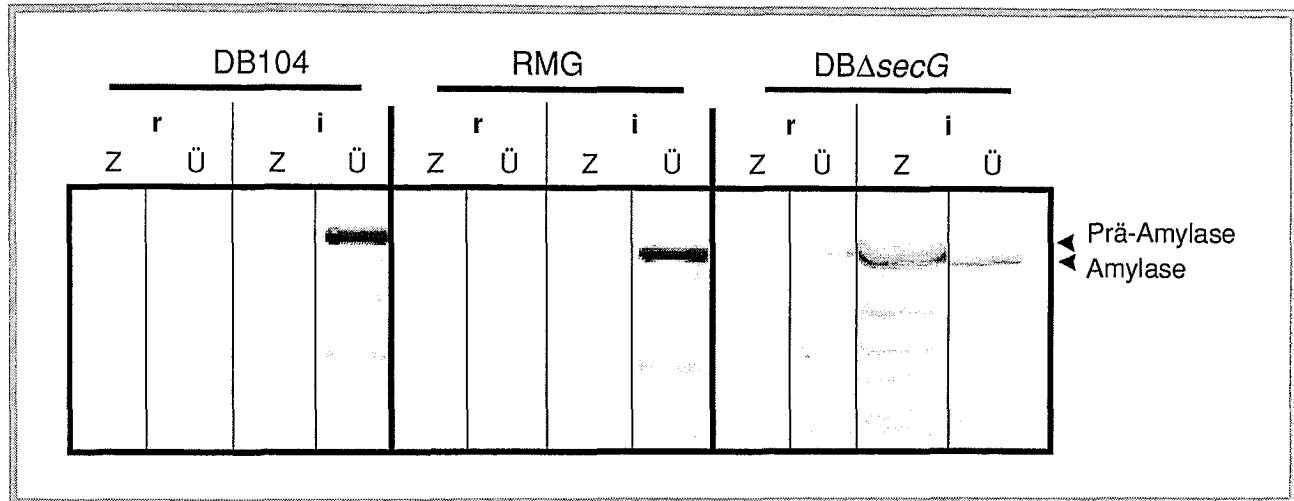


Abb. 21: Amylaseexport bei 37 °C (Western Blot). Die pSX63 enthaltenden Zellen von *B. subtilis* Wildtyp DB104, RMG und DB Δ secG wurden unter reprimierten (r; 0,5% Glukose) und induzierten (i; 0,5% Xylose) Bedingungen in Flüssigmedium kultiviert. Die Zellen (Z) wurden vom Überstand (Ü) getrennt. Nach einer SDS-PAGE wurde die Amylase mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Hierbei zeigte sich, dass wie in Abbildung 21 dargestellt, in den Zellfraktionen und Überständen von DB104 (pSX63), RMG (pSX63) und DB Δ secG (pSX63) unter reprimierten Bedingungen (0,5% Glukose) keine Amylase nachgewiesen werden kann. Induziert man jedoch die Trankription des *amyL*-Gens durch Xylose (0,5%), kann das Genprodukt in den Kulturüberständen der drei Stämme nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur RMG (pSX63) und DB104 (pSX63) wird die Amylase in den Zellen von DB Δ secG (pSX63) sehr ineffizient transloziert. Erkennbar ist dies durch die massive Akkumulation der Prä-Amylase in der Zellfraktion von DB Δ secG (pSX63). Dies bedeutet, dass der beobachtete Wachstumsdefekt der Mutante bei Sekretionsstreß aus einem ineffizienten Protein-Export resultiert.

Um die Prozessierungskinetik der Amylase in den Stämmen von RMG (pSX63), DB104 (pSX63) und DB Δ secG (pSX63) vergleichen zu können, wurde ein Pulse Chase-Experiment bei 37 °C durchgeführt (Abb. 22).

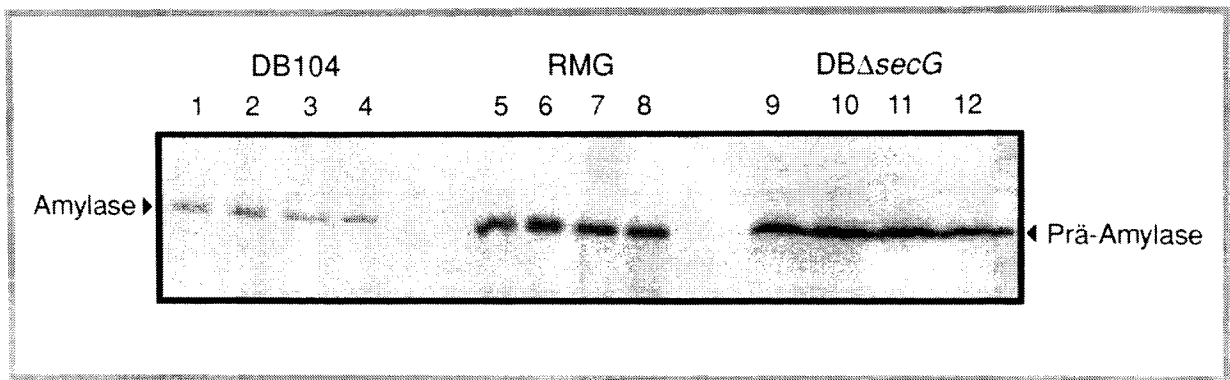


Abb. 22: Prozessierungskinetik der Amylase bei 37 °C (Pulse Chase-Experiment). Die Transkription des *amyL*-Gens in den Zellen von DB104 (pSX63), RMG (pSX63) und DB Δ secG (pSX63) wurde 10 min vor der Markierung mit 35 S-Methionin durch Zugabe von Xylose (0,5%) induziert. Nach dem Chase wurden Proben nach 15 (Spuren 1, 5 und 9), 60 (Spuren 2, 6 und 10), 120 (Spuren 3, 7 und 11) und 300 Sekunden (Spuren 4, 8 und 12) genommen und die Zellen mit TCA abgetötet. Nach Aufschluß der Zellen und Immunpräzipitation mit einem spezifischen Amylaseantikörper wurden die Proteine im SDS-Gel (10%) aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt.

Dabei zeigte sich, daß im Wildtyp und der RMG zu allen Zeitpunkten nach Zugabe von Chase jeweils eine Bande gleicher Größe nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich dazu waren die Banden bei der Mutante geringfügig höher. Da der Unterschied zwischen der Prä-Amylase und der reifen Amylase nur 2 kDa beträgt, wurden die Banden in den Gelspuren des Wildtyps und der RMG der reifen Amylase und die Banden in den Gelspuren der Mutante der Prä-Amylase zugeordnet. Demnach wird die Amylase im Gegensatz zu DB Δ secG in den Stämmen DB104 (pSX63) und RMG (pSX63) sehr schnell und effizient transloziert.

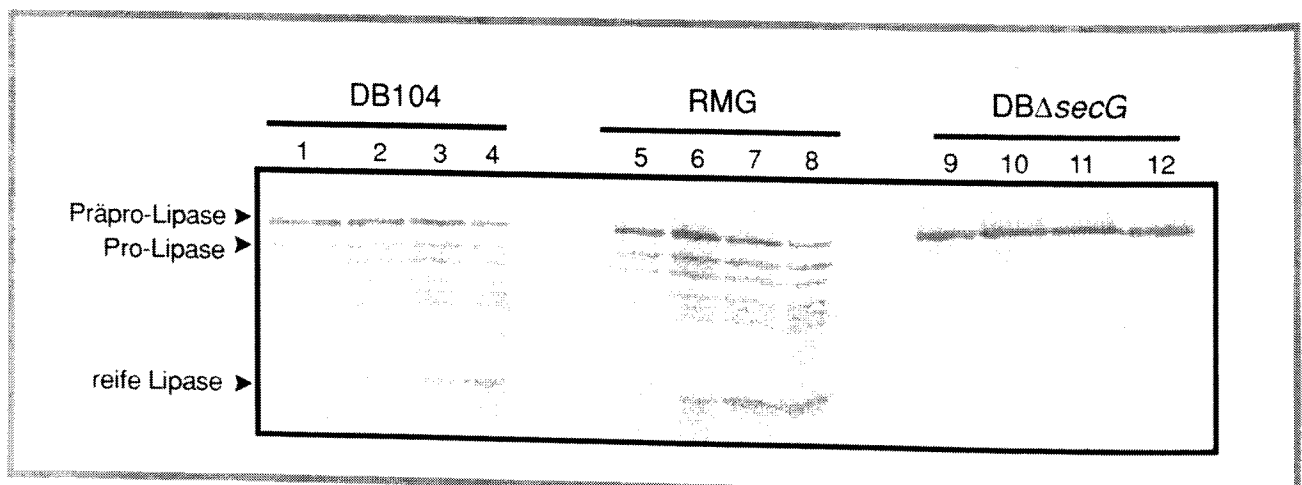


Abb. 23: Prozessierungskinetik der Präpro-Lipase bei 37°C (Pulse Chase-Experiment). Die pLipPS1kan (Plasmid kodiert für die Präpro-Lipase von *S. hyicus*; das Gen wird von seinem eigenem Promotor konstitutiv transkribiert) enthaltenen Zellen von *B. subtilis* Wildtyp DB104, RMG und DB Δ secG von *B. subtilis* wurden mit radioaktiven 35 S-Methionin für 1 Minute markiert und Proben nach Zugabe von kaltem überschüssigen Methionin nach 15 (Spuren 1, 5 und 9), 60 (Spuren 2, 6 und 10), 120 (Spuren 3, 7 und 11) und 300 Sekunden (Spuren 4, 8 und 12) genommen. Nach dem Chase wurden Proben nach 15 (Spuren 1, 5 und 9), 60 (Spuren 2, 6 und 10), 120 (Spuren 3, 7 und 11) und 300 Sekunden (Spuren 4, 8 und 12) genommen und die Zellen mit TCA abgetötet.

Nach Aufschluß der Zellen und Immunpräzipitation mit einem spezifischen Lipaseantikörper wurden die Proteine im SDS-Gel (12,5%) aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt.

Ein ähnlicher Befund wurde mit der Lipase nach einem Pulse Chase-Experiment mit den Stämmen DB104 (pLipPS1kan), RMG (pLipPS1kan) und DB Δ secG (pLipPS1kan) erhalten. Wie in Abbildung 23 dargestellt, verläuft die Translokation der Lipase in der RMG und DB104 mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit. In beiden Stämmen wird die Präpro-Lipase (90 kDa) in die 86 kDa große Pro-Lipase prozessiert, welche dann durch Proteasen im Kulturüberstand bis zur reifen Lipase (46 kDa) abgebaut wird (Meens *et al.*, 1993). Die Präpro-Lipase wird in DB Δ secG (pLipPS1kan) sehr ineffizient transloziert. Zu keinem Zeitpunkt nach der Zugabe des Chase kann bei der Mutante die Pro-Lipase nachgewiesen werden.

Das unterschiedliche Exportverhalten der Amylase und Lipase zwischen dem *B. subtilis* Wildtyp und der RMG bzw. der Δ secG-Mutante von *B. subtilis* zeigt eindeutig, dass das *S. carnosus* SecG-Protein problemlos die Funktionen des SecG beim Protein-Export in *B. subtilis* übernehmen kann.

3.2. *B. subtilis* / *S. carnosus* Hybridtranslokasen als Methode für die *in vivo*-Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen bei der Proteintranslokation in *B. subtilis*

Versuche zur Sekretion von heterologen Proteinen in *B. subtilis* zeigen, dass es häufig Probleme bei der Translokation über die Cytoplasmamembran gibt. Eine Ursache liegt vermutlich in nicht optimalen Wechselwirkungen zwischen den Komponenten des Exportapparates und dem Vorläuferprotein. Um diese Engpässe zu umgehen, ist es wichtig die für die Sekretion relevanten Wechselwirkungen im Detail zu verstehen. Mit Hilfe von *B. subtilis* / *S. carnosus*-Hybridtranslokasen ist dies möglich. Ausgangspunkt für diese Arbeit war eine secA-Austauschmutante von *B. subtilis* in der das secA-Gen von *B. subtilis* auf dem Chromosom gegen das entsprechende Gen von *S. carnosus* ersetzt ist (RMA). Die Charakterisierung der RMA-Mutante zeigte, dass eine Störung der Wechselwirkung zwischen dem heterologen SecA und einer weiteren unbekannten *B. subtilis* Sec-Komponente vorliegt. Welche Wechselwirkung dies ist, war nicht bekannt. Das Ziel der Untersuchungen war es, durch das gezielte Einbringen von *S. carnosus* Translokasekomponenten in die RMA die gestörten Wechselwirkungen zwischen dem *S. carnosus* SecA und einer *B. subtilis* Translokase-Untereinheit zu identifizieren.

3.2.1. Konstruktion einer secA/G-Austauschmutante von *B. subtilis*

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, welche der *B. subtilis* Translokationskomponenten für die nicht optimalen Wechselwirkungen mit dem heterologen SecA-Protein verantwortlich sein könnte, wurden Kenntnisse über die Proteintranslokation von *E. coli* herangezogen. Von *E. coli* ist bekannt,

dass während der Proteintranslokation die Membraninsertion- und Deinsertionszyklen des SecA-Proteins mit einer Topologieinversion des SecG-Proteins gekoppelt sind (Nishiyama *et al.*, 1996). Die *in vitro*-Studien der gekoppelten Strukturwechsel von SecA und SecG wurden durch die synthetische Lethalität einer kältesensitiven *secA*- und $\Delta secG$ -Doppelmutante von *E. coli* *in vivo* unterstützt (Suzuki *et al.*, 1998). In *B. subtilis* wird die Proteintranslokation über die Plasmamembran durch ein System katalysiert, das zur *E. coli* Translokase homolog ist (Overhoff *et al.*, 1991; van Wely *et al.*, 1999). Nimmt man für die Proteintranslokation in *B. subtilis* einen ähnlichen Mechanismus an wie in *E. coli*, war es demnach denkbar, dass die für eine effiziente Proteintranslokation erforderlichen Inversionszyklen des *B. subtilis* SecG-Proteins (SecG(Bs)) in Anwesenheit des *S. carnosus*-SecA in der RMA nicht optimal sind. Um dies zu überprüfen, wurde die potentiell gestörte SecA(Sc)-SecG(Bs)-Wechselwirkung durch eine optimale SecA(Sc)-SecG(Sc)-Wechselwirkung ersetzt. Hierfür wurde eine Austauschmutante von *B. subtilis*, in der sowohl das *secA*-Gen als auch das *secG*-Gen von *B. subtilis* chromosomal gegen die entsprechenden Gene von *S. carnosus* ausgetauscht sind, konstruiert (replacement mutant *secA/secG*, RMA/G).

Ausgangspunkt für die Konstruktion der RMA/G war die RMG-Mutante (Abschnitt 3.1.5.). Um in diesem Stamm zusätzlich das *B. subtilis* *secA*-Gen gegen das *secA*-Gen von *S. carnosus* auszutauschen, wurde die Mutante mit dem durch *Scal* gespaltenen Plasmid pDel6 (Klein & Freudl, in Vorbereitung) transformiert. Das Plasmid trägt den stromaufwärts liegenden Bereich (*orf183*) des *B. subtilis* *secA*-Gens, dahinter eine Chloramphenicol-Resistenzkassette, das *S. carnosus* *secA*-Gen und den stromabwärts liegenden Bereich des *B. subtilis* *secA*-Gens (*prfB*). Das Plasmid pDel6 kann in *B. subtilis* nicht replizieren und ein doppelter "cross-over" ins Chromosom durch die homologen Fragmente (*orf183* und *prfB*) ermöglicht. Der *secA*-Austausch in *B. subtilis* wird durch die Chloramphenicol-Resistenz angezeigt.

Etwa 15 – 20 Chloramphenicol-resistente Transformanten pro 1 µg linearisiertes Plasmid wurden nach Transformation der RMG mit dem *secA*-Austauschvektor erhalten. Der Austausch in der RMG wurde durch PCR- (nicht gezeigt) und Southern Blot-Experimente überprüft. Für den Southern Blot wurde die chromosomale DNA einer potentiellen RMA/G, der RMA und vom Stamm MKL1 mit *AvaI* und *KspI* gespalten (der Kontrollstamm MKL 1 unterscheidet sich vom Wildtyp DB104 durch einen stromaufwärts zum *secA*-Gen eingebrachten Chloramphenicol-Resistenzmarker; Klein & Freudl, in Vorbereitung). Als Sonden wurden die *secA*-Gene von *B. subtilis* (Abb. 24A) und *S. carnosus* (Abb. 24B) eingesetzt.

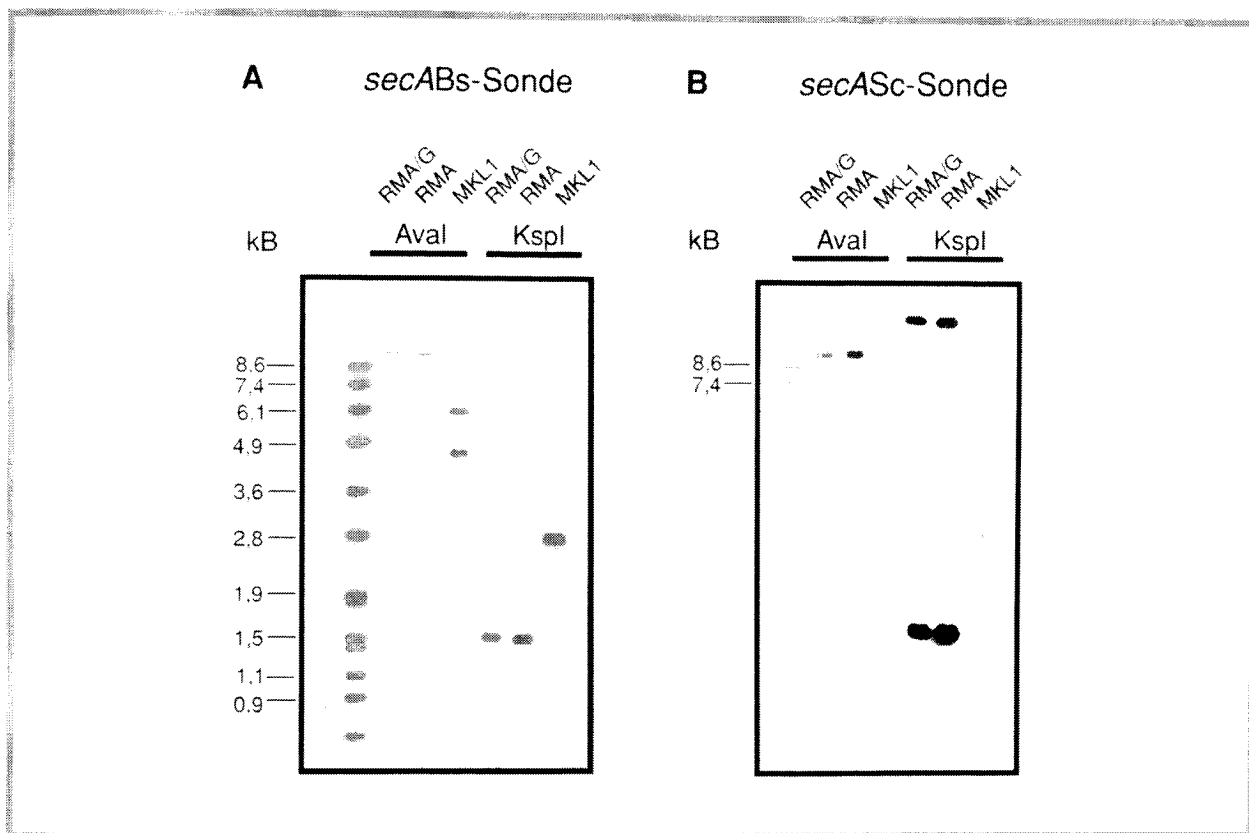


Abb. 24: Southern Blot Hybridisierung von chromosomaler DNA aus der RMA/G, der RMA und dem *B. subtilis* MKL1 mit dem *secA*-Gen aus *B. subtilis* und dem *secA*-Gen aus *S. carnosus* als Sonden. Die DNA wurde mit *Aval* und *Kspl* vollständig gespalten, in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Anschließend wurden die Membranen mit dem Dig-markierten *B. subtilis* *secA*-Gen (A) bzw. mit dem Dig-markierten *secA*-Gen von *S. carnosus* (B) hybridisiert. Der Nachweis der Hybridisierungssignale erfolgte mit Hilfe des "Digoxigenin labelling and detection"-System von Roche Molecular Biochemicals.

Das Enzym *Aval* spaltet im *secA*-Gen von *B. subtilis*, besitzt aber keine Erkennungsstelle im *secA*-Gen von *S. carnosus*, während wiederum nur das *secA*-Gen von *S. carnosus* eine Spaltstelle für *Kspl* enthält.

Aufgrund der *Aval*-Erkennungssequenz im *secA*-Gen von *B. subtilis*, ergibt die Spaltung der chromosomalen DNA von MKL1 mit *Aval* und Hybridisierung mit dem *B. subtilis* *secA*-Gen zwei etwa 5,8 kB und 4,2 kB große Signale. Dagegen wurden von der potentiellen RMA/G und der RMA unter diesen Bedingungen ein etwa 9,2 kB großes Hybridisierungssignal erhalten (Abb. 24A). Im Vergleich dazu werden aufgrund einer *Kspl*-Spaltstelle im *S. carnosus* *secA*-Gen zwei Signale mit *Kspl* gespaltenen DNA von der RMA und der RMA/G (Abb. 24B) und nur ein Signal vom MKL1-Stamm (Abb. 24A) detektiert. Hybridisierungssignale von MKL1 mit dem *S. carnosus* *secA*-Gen (Abb. 24B) wurden nicht erhalten. Offensichtlich ist eine Hybridisierung zwischen dem *B. subtilis* *secA*-Gen und der *S. carnosus* *secA*-Gensonde unter diesen stringenten Bedingungen (30% Formamid) nicht möglich.

Aus den Resultaten der Southern Blot-Experimente in Abbildung 24 konnte geschlossen werden, dass der Austausch des *B. subtilis* *secA*-Gens auf dem Chromosom der RMG gegen das *secA*-Gen von *S. carnosus* korrekt erreicht wurde. Damit lag eine RMA/G-Mutante vor.

3.2.1.1. Die RMA/G ist ebenso wie die RMA bei 37 °C lebensfähig und zeigt ein kältesensitives Wachstum

Das Wachstum von MKL1, RMA, RMG und RMA/G wurde auf Festmedium bei 37 °C und 25 °C miteinander verglichen (Abb. 25).

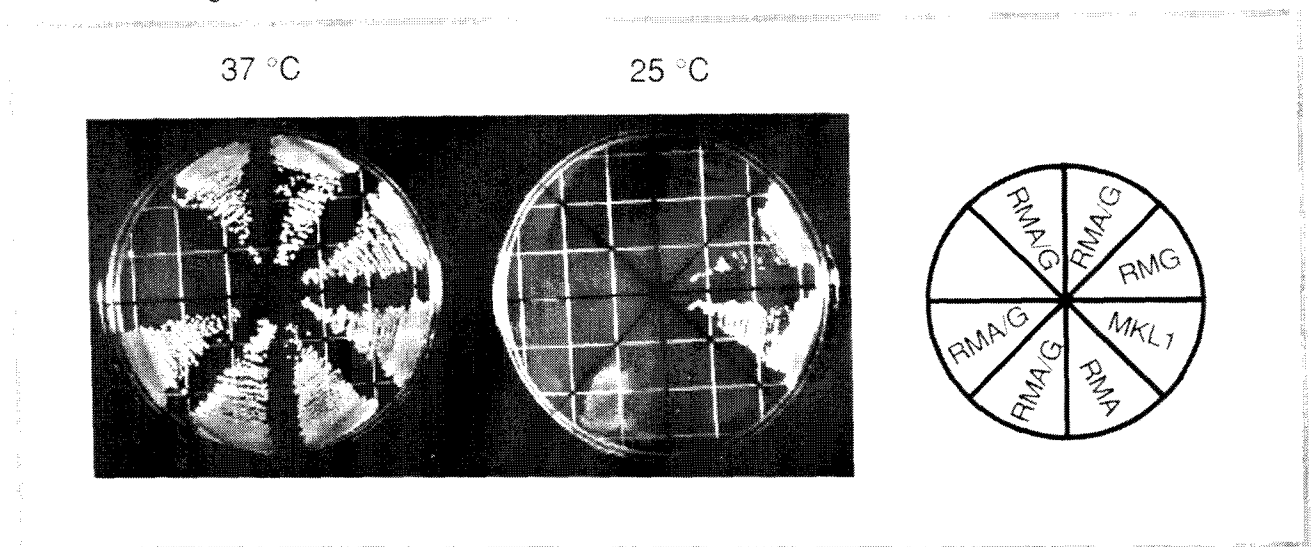


Abb. 25: Wachstum von MKL1, RMG, RMA sowie vier isolierte RMA/G-Klone auf Festmedium bei 37 °C und 25 °C. Die Stämme wurden in Flüssigmedium bei 37 °C angezogen und auf Festmedium ausgestrichen. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C und 25 °C für 16 bzw. 24 Stunden.

Wie in Abbildung 25 dargestellt, ist das Wachstum aller getesteten Stämme bei der permissiven Temperatur (37 °C) nicht unterscheidbar. Da ein funktioneller Protein-Export für das Wachstum der Zellen essentiell ist, spricht dieses Ergebnis dafür, dass die SecA- und SecG-Proteine von *S. carnosus* prinzipiell mit den restlichen *B. subtilis* Translokationskomponenten in der RMA/G produktiv wechselwirken können, so dass die Translokation von extrazellulären Proteinen, die für das Wachstum bei dieser Temperatur benötigt werden, gewährleistet ist. Diese Schlußfolgerung trifft ebenso für die RMA und RMG zu. Bei der nicht permissiven Temperatur (25 °C), findet man dagegen nur ein Wachstum von MKL1 und der RMG-Mutante. Das ungestörte Wachstum der RMG zeigt, dass die Wechselwirkungen zwischen dem *S. carnosus* SecG und den restlichen *B. subtilis* Translokationskomponenten auch bei der niedrigen Temperatur nicht gestört sind (siehe auch Kapitel 3.1.5.2.-3.1.5.4.). Im Gegensatz dazu kann die RMA/G, genauso wie die RMA, unter diesen Bedingungen nicht wachsen. Dies Befund sowie das Verhalten der RMG bedeutet, dass die SecA(Sc)-SecG(Bs)-Wechselwirkung in der RMA nicht gestört ist.

Bei der RMA wird vermutet, dass die Kältesensitivität die Folge einer Störung der Wechselwirkung zwischen dem *S. carnosus* SecA-Protein und einer *B. subtilis* Translokations-Komponente ist. Diese Störung besteht bereits bei 37 °C, wird jedoch bei niedrigeren Temperaturen weiter ausgeprägt und führt unter diesen Bedingungen zum Exportdefekt. Um zu untersuchen, ob dies auch bei der RMA/G der Fall ist, wurden die Zellen mit dem Plasmid pLipPS1kan transformiert. Der Export der von pLipPS1kan kodierten Lipase wurde mit Hilfe von Western Blot-Experimenten in den Stämmen MKL1 (pLipPS1kan), RMA (pLipPS1kan) und RMA/G (pLipPS1kan) bei 37 °C und 25 °C verglichen. Das Plasmid pLipPS1kan trägt die authentische Lipase (Präpro-Lipase) von *S. hyicus*, deren Expression konstitutiv über ihren eigenen Promotor erfolgt. Das Ergebnis der Western Blot-Analyse zeigte, dass die Lipase in allen Stämmen bei 37 °C und 25 °C mit gleicher Effizienz exportiert wurde (nicht gezeigt). Um eine sensitivere Technik im Hinblick auf die Membrantranslokation der Lipase zu erhalten, wurde der Export des Modellproteins mit Hilfe der Pulse Chase-Technik bei 37 °C und 25 °C (Abb. 26) untersucht. Dieses Verfahren bietet gegenüber der Western Blot-Methode, bei der die Translokation des Modellproteins in der Regel über einen längeren Zeitraum (meist mehrere Stunden) bestimmt wird, den Vorteil, dass man die Translokation bzw. die Prozessierung des Vorläuferproteins in seine reife Form über einen Zeitraum von nur wenigen Minuten verfolgen kann.

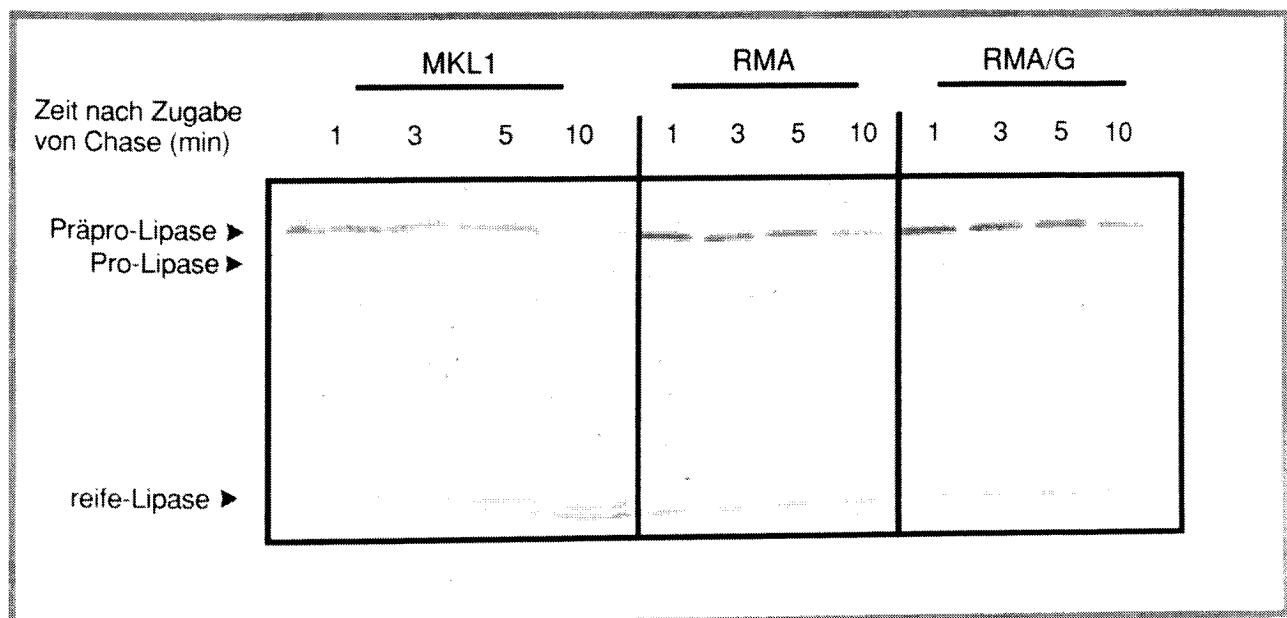


Abb. 26: Prozessierungskinetik der Lipase in den Stämmen MKL1 (pLipPS1kan), RMA (pLipPS1kan) und RMA/G (pLipPS1kan) bei 25 °C (Pulse Chase-Experiment). Jeweils eine frische Kolonie der Stämme wurde in Minimalmedium (Zusatz von Methionin, Kanamycin 15µg/ml) verdünnt und bis zu einer OD von 0,6 bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden anschließend in Minimalmedium (ohne Zusatz von Methionin) gewaschen, in frischem Medium (ohne Zusatz von Methionin) resuspendiert und für weitere 40 min bei 25 °C "ausgehungert". Die Markierung und Aufarbeitung der Proben, SDS-PAGE und Autoradiographie erfolgte wie im Material und Methodenteil (Kapitel 2.6.5.) beschrieben. Zeitpunkte der Probenentnahme nach Zugabe von Chase: 1-, 3-, 5- und 10 Minuten.

Es zeigte sich, dass die Prozessierungskinetik der Präpro-Lipase in den Stämmen MKL1 (pLipPS1kan), RMA (pLipPS1kan) und RMA/G (pLipPS1kan) bei 37 °C annähernd gleich war (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu war der Lipase-Export in den Stämmen RMA/G (pLipPS1kan) und RMA (pLipPS1kan) im Vergleich zum Kontrollstamm MKL1 (pLipPS1kan) etwas verzögert. Erkennbar ist dieses durch die größeren Mengen der Präpro-Lipase bei der RMA und RMA/G, im Vergleich zu MKL1 (pLipPS1kan). Dieses Resultat zeigt, dass in der RMA/G, genauso wie in der RMA eine Störung vorliegt. Die Ergebnisse der RMA/G und der RMG zeigen jedoch eindeutig, dass keine SecA(Sc)-SecG(Bs)-Wechselwirkung gestört ist. Es ist folglich in der RMA eine andere Wechselwirkung zwischen dem *S. carnosus* SecA und einer *B. subtilis* Translokasekomponente gestört.

3.2.1.2. Das Prä-OmpA-Protein von *E. coli* wird in der RMA/G ineffizient transloziert

Meens *et al.* (1994 & 1997) fanden heraus, dass das authentische OmpA-Protein von *E. coli* effizient über die Plasmamembran von *B. subtilis* DB104 und *S. carnosus* TM300 bei 37 °C transloziert wird. Um so erstaunlicher waren deshalb die Befunde von Klein & Freudl (in Vorbereitung) im Hinblick auf die Membrantranslokation dieses heterologen Modellproteins in der RMA. OmpA-Exportstudien, die mit dem Kontrollstamm MKL1, der RMA und *S. carnosus* TM300 bei der permissiven Temperatur von 37 °C, also der Temperatur bei der die RMA keine Defekte im Wachstum aufweist, durchgeführt wurden, zeigten, dass das OmpA-Protein in *B. subtilis* MKL1 und *S. carnosus* TM300 transloziert wurde, während in der RMA der OmpA-Vorläufer von der Membrantranslokation ausgeschlossen blieb. Dieses Ergebnis zeigte deutlich, dass nicht das *S. carnosus* SecA-Protein *per se* für den Ausschluß des OmpA-Vorläufers vom Protein-Export in der RMA verantwortlich ist, sondern dieses eher das Resultat nicht optimaler Wechselwirkungen zwischen dem heterologen SecA-Protein, dem OmpA-Vorläufer und einer *B. subtilis* Translokationskomponente ist. Um den OmpA-Export in der RMA/G untersuchen zu können, wurden die Stämme MKL1, RMA und RMA/G mit dem Plasmid pCU3OmpAkan transformiert. Die Transkription des *ompA*-Gens in den erhaltenen Stämmen MKL1 (pCU3OmpAkan), RMA (pCU3OmpAkan) und RMA/G (pCU3OmpAkan) kann durch Glukose (0,5%) reprimiert bzw. IPTG (1mM) induziert werden. Der Export von OmpA wurde mit Hilfe von Western Blot- (Abb. 27A) und Pulse Chase-Experimenten (Abb. 27B) bei 37 °C untersucht.

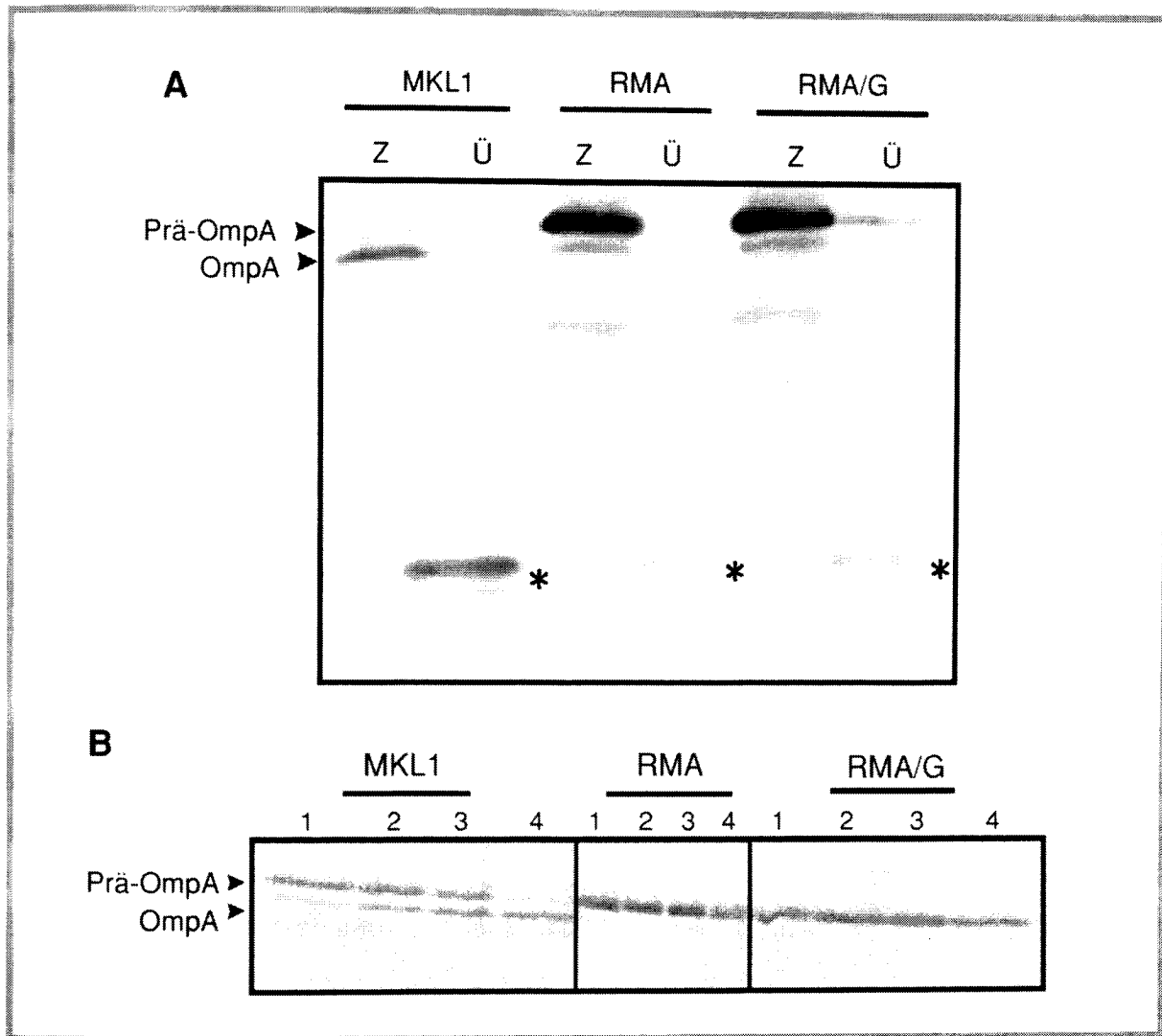


Abb. 27: Vergleich des OmpA-Exports zwischen den Stämmen MKL1 (pCU3OmpAkan), RMA (pCU3OmpAkan) und RMA/G (pCU3OmpAkan) bei 37 °C. A Western Blot. Die Zellen wurden in Flüssigmedium (LB-Medium, 0,5% Glukose und 15µg/ml Kanamycin) bei 37 °C kultiviert und am nächsten Morgen 1:10 in frischem Flüssigmedium (LB-Medium, 15µg/ml Kanamycin) verdünnt. Die Transkription des *ompA*-Gens wurde für 2,5 Stunden durch IPTG (1mM) induziert. Zellfraktionen (Z) und Überstände (Ü) wurden getrennt aufgearbeitet, eine SDS-PAGE (10%) und ein Western Blot-Experiment, in dem ein spezifischer OmpA-Antikörper eingesetzt wurde, durchgeführt. Die aufgetragenen Proteinmengen entsprachen jeweils einem Milliliter mit einer OD von 1. Mit einem "*" markiert sind die spezifischen 16 bzw. 18 kDa großen OmpA-Spaltprodukte. **B Pulse Chase.** 5 ml Minimalmedium (Methionin, 15µg/ml Kanamycin) wurden mit jeweils einer frischen Kolonien der oben genannten Stämme von Festmedium angeimpft. Die Zellen wurden dann bei einer OD von 0,7 geerntet und in Minimalmedium (ohne Methionin) gewaschen und nach Resuspension in frischem Medium (ohne Methionin) für weitere 30 min bei 37 °C "ausgehungert". Die Transkription des *ompA*-Gens wurde 10 min vor der Markierung mit ³⁵S-Met (Pulse) durch IPTG (1mM) induziert. Die Aufarbeitung der Proben, SDS-PAGE (12,5%) sowie die anschließende Autoradiographie sind im Material und Methodenteil (Kapitel 2.6.5.) beschrieben. Zeitpunkte der Probenentnahme nach Chase: 15-, 60-, 120- und 300 Sekunden.

Zunächst einige Bemerkungen zum OmpA-Export in *B. subtilis*. Das OmpA-Protein ist eines der Hauptproteine in der Außenmembran von *E. coli* und wird in Form eines 346 Aminosäuren großen

Vorläuferprotein synthetisiert. Der Größenunterschied des Vorläufers (38 kDa) und des prozessierten reifen Proteins (36 kDa) ist nach Auftrennung in einem SDS-Gel deutlich zu erkennen. Wie in diesem Kapitel bereits schon erwähnt, ermöglicht die authentische Signalsequenz des OmpA-Proteins den Export des OmpA-Proteins über die Plasmamembran von *B. subtilis* und *S. carnosus* (Meens *et al.*, 1993 & 1997). Allerdings kann die reife Form nur in den Zellfraktionen und nicht wie zu erwarten in den Kulturüberständen von *B. subtilis* und *S. carnosus* nachgewiesen werden. Stattdessen werden zwei spezifische OmpA-Spaltprodukte, die ein Molekulargewicht von 16 und 18 kDa besitzen, im Kulturüberstand gefunden. Diese Spaltprodukte entstammen beide der C-terminalen Domäne des OmpA-Proteins (Dissertation A. Matzen, 2000) und werden durch Abbau des translozierten OmpA-Proteins durch Membran- oder Zellwand-assoziierte Proteasen gebildet (Meens *et al.*, 1997).

Wie in Abbildung 27A dargestellt, sind in der Gelspur der Zellfraktion von MKL1 der OmpA-Vorläufer und deutlich intensiver das reife OmpA zu erkennen. Im Überstand sind die spezifischen 16 und 18 kDa großen OmpA-Spaltprodukte in großer Menge detektierbar. Dies zeigt, dass das OmpA-Protein im Stamm MKL1 transloziert wird. Im Vergleich dazu, findet man dieses OmpA-Bandenmuster auch in den Gelspuren der RMA und der RMA/G. Allerdings sind hier die Bandenintensitäten des OmpA-Vorläufers in den Zellfraktionen im Vergleich zu MKL1 deutlich stärker und die der Spaltprodukte in den Überständen der Mutanten im Vergleich zu MKL1 geringer. Dies bedeutet, dass ähnlich wie in der Hybridtranslokase der RMA, auch in der RMA/G die Wechselwirkungen zwischen dem heterologen SecA, dem OmpA-Vorläufer und einer *B. subtilis* Translokationskomponente nicht optimal sind. Der OmpA-Exportdefekt in der RMA/G ist in einem Pulse Chase-Experiment noch deutlicher zu erkennen (Abb. 27B). Zu allen Zeitpunkten kann für die RMA/G und RMA kein prozessiertes OmpA-Protein nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu findet in MKL1 eine effiziente Translokation des Modellproteins statt. Hier wird bereits 5 Minuten nach Chase nur noch das prozessierte OmpA-Protein nachgewiesen.

3.2.2. Konstruktion einer Hybridtranslokase in *B. subtilis*, die das *S. carnosus* SecA und SecY-Protein enthält

Die Studien mit der RMG und RMA/G-Mutante belegen eindeutig, dass der RMA-Protein-Exportdefekt nicht die Folge störender SecA-SecG-Wechselwirkungen ist. Die Defekte resultieren somit aus nicht optimalen Wechselwirkungen zwischen dem *S. carnosus* SecA-Protein und einer anderen *B. subtilis* Translokationskomponente. Um zu untersuchen, ob die Defekte aus nicht optimalen SecA(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkungen resultieren, sollte eine *secA/Y*-Austauschmutante von *B. subtilis* konstruiert werden. Hierfür mußte zuerst eine RMY (replacement mutant *secY*) konstruiert werden, bei der das *B. subtilis* *secY*-Gen durch das entsprechende Gen von *S. carnosus* chromosomal ausgetauscht ist. Die Konstruktion der RMY mit Hilfe des pORI-Systems gelang jedoch nicht. Aufgrund der Tatsache, dass das *S. carnosus* SecY die Funktionen

des SecY-Proteins in *B. subtilis* prinzipiell übernehmen kann (R. Breitling, persönliche Mitteilung, Universität Jena), war dieses Negativergebnis vermutlich auf ein methodisches Problem zurückzuführen. Die Konstruktion der RMY wurde daher mit dieser Strategie nicht weiter verfolgt. Statt dessen wurde, um eine *secA/Y*-Austauschmutante von *B. subtilis* zu erhalten, mit dem Stamm DB104::pLKA2 (pSCY3) weitergearbeitet (zur Verfügung gestellt durch R. Breitling, Universität Jena), bei dem das *secY*-Gen durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt wurde und daher fehlt. Der Stamm enthält zudem das Plasmid pSCY3 (pSCY3 trägt das *S. carnosus* *secY*-Gen, welches konstitutiv exprimiert wird). Die Mutante DB104::pLKA2 (pSCY3) zeigt im Vergleich zu DB104 keine Wachstums- und Export-Defekte (R. Breitling, persönliche Mitteilung) was zeigt, dass das *S. carnosus* SecY die Funktionen des *B. subtilis* SecY in *B. subtilis* offensichtlich übernehmen kann. Um das *B. subtilis* *secA*-Gen durch das *secA* von *S. carnosus* auf dem Chromosom von DB104::pLKA2 (pSCY3) auszutauschen, wurde die Mutante mit dem linearisierten Plasmid pDel6 (Klein & Freudl, in Vorbereitung) transformiert. Etwa 20 Transformanten wurden pro 1 µg Plasmid erhalten. Der *secA*-Austausch im Chromosom von DB104::pLKA2 (pSCY3) wurde mit Hilfe der PCR-Technik überprüft (nicht gezeigt). Im resultierenden Stamm RMA/Y wird die Sec-Translokase von dem SecA und SecY-Protein von *S. carnosus* und den restlichen Translokasekomponenten von *B. subtilis* gebildet.

3.2.2.1. Die RMA/Y ist bei der für die RMA nicht permissiven Temperatur lebensfähig

Um einen Hinweis zu erhalten, ob der Protein-Exportdefekt der RMA, der bei 25 °C wachstumlimitierend ist, aus nicht optimalen Wechselwirkungen zwischen dem *S. carnosus* SecA und dem SecY von *B. subtilis* resultiert, wurde das Wachstum der Stämme DB104, RMA und RMA/Y auf Festmedium bei 37 °C und 25 °C (Abb. 28) verglichen.

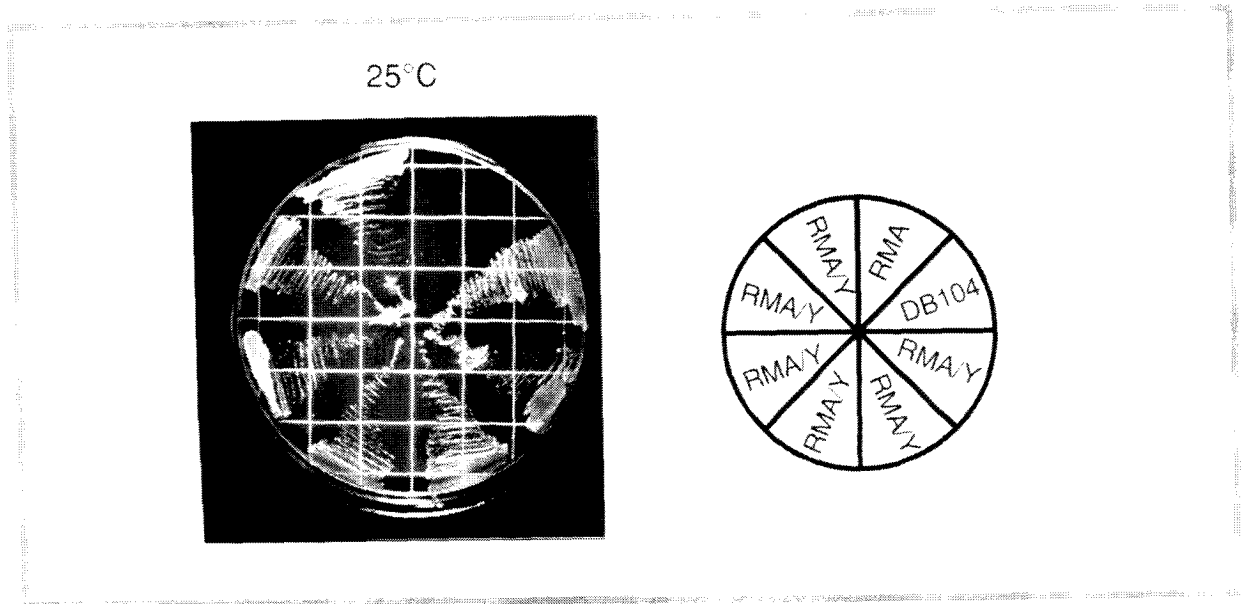


Abb. 28: Wachstum von DB104, der RMA, und sechs Klonen der RMA/Y auf Festmedium bei 25 °C. Die Stämme wurden in Flüssigmedium bei 37 °C angezogen und auf Festmedium ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C für 24 Stunden.

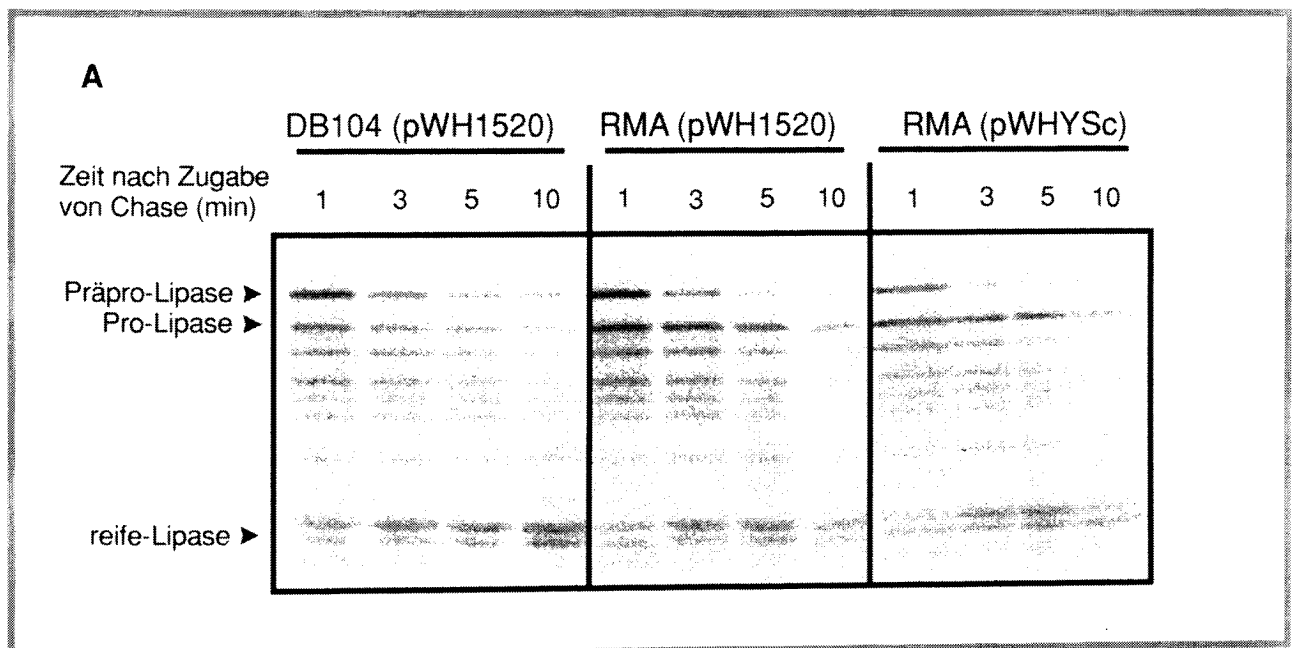
Hierbei zeigte sich, dass die Stämme DB104, RMA und RMA/Y bei 37 °C gleich wuchsen (nicht dargestellt). Interessant war dagegen das Wachstumsverhalten bei 25 °C: Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, kann die RMA nicht wachsen. Die störenden Wechselwirkungen zwischen dem *S. carnosus* SecA und einer anderen *B. subtilis* Translokationskomponente werden bei niedrigen Temperaturen verstärkt. Dies führt zu einem ineffizienten Protein-Export der wachstumslimitierend ist. Im Gegensatz dazu wurde ein Wachstum von DB104 und auch tatsächlich von der RMA/Y beobachtet. Dies bedeutet, dass die SecA(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkung in der RMA gestört ist. Eine optimale Wechselwirkung zwischen den zentralen Exportkomponenten SecA und SecY ist also für das Wachstum von *B. subtilis* essentiell.

3.2.2.2. Der Protein-Exportdefekt der RMA bei der nicht permissiven Temperatur wird durch das Einbringen des *secY*-Gens von *S. carnosus* aufgehoben

Aufgrund der Kanamycin (Kan^R)- und Chloramphenicol (Cm^R)-Resistenz der RMA/Y-Mutante konnten keine Export-Studien mit den etablierten Modellproteinen der von pLipPS1 kodierten Lipase (Cm^R - oder Kan^R -Resistenz) und dem von pCU3OmpA kodierten OmpA-Protein (Cm^R - oder Kan^R -Resistenz) durchgeführt werden. Um dennoch den Protein-Export untersuchen zu können, wurde der Stamm RMA (pWHYSc) konstruiert. Das Plasmid pWHYSc trägt das *S. carnosus* *secY*-Gen. Die Expression des *S. carnosus* *secY*-Gens unterliegt der Kontrolle eines starken *xyf*-Promotor/Operators, der durch Glukose reprimiert bzw. durch Xylose induziert werden kann. Zudem kann im Gegensatz zu einer hohen *secY*-Genexpression in Anwesenheit von Xylose eine schwache Expression in Anwesenheit von Ribose erreicht werden (eigene Beobachtung). Um zunächst einen Hinweis zu erhalten, ob die das kaltesensitive Wachstumsverhalten der RMA auch

in der Anwesenheit von pWHYSc verschwindet, wurde das Wachstum der Kontrollstämme DB104 (pWH1520) (pWH1520: Leerplasmid, Rygus & Hillen, 1991), DB104 (pWHYSc), RMA (pWH1520) im Vergleich zur RMA (pWHYSc) in Anwesenheit von Ribose in Flüssigmedium bei 37 °C und 25 °C untersucht (nicht dargestellt). Hierbei zeigte sich, dass alle Stämme bei 37 °C gleich wuchsen. Der entscheidende Effekt war jedoch, dass die Verzögerung des Wachstums der RMA (pWH1520) im Vergleich zu DB104 (pWH1520) und DB104 (pWHYSc) durch die Anwesenheit von pWHYSc aufgehoben werden konnte. Dies war ein weiterer Hinweis auf störende SecA(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkungen in der RMA.

Die Stämme DB104 (pWH1520), RMA (pWH1520) und RMA (pWHYSc) wurden mit pLipPS1kan transformiert und der Export der Lipase in den resultierenden Stämmen DB104 (pWH1520) (pLipPS1kan), RMA (pWH1520) (pLipPS1kan) und RMA (pWHYSc) (pLipPS1kan) mit Hilfe der Pulse Chase-Technik untersucht (Abb. 29).



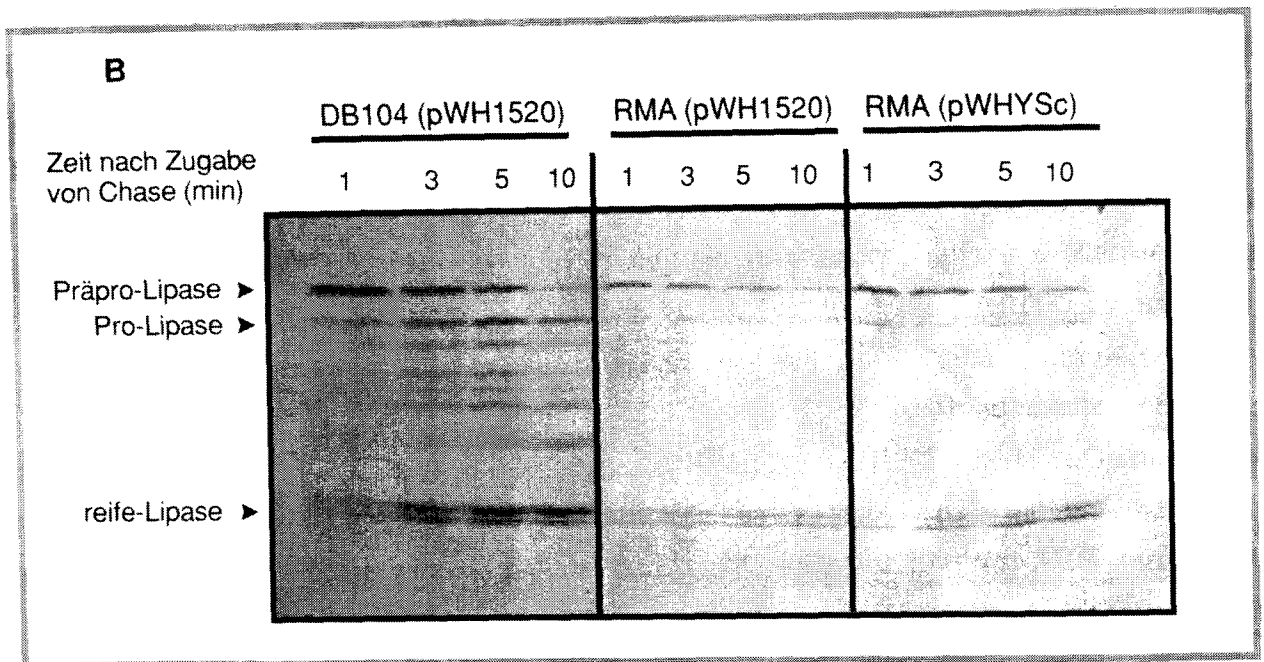


Abb. 29: Prozessierungskinetik der Präpro-Lipase in den Stämmen DB104 (pWH1520) (pLipPS1kan), RMA (pWH1520) (pLipPS1kan) und RMA (pWHYSc) (pLipPS1kan) bei 37 °C (A) und 25 °C (B) (Pulse Chase-Experimente). Die Stämme wurden in Flüssigmedium (Minimalmedium mit Methionin, 10 µg/ml Tetrazyclin, 15 µg/ml Kanamycin) bei 37 °C angezogen und die Zellen in frischem Flüssigmedium auf eine OD von 0,2 eingestellt. Die Zellen wurden weiter bei 37 °C kultiviert, dann bei einer OD von 0,8 geerntet und in Minimalmedium (ohne Methionin) gewaschen und für weitere 40 min bei 37 °C (A) oder 25 °C (B) "ausgehungert". Die Markierung und Aufarbeitung der Zellen wurde wie im Material und Methodenteil beschrieben (Kapitel 2.6.5.) durchgeführt. Zeitpunkte der Probenentnahme nach Zugabe der Chase-Lösung: 1, 3, 5 und 10 Minuten.

Wie in Abbildung 29A zu erkennen ist, erfolgt die Prozessierung der Präpro-Lipase bei 37 °C in allen Stämmen mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit. Im Gegensatz dazu wurde bei 25 °C (Abb. 29B), also der Temperatur bei der das Wachstum der RMA gestört ist, ein unterschiedliches Exportverhalten des Modellproteins gefunden. Während die Lipase-Translokation bei DB104 (pWH1520) (pLipPS1kan) 10 min nach Zugabe des Chase vollständig erfolgt ist, verläuft der gleiche Vorgang im Vergleich dazu bei der RMA (pWH1520) (pLipPS1kan) sehr ineffizient. Bei der RMA (pWH1520) (pLipPS1kan) kann zu allen Zeitpunkten keine Bande nachgewiesen werden, die der prozessierten und somit translozierten Pro-Lipase entspricht. Diese Bande läßt sich hingegen, wenn auch in geringeren Mengen als bei DB104 (pWH1520) (pLipPS1kan), bei der RMA (pWHYSc) (pLipPS1kan) nachweisen. Das Plasmid pWHYSc stellt also bei 25 °C den defekten Protein-Export in der RMA zumindestens teilweise wieder her.

Um auszuschließen, dass die Anwesenheit von pWHYSc den Protein-Export beeinträchtigt, wurde der Export anhand der Lipase mit den Stämmen DB104 (pWH1520) (pLipPS1kan) und DB104 (pWHYSc) (pLipPS1kan) mit Hilfe der Pulse Chase-Technik bei 37 °C und 25 °C untersucht (nicht dargestellt). Es zeigte sich, dass das Exportverhalten der Lipase bei DB104 (pWH1520) (pLipPS1kan) und DB104 (pWHYSc) (pLipPS1kan) identisch ist. Hieraus kann

geschlossen werden, dass die *S. carnosus* SecY-Expression den Export von Vorläuferproteinen nicht stört.

3.2.2.3. Der OmpA-Exportdefekt in der RMA wird durch das *secY*-Gen von *S. carnosus* aufgehoben

Im Gegensatz zur Lipase von *S. hyhicus* wird das OmpA-Protein von *E. coli* in der RMA bei 37 °C, also der Temperatur bei der die RMA keine Wachstumsdefekte aufweist, sehr ineffizient exportiert. Um untersuchen zu können, ob die Hybridtranslokase des Stammes RMA (pWHYSc) das OmpA-Vorläuferprotein als Substrat akzeptiert, oder wie die RMA-Hybridtranslokase zwischen unterschiedlichen Vorläuferproteinen bereits bei der permissiven Temperatur (37 °C) selektioniert, wurde der OmpA-Export in den Stämmen DB104 (pWH1520) (pCU3OmpAkan), RMA (pWH1520) (pCU3OmpAkan) und RMA (pWHYSc) (pCU3OmpAkan) bei 37 °C und 25 °C untersucht. Dies erfolgte zunächst mit Hilfe eines Western Blot-Experimentes (Abb. 30).

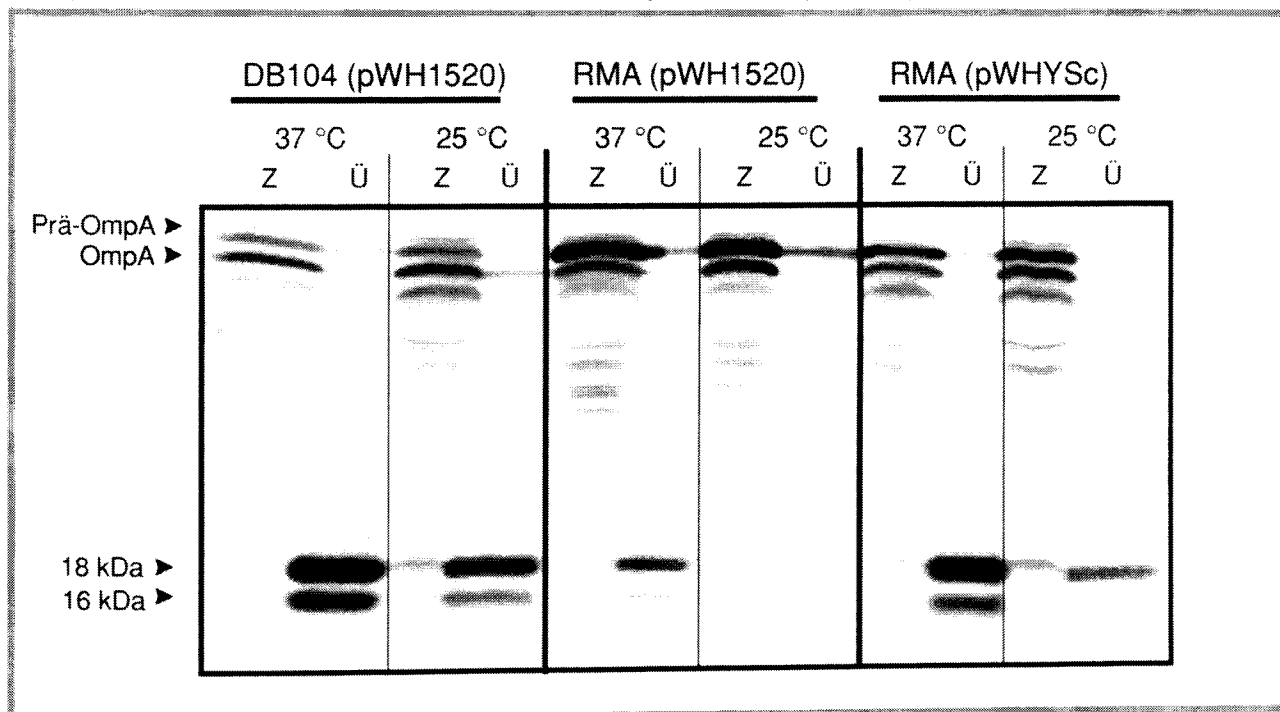


Abb. 30: OmpA-Export in den Stämmen DB104 (pWH1520) (pCU3OmpAkan), RMA (pWH1520) (pCU3OmpAkan) und RMA (pWHYSc) (pCU3OmpAkan) bei 37 °C und 25 °C (Western Blot-Experiment). Die Stämme wurden in Flüssigmedium bei 37 °C angezogen (0,5% Ribose, 10µg/ml Tetrazyklin, 15µg/ml Kanamycin), die Zellen gewaschen und anschließend in frischem Medium (0,5% Ribose, 10µg/ml Tetrazyklin, 15µg/ml Kanamycin) auf eine OD von 0,5 verdünnt. Die OmpA-Expression erfolgte für 4 Stunden bei 37 °C und 25 °C in Anwesenheit von IPTG (1mM). Die Zellen wurden vom Überstand getrennt und die Proteine in einem SDS-Gel (12,5%) aufgetrennt. Der Nachweis des OmpA-Proteins erfolgte im Western Blot mit Hilfe eines spezifischen OmpA-Antikörpers. Die aufgetragenen Proteinmengen entsprechen jeweils einem Milliliter Kultur mit einer OD von 1. Z: Zellfraktionen; Ü: Überstände. 16 kDa und 18 kDa: OmpA-spezifische Spaltprodukte.

Es zeigte sich, wie in Abbildung 30 dargestellt, dass die Hybridtranslokase des Stammes RMA (pWHYSc) im Gegensatz zur RMA-Hybridtranslokase den OmpA-Vorläufer tatsächlich wieder als Substrat akzeptiert. Das reife OmpA-Protein und dessen Spaltprodukte werden beim Stamm RMA (pWHYSc) (pCU3OmpAkan) im Vergleich zur RMA (pWH1520) (pCU3OmpAkan) bei beiden untersuchten Temperaturen in deutlich größeren Mengen nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass in der RMA eine Störung der Wechselwirkung zwischen dem SecA(Sc), SecY(Bs) und dem OmpA-Vorläufer vorliegt, welche einen effizienten Export nicht zulässt. Ein Vergleich mit der Wildtyp-Kontrolle zeigte allerdings auch, dass die Exporteffizienz des OmpA-Proteins beim Stamm RMA (pWHYSc) (pCU3OmpAkan) nicht optimal ist. Um diese Befunde genauer zu untersuchen, wurde mit den gleichen Stämmen ein Pulse Chase-Experiment bei 37 °C und 25 °C durchgeführt (Abb. 31).

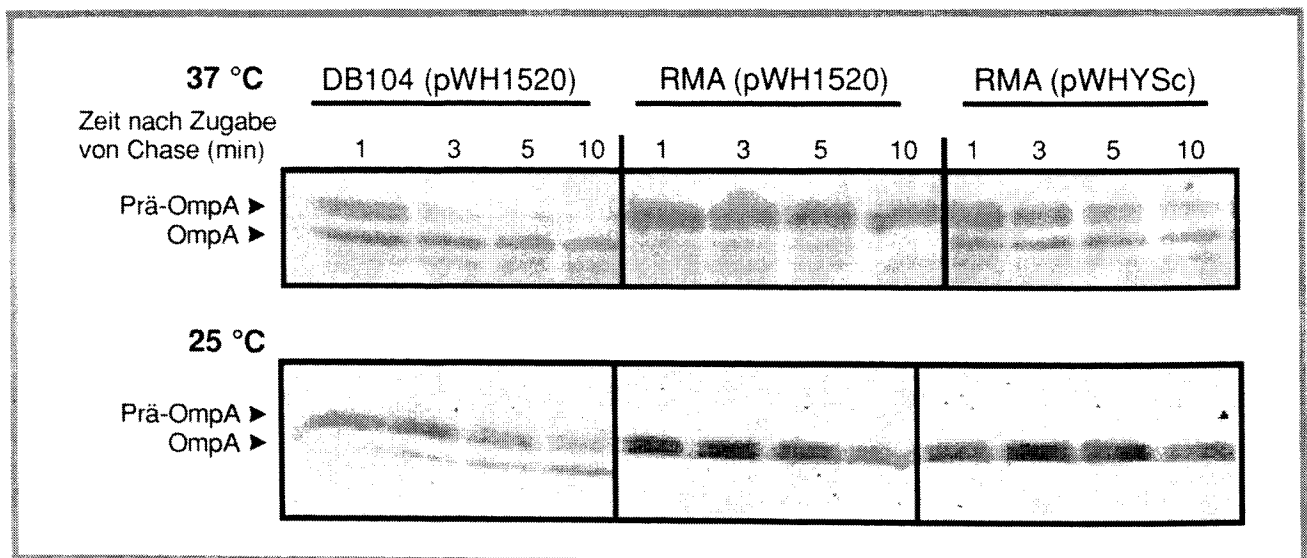


Abb. 31: Prozessierungskinetik des OmpA-Proteins in den Stämmen DB104 (pWH1520) (pCU3OmpAkan), RMA (pWH1520) (pCU3OmpAkan) und RMA (pWHYSc) (pCU3OmpAkan) bei 37 °C und 25 °C (Pulse Chase-Experiment). 5 ml Minimalmedium (mit Methionin, 10µg/ml Tetrazyklin, 15µg/ml Kanamycin) wurden mit einer frischen Kolonie der Stämme angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C kultiviert und bei einer OD von 0,4 (für 37 °C) bzw. 0,6 (für 25 °C) geerntet. Anschließend wurden die Zellen mit Minimalmedium (ohne Methionin) gewaschen, in frischem Minimalmedium (ohne Methionin) resuspendiert und für weitere 30 min bei 37 °C bzw. 25 °C "ausgehungert". Die Transkription des *ompA*-Gens wurde 10 min vor der Markierung mit ³⁵S-Met durch Zugabe von IPTG (1mM) induziert. Markierung der Zellen, Aufarbeitung der Proben, SDS-PAGE und Autoradiographie erfolgte wie im Material und Methodenteil (Kapitel 2.6.5.) beschrieben. Zeitpunkte der Probenentnahme nach Zugabe des Chase: 1, 3, 5 und 10 Minuten.

Wie in Abbildung 31A zu erkennen ist, ist die Translokation des OmpA-Proteins im Stamm DB104 (pWH1520) (pCU3OmpAkan) bereits 5 Minuten nach Chase erfolgt. Im Stamm DB104 (pWH1520) (pCU3OmpAkan) kann zu diesem Zeitpunkt der OmpA-Vorläufer nicht mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu wird zu allen Zeitpunkten bei der RMA (pWH1520) (pCU3OmpAkan) nur das unprozessierte OmpA-Protein nachgewiesen. Der OmpA-Vorläufer wird also, im

Gegensatz zur Lipase (Abb. 29A), in der RMA selektiv vom Protein-Export ausgeschlossen. Die beobachtete Vorläufer-Diskriminierung der RMA-Hybridtranslokase wird durch das Plasmid pWHYSc aufgehoben. Zu allen Zeitpunkten kann bei der RMA (pWHYSc) (pCU3OmpAkan) das prozessierte und somit translozierte OmpA-Protein nachgewiesen werden. Die RMA (pWHYSc)-Hybridtranslokase akzeptiert also wieder den OmpA-Vorläufer als Substrat. Demnach sind die trimeren Wechselwirkungen zwischen dem SecA(Sc), SecY(Bs) und OmpA-Vorläufer in der RMA bei 37 °C nicht optimal. Bei 25 °C ist die OmpA-Translokation im Stamm DB104 (pWH1520) (pCU3OmpAkan), wie in Abbildung 31B gezeigt, im Vergleich zu 37 °C etwas verlangsamt. Dieses Phänomen ist auf die intrinsische Kältesensitivität des Protein-Exports zurückzuführen (Pogliano & Beckwith, 1993). Im Vergleich dazu wird das OmpA-Protein in der RMA (pWH1520) (pCU3OmpAkan) und der RMA (pWHYSc) (pCU3OmpAkan) nicht transloziert. Hieraus kann man schließen, dass bei 37 °C die komplexen Wechselwirkungen zwischen der RMA (pWHYSc)-Hybridtranslokase und dem OmpA-Vorläufer nach wie vor nicht optimal sind und bei 25 °C weiter ausgeprägt werden.

3.2.2.4. Der Kompetenz- und Sporulationsdefekt der RMA wird durch das *secY*-Gen von *S. carnosus* aufgehoben

Die RMA zeigt bereits bei der permissiven Temperatur (37 °C) Defekte in der Sporenbildung und Kompetenzentwicklung. Die vorhergehenden Experimente hatten gezeigt, dass die SecA(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkung in der Mutante nicht optimal ist. Demnach ist in diesem Stamm der Protein-Export ebenso wie die Insertion von Membranproteinen in die Plasmamembran gestört. Man weiß, dass für die Ausbildung der Kompetenz und Sporenbildung zahlreiche Membran- und extracytoplasmatische Proteine benötigt werden. Wie in den Kapiteln 3.2.2.1. und 3.2.2.2. dargelegt, stellt die Expression des *S. carnosus* SecY-Proteins in der RMA den Protein-Export und das Wachstum bei 25 °C wieder her. Um zu untersuchen, ob der Kompetenz- und Sporulationsdefekt der RMA auch durch das *S. carnosus* SecY-Protein aufgehoben werden kann, wurden diese post-exponentiellen Phänomene in den Stämmen DB104 (pWH1520), RMA (pWH1520) und RMA (pWHYSc) untersucht (Tab. 7 und Tab. 8).

Tab. 7: Sporulationstest mit den Stämmen DB104 (pWH1520), RMA (pWH1520) und RMA (pWHYSc) bei 37 °C.

Stamm	Anzahl der Kolonien (10^5) nach Chloroform	Anzahl der Kolonien (10^5) ohne Chloroform	Sporulationsfrequenz (10^{-3})
DB104 (pWH1520)	48,7	653	74,6 (100%)
RMA (pWH1520)	0	623	0 (0%)
RMA (pWHYSc)	1,2	420	2,9 (4%)

Die Stämme wurden in Flüssigmedium (0,5% Ribose, 10 µg/ml Tetrazyklin) über-Nacht bei 37 °C angezogen. Die Zellen wurden mit Sporulationsmedium gewaschen und 1:50 in frischem Sporulationsmedium (10 µg/ml Tetrazyklin) verdünnt und für weitere 24 Stunden bei 37 °C kultiviert. Zur Bestimmung der Sporenbildung wurden 100 µl Kultur mit dem gleichen Volumen Chloroform gemischt und bei 80 °C für 30 Minuten inkubiert (vegetative Zellen werden hierdurch abgetötet). Anschließend wurden die Sporen in Flüssigmedium verdünnt, auf Festmedium ausplattiert und über-Nacht bei 37 °C inkubiert. Um die Gesamtzahl der Zellen in den Kulturen zu ermitteln, wurden diese ohne vorherige Chloroformbehandlung ebenso in Flüssigmedium verdünnt, auf Festmedium ausplattiert und über-Nacht bei 37 °C inkubiert. Die in der Tabelle aufgeführte Kolonienzahl mit bzw. ohne Chloroformbehandlung stellt den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten dar. Die Sporulationsfrequenz entspricht dem Quotienten der Kolonienzahl mit und ohne Chloroformbehandlung. Die Sporulationsfrequenz des Stammes DB104 (pWH1520) wurde als 100% gesetzt.

Die Tabelle 7 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass keine Kolonien des Stammes RMA (pWH1520) nach Chloroformbehandlung erhalten wurden. Demnach ist die Sporenbildung in diesem Stamm defekt. Im Gegensatz dazu wird dieser Defekt in der RMA, wenn auch im Vergleich zu DB104 (pWH1520) noch nicht optimal, durch die Anwesenheit von pWHYSc aufgehoben. Mit dem Stamm DB104 (pWH1520) wurden 653×10^5 Zellen ohne und etwa 49×10^5 Zellen mit Chloroformbehandlung erhalten. Somit bildete statistisch betrachtet etwa jede dreizehnte vegetative Zelle eine Spore aus. Im Falle des Stammes RMA (pWHYSc) wird dieses wieder im Gegensatz zur RMA (pWH1520) von jeder 350sten Zelle erreicht.

Tab. 8: Bestimmung der genetischen Kompetenz von DB104 (pWH1520), RMA (pWH1520) und RMA (pWHYSc) bei 37 °C.

Stamm	Anzahl der Transformanten
DB104 (pWH1520)	6400 (100%)
RMA (pWH1520)	1,3 (0,02%)
RMA (pWHYSc)	26 (0,4%)

Die Stämme wurden mit 4 µg des Plasmids pCU3OmpAkan transformiert und anschließend auf Festmedium (15 µg/ml Kanamycin, 10 µg/ml Tetrazyklin) ausplattiert.

Die in der Tabelle aufgeführte Kolonienzahl stellt den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten dar. Die Kolonienzahl des Stammes DB104 (pWH1520) ist als 100% gesetzt.

Die in Tabelle 8 aufgeführte Kolonienzahl des Stammes DB104 (pWH1520) betrug 6400 und mit der RMA (pWH1520) nur noch durchschnittlich 1,3. Die Anzahl der Transformanten der RMA erhöhte sich durch pWHYSc um den Faktor 20 auf 26.

Diese Befunde zeigten, dass offensichtlich auch der Export von Proteinen, die für die Initiation der Sporulation und / oder Kompetenzentwicklung in der RMA wichtig sind, durch das *S. carnosus* SecY-Protein wieder ermöglicht wird. Der Sporulations- und Kompetenzdefekt der RMA wird folglich durch eine gestörte SecA-SecY-Wechselwirkung hervorgerufen.

3.2.3. Konstruktion einer *secE*-Austauschmutante von *B. subtilis*

Wie für SecA gezeigt, führte ein einzelner chromosomaler Austausch in *B. subtilis* durch das entsprechende Gen von *S. carnosus* zu einem Protein-Exportdefekt, dessen Auswirkungen (temperatursensitives Wachstum, Defekte in den post-exponentiellen Phänomenen) einen experimentellen Ansatz für *in vivo*-Untersuchungen an der Sec-Translokase bieten. Die Konstruktion einer SecE-Austauschmutante von *B. subtilis* (replacement mutant *secE*; RME) sollte einen neuen Einstieg in *in vivo*-Untersuchungen an der Sec-Translokase eröffnen.

Analog zur Gewinnung der RMG-Mutante, wurde auch die RME mit Hilfe des pORI-Systems konstruiert. Hierfür wurde das Plasmid pORIsEcSc konstruiert. Das Plasmid trägt den stromaufwärts liegenden Bereich (500 Bp) des *B. subtilis* *secE*-Gens (*rpmG*) vor dem *S. carnosus* *secE*-Gen und dahinter den stromabwärts liegenden Bereich (500 Bp) des *B. subtilis* *secE*-Gens (*nusG*). Der Stamm DB104 wurde mit dem Plasmid pORIsEcSc transformiert und mit den erhaltenen Transformanten, wie im Material- und Methodenteil (Kapitel 2.5.3.12.) beschrieben fortgefahren. Um den *secE*-Austausch im Chromosom von DB104 nachzuweisen, wurde die chromosomale DNA der Transformanten isoliert und als Template zusammen mit für das *B. subtilis* bzw. *S. carnosus* SecE spezifischen Oligonucleotiden in einer PCR eingesetzt (die Oligonukleotide ScsecE1/ScsecE2 und BssecE1/BssecE2 sind von den Nukleotidsequenzen des *S. carnosus* *secE* bzw. des *B. subtilis* *secE*-Gens abgeleitet) (Abb. 32).

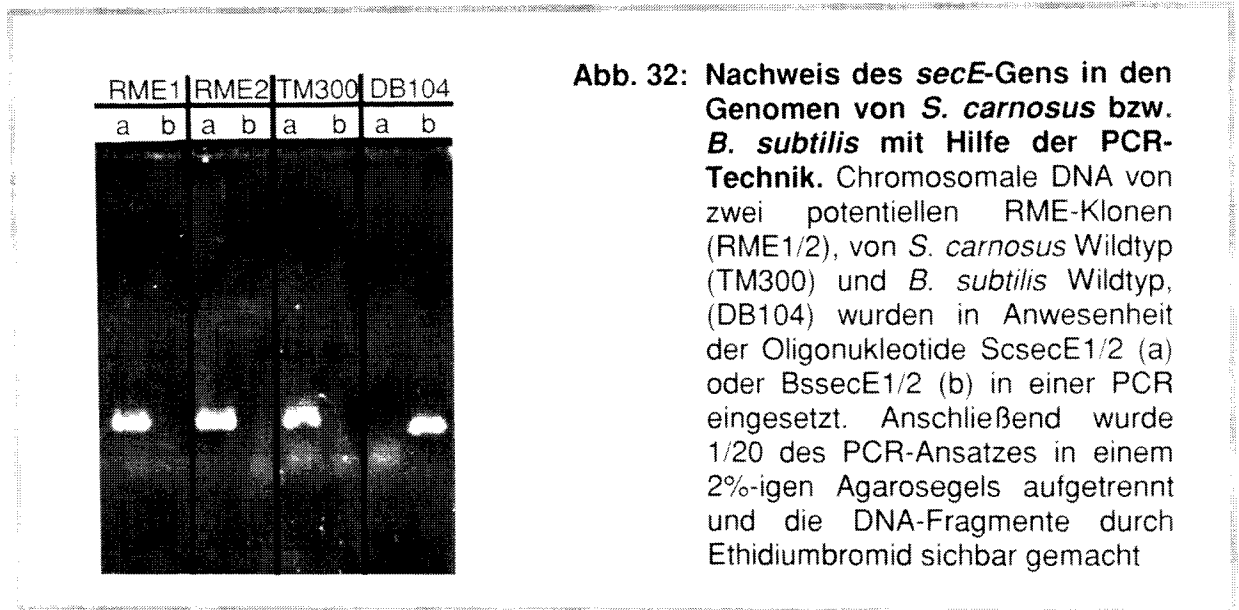


Abb. 32: Nachweis des *secE*-Gens in den Genomen von *S. carnosus* bzw. *B. subtilis* mit Hilfe der PCR-Technik. Chromosomale DNA von zwei potentiellen RME-Klonen (RME1/2), von *S. carnosus* Wildtyp (TM300) und *B. subtilis* Wildtyp, (DB104) wurden in Anwesenheit der Oligonukleotide ScsecE1/2 (a) oder BssecE1/2 (b) in einer PCR eingesetzt. Anschließend wurde 1/20 des PCR-Ansatzes in einem 2%-igen Agarosegels aufgetrennt und die DNA-Fragmente durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht

Wie in Abbildung 32 dargestellt, ergab chromosomale DNA von DB104 als Template in einer PCR mit den Oligonucleotiden ScsecE1/ScsecE2 kein nachweisbares DNA-Fragment. Mit den Oligonucleotiden BssecE1/BssecE2 wurde jedoch ein 180 Bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Chromosomale DNA von *S. carnosus* TM300 als Template ergab mit BssecE1/BssecE2 kein und mit ScsecE1/ScsecE2 ein 210 Bp großes PCR-Fragment, welches dem *S. carnosus secE*-Gen entspricht. Diese 210 Bp großen Genfragmente wurden bei der Verwendung der Oligonukleotide ScsecE1/ScsecE2 ebenso mit der chromosomalen DNA der potentiellen RME-Klone erhalten. Dagegen führte die PCR mit BssecE1/BssecE2 bei diesen Klonen zu keinem nachweisbaren DNA-Fragment. Die PCR-Analyse zeigt somit deutlich den Austausch des *B. subtilis secE*-Gens gegen das *secE*-Gen von *S. carnosus* auf dem Chromosom von DB104. Eine RME-Mutante lag nun vor.

3.2.3.1. Die RME zeigt bereits bei 37 °C einen Wachstumsdefekt, der sich bei niedrigeren Temperaturen weiter verstärkt

Bereits bei der Konstruktion der RME war aufgefallen, dass die Mutante kleinere Kolonien bildete als der Wildtyp. Um den Einfluß des SecE-Austausches auf das Wachstum genauer zu untersuchen, wurde die RME sowie der Kontrollstamm DB104 in Flüssigmedium bei 37 °C und 25 °C angezogen (Abb. 33).

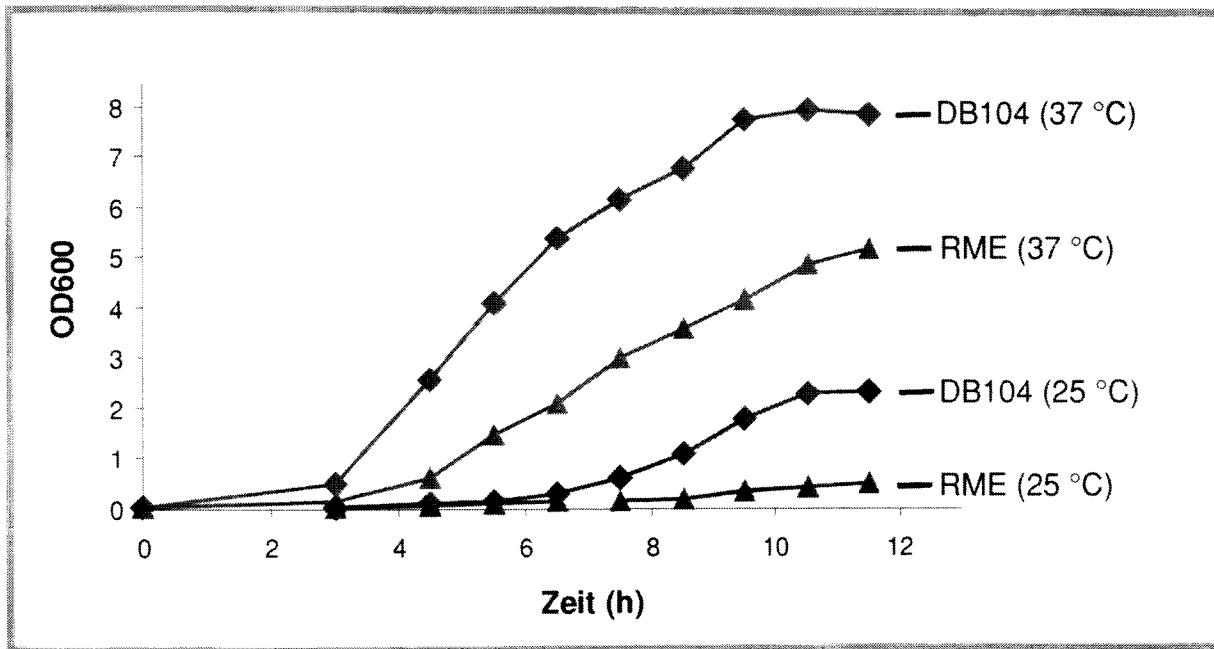


Abb. 33: Wachstum von DB104 und RME in Flüssigmedium bei 37 °C und 25 °C. Die Stämme wurden bei 37 °C angezogen und die Zellen in frischem LB-Medium auf eine OD von 0,05 verdünnt. Das Wachstum der Stämme wurde dann bei den angezeigten Temperaturen für 11,5 Stunden photometrisch verfolgt.

Dabei bestätigte sich die bereits bei der Isolierung der RME gemachte Beobachtung. Die Mutante teilte sich bei 37 °C deutlich langsamer als DB104. Bei 25 °C war dieser Defekt im Wachstum der RME noch weiter ausgeprägt. Um testen zu können, ob diese Wachstumsverzögerung der Mutante aus einem defekten Protein-Export resultiert, wurden die Stämme DB104 und RME mit dem Plasmid pLipPS1kan transformiert und der Lipase-Export in den resultierenden Stämmen DB104 (pLipPS1kan) und RME (pLipPS1kan) mit Hilfe der Pulse Chase-Technik untersucht (Abb. 34).

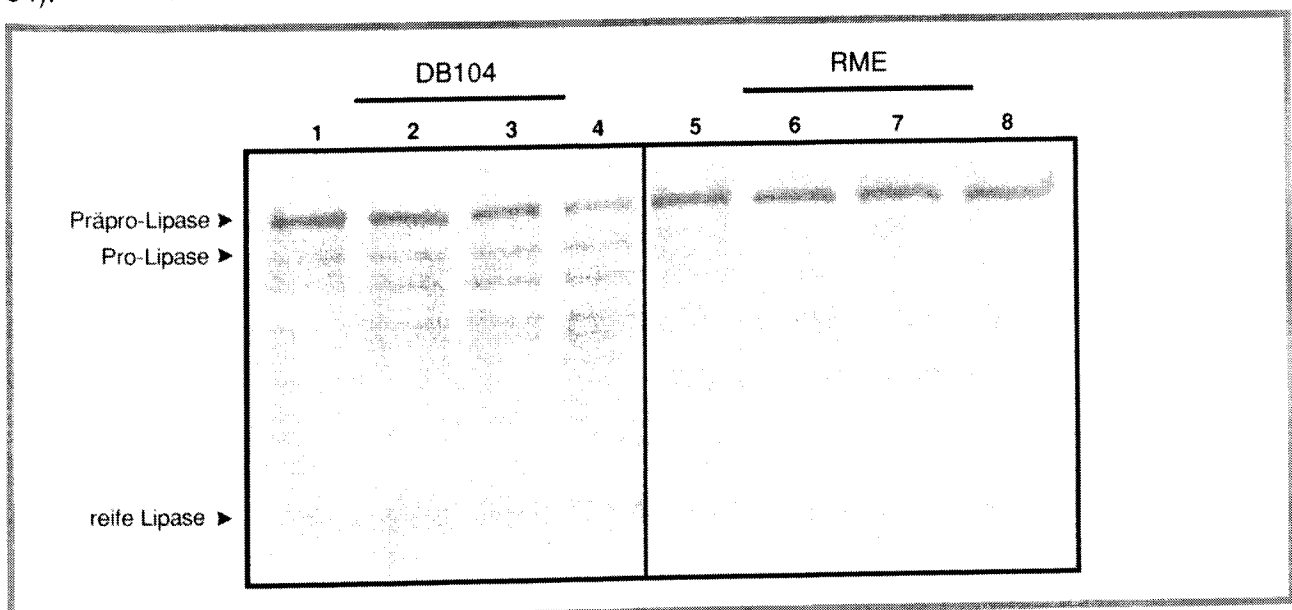


Abb. 34: Prozessierungskinetik der Präpro-Lipase in DB104 (pLipPS1kan) und RME (pLipPS1kan) bei 37 °C. Flüssigmedium (Minimalmedium mit Methionin, Kanamycin

10 µg/ml) wurde mit einer frischen Kolonien der Stämme angeimpft und die Zellen bei 37 °C bis zu einer OD von 0,7 kultiviert. Die Zellen wurden geerntet, in Minimalmedium (ohne Methionin) gewaschen und in frischem Medium (ohne Methionin) für weitere 30 min bei 37 °C "ausgehungert". Markierung der Zellen, Aufarbeitung der Proben, SDS-PAGE und Autoradiographie sind im Material und Methodenteil (Kapitel 2.6.5.) beschrieben. Zeitpunkte der Probennahme nach Chase: 15 (Spur 1 und 5), 60 (Spur 2 und 6), 120 (Spur 3 und 7) und 300 (Spur 4 und 8) sec.

Wie in Abbildung 34 gezeigt ist, wird die Lipase im Wildtyp effizient transloziert. Die Banden, die der translozierten Pro-Lipase entsprechen sind in den Gelspuren von DB104 deutlich zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist in den Gelspuren der RME nur die unprozessierte Präpro-Lipase sichtbar. Dies zeigt, dass die bereits bei 37 °C beobachtete Wachstumsverzögerung der RME auf einen Defekt im Protein-Export zurückzuführen ist. Um diesen Befund weiter zu stützen, wurde zusätzlich der Export des OmpA-Proteins untersucht (nicht gezeigt). Dabei stellte sich heraus, dass auch die OmpA-Prozessierung in der RME-Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich verzögert war.

Offensichtlich sind die Wechselwirkungen des *S. carnosus* SecE-Proteins mit einer (oder mehreren) Translokasekomponente(n) von *B. subtilis* in der RME nicht optimal was, wie gezeigt, zu einem ineffizienten Protein-Export und damit zu einem Wachstumsdefekt führt.

3.2.3.2. Der Wachstumsdefekt der RME wird durch Einbringen des *secY*-Gens von *S. carnosus* teilweise aufgehoben

Analog zur RMA sollten auch die mit der RME erhaltenen Befunde genutzt werden, um Wechselwirkungen zwischen Komponenten der Sec-Translokase zu untersuchen. In *B. subtilis* bilden SecY und SecE eine Kanal-ähnliche Struktur, die in vergleichbarer Form auch beim eukaryontischen Sec61p-Komplex gefunden wurde (Meyer *et al.*, 1999). Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob in der RME die SecE(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkungen gestört sind, wurde die Mutante und der Kontrollstamm DB104 mit dem Plasmid pWHYSc (pWHYSc trägt das *secY*-Gen von *S. carnosus*) und dem Leerplasmid pWH1520 transformiert. Die Hybridtranslokase des Stammes RME (pWHYSc) enthält die *S. carnosus* Proteine SecY und SecE, das *B. subtilis* SecY (die chromosomale Kopie des *B. subtilis* *secY*-Gens ist nach wie vor vorhanden) sowie die restlichen Translokationskomponenten von *B. subtilis*. Das Wachstum der Stämme DB104 (pWH1520), DB104 (pWHYSc), RME (pWH1520) und RME (pWHYSc) wurde in Flüssigmedium bei 37 °C (Abb. 35A) und 25 °C (Abb. 35B) verglichen.

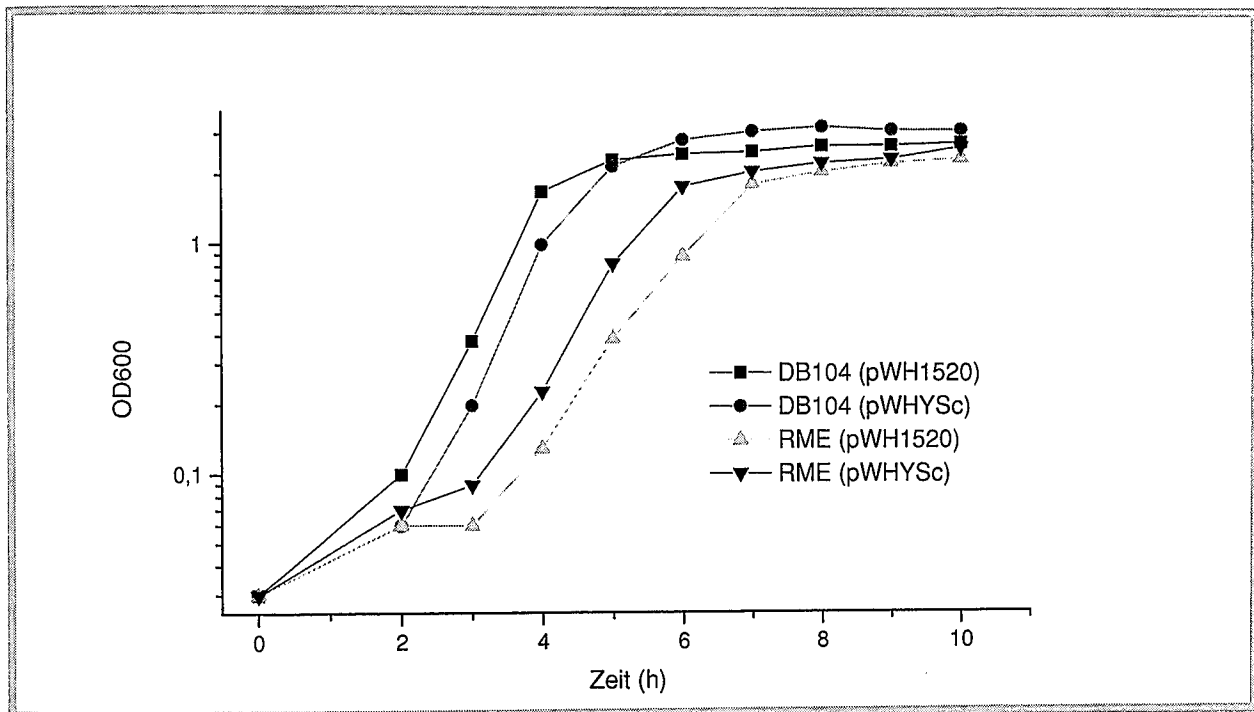


Abb. 35A: Wachstum von DB104 (pWH1520), DB104 (pWHYSc), RME (pWH1520) und RME (pWHYSc) in Flüssigmedium bei 37 °C. Die Stämme wurden bei 37 °C angezogen und in frisches Flüssigmedium (LB, 10 µg/ml Tetrazyklin) auf eine OD von 0,03 verdünnt und das Wachstum photometrisch verfolgt.

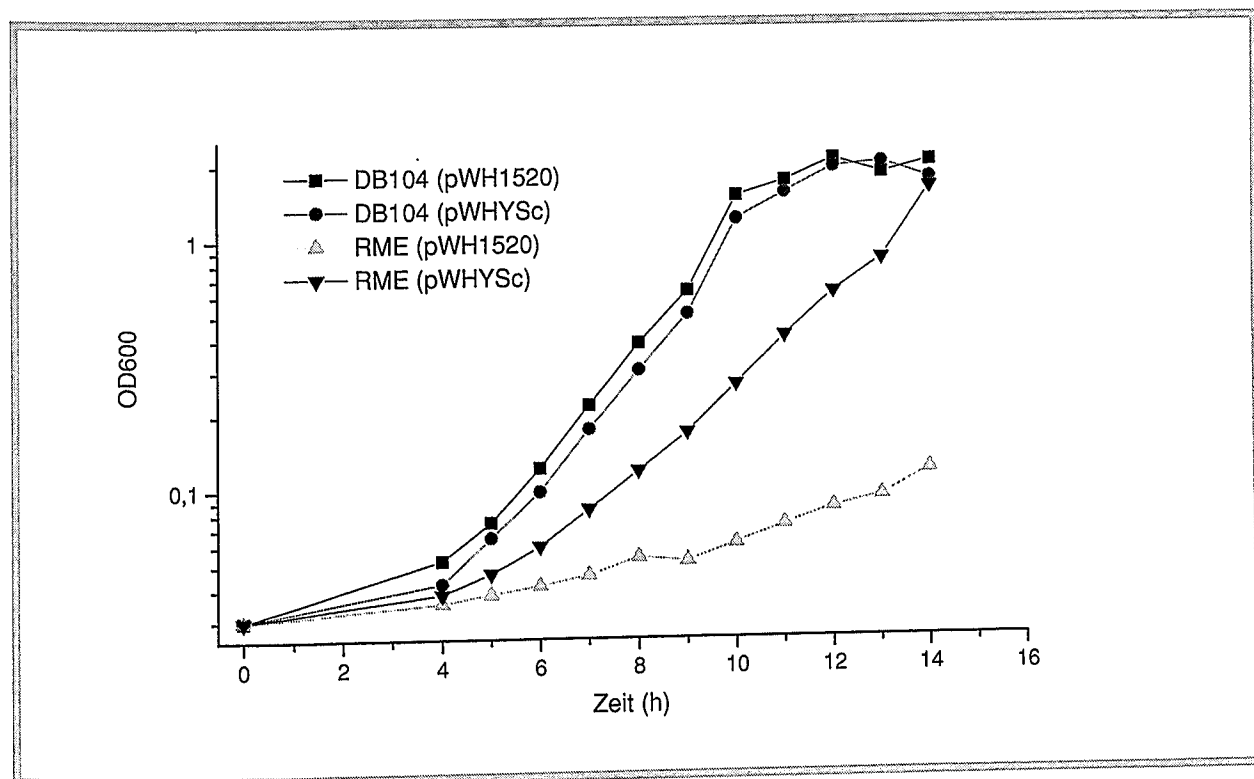


Abb. 35B: Wachstum von DB104 (pWH1520), DB104 (pWHYSc), RME (pWH1520) und RME (pWHYSc) in Flüssigmedium bei 25 °C. Die Stämme wurden bei 37 °C angezogen und in frisches Flüssigmedium (LB, 10 µg/ml Tetrazyklin) auf eine OD von 0,03 verdünnt und das Wachstum photometrisch verfolgt.

Wie in Abbildung 35A gezeigt, teilten sich die Zellen von DB104 (pWH1520) und DB104 (pWHYSc) bei 37 °C mit vergleichbarer Geschwindigkeit. Im Vergleich hierzu war das Wachstum von RME (pWH1520) deutlich verzögert. Besonders in der Anfangsphase ("lag"-Phase) war die Teilungsrate der Mutante im Vergleich zum Wildtyp niedriger. Die Verzögerung des Wachstums der RME wurde durch das Plasmid pWHYSc teilweise aufgehoben. Der Stamm RME (pWHYSc) teilte sich nach der "lag"-Phase mit einer höheren Geschwindigkeit als die zugehörige Vektorkontrolle. Die Teilungsrate des Wildtyps wurde jedoch auch von der RME (pWHYSc) nicht erreicht. Bei 25 °C ist, wie in Abbildung 35B zu erkennen ist, die Kompensation des Wachstumsdefektes der RME durch die Anwesenheit des *S. carnosus* *secY*-Gens noch eindeutiger. Während die Kontrollstämme DB104 (pWH1520) und DB104 (pWHYSc) nahezu identisch wuchsen, ist die Verzögerung des Wachstums der RME (pWH1520) im Vergleich zu 37 °C stärker ausgeprägt. Das Plasmid pWHYSc verhilft der RME zu einem deutlich verbesserten Wachstum. Jedoch erreicht die Mutante trotz der Anwesenheit von pWHYSc nicht die Teilungsrate des Wildtyps.

Das verbesserte Wachstum der RME (pWHYSc) im Vergleich zur RME (pWH1520) deutete an, dass in der Hybridtranslokase die Wechselwirkungen zwischen den heterologen Sec-Proteinen Y und E produktiv sind und den Protein-Export wieder effizienter vermitteln. Daraus kann man schließen, dass die SecE(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkungen in der RME nicht optimal sind.

Um untersuchen zu können, ob das verbesserte Wachstum der RME (pWHYSc) im Vergleich zur RME (pWH1520) aus einem effizienteren Protein-Export resultiert, wurden die Stämme DB104 (pWH1520), RME (pWH1520) und RME (pWHYSc) zusätzlich mit den Plasmiden pLipPS1kan und pCU3OmpAkan transformiert. Der Export der durch pLipPS1kan kodierten Lipase (Abb. 36) bzw. des durch pCU3OmpAkan kodierten OmpA-Proteins (Abb. 37) wurde in den oben genannten Stämmen mit Hilfe der Pulse Chase-Technik untersucht.

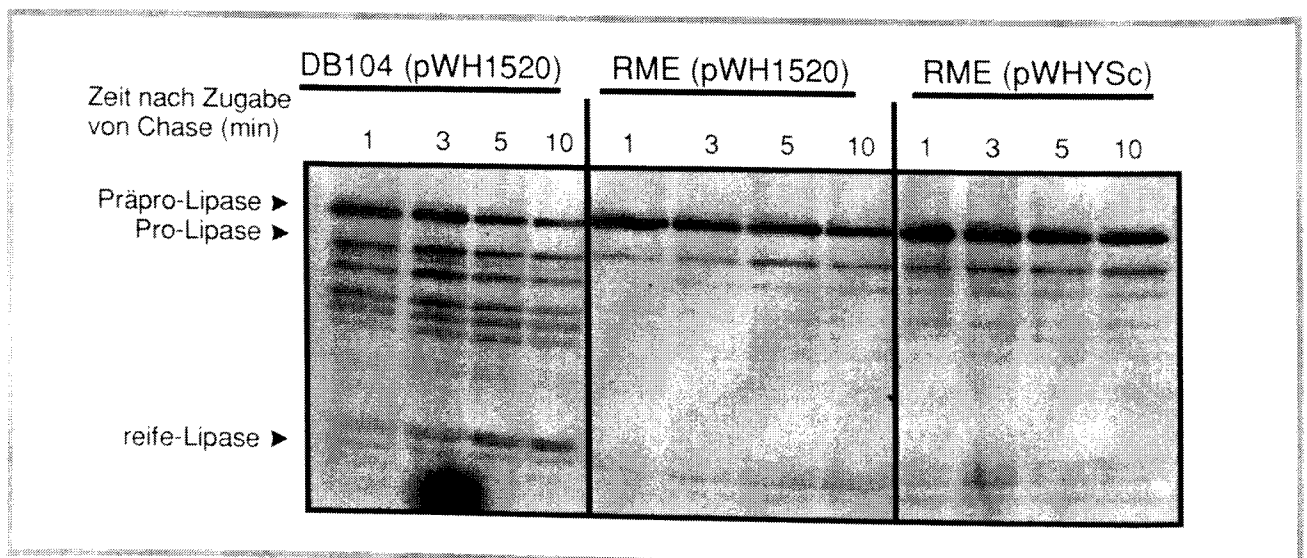


Abb. 36: Prozessierungskinetik der Präpro-Lipase in DB104 (pWH1520) (pLipPS1kan), RME (pWH1520) (pLipPS1kan) und RME (pWHYSc) (pLipPS1kan) bei 37 °C. Minimalmedium (mit Methionin, Kanamycin 10µg/ml) wurde mit einer frischen Kolonien

angeimpft und die Zellen bei 37 °C bis zu einer OD von 0,4 kultiviert. Die Zellen wurden geerntet, in Medium (ohne Methionin) gewaschen und in frischem Minimalmedium (ohne Methionin) für weitere 40 min bei 37 °C "ausgehungert". Markierung der Zellen, Aufarbeitung der Proben, SDS-PAGE und Autoradiographie sind im Material und Methodenteil (Kapitel 2.6.5.) beschrieben. Zeitpunkte der Probennahme nach Chase: 1, 3, 5 und 10 Minuten.

Dabei zeigte sich, wie in Abbildung 36 zu erkennen ist, dass in der RME der Prozessierungsdefekt der Lipase bei 37 °C durch das *S. carnosus* SecY-Protein nicht verschwindet. Bei der RME (pWH1520) (pLipPS1kan) als auch der RME (pWHYSc) (pLipPS1kan) nahm die Menge der unprozessierten Präpro-Lipase im Vergleich zum Kontrollstamm nicht ab.

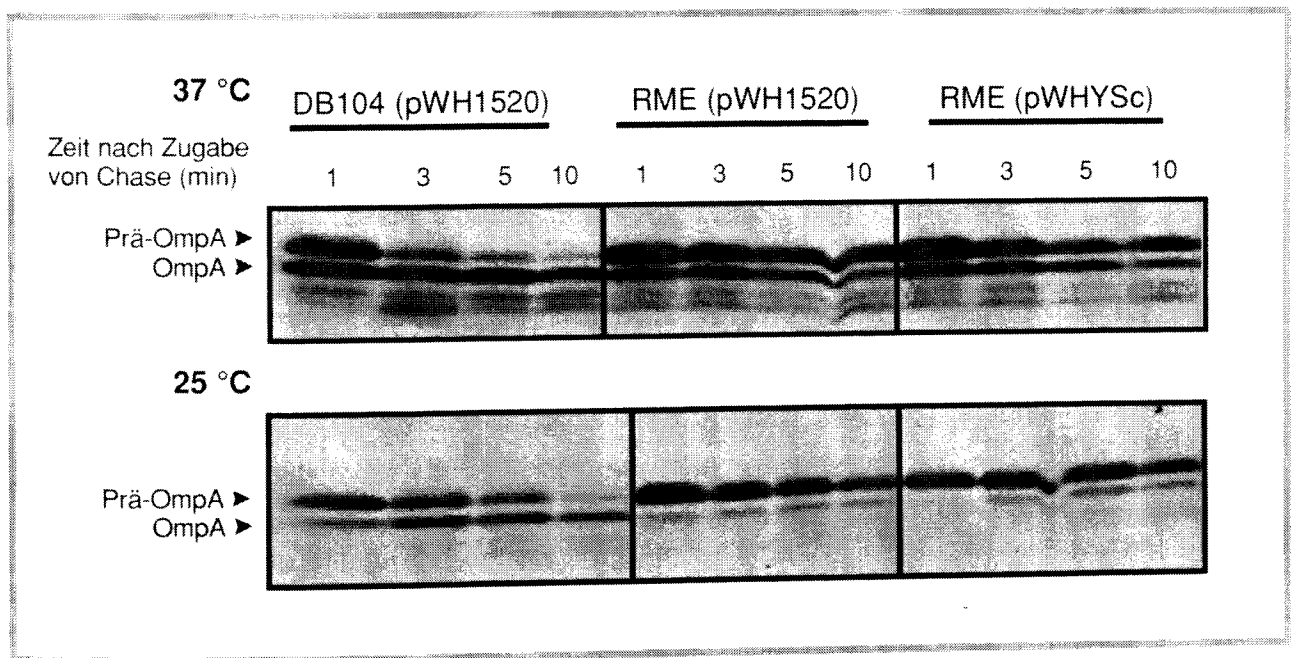


Abb. 37: Prozessierungskinetik des OmpA-Proteins in DB104 (pWH1520) (pCU3OmpAkan), RME (pWH1520) (pCU3OmpAkan) und RME (pWHYSc) (pCU3OmpAkan) bei 37 °C (A) bzw. 25 °C (B). Minimalmedium (mit Methionin, Kanamycin 10µg/ml) wurde mit einer frischen Kolonien angeimpft und die Zellen bei 37 °C bis zu einer OD von 0,6 kultiviert. Die Zellen wurden geerntet, in Medium (ohne Methionin) gewaschen und in frischem Minimalmedium (ohne Methionin) für weitere 40 min bei der angegebenen Temperatur "ausgehungert". Markierung der Zellen, Aufarbeitung der Proben, SDS-PAGE und Autoradiographie sind im Material und Methodenteil (Kapitel 2.6.11.) beschrieben. Zeitpunkte der Probennahme nach Chase: 1, 3, 5 und 10 Minuten.

Wie in Abbildung 37 gezeigt ist, ergaben die Pulse Chase-Experimente mit den Stämmen DB104 (pWH1520) (pCU3OmpAkan), RME (pWH1520) (pCU3OmpAkan) und RME (pWHYSc) (pCU3OmpAkan) einen ähnlichen Befund. Auch hier konnte die OmpA-Prozessierung in der RME (pCU3OmpAkan) einen ähnlichen Befund. Auch hier konnte die OmpA-Prozessierung in der RME durch das *S. carnosus* SecY-Protein weder bei 37 °C noch bei 25 °C praktisch nicht beschleunigt werden. Während beim Wildtyp 10 min nach dem Chase bei 37 °C und 25 °C kein OmpA-Vorläufer werden. Während beim Wildtyp 10 min nach dem Chase bei 37 °C und 25 °C kein OmpA-Vorläufer mehr nachgewiesen wurde (das OmpA-Protein also effizient transloziert war), akkumulieren bei der RME (pWH1520) (pCU3OmpAkan) und RME (pWHYSc) (pCU3OmpAkan) zu diesem Zeitpunkt noch große Mengen des OmpA-Vorläufers.

Die Hybridtranslokase des Stammes RME (pWHYSc) verbessert offensichtlich nur den Export von einem oder wenigen zelleigenen Vorläuferproteinen, die für das Wachstum essentiell sind. Welches extracytosolische Protein von der RME (pWHYSc)-Hybridtranslokase als Substrat besser akzeptiert wird, ist nicht bekannt.

3.2.3.3. Die RME zeigt einen Defekt in der Sporenbildung und Kompetenzentwicklung, der im Falle der Kompetenz durch das *S. carnosus* *secY*-Gen zum Teil kompensiert wird

Analog zum Vorgehen bei der RMA wurden auch bei der RME Sporenbildung (Tab. 9) und Kompetenzentwicklung (Tab. 10) im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

Tab. 9: Sporulationstest mit den Stämmen DB104 (pWH1520), RME (pWH1520) und RME (pWHYSc) bei 37 °C.

Stamm	Anzahl der Kolonien (10 ⁵) nach Chloroform	Anzahl der Kolonien (10 ⁵) ohne Chloroform	Sporulationsfrequenz (10 ⁻³)
DB104 (pWH1520)	223	2620	85,3 (100%)
RME (pWH1520)	4	1600	2,5 (3%)
RME (pWHYSc)	4	1680	2,5 (3%)

Die Stämme wurden in Flüssigmedium (0,5% Ribose, 10 µg/ml Tetrazyklin) über-Nacht bei 37 °C angezogen. Die Zellen wurden mit Sporulationsmedium gewaschen und 1:50 in frischem Sporulationsmedium (10 µg/ml Tetrazyklin) verdünnt und für weitere 24 Stunden bei 37 °C kultiviert. Zur Bestimmung der Sporenbildung wurden 100µl Kultur mit dem gleichen Volumen Chloroform gemischt und bei 80 °C für 30 Minuten inkubiert (vegetative Zellen werden hierdurch abgetötet). Anschließend wurden die Sporen in Flüssigmedium verdünnt, auf Festmedium ausplattiert und über-Nacht bei 37 °C inkubiert. Um die Gesamtzahl der Zellen in den Kulturen zu ermitteln, wurden diese ohne vorherige Chloroformbehandlung ebenso in Flüssigmedium verdünnt, auf Festmedium ausplattiert und über-Nacht bei 37 °C inkubiert. Die in der Tabelle aufgeführte Kolonienzahl mit bzw. ohne Chloroformbehandlung stellt den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten dar. Die Sporulationsfrequenz entspricht dem Quotienten der Kolonienzahl mit und ohne Chloroformbehandlung. Die Sporulationsfrequenz des Stammes DB104 (pWH1520) wurde als 100% gesetzt.

Die in Tabelle 9 dargestellten Ergebnisse der Sporenanalyse zeigen, dass nur wenige Kolonien mit der RME-Mutante nach Chloroformbehandlung erhalten wurden. Dies zeigte, dass die RME, genauso wie die RMA, Defekte bei der Sporulation aufweist. Die Sporulationsfrequenz der RME war gegenüber dem Wildtyp um 97% erniedrigt und wurde durch die Anwesenheit des *secY*-Gens von *S. carnosus* nicht beeinflusst.

Tab. 10: Bestimmung der genetischen Kompetenz der Stämme DB104 (pWH1520), RME (pWH1520) und RME (pWHYSc) bei 37 °C.

Stamm	Anzahl der Transformanten
DB104 (pWH1520)	15000 (100%)
RME (pWH1520)	13 (0,09%)
RME (pWHYSc)	78 (0,5%)

Die Stämme wurden mit 5 µg des Plasmids pLipPS1kan transformiert und anschließend auf Festmedium (15 µg/ml Kanamycin, 10 µg/ml Tetrazyklin) ausplattiert. Die in der Tabelle aufgeführte Kolonienzahl stellt den Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten dar. Die Kolonienzahl des Stammes DB104 (pWH1520) ist als 100% gesetzt.

Die in Tabelle 10 aufgeführten Ergebnisse der Analyse der Kompetenzentwicklung ergab, 15000 Kolonien von DB104 (pWH1520). Mit dem Stamm RME (pWH1520) waren es durchschnittlich nur noch 13 Kolonien. Die Anzahl der Transformanten der RME wurde durch die Anwesenheit des *S. carnosus secY*-Gens um den Faktor 6 auf 78 erhöht. Der Kompetenzdefekt der RME wird folglich unter anderen durch eine gestörte SecE(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkung hervorgerufen.

Somit wird die Funktion der RME-Hybridtranslokase durch das *S. carnosus* SecY offensichtlich nur für bestimmte Vorläufer-Substrate verbessert.

4. Diskussion

4.1. Klonierung und Charakterisierung des *secG*-Gens von *Staphylococcus carnosus*

Im ersten Teil der vorliegenden Dissertation wurde das *secG*-Gen von *S. carnosus* kloniert und das zugehörige Protein funktionell charakterisiert.

4.1.1. Isolierung des *secG*-Gens von *S. carnosus* und Sequenzanalyse auf DNA und Proteinebene

1999 wurde von van Wely *et al.* das erste Gram-positive *secG*-Gen kloniert. Unter Verwendung des *secG*-Gens von *B. subtilis* als heterologer Sonde wurde aus einer *S. carnosus*-Genbank ein 850 Bp großes DNA-Fragment isoliert, welches für ein potentiell SecG-Homologes kodiert. Das *S. carnosus secG*-Gen kodiert für ein 78 Aminosäuren langes Polypeptid. 90 Nukleotide stromabwärts von *secG* befindet sich ein weiteres Gen, dessen Sequenz allerdings nicht vollständig auf dem isolierten DNA-Fragment enthalten ist. Diese Teilsequenz kodiert für 98 Aminosäuren, die Homologien (74 %) zum N-Terminus des YvaK-Proteins von *B. subtilis* zeigen, welches wiederum Ähnlichkeiten zu Carboxylesterasen aufweist. In *B. subtilis* scheint *secG* das erste Gen eines Operons zu sein (van Wely *et al.*, 1999). Die auf *secG* folgenden fünf Gene (*yvaK*, *yvaJ*, *yvaI*, *ssrA*, *yvaG*) dieses Operons sind bisher noch nicht untersucht.

Die Homologie zwischen dem *S. carnosus* SecG und *B. subtilis* bzw. *E. coli* SecG liegt bei 82% bzw. 23%. Im Vergleich zum *B. subtilis* SecG (76 Aminosäuren) ist das *S. carnosus* SecG-Protein zwei Aminosäuren länger und im Vergleich zum *E. coli* SecG um 32 Aminosäuren am C-Terminus verkürzt. Das heißt, dass das SecG-Protein zwar zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien konserviert ist, aber doch auch Unterschiede vorhanden sind, die für Wechselwirkungen des SecG-Proteins mit anderen Komponenten des Translokationsapparates von Bedeutung sein könnten.

Laut Topologievorhersage besitzt das Protein in Analogie zu den SecG-Proteinen von *E. coli* und *B. subtilis* zwei Transmembransegmente (TMS). Für das *E. coli* SecG wurde mit Hilfe von PhoA-Fusionen, gezeigt, dass sich sowohl der N- als auch C-Terminus im Periplasma befinden (siehe Abb. 3) (Nishiyama *et al.*, 1996). Dass es sich beim *S. carnosus* SecG-Homologen um ein Membranprotein handelt, konnte experimentell bestätigt werden: Mit Hilfe eines spezifischen Peptidantikörpers ließ sich das Protein sowohl in der Cytoplasmamembran des *S. carnosus* Wildtyps nachweisen, als auch in der entsprechenden Fraktion eines *E. coli*-Stammes, der das *S. carnosus* SecG-Protein von einem "high-copy"-Plasmid exprimiert. Im SDS-Gel lief das Protein bei etwa 9 kDa, was mit der theoretisch berechneten molaren Masse des *S. carnosus* SecG-Proteins von 8,1 kDa gut übereinstimmt.

4.1.2. Funktionelle Expression des *S. carnosus* SecG-Proteins in der *E. coli* secG-Deletionsmutante KN370

Die *E. coli* secG-Deletionsmutante KN370 zeigt einen kältesensitiven Phänotyp (Nishiyama *et al.*, 1994). Bei 37 °C wird kein Export- und Wachstumsdefekt beobachtet, während bei 20 °C die secG-Deletion zu einer Beeinträchtigung der Translokation einiger Vorläuferproteine führt. Als Folge der Akkumulation von Vorläuferproteinen zeigt die Mutante bei 20 °C einen Wachstumsdefekt.

In Anwesenheit des Plasmides pSecGEc, welches das secG-Gen von *E. coli* trägt, wurde das Wachstum von KN370 bei der nicht permissiven Temperatur wieder hergestellt. Im Gegensatz dazu wurde kein Wachstum erhalten, wenn die *E. coli*-Mutante mit dem Plasmid pSecGSc transformiert wurde (pSecGSc trägt das *S. carnosus* secG-Gen). Eine Komplementation des kältesensitiven Wachstums von KN370 fand allerdings auch durch das *B. subtilis* SecG-Protein nicht statt (van Wely *et al.*, 1999; eigene Beobachtung). Diese Daten zeigen, dass die Gram-positiven SecG-Proteine die Funktionen des SecG in *E. coli* nicht übernehmen können. Man weiß, dass für das *E. coli* SecG die Änderung der Membrantopologie für die Funktion des Proteins eine wichtige Rolle spielt. Es wurde festgestellt, dass die Inversion der SecG-Topologie mit der SecA-Membraninsertion und -deinsertion gekoppelt ist (Nishiyama *et al.*, 1996). Man vermutet, dass durch die SecG-Topologieinversion der Energieaufwand für die katalytischen Zyklen des SecA-Proteins reduziert und hierdurch die Proteintranslokation stimuliert wird. Obwohl bisher keine direkte SecA-SecG-Wechselwirkung gezeigt werden konnte, deuten verschiedene Ergebnisse biochemischer und genetischer Ansätze auf eine Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen hin (Matsumoto *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 1998; Ramamurthy *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1998). Als mögliche Kontaktstelle wurde das cytosolische Segment des SecG-Proteins postuliert (Nishiyama *et al.*, 1996). Diese Region ist sehr Glycin-reich und enthält eine Nettoladung von +1. Desweiteren wurden secG-Mutanten isoliert, die im cytosolischen Bereich verändert waren (Bost & Belin, 1995) und die Reste Thr-41, Leu-42 und Phe-43 betraf. Die Mutanten zeigten einen typischen Sec-Phänotyp, d. h. der Export von Vorläuferproteinen war durch die secG-Mutationen beeinträchtigt. Dies verdeutlicht zusätzlich die Wichtigkeit der cytoplasmatischen Domäne für die SecG-Funktion. Ein auffälliger Unterschied zwischen dem *E. coli*- und dem *B. subtilis*- bzw. *S. carnosus* SecG-Protein besteht in der Gesamtanzahl der positiven und negativen Ladungen im cytosolischen Segment. Sie beträgt bei *E. coli* insgesamt 3 (Nettoladung +1) und bei *B. subtilis* bzw. *S. carnosus* 8 (Nettoladung +2). Möglicherweise sind in diesem Bereich notwendige Wechselwirkungen zwischen den Gram-positiven SecG-Proteinen und dem SecA von *E. coli* gestört. Darüber hinaus sind das *B. subtilis* und *S. carnosus* SecG im Vergleich zum *E. coli* SecG am C-Terminus um 34 bzw. 32 Reste verkürzt. Dieser Unterschied ist möglicherweise bedeutsam für die Effizienz der einzelnen Wechselwirkungen des SecG-Proteins mit anderen Translokase-Untereinheiten und wie für *E. coli* kürzlich berichtet wurde auch mit sich selbst. So wurde durch das gezielte Einführen von

Cysteineresten im C-terminalen Bereich des SecG-Proteins eine Disulfidverbrückung zwischen zwei SecG-Muteinen erhalten (Abb. 3) (Nagamori *et al.*, 2000), was zeigt, dass sich innerhalb der Translokase zwei SecG-Moleküle in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Die Vernetzung beeinträchtigte die SecG-Funktion nicht, d. h. auch das SecG-Dimer durchlief die Topologieinversionen, die an den In- und Deinsertionszyklus des SecA-Proteins gekoppelt sind und somit die Effizienz der Proteintranslokation gewährleisten. Die Tatsache, daß eine Komplementation des kaltesensitiven Wachstumsverhaltens von KN370 mit den SecG-Proteinen von *B. subtilis* und *S. carnosus* nicht möglich ist, spricht dafür, dass auch diese SecG-SecG-Wechselwirkung, welche bei den Gram-positiven Proteinen aufgrund des Fehlens der C-terminalen Domäne nicht stattfinden kann, zur Effizienz der Proteintranslokation in *E. coli* beitragen könnte. Auf der anderen Seite wurde von Nishiyama *et al.* (1996) gezeigt, dass die letzten 30 Reste des *E. coli* SecG-Proteins nicht für die Funktion essentiell sind. Dies deutet letztlich darauf hin, dass die Wechselwirkungen zwischen den TMS 1, 2 sowie der cytosolischen Region des *E. coli* SecG-Proteins und den anderen Komponenten des Proteinexportapparates optimal aufeinander abgestimmt sind.

Dass Anzahl und Typ der Translokase-Untereinheiten bei Gram-negativen und Gram-positiven Mikroorganismen konserviert, die Wechselwirkungen zwischen diesen allerdings in jedem Organismus spezifisch sind, zeigten auch die Untersuchungen zur Komplementation konditionaler *E. coli* *secA*-, *secY*- und *secD/F*-Mutanten mit plasmidkodierten *secA*, *secY* und *secDF*-Genen von *S. carnosus*. So konnten weder das SecA (Klein *et al.*, 1995), das SecY (Tschauder 1993) noch das SecDF-Protein (R. Kappes, persönliche Mitteilung) die entsprechenden Proteine in *E. coli* funktionell ersetzen.

4.1.3. Konstruktion und Charakterisierung einer *secG*-Deletionsmutante von *S. carnosus*

Um die Funktion des *S. carnosus* SecG-Proteins in Bezug auf den Protein-Export untersuchen zu können, wurde eine *secG*-Deletionsmutante von *S. carnosus* konstruiert (Kapitel 3.1.4.). In dieser Mutante wurde das *secG*-Gen auf dem Chromosom durch ein doppeltes "cross-over"-Ereignis gegen einen Resistenzmarker ausgetauscht. Die Δ *secG*-Mutante wurde anschließend im Western Blot-Verfahren biochemisch überprüft. Das SecG-Protein wurde im Wildtyp eindeutig nachgewiesen, während bei der Mutante die entsprechende Bande fehlte.

Im Gegensatz zu den entsprechenden Mutanten von *E. coli* (Nishiyama *et al.*, 1994) und *B. subtilis* (van Wely *et al.*, 1999) führte die *secG*-Deletion in *S. carnosus* nicht zu einem kaltesensitiven Wachstumsverhalten. Die isolierte Mutante war auch bei niedrigen Temperaturen lebensfähig. Dies zeigt, dass bei *S. carnosus* der Protein-Export unter physiologischen Bedingungen auch in Abwesenheit des SecG-Proteins ermöglicht wird. Da nur ein einzelner Klon isoliert wurde, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass diese Mutante neben der SecG-Deletion eine

Suppressor-Mutation trägt, welche den erwarteten Phänotyp der *secG*-Deletion unterdrückt. Es gibt jedoch einige Aspekte, die gegen eine Suppressor-Mutation sprechen: So ist die Wahrscheinlichkeit, gleichzeitig einen doppelten "cross-over" sowie eine Suppressor-Mutation im Genom von *S. carnosus* zu erhalten, statistisch betrachtet extrem niedrig ($10^{-7} - 10^{-8}$). Weiterhin ist es in diesem Zusammenhang wichtig zu erwähnen, dass die Abwesenheit von SecG nicht bei allen *E. coli*-Stämmen zu einem kältesensitiven Phänotyp führt. Die Kältesensitivität ist also stammspezifisch (Bost & Belin 1995; Nishiyama *et al.*, 1994). Der Grund hierfür ist zur Zeit noch unklar. Auffällig ist jedoch, dass nur Derivate von *E. coli* W3100 M25 durch die *secG*-Deletion einen konditional lethalen Phänotyp aufweisen, während dies bei anderen Stämmen nicht der Fall ist (MC1000, MC4100, BL21). Weil der Stamm W3100 M25 aus einer chemischen Mutagenese hervorgegangen ist, wird vermutet, dass bisher uncharakterisierte Mutationen in Kombination mit der *secG*-Deletion einen konditional lethalen Phänotyp verursachen (Flowers *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurde auch für das *B. subtilis* *secG*-Gen gezeigt, dass seine Deletion unter physiologischen Bedingungen nicht lethal ist (van Wely *et al.*, 1999). Diese Daten deuten darauf hin, dass in Gram-positiven Bakterien, wie auch in einigen *E. coli*-Stämmen (siehe oben), der Export von für das Wachstum essentiellen Proteinen unter physiologischen Bedingungen auch in Abwesenheit des SecG-Proteins gewährleistet ist.

Es konnte aber gezeigt werden, dass die Proteinsekretion in der *S. carnosus* $\Delta secG$ -Mutante bei Überproduktion eines sekretorischen Proteins (Lipase-Calcitonin-Fusionsprotein; Dilsen *et al.*, 2000) gestört ist. So wurde unter diesen Bedingungen eine Wachstumsverzögerung der $\Delta secG$ -Mutante im Vergleich zum *S. carnosus* Wildtyp bei 20 °C beobachtet. Dies zeigte, dass das *S. carnosus* SecG zumindestens bei Sekretionsstreß in Kombination mit niedrigen Temperaturen für ein effizientes Wachstum benötigt wird. Ein ähnliches Phänomen wurde für die *secG*- (van Wely *et al.*, 1999) und eine *secDF*-Deletionsmutante (Bolhuis *et al.*, 1998) von *B. subtilis* berichtet. Bezüglich der SecG-Funktion bedeutet dies, dass die Gram-positiven SecG-Proteine benötigt werden, um eine hohe Sekretionskapazität zu gewährleisten. Dieser Punkt ist aus biotechnologischer Sicht interessant, da ein Produktionsstamm, der das SecG-Protein überexprimiert, möglicherweise eine effizientere Sekretionsleistung besitzen könnte.

Bei *E. coli* (Nishiyama *et al.*, 1993) und *B. subtilis* (Swaving *et al.*, 1999) stimuliert SecG die *in vitro*-Proteintranslokation verschiedener Vorläuferproteine. Um vergleichbare Hinweise auf eine Beteiligung des *S. carnosus* SecG-Proteins am Protein-Export zu erhalten, wurde die *in vitro*-Proteintranslokation in invertierte Membranvesikel des *S. carnosus* Wildtyps (WT-IMVs) und $\Delta secG$ -IMVs untersucht. Als Modellprotein wurde hierbei die Präpro-Lipase von *S. hyicus* eingesetzt, von der bekannt ist, dass sie in WT-IMVs importiert werden kann (Schimz *et al.*, 1995). Es zeigte sich, dass der Import der Präpro-Lipase in IMVs, die nachweislich das SecG-Protein enthielten, um den Faktor 20 im Vergleich zu $\Delta secG$ -IMVs erhöht ist. Dies Ergebnis zeigte, dass für eine effiziente *in vitro*-Proteintranslokation in *S. carnosus*-Vesikel das SecG-Protein absolut

erforderlich ist. Aus den *in vivo* (Kapitel 3.1.4.3.) und *in vitro*-(3.1.4.4.) Protein-Exportstudien kann eindeutig auf eine Beteiligung des *S. carnosus* SecG-Proteins am Protein-Export geschlossen werden. Auffällig ist jedoch die Diskrepanz die zwischen der SecG-Abhängigkeit *in vivo* und *in vitro* besteht. Bei *E. coli* weiß man, dass der Protonengradient über die Plasmamembran ("proton motiv force", PMF) und SecG unterschiedliche Aufgaben bei der Proteintranslokation übernehmen und die Translokationseffizienz auf unterschiedliche Weise stimulieren (Hanada *et al.*, 1996). Zudem ist bekannt, dass in Abwesenheit der PMF das SecG-Protein für die *in vitro*-Proteintranslokation eine deutlich wichtigere Rolle spielt. Im Gegensatz zur *in vitro*-Situation wird *in vivo* die PMF ständig erneuert. Dies könnte bedeuten, dass die starke SecG-Abhängigkeit der *in vitro*-Proteintranslokation, die analog zu *E. coli* auch bei *S. carnosus* beobachtet wurde, auf einer zumindest erniedrigten PMF beruhen könnte.

4.1.4. Das *S. carnosus* SecG-Protein kann optimal mit den Translokase-Untereinheiten von *B. subtilis* wechselwirken

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung des *S. carnosus* *secG*-Gens wurden die Eigenschaften der in dieser Arbeit konstruierten RMG-Mutante von *B. subtilis* (Kapitel 3.1.5.) mit einer *secG*-Deletionsmutante $\Delta secG$ von *B. subtilis* (van Wely *et al.*, 1999) und dem *B. subtilis* Wildtyp DB104 verglichen. Auf dem Chromosom der RMG ist das *B. subtilis* *secG*-Gen durch das entsprechende Gen von *S. carnosus* ausgetauscht. Der Nachweis des *S. carnosus* *secG*-Genproduktes in der RMG wurde mit Hilfe der Western Blot-Technik erbracht (Kapitel 3.1.5.1.).

Mehrere experimentelle Befunde zeigen, dass das *S. carnosus* SecG optimal mit den Exportkomponenten von *B. subtilis* wechselwirkt: 1. Die *secG*-Deletion in *B. subtilis* führte bei Temperaturen unterhalb von 20 °C zu einem verzögerten Wachstum auf Festmedium. Dies wurde bei der RMG nicht beobachtet. 2. Bei der Überexpression eines Exportproteins wurde bereits bei 37 °C ein deutlicher Wachstumsdefekt der $\Delta secG$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp und der RMG auf Fest- und in Flüssigmedium beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass die RMG-Hybridtranslokase einen effizienten Protein-Export vermitteln kann. Dieser wurde anhand der α -Amylase aus *B. licheniformis* (AmyL) und der *S. hyicus* Präpro-Lipase im Detail untersucht. Von beiden Proteinen ist eine effiziente Membrantranslokation im *B. subtilis* Wildtyp berichtet worden (Herbort 1996; Meens *et al.*, 1993). Mit Hilfe von Western Blot- und Pulse Chase-Studien wurde festgestellt, dass es bei der $\Delta secG$ -Mutante zu einer Akkumulation von AmyL-Vorläufer kommt. Dies deutet darauf hin, dass das beeinträchtigte Wachstum der $\Delta secG$ -Mutante die Folge einer Überlastung des zellulären Sekretionsapparates ist, der durch die AmyL-Überexpression hervorgerufen wird. Der überproduzierte AmyL-Vorläufer konkurriert vermutlich mit zelleigenen Vorläuferproteinen um die (bedingt durch die Abwesenheit des SecG-Proteins) ineffizient

funktionierenden Exportstellen. Der gestörte Export essentieller Proteinen könnte demnach den Wachstumsdefekt bedingen.

Ähnlich wie bei AmyL war auch die Translokation der Lipase durch die *secG*-Gendeletion in *B. subtilis* bereits bei 37 °C beeinträchtigt. Im Vergleich dazu verlief die Translokation des Modellproteins in der Wildtypkontrolle und der RMG deutlich effizienter.

Die Untersuchungen zum Wachstum und Protein-Export von $\Delta secG$ und RMG zeigten, dass das *S. carnosus* SecG optimal mit den Exportkomponenten von *B. subtilis* wechselwirken und die Funktionen des SecG-Proteins in *B. subtilis* übernehmen kann. Wie bereits erwähnt, ist eine SecG-Topologieinversion für die Funktion des *E. coli* Proteins von Bedeutung (Nishiyama *et al.*, 1996). In Analogie dazu kann man mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, dass das *S. carnosus* SecG-Protein diese Topologieinversionen auch in *B. subtilis* durchführen kann, welche die Membraninsertion -deinsertionszyklen des SecA-Proteins unterstützen.

4.2. *Bacillus subtilis* / *Staphylococcus carnosus* Hybridtranslokasen als Methode für die *in vivo*-Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen bei der Proteintranslokation

Die Wechselwirkungen zwischen den Translokase-Untereinheiten und den zelleigenen (homologen) sekretorischen Proteinen sind in jedem Organismus funktionell aufeinander abgestimmt, also produktiv. Dies führt dazu, dass homologe Proteine wie beispielsweise Amylasen, Lipasen und Proteasen, welche die Gattung *Bacillus* in großen Mengen sekretiert, mit Hilfe dieser Bakterien im industriellen Maßstab gewonnen werden können (Ferrari *et al.*, 1993). Versuche, dieses ausgeprägte Sekretionsvermögen für die Gewinnung heterologer Proteine zu nutzen, verliefen dagegen häufig enttäuschend. Ein Engpaß stellten hierbei unter anderem vermutlich nicht optimale Wechselwirkungen zwischen dem heterologen Vorläuferprotein und der Translokase dar (Simonen & Palva, 1993). Als Folge dieser Störungen wurden die Proteine nur ineffizient oder sogar, wie im Falle eines Prä(Amylase)-Interferon-Fusionproteins, überhaupt nicht exportiert (Schein *et al.*, 1986). Welche Wechselwirkungen zwischen Translokase und Vorläuferprotein für eine erfolgreiche Membrantranslokation bestimmend sind, ist noch unklar.

Der zweite Teil der vorliegenden Dissertation befaßte sich mit Wechselwirkungen, die während der Membrantranslokation 1. zwischen den einzelnen Translokase-Untereinheiten und 2. zwischen der Translokase und dem Vorläuferprotein stattfinden. Diese Arbeiten wurden mit Hilfe von *B. subtilis* / *S. carnosus*-Hybridtranslokasen in *B. subtilis* *in vivo* durchgeführt. Den Ausgangspunkt bildeten die Eigenschaften einer *secA*-Austauschmutante von *B. subtilis* (RMA), in der das *B. subtilis* *secA*-Gen auf dem Chromosom gegen das *secA*-Gen von *S. carnosus* ausgetauscht worden war (Klein & Freudl, in Vorbereitung). Ein Vergleich der Primärsequenzen der SecA-Proteine von *B. subtilis* (SecA(Bs)) und *S. carnosus* (SecA(Sc)) zeigt, dass beide Proteine eine vergleichbare

Domänenstruktur sowie eine ähnliche Ladungsverteilung und Hydrophobizitätskurve besitzen. Allerdings sind etwa 40% der Reste unterschiedlich (die Gesamthomologie beträgt 73%). Dies läßt vermuten, dass sich die Oberflächenstrukturen beider SecA-Proteine zumindest geringfügig unterscheiden. Die RMA-Hybridtranslokase besteht aus dem *S. carnosus* SecA-Protein und den membranintegralen Translokase-Untereinheiten von *B. subtilis* und vermittelt bei 37 °C den Export aller extracytosolischen Proteine, die für das Wachstum erforderlich sind. Das ungestörte Wachstum der RMA bei 37 °C zeigt, dass das heterologe SecA mit den *B. subtilis* Export-Komponenten im Prinzip produktiv wechselwirken kann. Bei 25 °C hingegen zeigt die RMA einen deutlichen Wachstumsdefekt. Daraus kann geschlossen werden, dass bereits bei 37 °C bestehende geringe Störungen der Wechselwirkungen zwischen den Oberflächen des SecA(Sc) mit anderen Komponenten des *B. subtilis* Exportapparates bei niedrigeren Temperaturen verstärkt und wachstumslimitierend werden. Welche Wechselwirkungen im Detail gestört sind, ist unbekannt.

Untersuchungen zum Protein-Export in der RMA haben gezeigt, dass die Translokation bestimmter Vorläuferproteine bei der permissiven Temperatur eingeschränkt ist. Betroffen sind hiervon ein heterologes Protein aus *E. coli* (OmpA) und verschiedene Faktoren, welche für die Sporenbildung und Kompetenz in *B. subtilis* wichtig sind (siehe unten). Im Gegensatz dazu wird die *S. hyicus* Lipase, die ein typisches Gram-positives Export-Protein darstellt, in der RMA effizient transloziert. Wie oben erwähnt, wird vermutet, dass auch der Export bestimmter homologer Proteine in der RMA zumindest signifikant eingeschränkt ist. Diese Vermutung beruht auf der Beobachtung, dass die RMA bereits bei 37 °C Defekte in der Sporulation und Kompetenzentwicklung aufweist, die in der postexponentiellen Wachstumsphase von *B. subtilis* zu beobachten sind. Bei der Sporulation handelt es sich um einen Differenzierungsvorgang, der als Antwort auf z. B. Nährstoffmangel eingeleitet wird, während die natürliche Kompetenz die Fähigkeit ist, extrazelluläre DNA aufzunehmen (Dubnau, 1991; Magnuson *et al.*, 1994; Msadek, 1999). Es wurden zwei Peptide, PhrA und CSF ("competence and sporulation stimulating factor"), identifiziert, die bei hoher Zelldichte im extrazellulären Medium von *B. subtilis* akkumulieren und eine pheromonähnliche Wirkung ausüben. Diese Peptide werden von *B. subtilis* als Vorläuferprotein synthetisiert und vermutlich über den Sec-abhängigen Exportweg sekretiert. Im Anschluß daran werden die Proteine prozessiert und als Pentapeptide wieder in die Zelle aufgenommen, wo sie an der Regulation der Sporulationsinitiation beteiligt sind (Lazazzera *et al.*, 1997). Der CSF-Faktor stimuliert zudem die Expression der Gene, welche für die Ausbildung der Kompetenz nötig sind. Da *S. carnosus* weder Sporen bildet noch eine natürliche Kompetenz besitzt, ist es durchaus möglich, dass in der RMA eine spezifische Wechselwirkung solcher regulatorischer Vorläuferpeptide mit dem heterologen SecA nicht stattfinden kann.

Die Beobachtung, dass in der RMA offensichtlich nur ganz bestimmte Proteine vom Export ausgeschlossen sind, deutet darauf hin, dass spezifische Eigenschaften des Vorläuferproteins

einen erheblichen Einfluß darauf haben, ob es in der RMA-Situation exportiert wird oder nicht. Die strukturellen Eigenschaften eines Vorläufers werden unter anderem durch seine Signalsequenz beeinflusst (Kapitel 1.1.1.). Diese verzögert beispielsweise die Faltung des Vorläufers in seine Tertiärstruktur und ermöglicht hierdurch seine Wechselwirkung mit den Export-Komponenten. Signalsequenzen weisen generell nur eine geringe Ähnlichkeit auf Sequenzebene auf. Um auszuschliessen, dass der OmpA-Exportdefekt auf dessen Signalsequenz (SS_{OmpA}) beruht, wurde anstelle der SS_{OmpA} die Lipase-Signalsequenz (SS_{Lip}) vor den reifen Teil des OmpA-Proteins fusioniert und die SS_{OmpA} vor die Lipase. Dies hatte allerdings keinen Einfluß auf das Exportverhalten des OmpA-Proteins bzw. der Lipase in der RMA. (M. Klein, persönliche Mitteilung). Dies zeigte, dass nicht spezielle Eigenschaften der Signalsequenz für den ineffizienten OmpA-Export in der RMA verantwortlich ist, sondern offensichtlich der gesamte Vorläufer für den Export eine wichtige Rolle spielt. Desweiteren belegte die effiziente OmpA-Membrantranslokation im *S. carnosus*-Wildtyp (Meens *et al.*, 1993 & 1997), dass auch das *S. carnosus* SecA nicht *per se* für den Exportdefekt verantwortlich ist. Stattdessen kann man hieraus folgern, dass in der RMA eine komplexe Wechselwirkung gestört sein muß, an der mindestens drei Partner beteiligt sind: SecA(Sc), OmpA-Vorläufer (PräOmpA) und eine unbekannte Komponente des *B. subtilis* Exportapparates (SecX(Bs)). Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die gestörte SecA(Sc)-SecX(Bs)-Wechselwirkung in der RMA zu optimieren, indem SecX(Bs) durch SecX(Sc) ersetzt wird. Wenn dies möglich ist kann man die Aussage treffen, dass SecA(Sc) und SecX(Sc) miteinander sowie mit dem Exportprotein wechselwirken.

In *E. coli* gibt es Hinweise darauf, dass SecA und SecG funktionelle Partner sind (Nishiyama *et al.*, 1996; Matsumoto *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 1998; Ramamurthy *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1998). Analog zu *E. coli* könnten diese Wechselwirkungen auch in *B. subtilis* und *S. carnosus* für die Proteintranslokation wichtig sein, so dass eine gestörte SecA(Sc)-SecG(Bs)-Wechselwirkung in der RMA für die Wachstums- und Exportdefekte verantwortlich sein könnte. Desweiteren sind in *E. coli* auch konkrete SecA-SecY-Kontakte demonstriert worden (Manting *et al.*, 1997; Snyders *et al.*, 1997), so dass auch diese Wechselwirkung in *B. subtilis* und *S. carnosus* für den Protein-Export von Bedeutung sein könnte und möglicherweise in der RMA nicht optimal funktioniert.

4.2.1. Die SecA-SecG-Wechselwirkung ist für den Wachstums- und Proteintranslokationsdefekt der RMA nicht verantwortlich

Um zu untersuchen, ob der beobachtete konditionale Exportdefekt und das kältesensitive Wachstumsverhalten der RMA die Folge einer nicht optimalen Wechselwirkung zwischen dem *S. carnosus* SecA und dem SecG-Protein von *B. subtilis* ist, wurde zusätzlich zum *S. carnosus* SecA auch das SecG-Protein von *S. carnosus* in die RMA eingebracht (Kapitel 3.2.1.). Auf diese Weise sollte die SecA-SecG-Wechselwirkung in der resultierenden RMA/G optimiert werden. Das

Einbringen des *S. carnosus* SecG-Proteins in die RMA führte allerdings nicht zum Verschwinden der beobachteten Wachstums- und Export-Defekte. Es wurden jedoch auch keine neuen Phänotypen bei der RMA/G-Mutante festgestellt. Die RMA/G verhielt sich wie die RMA, d. h. die RMA/G zeigte ebenfalls einen konditionalen Protein-Exportdefekt dessen Folge ein kältesensitives Wachstumsverhalten war. Interessanterweise zeigte das Verhalten einer RMG-Mutante (Kapitel 3.2.1.1.), dass das *S. carnosus* SecG-Protein, im Gegensatz zum SecA, mit den Translokase-Untereinheiten von *B. subtilis* optimal wechselwirken kann. Das Wachstums- und Exportverhalten der RMG-Mutante entsprach dem eines *B. subtilis* Wildtypstammes. Somit kann aus den mit der RMG und der RMA/G-Mutante erhaltenen Ergebnissen gefolgert werden, dass die SecA(Sc)-SecG(Bs)-Wechselwirkung in der RMA nicht gestört ist. SecG stellt folglich nicht die gesuchte Komponente SecX dar.

In *E. coli* wird die N-terminale Domäne des SecA-Proteins (Mori *et al.*, 1998) und der cytosolische Bereich des SecG-Proteins (Nishiyama *et al.*, 1996) als potentielle Kontaktstelle zwischen beiden Proteinen postuliert. Analog zu *E. coli* könnten auch in *B. subtilis* und *S. carnosus* das SecA und SecG-Protein in diesen Regionen wechselwirken. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sind die SecA-SecG-Wechselwirkungen weder in der RMG noch in der RMA gestört. Dies bedeutet, dass die für die funktionellen Wechselwirkungen relevanten Kontakte sich zwischen den entsprechenden *B. subtilis* und *S. carnosus* Proteinen in der RMA und RMG ausbilden können. Ein Vergleich auf Ebene der Primärsequenz zwischen dem N-Terminus der SecA-Proteine bzw. den cytosolischen Regionen der SecG-Proteine von *B. subtilis* und *S. carnosus* zeigt, dass diese Bereiche gut übereinstimmen und sehr hydrophob sind. Daher kann man vermuten, dass diese hydrophoben Wechselwirkungen in *B. subtilis* und in *S. carnosus* für die Proteintranslokation eine wichtige Rolle spielen.

4.2.2. Eine gestörte Wechselwirkung zwischen dem *S. carnosus* SecA und dem SecY-Protein von *B. subtilis* bedingt in der RMA Export- und Wachstumsdefekte

Während in *E. coli* ein direkter SecA-SecG-Kontakt nicht bekannt ist, ist dieser für SecA und SecY demonstriert worden (Manting *et al.*, 1997; Snyder *et al.*, 1997). In *B. subtilis* gibt es Hinweise darauf, dass eine SecA-SecY-Wechselwirkung für die Sporenbildung benötigt wird (Kobayashi *et al.*, 2000). Eine konkrete Funktion dieser Wechselwirkung im Zusammenhang mit Wachstum und Protein-Export ist in Gram-positiven Bakterien jedoch nicht bekannt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die SecA(Sc)-SecG(Bs)-Wechselwirkung in der RMA nicht gestört ist, wurde im weiteren untersucht, ob eine nicht optimale SecA(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkung in der RMA für den Protein-Exportdefekt verantwortlich ist. Um eine optimierte SecA(Sc)-SecY(Sc)-Wechselwirkung in der RMA zu ermöglichen, wurde zusätzlich zum *S. carnosus* SecA das SecY-Protein von *S. carnosus* in die RMA eingebracht. Die Anwesenheit des *S. carnosus* SecY-Proteins in der RMA führte dann in der Tat zum Verschwinden des Wachstums-

und Export-Defektes. Dies zeigte, dass die RMA-Defekte auf einer gestörten SecA(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkung beruhen. Somit wurde in Gram-positiven Bakterien zum ersten Mal eine für die Physiologie und insbesondere für den Protein-Export wichtige SecA-SecY-Wechselwirkung aufgezeigt. Im Gegensatz zur SecA-SecG-Wechselwirkung ist also die Wechselwirkung zwischen den zentralen Komponenten SecA und SecY für einen effizienten *in vivo*-Protein-Export absolut notwendig. Die Störung der SecA(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkung in der RMA beruht vermutlich auf geringfügig unterschiedliche Oberflächeneigenschaften (Ladungen, hydrophile und hydrophobe Domänen) der SecA-Proteine von *B. subtilis* und *S. carnosus*. SecY und SecE bilden eine Pore (siehe Abb. 39), in die SecA vermutlich während der Proteintranslokation inseriert. Die Oberflächen zwischen SecA(Bs) und SecY(Bs) sind im Verlauf der Evolution optimal aufeinander abgestimmt worden. Bei der SecA(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkung natürlich nicht der Fall. Da jedoch das *S. carnosus* SecA prinzipiell die Eigenschaften des *B. subtilis* SecA-Proteins auf Ebene der Primärsequenz besitzt, zeigt das Verhalten der RMA, dass bereits kleinste Änderungen im SecA (und vermutlich auch im SecY) einen dramatischen Effekt auf das Exportverhalten bestimmter Vorläufer hat. Bedingt durch eine unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheit des *S. carnosus* SecA-Proteins könnte (a) (Abb. 38, Punkt 2) die Bindungsaffinität zum SecY-Protein von *B. subtilis* gegenüber der Wildtypsituation verringert und / oder (b) (Abb. 38, Punkt 3) die SecA(Sc)-Insertion in die *B. subtilis* Translokationspore gestört sein. Der letzte Aspekt ist besonders für die Ausbildung des Translokations-Initiationskomplexes wichtig, der eine Grundvoraussetzung für die nachfolgende Membrantranslokation des Vorläuferproteins ist.

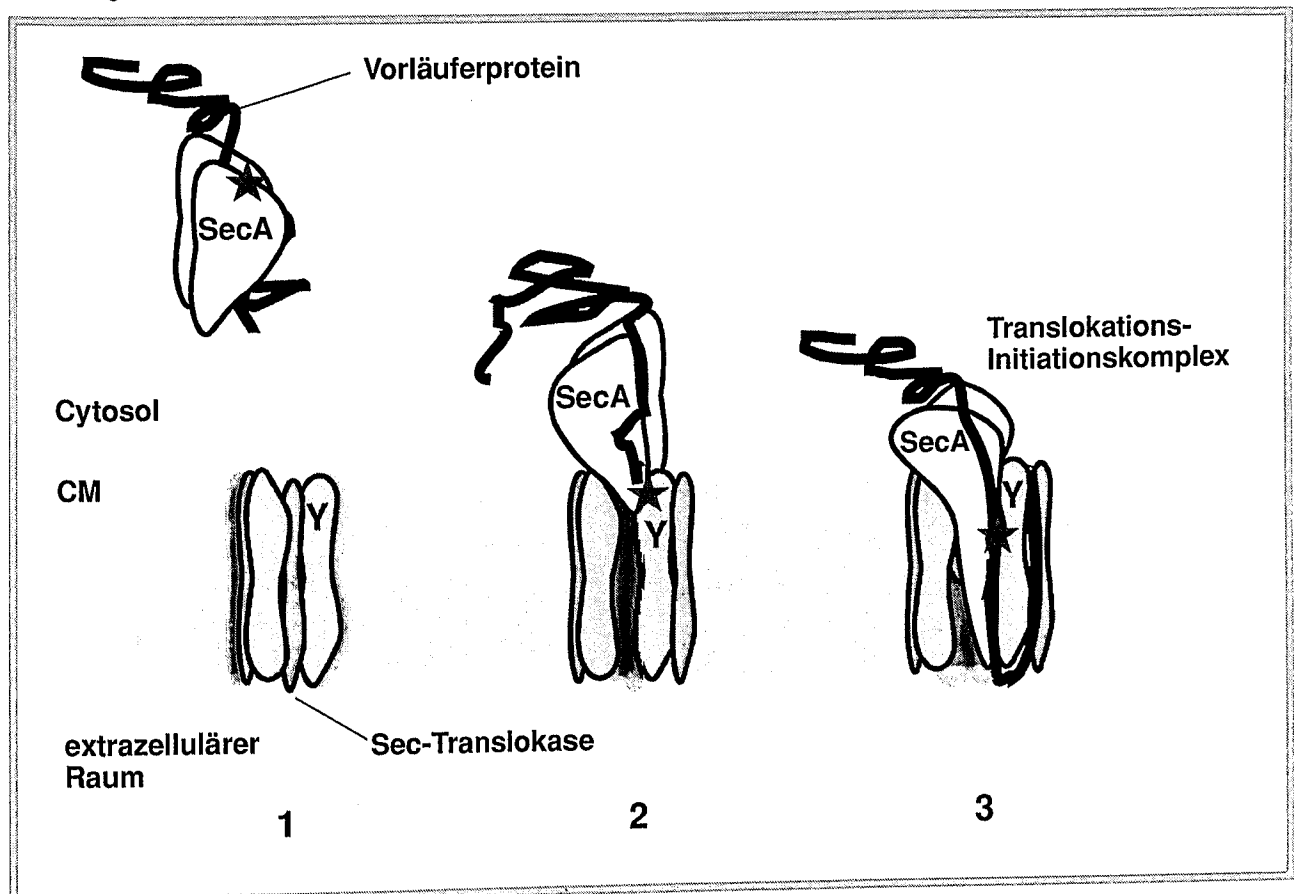


Abb. 38: Die einleitenden Schritte der Proteintranslokation in der *secA*-Austauschmutante von *B. subtilis* (RMA). 1: Bindung zwischen *S. carnosus* SecA und Vorläuferprotein. 2: Bindung des SecA(Sc)-Vorläuferprotein-Komplexes an die Innenseite der Plasmamembran durch Wechselwirkung mit dem *B. subtilis* SecY-Protein (Y). 3: Insertion des SecA(Sc)-Vorläufer-Komplexes in die *B. subtilis* Translokationspore (= Ausbildung des Initiationskomplexes). Dabei wird ein N-terminaler "Loop" des Vorläufers, welcher die Spaltstelle der Signalpeptidase enthält, auf der Außenseite der Membran exponiert. Der Stern markiert die Schritte, die in der RMA gestört sein könnten. CM: Cytoplasmamembran

Nicht gestört ist in der RMA vermutlich der Bindungsschritt zwischen dem SecA(Sc)-Protein und den Vorläuferproteinen (hiervon ausgenommen könnten allerdings bestimmte Vorläufer sein, die für die Initiation der Sporulation und Kompetenz in *B. subtilis* von Bedeutung sind (siehe Kapitel 4.2.)). Hierfür spricht, dass der OmpA-Vorläufer im *S. carnosus* Wildtyp exportiert wird. Dies zeigt, dass im *S. carnosus* Wildtyp eine produktive SecA(Sc)-PräOmpA-Wechselwirkung stattfindet, so dass dies analog auch in der RMA der Fall sein sollte. Die SecA-Vorläufer-Bindung könnte bereits im Cytosol (Abb. 38, Punkt 1) oder, wie für *E. coli* gefordert, an der CM (Abb. 38, Punkt 2) erfolgen. Für eine Bindung im Cytosol spricht die Tatsache, dass *B. subtilis* kein SecB-Homologes besitzt. In *E. coli* bindet SecB den Vorläufer zu einem post-translationalen Zeitpunkt und verzögert so dessen Faltung in eine Tertiärstruktur. Hierdurch wird der Vorläufer in einer exportkompetenten Konformation gehalten. Zudem ist das SecB für das Protein-Targeting notwendig (siehe Kapitel 1.1.2.2.). Diese Aufgaben könnte in Gram-positiven Bakterien das SecA-Protein übernehmen. In diesem Zusammenhang sind die Befunde von Herbort *et al.* (1999) erwähnenswert, die herausfanden, dass die SecA-Menge in *B. subtilis* am Ende der exponentiellen Wachstumsphase ein Maximum erreicht. In dieser Phase werden auch verstärktextercytosolische Enzyme sekretiert. Demnach scheint die *secA*-Expression auf den Beginn der größten Sekretionsaktivität hin optimiert zu sein. Es wird deshalb vermutet, dass das zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase im Überschuß vorliegende SecA-Protein an die Vorläufer bindet, um diese - analog zu SecB in *E. coli* - zunächst im Cytosol "abzupuffern" und in einer exportkompetenten Konformation zu halten.

Auch Schritt 2 (Abb. 38), also die Bindung des SecA-Vorläufer-Komplexes an das membrangebundene SecY, könnte in der RMA gestört sein. Eine niedrige SecA(Sc)-SecY(Bs)-Affinität würde das Zeitfenster für eine funktionelle Wechselwirkung zwischen SecA, dem an SecA gebundenen Vorläufer und SecY deutlich verkleinern und dadurch die Einleitung der Translokation unwahrscheinlicher machen. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass in *E. coli* bestimmte Mutationen im *secY*-Gen eine erhöhte SecA-SecY-Affinität zur Folge haben. Dies führt dazu, dass der Export von Proteinen mit defekten Signalsequenzen möglich wird, während dies im *E. coli* Wildtyp nicht funktioniert (Manting *et al.*, 1999; van der Wolk *et al.*, 1998). Dies bedeutet offensichtlich, dass eine verbesserte Bindung zwischen SecA und SecY die "proof-reading"-Aktivität (Überprüfungsmechanismus) der Translokase umgeht. Hieraus könnte man nun schliessen, dass in der RMA-Hybridtranslokase die SecA-SecY-Affinität gegenüber der *B.*

subtilis-Wildtypsituation verringert und damit die "proof-reading"-Aktivität entsprechend erhöht ist. Als Folge davon werden insbesondere heterologe Vorläufer von der RMA-Hybridtranslokase als Substrat nicht mehr akzeptiert.

Sehr wahrscheinlich ist in der RMA jedoch hauptsächlich Schritt 3, also die Ausbildung des Initiationskomplexes, gestört. Damit dieser Schritt erfolgreich verlaufen kann, müssen mindestens drei Komponenten, nämlich SecA, SecY und insbesondere auch das Vorläuferprotein, funktionell zusammenwirken. Der in der RMA vorliegende Exportdefekt betrifft jedoch nur ganz bestimmte Vorläufer (z. B. OmpA), während andere Proteine (z. B. die Lipase) problemlos transloziert werden. Er ist also vorläuferspezifisch. Daraus kann geschlossen werden, dass man die SecA-SecY-Wechselwirkung nicht isoliert betrachten darf, sondern das Vorläuferprotein als gleichberechtigten Partner in dieses komplexes Wechselwirkungssystem mit einbeziehen muß. Auf diesen Punkt soll im nächsten Kapitel detaillierter eingegangen werden. .

Untersuchungen zum Protein-Export zeigten, dass die Exporteffizienz des Stammes RMA/Y immer noch niedriger ist als beim *B. subtilis* Wildtyp. Daraus kann man schliessen, dass noch mindestens eine weitere Störung vorhanden sein muß. Vorstellbar wäre, dass durch das Einbringen des *S. carnosus* SecY-Proteins zwar die gestörte SecA(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkung durch eine optimale SecA(Sc)-SecY(Sc)-Wechselwirkung ersetzt wurde. Gleichzeitig könnte in diesem Stamm aber eine andere Wechselwirkung - beispielsweise zwischen dem eingebrachten *S. carnosus* SecY und dem SecE-Protein von *B. subtilis* - neu aufgekommen sein. Hierfür sprechen Ergebnisse, die im Verlaufe dieser Arbeit erhalten wurden und eindeutig zeigen, dass außer einer optimalen SecA-SecY- auch eine funktionell abgestimmte SecE-SecY-Wechselwirkung (siehe Kapitel 4.2.5.) für den Protein-Export notwendig ist. Es ist somit durchaus denkbar, dass für eine effiziente Proteintranslokation optimale Wechselwirkungen zwischen allen zentralen Translokase-Untereinheiten erforderlich sind, wobei zusätzlich die Natur des Vorläufers eine Rolle spielt.

4.2.3. Die Ausbildung eines funktionellen Translokations-Initiationskomplexes, bestehend aus SecA, SecY und Vorläuferprotein, ist für eine effiziente Proteintranslokation essentiell

Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen, dass ein früher Schritt der Proteintranslokation in der RMA, vermutlich der Übergang von Schritt 2 zu Schritt 3 (Abb. 38), gestört ist. Bei *E. coli* hat man gefunden, dass bereits die erstmalige Insertion des SecA-Proteins, die bei der Bildung des Initiationskomplexes erfolgt, ausreicht, um die Prozessierung des Vorläuferproteins durch die Signalpeptidase zu ermöglichen (Schiebel *et al.*, 1991; siehe Abb. 38, Punkt 3). Analog zu *E. coli* könnte dies auch bei *B. subtilis* und *S. carnosus* der Fall sein. Das OmpA-Vorläuferprotein wird in der RMA-Mutante nicht prozessiert. In Anwesenheit des *S. carnosus* SecY-Proteins funktioniert dieser Schritt allerdings wieder und das OmpA wird nachweislich transloziert (Kapitel 3.2.2.3.). Dies könnte bedeuten, dass die SecA(Sc)-Insertion in die *B. subtilis* SecY/E-Pore in der RMA gestört ist, so dass die Spaltstelle der OmpA-Signalsequenz der Signalpeptidase nicht effizient

genug präsentiert wird. (Schiebel *et al.* 1991). Dies bedeutet, dass in der RMA im Falle des OmpA-Proteins die Ausbildung des Translokations-Initiationskomplexes signifikant gestört sein muß. Dieser besteht aus mindestens drei gleichwertigen Partnern: SecA, SecY und dem Vorläuferprotein. In der RMA ist eine dieser Wechselwirkungen gestört, was zu einer Verstärkung des "proof-readings" führt. Für eine erfolgreiche Translokation ist also die Ausbildung dieses trimeren Komplexes notwendig.

In *E. coli* wird dagegen für den einleitenden Schritt der Proteintranslokation nur die SecA-SecY-Bindungsstabilität als kritisch angesehen (van der Wolk *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass eine erhöhte SecA-SecY-Affinität auch zu einer effizienteren Einleitung der Proteintranslokation führt. Die in dieser Arbeit erhaltenen Befunde zeigen jedoch, dass 1. die SecA-SecY-Wechselwirkung nicht unabhängig vom Vorläuferprotein, also isoliert betrachtet werden kann und 2. der Translokations-Initiationskomplex aus SecA, SecY und Vorläuferprotein gebildet wird, wobei strukturelle Eigenschaften des Vorläuferproteins für die Stabilität des trimeren Komplexes eine wichtige Rolle spielen. Damit hat sich die Verwendung von *B. subtilis* / *S. carnosus*-Hybridtranslokasen als Werkzeug zur Untersuchung der bakteriellen Proteintranslokation mehr als bewährt.

Die biotechnologische Bedeutung dieser Ergebnisse für Ansätze zur Sekretion von heterologen Proteinen wird im Kapitel 4.2.6. diskutiert.

4.2.4. Die Funktion der Sec-Translokase ist für die Sporenbildung und Kompetenzentwicklung von *B. subtilis* essentiell

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Sporulation zeigten, dass etwa jede dreizehnte vegetative Zelle des *B. subtilis* Wildtyps unter bestimmten Bedingungen eine Spore ausbildet. Die RMA sporulierte dagegen nicht. Der Sporulationsdefekt der RMA, der bereits bei der permissiven Temperatur (37° C) zu beobachten ist, läßt sich wahrscheinlich auf einen zumindest stark eingeschränkten Export pheromonähnlich-wirkender Peptide (wie z. B. PhrA oder CSF ("competence and sporulation stimulating factor")) zurückführen. Deren Akkumulation im Medium und Wiederaufnahme in die Zelle ist für die Initiation der Sporulation entscheidend. Darüberhinaus ist es auch möglich, dass die mit 40 (CSF) bzw. 44 Aminosäuren (PhrA) (Solomon *et al.*, 1996) relativ kurzen Vorläuferpeptide nicht effizient mit dem *S. carnosus* SecA wechselwirken können und deswegen schlechter exportiert werden (siehe Abschnitt 4.2.). Gegen diese Vermutung spricht allerdings, dass der Sporulationsdefekt der RMA zumindest teilweise in Anwesenheit des *secY*-Gens von *S. carnosus* verschwindet. Dieser Befund ist ein sehr guter Hinweis darauf, dass die Membrantranslokation homologer extracytosolischer Proteine, welche für die Initiation der Sporenbildung essentiell sind, aufgrund einer gestörten SecA(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkung in der RMA nicht effizient abläuft. In diesem Zusammenhang sind folgende Daten erwähnenswert: Die sogenannte *secA12*-Mutante von *B. subtilis* (Asai *et al.*, 1997) zeigt ebenso wie die RMA einen

Sporulationsdefekt. Interessanterweise vermuteten die Autoren zunächst, dass das *B. subtilis* SecA bei der Sporulation eine regulatorische Funktion unabhängig vom Protein-Export ausübt. Der Sporulationsdefekt der *secA12*-Mutante wurde jedoch durch Mutationen im *secY*-Gen supplemiert (Kobayashi *et al.*, 2000). Die Suppressormutationen führten zu Austausch in den TMS 2, 7 und 10 des SecY-Proteins. Daraus wurde geschlossen, dass diese TMS bei der SecA-SecY-Wechselwirkung eine wichtige Rolle spielen. Zudem wurde angenommen, dass sich während der Peptidtranslokation ein trimerer Komplex, bestehend aus SecA, SecY und der Signalsequenz des Vorläuferpeptids bildet. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt und spricht gegen eine regulatorische Funktion des SecA-Proteins bei der Sporenbildung.

Die Untersuchungen zur Kompetenz zeigten, dass die Transformationsrate der RMA im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 5330 verringert war. Der Kompetenzdefekt der RMA beruht analog zum Sporulationsdefekt sehr wahrscheinlich auf einem verminderten Export bestimmter Vorläuferproteine wie beispielsweise CSF ("competence and sporulation stimulating factor"), die nach Wiederaufnahme in die Zelle die Initiation der Kompetenzentwicklung regulieren (Lazazzera *et al.*, 1999). Die Kompetenz der RMA wurde in Anwesenheit des *S. carnosus* *secY*-Gens um den Faktor 20 erhöht. Dieser Befund deutet auf einen leicht verbesserten Export von kompetenzspezifischen Proteinen in der RMA durch das *S. carnosus* SecY-Protein hin.

Die Resultate, die aus den Untersuchungen zur Sporulation und Kompetenz erhalten wurden, stehen im Einklang mit den Befunden von Kobayashi *et al.* (2000) (siehe oben). Sie deuten darauf hin, dass SecA keine direkte Funktion bei der Sporulation übernimmt, sondern dass ein reibungsloses Funktionieren der Sec-Translokase sowohl für die Sporenbildung als auch für die Kompetenzentwicklung in *B. subtilis* essentiell ist.

4.2.5. Auch eine funktionelle SecE-SecY-Wechselwirkung ist in *B. subtilis* für die Membrantranslokation von Vorläuferproteinen von Bedeutung

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten belegen, dass eine funktionelle Wechselwirkung zwischen den zentralen Komponenten SecA und SecY für den Protein-Export absolut notwendig ist. Hingegen ist das akzessorische SecG nicht essentiell, trägt allerdings durch seine Anwesenheit zu einer Stimulation der Proteintranslokation bei (Stichwort: "molekulare Schmiere"). Im Gegensatz zum SecG ist das SecE-Protein eine essentielle Komponente des bakteriellen Proteinexportapparates. Zahlreiche Studien in *E. coli* deuten eine enge Beziehung zwischen dem SecE- und dem SecY-Protein an (siehe Kapitel 1.3.). Die konkrete Funktion des SecE-Proteins ist in Bakterien allerdings unbekannt.

Wie für das SecA gezeigt, kann in *B. subtilis* bereits ein einzelner Austausch eines *sec*-Gens gegen das entsprechende Gen von *S. carnosus* zu Defekten führen, die einen experimentellen Ansatz für *in vivo*-Untersuchungen zum bakteriellen Protein-Export bieten (Klein & Freudl, in Vorbereitung). Um einen Hinweis auf die Funktion des SecE-Proteins erhalten zu können, wurde

analog zur RMA eine SecE-Austauschmutante von *B. subtilis* (RME) konstruiert. In dieser Mutante ist das *B. subtilis* secE-Gen auf dem Chromosom gegen das entsprechende Gen von *S. carnosus* ausgetauscht (Kapitel 3.2.3.). Die Homologie zwischen dem *S. carnosus* SecE-Protein und dem SecE von *B. subtilis* liegt bei 61% (54% Identität) (Meens *et al.*, 1994). Beide Proteine besitzen ein TMS mit einer davor liegenden cytoplasmatischen Domäne, was zeigt, dass sie prinzipiell ähnlich aufgebaut sind. Dennoch unterscheiden sich die SecE-Proteine von *S. carnosus* und von *B. subtilis* in 39% der Reste. Dies lässt vermuten, dass, bedingt durch die unterschiedliche Primärsequenz, die SecE(Sc)-Struktur gegenüber der SecE(Bs)-Struktur geringfügig verändert ist. Im Gegensatz zur RMA zeigt die RME bereits bei 37 °C einen deutlichen Wachstumsdefekt. Außerdem ist bei dieser Mutante nicht nur der Export des OmpA-Proteins aus *E. coli*, sondern auch der Export der *S. hyicus* Lipase stark beeinträchtigt. Im Gegensatz zur RMA besitzt die RME demnach keine Vorläufer-Spezifität. Diese Befunde deuten darauf hin, dass in der RME ein wesentlich massiverer Exportdefekt vorliegt als in der RMA. Vermutlich als Folge des gestörten Protein-Exports wie die RME wie die RMA Defekte in der Sporenbildung und Kompetenzentwicklung auf. Dies steht im Einklang mit der Vermutung, dass ein reibungsloses Funktionieren der *B. subtilis* Sec-Translokase für die Sporenbildung und Kompetenz von Bedeutung ist (Kobayashi *et al.*, 2000; diese Arbeit, Kapitel 4.2.4.).

Die mit der RME erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass das *S. carnosus* SecE nur bedingt die SecE-Funktion in *B. subtilis* übernehmen kann. Dies ist um so erstaunlicher, da das *S. carnosus* SecE mit einer vergleichsweise geringeren Ähnlichkeit zum *E. coli* SecE von 44% (26% Identität) den kaltesensitiven Wachstums- und Protein-Export-Defekt einer *E. coli* secE-Mutante komplementieren kann (Meens *et al.*, 1994). Auch das *B. subtilis* SecE komplementiert das kaltesensitive Wachstumsverhalten dieser Mutante (Jeong *et al.*, 1993). Dies zeigt, dass die Gram-positiven SecE-Proteine mit den restlichen Komponenten des *E. coli*-Proteinexportapparates produktiv wechselwirken können. Die Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen und dem Verhalten der RME kann nicht erklärt werden.

Für den Wachstums- und Export-Defekt der RME könnte möglicherweise der folgende Aspekt verantwortlich sein: So führt in *E. coli* ein Basenaustausch unmittelbar vor dem ATG-Startkodon des secE-Gens zu einem kaltesensitiven Wachstumsverhalten und es konnte gezeigt werden, dass das Verhalten dieser *E. coli* secE-Mutante auf einer Reduktion der SecE-Menge um etwa 60% gegenüber dem Wildtypstamm beruht (Schatz *et al.*, 1991). Beeinträchtigt werden könnte die *S. carnosus* secE-Expression in der RME durch folgende Tatsache: Bei der RME-Konstruktion wurde die Basensequenz zwischen der Ribosombindestelle und dem ATG-Startkodon des *S. carnosus* secE-Gens im Vergleich zur Wildtypsequenz verändert. Dies könnte in der RME-Mutante analog zur erwähnten *E. coli*-Mutante zu einer reduzierten secE-Expression führen. Da kein geeigneter *S. carnosus* SecE-Antikörper zur Verfügung stand, konnte die Expression des *S. carnosus* secE-Gens in der RME nicht direkt überprüft werden. Es kann somit nicht

ausgeschlossen werden, dass die *S. carnosus* SecE-Menge in der RME gegenüber der SecE-Menge im *B. subtilis* Wildtyp erniedrigt ist. Gegen diese Möglichkeit sprechen jedoch folgende Punkte: (a) Ähnlich wie bei der RME-Konstruktion wurde auch bei der RMG der Sequenzbereich zwischen Ribosomenbindestelle und ATG-Startkodon gegenüber der *B. subtilis* Wildtypsituation geringfügig verändert. Dies hat allerdings nachweislich keinen Einfluß auf die *secG*(Sc)-Expression in der RMG. (b) Durch das Einbringen des *S. carnosus secY*-Gens konnte das Wachstum der RME signifikant verbessert werden. Dies zeigte, dass der Wachstums- und Export-Defekt der RME auf einer nicht optimalen SecE(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkung beruhen muß und vermutlich nicht auf eine verringerte SecE(Sc)-Menge zurückgeht. Eine funktionelle SecE-SecY-Wechselwirkung ist also neben der SecA-SecY-Wechselwirkung für den Export absolut notwendig. Die Störung der SecE(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkung beruht sehr wahrscheinlich auf einer geringfügig unterschiedlichen Struktur des SecE(Sc)-Proteins im Vergleich zum *B. subtilis* SecE. Im *B. subtilis*-Wildtyp sind die SecE(Bs)-SecY(Bs)-Kontaktflächen optimal aufeinander abgestimmt. Analog zu *E. coli* könnten dies folgende Regionen sein (siehe auch Kapitel 1.3., Abb. 3B): (a) Die SecY-C4- und SecE-C2-Domäne, (b) das SecE-TMS 3 und die SecY-TMS 2, 7 und 10 sowie (c) die periplasmatische Domäne 2 (P2) von SecE und die SecY-P1-Domäne. Diese potentiellen Kontaktflächen sind zwischen dem SecE(Sc) und dem SecY(Bs) natürlich nicht optimal aufeinander abgestimmt. Das Verhalten der RME zeigt nun, dass bereits kleinste Veränderungen - die SecE-Proteine von *S. carnosus* und *B. subtilis* sind sich prinzipiell sehr ähnlich - zu einem massiven Wachstums- und Protein-Export-Defekt führen können. Folgende für die Einleitung der Proteintranslokation wichtige Schritte könnten in der RME gestört sein: 1. Die effiziente Bildung des Translokations-Initiationskomplexes 2. Die Verdrängung der SecE-Transmembrandomäne von seiner SecY-Bindestelle durch das Signalpeptid eines translozierenden Vorläuferproteins (siehe Abb. 40).

Für die Störung des erstgenannten Vorgangs könnten geringfügig unterschiedliche strukturelle Eigenschaften der SecE-Proteine von *S. carnosus* und *B. subtilis* verantwortlich sein. SecY und SecE bilden einen Kanal und sind demnach eng miteinander assoziiert (Abb. 39).

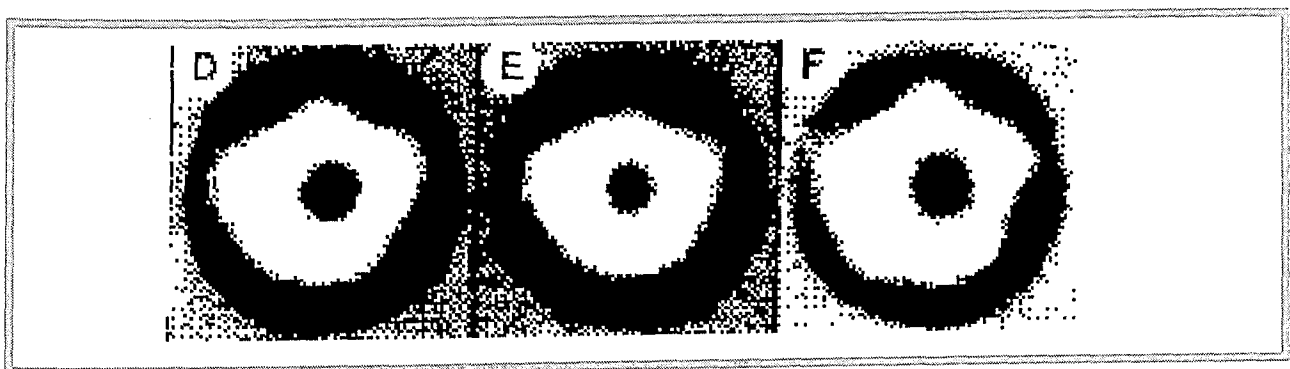


Abb. 39: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des SecY/E-Komplexes von *B. subtilis* (Meyer *et al.*, 1999). Weiß: SecY und SecE. In der Mitte des Komplexes (schwarz) die potentielle Pore in die vermutlich das SecA-Protein während der Proteintranslokation in- und einseriert.

Bedingt durch die genannten Unterschiede zwischen den beiden SecE-Proteinen könnte sich auch die räumliche Struktur des SecY(Bs)-Proteins und somit die Struktur der gesamten RME-Translokationspore ändern. Hierdurch wäre die Effizienz der SecA(Bs)-Insertion sehr wahrscheinlich herabgesetzt. Analog zur RMA wurde auch in der RME der OmpA-Vorläufer nur sehr ineffizient prozessiert (siehe Abschnitt 4.2.3.). Dies zeigt, dass auch in der RME vermutlich ein früher Schritt der Proteintranslokation, wie beispielsweise die Bildung des Translokations-Initiationskomplexes, massiv gestört ist.

Von Plath *et al.* (1998) wurde ein Modell zur Einleitung der Proteintranslokation entwickelt, welches analog auch für *B. subtilis* und *S. carnosus* zutreffen könnte (Abb. 40). Von den Autoren wurden systematische "cross-linking"-Studien durchgeführt, die chemische Vernetzungen zwischen der Signalsequenz eines Vorläuferproteins und der Hefe-Translokase hervorbrachten. Es wurde postuliert, dass die Signalsequenz eines Vorläuferproteins und Sss1p, das SecE-Homologe der Hefe, an die gleichen Oberflächen des Sec61p, dem SecY-Homologen, bindet. Sss1p/SecE könnte demnach die Translokationspore in Abwesenheit eines Vorläuferproteins verschlossen halten (Abb. 40, Punkt 1). Die Insertion der Signalsequenz würde zur Verdrängung von Sss1p/SecE von seiner Sec61p/SecY-Bindestelle führen und auf diese Weise die Translokationspore für das zu translozierende Polypeptid öffnen (Abb. 40, Punkt 2). Ein Verschluß der Translokationspore ist für die Zelle zweifelsohne essentiell, da ein unregulierter Durchfluß von Ionen beispielsweise den lebenswichtigen Protonen-Gradienten (PMF) zerstören könnte. Wie bereits eingangs erwähnt, wäre es demnach auch denkbar, dass in der RME der eben geschilderte Verdrängungsschritt gestört ist.

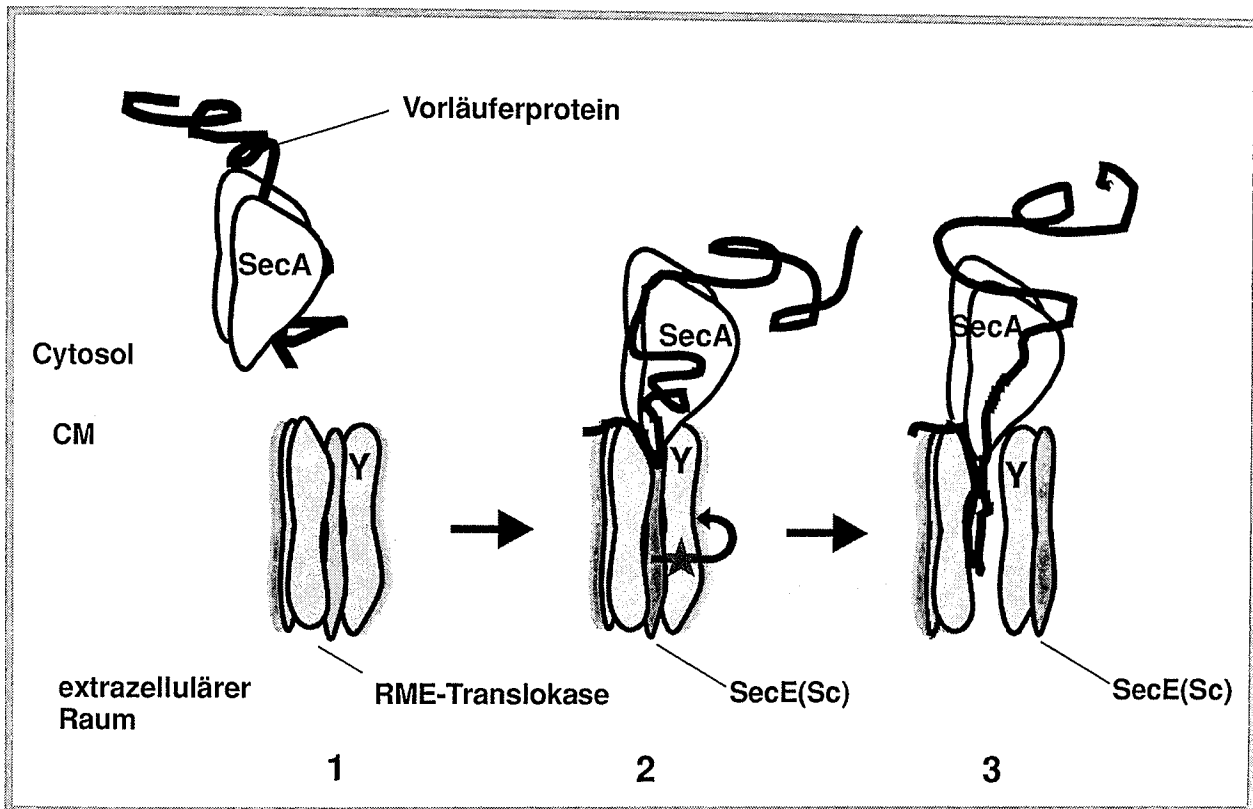


Abb. 40 Modell der einleitenden Schritte der Proteintranslokation in der *secE*-Austauschmutante von *B. subtilis* (RME). Die einzelnen Punkte sind im Text erläutert. SecE(Sc): SecE-Protein von *S. carnosus*; Y: SecY-Protein von *B. subtilis*; CM: Cytoplasmamembran. Der Stern deutet die Störung der dynamischen SecE(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkung an.

Im Gegensatz zum Wachstumsdefekt verschwand in der RME der Protein-Exportdefekt bezüglich der Proteine OmpA und Lipase in Anwesenheit des *S. carnosus* SecY-Proteins nicht. Das gleiche gilt für den Sporulationsdefekt. Dagegen war die Ausbildung der natürlichen Kompetenz in Gegenwart von SecY(Sc) leicht verbessert. Dies zeigt, dass die Funktion der RME-Hybridtranslokase durch das SecY(Sc) zumindest für bestimmte Vorläufersubstrate verbessert ist. Es müssen aber nach wie vor Störungen vorliegen. Vermutlich ist durch das Einbringen des *S. carnosus* SecY-Proteins in die RME die gestörte SecE(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkung durch eine optimale SecE(Sc)-SecY(Sc)-Wechselwirkung ersetzt worden. Gleichzeitig ist im Stamm RME (pWHYSc) (das Plasmid trägt das *S. carnosus* *secY*-Gen) vermutlich eine gestörte Wechselwirkung zwischen dem SecY(Sc) und dem SecA(Bs)-Protein neu aufgetreten. Hierfür sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit, die eindeutig zeigen, dass eine funktionell abgestimmte SecA-SecY-Wechselwirkung für den Protein-Export notwendig ist.

Um untersuchen zu können, ob für einen effizienten Protein-Export optimale Wechselwirkungen zwischen den zentralen Komponenten SecA, SecY, SecE und dem Vorläuferprotein ausreichend sind, müßte man in die Stämme RMA (pWHYSc) und RME (pWHYSc) zusätzlich das SecE(Sc) bzw. SecA(Sc)-Protein einbringen.

4.2.6. Biotechnologische Bedeutung der erzielten Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die geringfügige Störung der SecA(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkung in der RMA zu einer ineffizienten Membrantranslokation des OmpA-Proteins führt, während die Lipase exportiert wird. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, dass für die im *B. subtilis* und *S. carnosus* Wildtyp stattfindene Membrantranslokation des OmpA-Proteins eine optimale SecA-SecY-Wechselwirkung absolut notwendig ist. Während es sich bei der *S. hyicus* Lipase um ein typisches Exportprotein Gram-positiver Bakterien handelt, kann OmpA als Vorläufer aus einem Gram-negativen Bakterium als ein guter Vertreter für heterologe Exportproteine angesehen werden. Dies könnte bedeuten, dass bei einer ineffizienten Sekretion heterologer Proteinen in den Wildtypen von *B. subtilis* bzw. auch *S. carnosus* die Wechselwirkung zwischen den drei gleichwertigen Partnern SecA, SecY und Vorläufer optimiert werden müßte. Um dies zu erreichen wäre es beispielsweise vorstellbar (a) eine ungerichtete Mutagenese im SecA und / oder SecY-Protein durchzuführen oder (b) gezielt Reste im SecA oder SecY auszutauschen. Hinweise, welche Reste beispielsweise in den Gram-positiven SecY-Proteinen für den Export wichtig sein könnten, kommen aus *E. coli*. So wurde gezeigt, dass der *in vitro*-Protein-Export um den Faktor 3 – 4 durch eine Mutation im TMS 7 von SecY verbessert wurde (Manting *et al.*, 1999). Der *in vivo*-Export eines heterologen Fusionsproteins wurde durch das Einbringen der SecY-Variante PrIA4 gar um den Faktor 9 verbessert (Perez-Perez *et al.*, 1994). Das PrIA4-Protein weist je eine Mutation im TMS 7 und 10 auf. Analog zu *E. coli* könnte demnach auch in *B. subtilis* und *S. carnosus* das TMS 7 von SecY für den Protein-Export von Bedeutung sein.

5. Zusammenfassung

Versuche zur Sekretion von heterologen Proteinen in Gram-positiven Bakterien zeigen, dass es häufig Probleme bei der Translokation über die Cytoplasmamembran gibt. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in nicht-optimalen Wechselwirkungen zwischen den Translokase-Untereinheiten (Sec-Komponenten) und dem zu exportierenden Protein. In der vorliegenden Dissertation wurde mit Hilfe von *Bacillus subtilis* / *Staphylococcus carnosus*-Hybridtranslokasen solche, für die Sekretion von heterologen Proteinen relevanten Wechselwirkungen im Detail untersucht. Ausgangspunkt der Arbeiten war eine *secA*-Austauschmutante von *B. subtilis* (RMA), in der das *B. subtilis* *secA*-Gen gegen das entsprechende Gen von *S. carnosus* auf dem Chromosom ausgetauscht ist. Der Austausch führt zu einer gestörten Wechselwirkung zwischen dem *S. carnosus* SecA-Protein (SecA(Sc)) und mindestens einer *B. subtilis* Translokase-Untereinheit (SecX(Bs)). Die Folge dieser Störung ist ein konditionaler Protein-Exportdefekt, der ein kältesensitives Wachstum zur Folge hat. Zudem wird ein heterologes Vorläuferprotein (Prä-OmpA von *Escherichia coli*) selektiv vom Protein-Export in der RMA ausgeschlossen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch das gezielte Einbringen weiterer *S. carnosus* Translokasekomponenten in die RMA die gestörten SecA(Sc)-SecX(Bs)-Wechselwirkungen zu identifizieren.

Für die geplanten Untersuchungen war es notwendig, das bislang noch fehlende *S. carnosus* *secG*-Gen zu klonieren. Die Klonierung eines mit einer *B. subtilis* *secG*-Sonde reagierenden DNA-Fragmentes und die anschließende funktionelle Charakterisierung ergab, dass *S. carnosus* ein zu den SecG-Proteinen von *E. coli* und *B. subtilis* homologes Protein besitzt, welches für eine effiziente *in vivo* und *in vitro*-Proteintranslokation erforderlich ist.

Die Charakterisierung einer *secG*-Austauschmutante von *B. subtilis* (RMG), in der das *B. subtilis* *secG*-Gen auf dem Chromosom gegen das *secG*-Gen von *S. carnosus* ausgetauscht ist zeigte, dass das *S. carnosus* SecG-Protein optimal mit den restlichen Translokase-Untereinheiten von *B. subtilis* wechselwirken kann. Die RMG verhielt sich wie ein *B. subtilis* Wildtypstamm und nicht wie die oben erwähnte RMA-Mutante, in der eine Wechselwirkung zwischen dem *S. carnosus* SecA und einer weiteren *B. subtilis* Sec-Komponente gestört ist. Der weitere Austausch des *B. subtilis* *secG*-Gens gegen das entsprechende Gen von *S. carnosus* auf dem Chromosom der RMA (RMA/G), führte nicht zum Verschwinden der RMA-Phänotypen. Die konstruierte RMA/G-Mutante verhielt sich wie die RMA. Dieses Ergebnis, sowie das Verhalten der RMG-Mutante zeigten, dass die SecA(Sc)-SecG(Bs)-Wechselwirkung in der RMA nicht gestört ist.

Durch das Einbringen des *S. carnosus* SecY-Proteins in die RMA wurde hingegen der kältesensitive Phänotyp sowie die selektive Diskriminierung des heterologen OmpA-Vorläufers vom Protein-Export aufgehoben. Dies zeigt, dass die SecA(Sc)-SecY(Bs)-Wechselwirkung in der RMA gestört ist. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass der OmpA-Vorläufer (wie sehr wahrscheinlich alle sekretorischen Proteine) in einer "frühen" Phase der Proteintranslokation von SecA und SecY gleichzeitig gebunden wird, das Vorläuferprotein also ein gleichwertiger Bestandteil eines mindestens trimeren Komplexes, bestehend aus Vorläufer, SecA und SecY-Protein ist, bei dem die Struktur des Vorläufers eine wichtige Rolle spielt. In einem vergleichbaren Ansatz wurde darüber hinaus gezeigt, dass außer einer optimalen SecA-SecY-Wechselwirkung auch eine optimal abgestimmte Wechselwirkung zwischen dem SecE und SecY-Protein für eine effiziente Proteintranslokation von Bedeutung ist.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen die Schlußfolgerung zu, dass die häufig beobachtete, ineffizient ablaufende oder völlig ausbleibende Membrantranslokation von heterologen Proteinen in Gram-positiven Wirtsbakterien auf einer ineffizienten bzw. unproduktiven Bildung eines Translokationsinitiationskomplexes, bestehend aus Vorläufer, SecA, SecY und (sehr wahrscheinlich) SecE beruht.

6. Literatur

- Akita, M., Sasaki, S., Matsuyama, S. und Mizushima, S., (1990) SecA interacts with secretory proteins by recognizing the positive charge at the amino terminus of the signal peptide in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**:8164-8169
- Altman, E., Emr, S.D. und Kumamoto, C.A. (1990) The presence of both the signal sequence and a region of mature LamB protein is required for the interaction of LamB with the export factor SecB. *J. Biol. Chem.* **265**, 30:18154-18160
- Asai, K., Kawamura, F., Sadaie, Y. und Takahashi, H. (1997) Isolation and characterisation of a sporulation initiation mutation in the *Bacillus subtilis* *secA* gene. *J. Bacteriol.* **179**(2):544-547
- Baba, T., Taura, T., Shimioke, T., Akiyama, Y., Yoshihisa, T. und Ito, K. (1994) A cytoplasmic domain is important for the formation of a SecY-SecE translocator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:4539-4543
- Bensadoun, A. und Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering material. *Anal. Biochem.* **70**:241-250
- Bieker, K., Philipps, G. J. und Silhavy, T. J. (1990) The *sec* and *pri* genes of *Escherichia coli*. *J. Bioenerg. Biomemb.* **22**:291-310
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523
- Bolhuis, A., Broekhuizen, C. P., Sorokin, A., van Roosmalen, M. L., Venema, G., Bron, S., Quax, W. J. und van Dijk, J. M. (1998) The SecDF protein of *Bacillus subtilis*, a molecular Siamese twin required for efficient protein secretion. *J. Biol. Chem.* **273**: 21217-21224
- Bost, S. und Belin, D. (1995) A new genetic selection identifies essential residues in SecE, a component of the *Escherichia coli* protein export machinery. *EMBO J.* **14**(18):4412-4421
- Bost, S. und Belin, D. (1997) *Pri* mutations in the *Escherichia coli* *secE* gene. *J. Biol. Chem.* **272**(7):4087-4093
- Breitling, R., Gerlach, D., Hartmann, M. und Behnke, D. (1989) Secretory expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* of the human interferon α genes directed by staphylokinase signals. *Mol. Gen. Genet.* **217**:384-391
- Briggs, M. S., Cornell, D.G., Dluhy, R. A. und Gierasch, L. M. (1986) Conformations of signal peptides induced by lipids suggest initial steps in protein export. *Science* **233**:206-8
- Brundage, L., Hendrick, J., P., Schiebel, E., Driessen, A. J. M. und Wickner, W. (1990) The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* **62**:649-657
- Cabelli, R.J., Dolan, K.M., Qian, L. und Oliver, D.B. (1991) Characterization of membrane-associated and soluble states of SecA protein from wild-type and *SecA51*(TS) mutant strains of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**:24420-24427
- Dalbey, R. E., Lively, M. O., Bron, S. und van Dijk, J. M. (1997) The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Science* **6**:1129-1138

- Dalbey, R.E. und Wickner, W. (1985) Leader peptidase catalyzes the release of exported proteins from the outer surface of the *Escherichia coli* plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **260**:15925-15931
- Dapic, V. und Oliver, D. B. (2000) Distinct membrane-binding properties of N- and C-terminal domains of *Escherichia coli* SecA ATPase. *J. Biol. Chem.* **275**(32):25000-25007
- De Gier, J. W., Valent, Q. A., von Heijne, G. und Lührink, J. (1997) The *E. coli* SRP: preferences of a targeting factor. *FEBS. Lett* **408**:1-4
- Den Blaauween, T., Fekkes, P., De Wit, J.G., Kuiper, W. und Driessen, A.J.M. (1996) Domain interaction of the peripheral preprotein translokase subunit SecA. *Biochemistry* **35**:11994-12004
- Dilsen, S., Paul, W., Sangathe, A., Tippe, D., Freudl, R., Thömmes, J., Kula, M.-R., Taktors, R., Wandrey, C. und Weuster-Botz, D. (2000) Fed batch production of recombinant human calcitonin precursor fusion protein using *Staphylococcus carnosus* as an expression-secretion system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**:361-369
- Driessen, A. J. M. (1992) Precursor protein translocation by the *Escherichia coli* translocase is directed by the proton motive force. *EMBO J.* **11**:847-853
- Driessen, A. J. M. (1994) How proteins cross the bacterial cytoplasmic membrane. *J. Membrane Biol.* **142**:145-159
- Driessen, A. J. M. (1998) Prokaryotic protein translocation. In *Protein Targeting and Translocation* p. 85 Portland Press Research Monograph XII
- Driessen, A. J. M., Fekkes, P. und van der Wolk, J. P. W. (1998) The Sec system. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:216-222
- Dubnau, D. (1991) Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* **55**:395-424
- Duong, F. und Wickner, W. (1997a) Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme *EMBO J.* **16**(10):2756-2768
- Duong, F. und Wickner, W. (1997b) The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J.* **16**(16):4871-4879
- Duong, F. und Wickner, W. (1999) The PrlA and PrlG phenotypes are caused by a loosened association among the translocase SecYEG subunits. *EMBO J.* **18**:3263-3270
- Economou, A., Pogliano, J. A., Beckwith, J., Oliver, D. B. und Wickner, W. (1995) SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell* **83**:1171-1181
- Economou, A. und Wickner, W. (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* **78**:835-843
- Eichler, J. und Wickner, W. (1997) Both an N-terminal 65-kDa domain and a C-terminal 30 kDa domain of SecA cycle into the membrane at SecYEG during translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:5574-5581
- Emr, S.D., Hanely-Way, S. und Silhavy, T. (1981) Suppressor mutations that restore export of a protein with a defective signal sequence. *Cell* **23**:79-88

- Fekkes, P., van der Does, G. und Driessen, A. J. M. (1997) The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J.* **16**:6105-6113
- Ferrari, E., Jarnagin, A. S. und Schmidt, B. F. (1993) Commercial production of extracellular enzymes, p. 917-937. In *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics*. American Society for Microbiology, Washington, D. C
- Fikes, J. D. und Bassford, P. J. (1989) Novel *secA* alleles improve export of maltose-binding protein synthesized with a defective signal sequence. *J. Bacteriol.* **171**:402-409
- Flower, A. M., Doebele, R. C. und Silhavy, T. (1994) PrlA and PrlG suppressors reduce the requirement for signal sequence recognition. *J. Bacteriol.* **176**(18):5607-5614
- Flower, A. M., Osborne, R. S. und Silhavy, T. (1995) The allele-specific synthetic lethality of *prlA-prlG* double mutants predicts interactive domains of SecY and SecE. *EMBO J.* **14**(5):884-893
- Flower, A. M., Hines, L. L. und Pfennig, P. L. (2000) SecG is an auxiliary component of the protein export apparatus of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **263**:131-136
- Gardel, C., Benson, S., Hunt, J., Michaelis, S. und Beckwith, J. (1987) *SecD*, a new gene involved in protein export in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**:1286-1290
- Gardel, C., Johnson, K., Jacq, A. und Beckwith, J. (1990) The *secD* locus of *E.coli* codes for two membrane proteins required for protein export. *EMBO J.* **9**:3209-3216
- Götz, F. und Schumacher, B. (1987) Improvements of protoplast transformation in *Staphylococcus carnosus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **40**: 285-288
- Guerout-Fleury, A.-M., Shazand, K., Frandsen, N. und Stragier, P. (1995) Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* **167**:335-336
- Hanada, M., Nishiyama, K.-i. und Tokuda, H. (1996) SecG plays a critical role in protein translocation in the absence of the proton motive force as well as at low temperature. *FEBS Lett.* **381** (1-2):25-28
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA Cloning: A practical approach* (ed. D. M. Glover) vol. 1 p. 109. IRL Press, Oxford
- Hanein, D., Matlack, K. E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K. U., Miller, K. R., Rapoport, T., A. und Akey, C. W. (1996) Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell* **87**:721-732
- Hardy, K.G. (1985) Bacillus cloning methods. In: DNA cloning Vol.II (Glover, D.M. ed), IRL Press, Oxford, Washington D.C. S. 1-17
- Hardy S. J. S. und Randall L. L. (1991) A kinetic partitioning model of selective binding of nonnative proteins by the bacterial chaperone SecB. *Science* **251**:439-443
- Harris, C. R. und Silhavy, T. J. (1999) Mapping an interface of SecY (PrlA) and SecE (PrlG) by using synthetic phenotypes and *in vivo* cross-linking. *J. Bacteriol.* **181**:3438-3444
- Hartl, F. U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J. P. und Wickner, W. (1990) The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell* **63**:269-279.

- Harwood, C. R. (1992) *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *TIBTECH* **10**:247-256
- Hell, K., Herrmann, J. M., Pratje, E., Neupert, W. und Stuart, R. A. (1998) Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:2250-2255
- Herbort, M. (1996) Untersuchungen zur Regulation der Expression des Gens für das SecA-Protein, einer zentralen Komponente des Proteinexportapparates von *Bacillus subtilis*. *Berichte des Forschungszentrums Jülich*; 3310: ISSN 0944-2952
- Herbort, M., Klein, M., Manting, E.H., Driessen, A.J.M. and Freudl, R. (1999) Temporal expression of the *Bacillus subtilis* secA gene, encoding a central component of the preprotein translokase. *J Bacteriol.* **181**(2):493-500
- Homma, T., Yoshihisa, T. und Ito, K. (1997) Subunit interactions in the *Escherichia coli* protein translocase: SecE and SecG associate independently with SecY. *FEBS Lett.* **408**:11-15
- Ito, K., Wittekind, M., Nomura, H., Shiba, K., Yura, T., Miura, A. und Nashimoto, H. (1983) A temperature-sensitive mutant of *E. coli* exhibiting slow processing of exported proteins. *Cell* **32**:789-797
- Jeong, S.M., Yoshikawa, H. und Takahashi, H. (1993) Isolation and characterization of the secE homologue gene of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **10**, 1:133-142
- Joly, J. C. und Wickner, W. (1993) The SecA and SecY subunits of translocase are nearest neighbours of a translocating preprotein, shielding it from phospholipids. *EMBO J.* **12**:255-263
- Joly, J. C., Leonard, M. und Wickner, W. (1994) Subunit dynamics in *Escherichia coli* preprotein translocase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:4703-4707
- Kaiser, K. und Murray, N.E. (1979) Physical characterization of the "Rac" prophage in *E.coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **175**:159-174
- Kaufmann, A., Manting, E. H., Veenendaal, A. K., Driessen, A. J. M. und van der Does, C. (1999) Cysteine-directed cross-linking demonstrates that helix 3 of SecE is close to helix 2 of SecY and helix 3 of a neighboring SecE. *Biochemistry* **38**:9115-9125
- Kawamura, F. und Doi, R. H. (1984) Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral protease. *J. Bacteriol.* **160**:442-444
- Kihara, A., Akiyama, Y. und Ito, K. (1995) FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:4532-4536
- Kim, Y. J., Rajapandi, T. und Oliver, D. B. (1994) SecA protein is exposed to the periplasmic surface of the *E. coli* inner membrane in its active state. *Cell* **78**:845-853
- Klein, M. Meens, J. und Freudl, R. (1995) Functional characterization of the *Staphylococcus carnosus* SecA protein in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* secA mutant strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**:271-277
- Klein, M. und Freudl, R. (2000) A *Bacillus subtilis* / *Staphylococcus carnosus* hybrid preprotein translocase selectively discriminates precursor proteins from translocation across the B. subtilis plasma membrane and causes severe defects in sporulation and competence development. (in Vorbereitung)

- Kobayashi, H., Ohashi, Y., Nanamiya, H., Asai, K. und Kawamura, F. (2000) Genetic analysis of SecA-SecY interaction required for spore development in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Letters* **184**:285-289
- Kumamoto, C.A. und Beckwith, J. (1983) Mutations in a new gene, *secB*, cause defective protein localisation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **54**(1):253-260
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessieres P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Codani JJ, Connerton IF, Danchin A, et al (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256
- Kusters, R. , Dowhan, R. F. und de Kruijff, B. (1991) Negatively charged phospholipids restore prePhoE translocation across phosphatidylglycerol-depleted inner membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **266**:8659-8662
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lazazzera, B. A., Solomon, J. M. und Grossmann, A. D. (1997) An export peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *Bacillus subtilis*. *Cell* **89**:917-925
- Lazazzera, B. A., Kurtser, I. G., McQuade, R. S. und Grossmann, A. D. (1999) An autoregulatory circuit affecting peptide signaling in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**:5193-5200
- Lecker, S., Lill, R., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C., Bassford, P., Kummamotot, C. und Wickner, W. (1989) Three pure chaperones of *Escherichia coli*-SecB, trigger factor and GroEL- form soluble complexes with precursor proteins *in vitro*. *EMBO J.* **9**:2703-2709
- Leenhouts, K., Buist, G., Bolhuis, A., ten Berge, A., Kiel, J., Mierau, I., Dabrowska, M., Venema, G. und Kok, J. (1996) A general system for generating unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes. *Mol. Gen. Genet.* **253**:217-224
- Liebl, W. (1986) Expression fusionierter Gene und Sekretion ihrer Produkte in Staphylokokken. Dissertation TU München
- Liepe, H.-U. (1982) Starter cultures and dry sausage. *Forum Mikrobiologie* **5**:10-15
- Luirink, J. und Dobberstein, B. (1994) Mammalian and *Escherichia coli* signal recognition particles. *Mol. Microbiol.* **11**:9-13
- Magnuson, R., Solomon, J. und Grossmann, A. D. (1994) Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *Bacillus subtilis*. *Cell* **77**:207-214
- Manting, E. H., van der Does, C. und Driessen, A. J. M. (1997) *In vivo* cross-linking of the SecA and SecY subunits of the *Escherichia coli* preprotein translocase. *J. Bacteriol.* **179**:5699-5704
- Manting, E. H., Kaufmann, A., van der Does, C. und Driessen, A. J. M. (1999) A single amino acid substitution in SecY stabilizes the interaction with SecA. *J. Biol. Chem.* **274**:23868-23874
- Manting, E. H., van der Does, C., Remigy, H., Engel, A. und Driessen, A. J. M. (2000) SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *EMBO J.* **19**(5):852-861

- Manting, E. H. und Driessen, A. J. M. (2000) *Escherichia coli* translokase: the unraveling of a molecular machine. *Mol. Microbiol.* **37**(2), 226-238
- Matsumoto, G., Yoshihisa, T. und Ito, K. (1997) SecY and SecA interact to allow SecA insertion and protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membran. *EMBO J.* **16**:6384-6393
- Matsumoto, G., Mori, H und Ito, K. (1998) Roles of SecG in ATP- and SecA-dependent protein translocation. *Proc. Natl. Sci. USA* **95**:13567-13572
- Matsuyama, S.-I., Fujita Y. und Mizushima, S. (1993) SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **11**:265-270
- Matzen, A. (2000) Untersuchungen von späten Schritten der Proteinsekretion bei den Gram-positiven Bakterien *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus carnosus*. *Berichte des Forschungszentrums Jülich; Jül-3745*: ISSN 0944-2952
- Meens, J., Frings, E., Klose, M. und Freudl, R. (1993) An outer membrane protein (OmpA) of *Escherichia coli* can be translocated across the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **9**:847-855
- Meens, J. Klose, M. und Freudl, R. (1994) The *Staphylococcus carnosus* secE gene: Cloning, nucleotide sequence, and functional characterization in *Escherichia coli* mutant strains. *FEMS Microbiol. Let.* **117**:113-120
- Meens, J., Herbort, M., Klein, M. und Freudl, R. (1997) Use of the pre-pro part of *Staphylococcus hyicus* lipase as a carrier for secretion of *Escherichia coli* outer membrane protein A (OmpA) prevents proteolytic degradation of OmpA by cell-associated protease(s) in two different Gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2814-2820
- Meyer, T. H., Menetret, F. J., Breitling, R., Miller, K. R., Akey, C. W. und Rapoport, T. A. (1999) The bacterial SecY/E translocation complex forms channel-like structures similar to those of the eucaryotic Sec61p complex. *J. Mol. Biol.* **285**:1789-1800
- Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Mori, H., Sugiyama, H., Yamanaka, M., Sato, K., Tagaya, M und Mizushima, S. (1998) Amino-terminal region of SecA is involved in the function of SecG for protein translocation into *Escherichia coli* membrane vesicles. *J. Biochem.* **124**:122-129
- Msadek, T. (1999) When the going gets tough: survival strategies and enviromental signaling networks in *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* **7**(5):201-207
- Murphy, C. K. und Beckwith, J. (1994) Residues essentiell for the function of SecE, a membrane component of the *Escherichia coli* secretion apparatus, are located in a conserved cytoplasmic region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:2557-2560
- Myers, E.W., Miller, W. (1988) Optimal alignment in linear space. *CABIOS* **4**:11-17
- Nagamori, S., Nishiyama, K.-i. und Tokuda, H. (2000) Two SecG molecules present in a single protein translocation machinery are functional even after crosslinking. *J. Biochem.* **128**:129-137
- Nakamura, K., Fujita, Y., Itoh, Y. und Yamane, K.(1989) Modification of length, hydrophobic properties and electric charge of *Bacillus subtilis* α -amylase signal peptide and their different effects on the production of secretory proteins in *B.subtilis* and *Escherichia coli* cells.

Mol. Gen. Genet. **216**:1-9

Nishiyama, K.-i., Mizushima S. und Tokuda, H. (1993) A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **12**:3409-3415

Nishiyama, K.-i., Mitsuharu, H und Tokuda, H. (1994) Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J.* **13**(14):3272-3277

Nishiyama, K.-i., Mizushima und S., Tokuda, H. (1995) Preferential interaction of Sec-G with Sec-E stabilizes an unstable Sec-E derivative in *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**(1):217-223

Nishiyama, K.-i., Suzuki, T. und Tokuda, H. (1996) Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell* **85**:71-81

Nishiyama, K.-i., Fukuda, A. Morita, K. und Tokuda, H. (1999) Membrane-deinsertion of SecA underlying proton motive force-dependent stimulation of protein translocation. *EMBO J.* **18**:1049-1058

Oliver, B. D. und Beckwith, J. (1981) *E. coli* mutants pleiotropically defective in the protein secretion proteins. *Cell* **25**:765-772

Overhoff, B., Klein, M., Spies, M. und Freudl, R. (1991) Identification of a gene fragment which codes for the 364-aminoterminal amino acid residues of a SecA homologue from *Bacillus subtilis*: further evidence for the conservation of the protein export apparatus in gram-positive and gram-negative bacteria. *Mol. Gen. Genet.* **228**:417-423

Plath, K., Mothes, W., Wikinson, B. M., Stirling, C. J. und Rapoport, T. A. (1998) Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell* **94**:795-807

Perez-Perez, J., Marquez, G., Barbero, J. L. und Gutierrez, J. (1994) Increasing the efficiency of protein export in *Escherichia coli*. *Biotechnology (NY)* **12**(2):178-180

Pogliano, J. A. und Beckwith, J. (1993) The *cs sec* mutants of *Escherichia coli* reflect the cold sensitivity of protein export itself. *Genetics* **133**:763-773

Pohlschröder, M., Murphy, C. und Beckwith, J. (1996) *In vivo* analyses of interactions of the *Escherichia coli* protein translocation machinery. *J. Biol. Chem.* **271**:19908-19914

Ramamurthy, V., Dapic, V. und Oliver, D. (1998) SecG and temperature modulate expression of azide-resistant and signal sequence suppressor phenotypes of *Escherichia coli secA* mutants. *J. Bacteriol.* **180**(23):6419-6423

Riggs, P.D., Derman, A.I. und Beckwith, J. (1988) A mutation affecting the regulation of a *secA-lacZ* fusion defines a new *sec* gene. *Genetics* **118**(4):571-579

Rygus, T. und Hillen, W. (1991) Inducible high-level expression of heterologues genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**:594-599

Sadaie, Y. und Kada, T. (1983) Formation of competent *Bacillus subtilis* cells. *J. Bacteriol.* **153**(2):813-821

- Saiki, R.K., Gefland, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuoki, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, M.A. (1988) Primer-directed amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491
- Sanger, F.G., Nicklen, S. und Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:5463-5467
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samuelson, J. C., Chen, M., Jiang, F., Möller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G. J. und Dalbey, R. E. (2000) YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* **406**:637-641
- Schaeffer, P., Millet, J. und Auber, J. P. (1965) Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**:704-711
- Schatz, P. J., Bieker, K. L., Ottemann, K. M., Silhavy, T. und Beckwith, J. (1991) One of three transmembrane stretches is sufficient for the functioning of the SecE protein, a membrane component of the *E. coli* secretion machinery. *EMBO J.* **10**:1749-1757
- Schein, C. H., Kashiwagi, K., Fujisawa, A. und Weissmann, C. (1986) Secretion of mature IFN- α 2 and accumulation of uncleaved precursor by *Bacillus subtilis* transformed with a hybrid α -amylase signal sequence-IFN- α 2 gene. *Bio/Technology* **4**:719-725
- Schleifer, K.H. und Fischer, U. (1982) Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *Int. Syst. Bacteriol.* **32**:153-156
- Scotti, P. A., Urbanus, M. L., Brunner, J., de Gier, J.-W. L., von Heijne, G., van der Does, C., Driessen, A. J. M., Oudega, B. und Luirink, J. (2000) YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J.* **19**(4):542-549
- Schiebel, E., Driessen, A.J.M., Hartl, F.-U. und Wickner, W. (1991) $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* **64**:927-939
- Schimz, K.-L., Decker, G., Frings, E., Meens, J., Klein, M. und Matthias Müller (1995) A cell-free protein translocation system prepared entirely from a Gram-positive organism. *FEBS Letters* **362**:29-33
- Selanov, A. und Bibi, E. (1997) FtsY, the prokaryotic signal recognition particle receptor homologue, is essentiell for biogenesis of membran proteins. *J. Biol. Chem.* **272**:2053-2055
- Simonen, M. und Palva, I. (1993) Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol. Rev.* **57**, 1:109-137
- Snyders, S., Ramamurthy, V. und Oliver, D. B. (1997) Identification of a region of interaction between *Escherichia coli* SecA and SecY proteins. *J. Biol. Chem.* **272**:11302-11306
- Solomon, J.M., Lazazzera, B.A. und Grossmann, A.D. (1996) Purification and characterisation of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **10**(16):2014-2024
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-518

- Stader, J., Gansherroff, L. J. und Silhavy, T. J. (1989) New suppressors of signal-sequence mutations, *prlG*, are linked tightly to the *secE* gene of *Escherichia coli*. *Genes and Development* **3**:1045-1052
- Suh, J.-W., Boylan, S.A., Thomas, S.M., Dolan, K.M., Oliver, D.B. und Price, C.W. (1990) Isolation of a *secY* homologue from *Bacillus subtilis*: evidence for a common protein export pathway in eubacteria. *Mol. Microbiol.* **4**:305-314
- Suzuki, H., Nishiyama, K.-i. und Tokuda, H. (1998) Coupled structure change of SecA and SecG revealed by the synthetic lethality of the *secAcsR11* and Δ *secG::kan* double mutant. *Mol. Microbiol.* **29**(1):331-341
- Swaving, J., van Wely, K. H. M. und Driessen, A. J. M. (1999) Preprotein translocation by hybrid translocase composed of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* subunits. *J. Bacteriol.* **181**(22): 7021-7027
- Takeshita, S., Sato, M., Toba, M., Mosahashi, W. und Hashimoto-Gotoh, T. (1987) High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for *lacZ* α -complementation and chloramphenicol kanamycin resistance selection. *Gene* **61**:63-74
- Taura, T., Baba, T., Akiyama, Y. und Ito, K. (1993) Determinants of the quantity of a stable SecY complex in the *Escherichia coli* cell. *J. Bacteriol.* **175**:771-775
- Taura, T., Yoshihisa, T. und Ito, K. (1997) Protein translocation functions of *Escherichia coli* SecY: *in vitro* characterization of cold-sensitive *secY*-mutants. *Biochimie* **79**:517-521
- Thom, R. J. und Randall, L. L. (1988) Role of the leader peptide of maltose-binding protein in two steps of the export process. *J. Bacteriol.* **12**:5654-5661
- Tschauder, S., Driessen, A. und Freudl, R. (1992) Cloning and molecular characterization of the *secY* genes from *Bacillus licheniformis* and *Staphylococcus carnosus*: comparative analysis of nine members of the SecY family. *Mol. Gen. Genet.* **235**:147-152
- Tschauder, S. (1993) Isolierung und Charakterisierung der *secY*-Gene aus *Bacillus licheniformis* und *Staphylococcus carnosus*. *Berichte des Forschungszentrums Jülich*:Jül-2779
- Ulbrandt, N. D., Newitt, J. A. und Bernstein, H. D. (1997) The *E. coli* signal recognition particle is required for the insertion of a subset of inner membrane proteins. *Cell* **88**:187-196
- Valent, Q. A., Scotti, P. A., High, S., de Gier, J.-W. L.; von Heijne, G., Lentzen, G., Wintermeyer, W., Oudega, B. und Lührink, J. (1998) The *Escherichia coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon. *EMBO J.* **17**(9):2504-2512
- Van der Wolk, P. W., Fekkes, P., Boorsma, A., Huie, J. L., Silhavy, T. J. und Driessen, A. J. M. (1998) PrlA4 prevents the rejection of signal sequence defective preproteins by stabilizing the SecA-SecY interaction during the initiation of translocation. *EMBO J.* **17**:3631-3639
- Van Dijl, J.M., de Jong, A., Smith, H., Bron und S., Venema, G. (1991) Non-functional expression of *Escherichia coli* signal peptidase I in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **137**:2073-2083
- Van Wely, K. H., Swaving, J., Broekhuizen, C. P., Rose, M., Quax, W. J. und Driessen, A. J. (1999) Functional identification of the product of the *Bacillus subtilis* *yvaL* gene as a SecG homologue. *J. Bacteriol.* **181**:1786-92
- Von Heijne, G. (1989) Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature (London)* **341**:456-458

- Von Heijne, G. (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* **184**:99-105
- Von Heijne G. und Abrahamsen, L. (1989) Species-specific variations in the signal peptide design. Implication for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett.* **244**: 439-446
- Voskuil, M. I. und Chambliss, G. H. (1993) Rapid isolation and sequencing of purified plasmid DNA from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1138-142
- Watanabe M. und Blobel, G. (1989a) Binding of a soluble factor of *Escherichia coli* to preproteins does not require ATP and appears to be the first step in the protein export. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:2248-2252
- Watanabe, M. und Blobel, G. (1989b) SecB functions as a cytosolic signal recognition factor for protein export in *E.coli*. *Cell* **48**:695-705
- Wösten, M. M. S. M. (1998) Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 127-150
- Yahr, T. L. und Wickner, W., T. (2000) Evaluating the oligomeric state of SecYEG in preprotein translocase. *EMBO J.* **19**(16):4393-4401
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 im Forschungszentrum Jülich GmbH angefertigt.

Zuallererst danke ich Herrn Prof. R. Freudl für die Überlassung des spannenden Themas, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen Ratschläge, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. J. F. Ernst danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Sahm danke ich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Dr. Arne Matzen, der mir als Freund und Wissenschaftler stets eine Hilfe war und die Zeit im Labor 226 unvergessen macht.

Dr. Michael Klein möchte ich danken für die Einweisung in den konkreten Umgang mit *Bacillus* und seinen Gram-positiven Artgenossen sowie seiner Tips und Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Dr. Karlo Schimz und Gaby Decker für die Bereitsstellung der OmpA-, Lipase- und Amylase-Antikörper, den *in vitro*-Protein-Exportstudien sowie den menschlichen Umgang.

Weiterhin möchte ich natürlich Natascha Blaudeck, Grit Hehmann, Maren Hintz, Dr. Rainer Kappes, Oliver Köberling, Dr. Stephanie Schnicke und Angela Vollstedt für das sehr gute Arbeitsklima in der Arbeitsgruppe „Proteinsekretion“ danken. Besonderen Dank schulde ich hierbei Astrid Bida, die mich zum richtigen Zeitpunkt unterstützte.

Herrn S. Peters bin ich zu Dank verpflichtet für seine professionelle photographische Arbeit

Der Eggeling AG danke ich für die nette Nachbarschaft.

Allen ungenannten Mitgliedern des Instituts für Biotechnologie 1 danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und für die allgemein sehr gute Stimmung im Haus.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich während meiner Ausbildung in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

...und nicht zuletzt danke ich natürlich meiner Alex und meinem Simon, die mir in der ganzen Zeit Verständnis und sehr viel Geduld entgegengebracht haben.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3877
Juni 2001
ISSN 0944-2952