



Untersuchung der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in nicht-pathogenen Gram-positiven Bakterien

Michael Caspers



Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Biotechnologie 1

Untersuchung der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in nicht-pathogenen Gram-positiven Bakterien

Michael Caspers

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences

Band/Volume 35

ISSN 1433-5549

ISBN 978-3-89336-488-6

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten sind im Internet
über <<http://dnb.d-nb.de>> abrufbar.

Herausgeber
und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
52425 Jülich
Telefon: 02461 61-5368 · Telefax: 02461 61-6103
E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2007

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences Band/Volume 35

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2006)

ISSN 1433-5549
ISBN: 978-3-89336-488-6

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder
in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder
unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I.1 Das Signalpeptid	2
I.2 „Targeting“ an die Sec-Translokase	3
I.3 Aufbau der Sec-Translokase	6
I.3.1 SecA: Der Nanomotor der Proteintranslokation	6
I.3.2 SecY, SecE und SecG: Der Translokationskanal	9
I.3.3 SecD, SecF, YajC und YidC: zusätzliche Komponenten der Sec-Translokase	12
I.4 Sec2: Eine zusätzliche Proteintranslokationsmaschinerie in Gram-positiven Bakterien	12
I.4.1 Die SecA2-abhängige Proteintranslokation	13
I.4.2 Die SecA2/SecY2-abhängige Proteintranslokation	15
I.5 : Zielsetzung dieser Arbeit	18
II. Material und Methoden	20
II.1 Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide	20
II.2 Chemikalien und Enzyme	26
II.3 Medien und Lösungen	26
II.4 Mikrobiologische Methoden	30
II.4.1 Kultivierung von Bakterien	30
II.4.2 Stammhaltung	30
II.4.3 Wachstumskurven	31
II.4.4 Transformation von Bakterien	31
II.4.4.1 Transformation von <i>E. coli</i> Stämmen	31
II.4.4.2 Transformation von <i>B. subtilis</i> Stämmen	31
II.4.4.3 Transformation von <i>C. glutamicum</i> Stämmen	32
II.4.4.4 Transformation von <i>S. carnosus</i> Protoplasten	33
II.4.5 Durchführung von „plasmid-curing“-Experimenten	33
II.5 Gentechnische Methoden	34
II.5.1 Allgemeine gentechnische Methoden	34
II.5.1.1 Agarose-Gelelektrophorese	34
II.5.1.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	35
II.5.1.3 Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase	35
II.5.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten	35
II.5.1.5 Umwandeln von überhängenden 5' Enden in glatte Enden	35
II.5.1.6 Entsalzung von DNA- Lösungen	36
II.5.1.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	36
II.5.2 Präparation von DNA	36
II.5.2.1 Präparation chromosomaler DNA	36
II.5.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA	36

II.5.2.3 Plasmidisolierung im präparativen Maßstab	37
II.5.3 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
II.5.4 Durchführung der „cross-over“-PCR	38
II.5.5 Nicht radioaktive DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode	38
II.5.6 DNA-DNA Hybridisierung nach Southern	40
II.6 Proteinchemische Methoden	41
II.6.1 Isolierung von Proteinen aus Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen	41
II.6.1.1 Induktion der Genexpression	41
II.6.1.2 Herstellung von <i>E. coli</i> Gesamtzellextrakten	42
II.6.1.3 Herstellung von <i>B. subtilis</i> und <i>S. carnosus</i> Gesamtzellextrakten	42
II.6.1.4 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus <i>C. glutamicum</i>	42
II.6.1.5 Aufarbeitung von Kulturüberständen	43
II.6.1.6 Fraktionierung von <i>S. carnosus</i> in Protoplasten und Zellwand	43
II.6.1.7 Osmotischer Schock mit <i>E. coli</i>	43
II.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
II.6.3 Coomassie- Färbung von Proteingelen	45
II.6.4 Silber-Färbung von Proteingelen	45
II.6.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern	45
II.6.6 Pulse-Chase mit <i>B. subtilis</i>	46
II.6.6.1 Markierung von <i>B. subtilis</i> WT	46
II.6.6.2 Markierung von <i>B. subtilis</i> NIG1152	47
II.6.6.3 Aufarbeitung der Proben	48
II.6.6.4 Gelaufarbeitung	48
II.6.7 MALDI-TOF Massenspektroskopie	49
II.6.8 Herstellung polyklonaler Antikörper	50
II.6.9 β -Galaktosidase-Aktivitäts-Test	51
II.6.10 Katalase-Aktivitäts-Test	51
III. Ergebnisse	53
III.1 Untersuchungen zum „targeting“ von SecA2/SecY2-Substraten in <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> und <i>S. carnosus</i>	53
III.1.1 Untersuchungen zum SecA2/SecY2-„targeting“ in <i>E. coli</i>	53
III.1.1.1 Ein authentisches SecA2/SecY2-Substrat wird in <i>E. coli</i> nicht exportiert. ...	53
III.1.1.2 Ein SecA2/SecY2-Signalpeptid erlaubt ein „targeting“ an die klassische Sec-Translokase in <i>E. coli</i>	56
III.1.2 Untersuchungen zum SecA2/SecY2-„targeting“ in <i>B. subtilis</i>	59
III.1.2.1 Das SrrSPPProLip-Protein wird in <i>B. subtilis</i> nicht exportiert.	59
III.1.3 Analyse des „targetings“ von SecA2/SecY2-Substraten in <i>S. carnosus</i>	61
III.1.3.1 Das SrrSPPProLip-Protein wird in <i>S. carnosus</i> über den Sec1-Weg transloziert.	61
III.1.3.2 Analyse der Translokation weiterer Fusionsproteine über den Sec1-Weg in <i>S. carnosus</i>	63
III.1.3.3 Analyse der Translokation von verkürzten, authentischen SecA2/SecY2- Substraten in <i>S. carnosus</i>	66
III.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zum „targeting“ von SecA2/SecY2- Substraten in <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> und <i>S. carnosus</i>	70
III.2 Untersuchung der Wechselwirkungen des <i>S. aureus</i> SecA2-Proteins mit Komponenten der Sec1-Translokase.	70

III.2.1 Das <i>S. aureus</i> SecA2 kann mit Komponenten der <i>B. subtilis</i> Sec1-Translokase und einem klassischen Sec-Substrat keine funktionellen Wechselwirkungen eingehen.	71
III.2.2 Chromosomale Integration der <i>S. aureus</i> <i>secA</i> -Gene in <i>B. subtilis</i> NIG1152.	73
III.2.3 Funktionelle Wechselwirkungen zwischen <i>S. aureus</i> SecA2, Komponenten der <i>B. subtilis</i> Sec1-Translokase und einem Protein mit SecA2/SecY2-Signalpeptid finden nicht statt.	78
III.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der Wechselwirkungen des <i>S. aureus</i> SecA2-Proteins mit Komponenten der Sec1-Translokase von <i>B. subtilis</i>	79
III.3 Studium der Bedeutung der Sec2-abhängigen Protein-translokation in nicht-pathogenen Bakterien.	79
III.3.1 Untersuchung der SecA2/SecY2-abhängigen Proteintranslokation in <i>S. carnosus</i>	80
III.3.1.1 In <i>S. carnosus</i> liegt ein <i>secA2/secY2</i> -Operon vor.	80
III.3.1.2 Das <i>S. carnosus</i> <i>secA2</i> ist nicht essentiell.	83
III.3.1.3 Die Deletion des <i>secA2</i> hat keinen Effekt auf die Proteintranslokation in <i>S. carnosus</i>	86
III.3.1.4 Der Promotor des <i>secA2/secY2</i> -Operons von <i>S. carnosus</i> ist aktiv.	88
III.3.1.5 Das <i>S. carnosus</i> SecA2/SecY2-System ist nicht funktionell.	91
III.3.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der SecA2/SecY2-abhängigen Proteintranslokation in <i>S. carnosus</i>	92
III.3.2 Studium der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in <i>C. glutamicum</i>	93
III.3.2.1 Die SecA-Proteine von <i>C. glutamicum</i>	93
III.3.2.2 Das <i>secA2</i> -Gen von <i>C. glutamicum</i> ist essentiell.	98
III.3.2.3 <i>C. glutamicum</i> besitzt zwei essentielle <i>secA</i> -Gene.	104
III.3.2.4 Konstruktion einer <i>C. glutamicum</i> <i>secA2</i> -Promotoraustauschmutante.	107
III.3.2.5 Die Lokalisierung der Katalase ist in <i>C. glutamicum</i> SecA2-abhängig.	112
III.3.2.6 Überexpression des <i>C. glutamicum</i> SecA2-Proteins führt zu erhöhter Katalase-Sekretion.	114
III.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Studium der Bedeutung der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in <i>C. glutamicum</i>	116
IV. Diskussion	117
IV.1 Untersuchungen zum „targeting“ von SecA2/SecY2- Substraten in <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> und <i>S. carnosus</i>	117
IV.1.1 Das authentische SecA2/SecY2-Substrat von <i>S. aureus</i> wird in <i>E. coli</i> nicht transloziert.	118
IV.1.2 Ein SecA2/SecY2-Signalpeptid erlaubt ein „targeting“ an die klassische Sec-Translokase.	119
IV.1.3 Nicht-glykosylierte SecA2/SecY2-Substrate können über die klassische Sec-Translokase transloziert werden.	123
IV.2 Untersuchungen der Wechselwirkungen des <i>S. aureus</i> SecA2-Proteins mit Komponenten der Sec1-Translokase.	126
IV.2.1 Das <i>S. aureus</i> SecA2 kann mit Komponenten der <i>B. subtilis</i> Sec1-Translokase und klassischen Sec-Substraten keine funktionellen Wechselwirkungen eingehen.	127

IV.2.2 Das <i>S. aureus</i> SecA2 kann mit Komponenten der <i>B. subtilis</i> Sec1-Translokase und einem Protein mit einem SecA2/SecY2-Signalpeptid keine funktionellen Wechselwirkungen eingehen.....	129
IV.3 Bedeutung der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in nicht-pathogenen Bakterien.	130
IV.3.1 Untersuchung der SecA2/SecY2-abhängigen Proteintranslokation in <i>S. carnosus</i>	131
IV.3.1.1 Das SecA2/SecY2-Sytem von <i>S. carnosus</i> ist nicht funktionell.....	132
IV.3.2 Untersuchung der SecA2-abhängigen Proteintranslokation in <i>C. glutamicum</i> ..	135
IV.3.2.1 Aminosäuresequenz-Analyse der <i>C. glutamicum</i> SecA-Proteine.....	136
IV.3.2.2 <i>C. glutamicum</i> besitzt als bislang einziges Bakterium zwei essentielle SecA-Proteine.....	137
IV.3.2.3 Die SecA2-abhängige Proteintranslokation ist in <i>C. glutamicum</i> wie in <i>M. tuberculosis</i> am Schutz vor oxidativem Stress beteiligt.	142
V. Zusammenfassung	145
VI. Literatur	146

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
bp	Basenpaar
BCIP	Bromochloro-indolyl-phosphat
BHIS	brainheart-Infusion, Sorbitol
BSA	Rinderserumalbumin
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen
Ci	Curie
cm	Chloramphenicol
CSPD	3-(4-Metoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'(5'-chloro)Tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4yl) Phenylphosphat, Dinatriumsalz
da	Dalton
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat (N steht für eines der Nukleoside A: Adenosin, C: Cytidin, G: Guanosin, T: Thymidin)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1, 4-Dithiothreitol
dUTP	2'-Desoxy-Uridin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ery	Erythromycin
g/l	Gramm/Liter
h	Stunden
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
kan	Kanamycin
kb	Kilobasen (=1000 Basenpaare)
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase-Gen
M	Molar
mA	Milliampère
min	Minuten
μ l/ml	Mikroliter/Milliliter
μ g/ml	Mikrogramm/Milliliter

NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS- PAGE	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunden
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜNK	Übernachtskultur
V	Volt
W	Watt
Wt	Wildtyp

Drei- und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutaminsäure	Glu	E	Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

I. Einleitung

Die Translokation von Proteinen über Biomembranen ist in allen lebenden Zellen ein essentieller Prozess. Diese Essentialität liegt darin begründet, dass selbst eine vergleichsweise einfach strukturierte prokaryotische Zelle über eine Aufteilung in Räume unterschiedlicher Funktion, sogenannte Kompartimente, verfügt. Jedes dieser Kompartimente besitzt einen spezifischen Satz an Proteinen. Es werden jedoch alle Proteine am gleichen Ort, den sogenannten Ribosomen, synthetisiert. Bei Prokaryoten befinden sich diese innerhalb der Cytoplasmafraktion, welches man vereinfacht als das „Innere“ der prokaryotischen Zelle bezeichnen kann. Damit die restlichen Kompartimente ebenfalls ihren Satz an Proteinen erhalten, muss es Verteilungsmechanismen geben, die dies gewährleisten. In Prokaryoten ist die Proteintranslokation der zentrale für diese Verteilung verantwortliche Mechanismus.

Zuerst muss jedes Protein, das nicht für das Cytoplasma bestimmt ist, neben der Information für seine Faltung, welche die eigentliche Funktionalität des Proteins gewährleistet, auch die Information für seine korrekte Lokalisierung besitzen. In der Regel werden solche extracytoplasmatischen Proteine als Vorläuferproteine synthetisiert, die in den reifen Teil des Proteins und ein Signalpeptid unterteilt werden. Dieses aminoterminal lokalisierte Signalpeptid ist das entscheidende Kriterium für eine Translokation über die das Cytoplasma umgebende Biomembran, die als Cytoplasmamembran bezeichnet wird.

Die eigentliche Translokation dieser Proteine über die Membran erfolgt an einem Multienzymkomplex in der Membran, der als Translokase, Translokator oder Translokon bezeichnet wird. In Prokaryoten gibt es im Wesentlichen zwei Wege, welche die Translokation von Proteinen über die Membran gewährleisten. Diese sind zum einen der generelle Sekretionsweg, der als Sec-Weg (sec: „secretion“) bezeichnet wird und der erst seit wenigen Jahren bekannte Tat-Weg (tat: „twin-arginine-translocation“). In allen Bakterien ist der Sec-Weg essentiell und dort für die Translokation des Großteils der Exportproteine verantwortlich, während der Tat-Weg meist nicht essentiell ist und nur den Export vergleichsweise weniger Proteine gewährleistet. Die bislang einzige Ausnahme hiervon stellen halophile Archaeobakterien dar, in denen der Tat-Weg essentiell ist und für die Translokation des Großteils der Exportproteine benötigt wird (Dilks *et al.*, 2005; Thomas und Bolhuis, 2006). Im Folgenden wird nur auf die Sec-abhängige Proteintranslokation im Detail eingegangen, da die Tat-abhängige Proteintranslokation für die vorliegende Arbeit zu vernachlässigen ist.

I.1 Das Signalpeptid

Proteine, die für den Transport über die bakterielle Cytoplasmamembran bestimmt sind, werden im Cytosol als Vorläuferproteine synthetisiert. Vorläuferproteine besitzen eine zusätzliche, aminoterminal Sequenz, die als Signalsequenz oder Signalpeptid bezeichnet wird. Dieses Signalpeptid dient als Erkennungs- und „targeting“-Signal für die Einschleusung des Proteins in den Translokator. Ferner dient das Signalpeptid bei Substraten des Sec-Exportweges zur Verlangsamung der Faltung in eine stabile und somit exportinkompatible Form („anti-folding“ Eigenschaften des Signalpeptids; Park *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1989).

Signalpeptide werden in einem als Prozessierung bezeichneten Vorgang während oder kurz nach der erfolgten Translokation vom reifen Teil des Exportproteins abgespalten. Dies geschieht durch spezifische, membranständige Proteasen, die als Signalpeptidasen bezeichnet werden.

Obwohl sich auf Ebene der Aminosäuresequenz keine Gemeinsamkeiten zwischen Signalpeptiden verschiedener Proteine finden, gibt es dennoch einen gemeinsamen, charakteristischen Aufbau. Dieser unterteilt das Signalpeptid in drei Regionen (siehe Abbildung 1) (von Heijne, 1985).

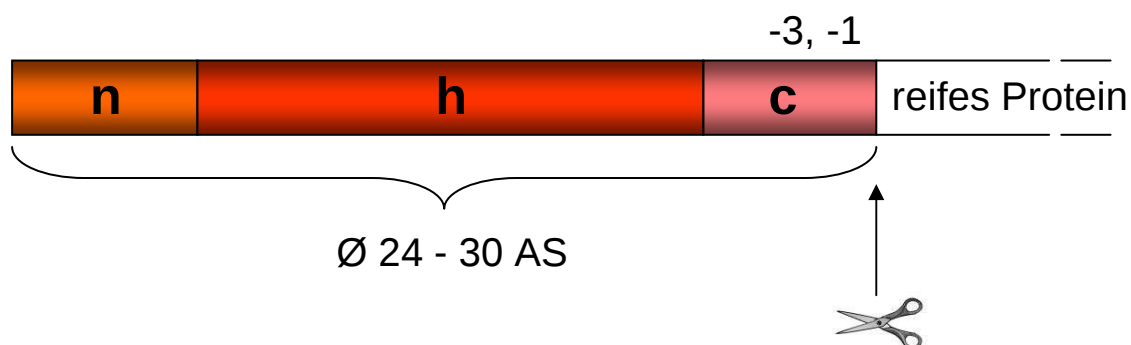


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Sec-Signalpeptids. Zu erkennen ist der hochkonservierte dreiteilige Aufbau in n-, h- und c-Region. Die n-Region besitzt aufgrund eines oder mehrerer Arginin- oder Lysin-Reste eine positive Nettoladung. Die h-Region wird hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren gebildet. Die c-Region besitzt wieder polaren Charakter und beinhaltet die Spaltstelle für die Signalpeptidase (SPase). Letztere ist durch kleine, unpolare Aminosäurereste (meist Alanin) an den Positionen -3 und -1 gekennzeichnet.

Die n-Region besitzt aufgrund eines oder mehrerer Lysin- oder Argininreste eine positive Nettoladung. Diese Ladung ermöglicht wahrscheinlich eine Wechselwirkung mit dem SecA-Protein sowie den sauren Phospholipiden der Membran (Akita *et al.*, 1990; de Vrije *et al.*, 1990). Bei der Insertion des Signalpeptids in die Membran ist diese positive Ladung dafür verantwortlich, dass es sich nach der sogenannten „positive-inside-rule“ so orientiert, dass die n-Region auf der cytoplasmatischen Seite verbleibt.

Auf die n-Region folgt die zentrale h-Region, die einen stark hydrophoben Charakter besitzt und eine Mindestlänge von acht Aminosäuren aufweist.

Die c-Region hat polaren Charakter und verfügt darüber hinaus über den einzigen auf Aminosäureebene konservierten Bereich des Signalpeptids: das Erkennungsmotiv für die Signalpeptidase. Dieses Erkennungsmotiv wird durch kleine, aliphatische Aminosäuren (meistens Alanin) an Position -1 und -3 determiniert (von Heijne, 1985; Izard und Kendall, 1994). Diese als „-3, -1“-Regel bezeichnete Gemeinsamkeit ist eines der zentralen Kriterien, das gängige Computer-Algorithmen für die Voraussage von potentiellen Spaltstellen und bei der Entscheidung darüber, ob es sich bei einer aminoterminalen Sequenz eines Proteins um ein Signalpeptid handelt oder nicht, verwenden. Es gibt jedoch auch nicht-spaltbare Signalpeptide, die bei integralen Membranproteinen als Membrananker fungieren können (Facey und Kuhn, 2004).

Trotz der Tatsache, dass die dreiteilige Struktur von prokaryotischen Signalpeptiden hoch konserviert ist, finden sich Unterschiede zwischen Signalpeptiden aus Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Die durchschnittliche Länge der Signalpeptide bei Exportproteinen Gram-negativer Bakterien beträgt 24 Aminosäuren und ist somit deutlich geringer als die der Signalpeptide von Proteinen aus Gram-positiven Bakterien, welche im Durchschnitt 30 Aminosäuren beträgt. Diese Verlängerung verteilt sich auf alle drei Regionen. Ferner ist die positive Nettoladung der n-Region bei Proteinen aus Gram-positiven Bakterien häufig höher (von Heijne und Abrahamsen, 1989; Simonen und Palva, 1993). Dennoch ist es prinzipiell möglich, Exportproteine aus Gram-negativen Bakterien in Gram-positiven Bakterien zu exportieren und umgekehrt (Meens *et al.*, 1993).

I.2 „Targeting“ an die Sec-Translokase

Exportproteine, die über den Sec-Weg exportiert werden, müssen in einer losen, entfalteten Konformation vorliegen. Faltung des Proteins führt bei der Sec-Translokation zu einer Exportinkompatibilität. Proteine besitzen jedoch die Tendenz, sich bereits während der Synthese im Cytosol zu falten. Da dies jedoch die Translokation über den Sec-Weg unmöglich machen würde, gibt es für Exportproteine Mechanismen, die dies unterbinden. Zum einen verlangsamt das aminoterminal Signalpeptid bei Exportproteinen eine Faltung in eine exportinkompatible Form („anti-folding“- Eigenschaft). Darüber hinaus wird die Faltung durch die Bindung von cytosolischen Faktoren verhindert, die neben dem Aufrechterhalten der exportkompatiblen Form auch noch dafür sorgen, dass Exportproteine die membranständige Translokase erreichen. Letzteres wird als „targeting“ der Exportproteine bezeichnet.

Untersuchungen in Bakterien führten dort zur Identifikation von zwei wesentlichen „targeting“-Wegen. Einer dieser Wege, der SecB-abhängige Weg, ist nur in Gram-negativen

Bakterien vorhanden, während der zweite Weg, der SRP-Weg, in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien zu finden ist (Abbildung 2). Die umfassendsten Untersuchungen zu beiden Wegen wurden in den Modellorganismen *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* vorgenommen.

In *E. coli* bindet das SecB-Protein, welches für die Ausübung seiner Funktion als Homotetramer assembliert, bereits während der Synthese spezifisch nur an den reifen Teil des Vorläuferproteins (Randall *et al.*, 1990). Somit unterbindet SecB die Faltung des Exportproteins in eine exportinkompatible Form. SecB gewährleistet darüber hinaus über seine hohe Affinität zur zentralen Komponente der Sec-Translokase, dem SecA-Protein, das „targeting“ des von ihm gebundenen Exportproteins an das membranständige Sec-Translokon (Hartl *et al.*, 1990). Ist die Übergabe an das SecA-Protein erfolgt, so wird SecB wieder in das Cytoplasma freigesetzt und steht für das „targeting“ weiterer Exportproteine zur Verfügung (Fekkes *et al.*, 1997). Der SecB-Weg, der zu einem posttranslationalen Exportmechanismus führt, ist in *E. coli* für das „targeting“ des Großteils der Exportproteine zuständig. Ein geringerer Teil der Exportproteine, und hier hauptsächlich die integralen Membranproteine der Cytoplasmamembran, wird anstelle von SecB über den SRP-Weg zur Translokase geleitet. Exportproteine, deren „targeting“ über den SRP-Weg erfolgt, besitzen in Bakterien für gewöhnlich Signalpeptide mit auffällig hoher Hydrophobizität (de Gier *et al.*, 1998; Lee und Bernstein, 2001).

Der SRP-(signal recognition particle) Weg wurde zuerst in Eukaryoten entdeckt (Walter und Blobel, 1982). Das SRP ist bei Eukaryoten ein Ribonucleoproteinkomplex aus sechs Proteinen und einer 7 S RNA. Die 54 kDa schwere Untereinheit des SRPs, ein GTP-bindendes Protein, bindet das Signalpeptid des Vorläuferproteins während der Proteinbiosynthese, und dieser Komplex aus SRP und Ribosom wird zu einem spezifischen SRP-Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) geleitet. Dort erfolgt co-translationale Proteintranslokation des Proteins in das ER-Lumen nach Ablösen des SRP (Luirink und Dobberstein, 1994; Rapoport *et al.*, 1996). Der bakterielle SRP-Weg (b-SRP) ist bedeutend simpler aufgebaut als die eukaryotische Variante. Das SRP besteht hier nur aus einem Protein, dem Ffh („fifty-four homologue“), welches das homologe Protein zum 54 kDa Protein der Eukaryoten darstellt, und einer 4,5 S RNA. Analog zu der Funktion des SRP in Eukaryoten bindet das b-SRP ebenfalls an naszierende Proteine und leitet den Komplex aus Vorläuferprotein und Ribosom (RNC: „Ribosome associated nascent chain complex“) zum Rezeptor FtsY, der membrangebunden und der α -Untereinheit des eukaryotischen SRP-Rezeptors homolog ist. Eine Übergabe des Vorläuferproteins an die Sec-Translokasekomponenten erfolgt nach GTP-Hydrolyse am Komplex aus RNC, b-SRP und FtsY (Valent *et al.*, 1998). Hierbei kommt es möglicherweise zu einer direkten Interaktion des FtsY mit dem SecYEG-Translokationskanal (Angelini *et al.*, 2005).

Ein SecB-homologes Protein existiert in den bisher daraufhin untersuchten Gram-positiven Bakterien nicht. Es war jedoch möglich, homologe Komponenten des b-SRP-Systems von

E. coli zu identifizieren. Das b-SRP besteht in *B. subtilis*, dem Gram-positiven Modellorganismus, aus einer RNA (scRNA), die der 7 S RNA der Eukaryoten bzw. der 4,5 S RNA von *E. coli* entspricht. Es konnte ein zum *E. coli* Ffh homologes Protein identifiziert werden und ein dem FtsY entsprechendes Protein (Struck *et al.*, 1988; Nakamura *et al.*, 1992; Honda *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurde eine weitere Komponente des b-SRP bei *B. subtilis* identifiziert. Es handelt sich dabei um das essentielle, histon-ähnliche Protein HBSu, welches an die Alu-Domäne der scRNA bindet (Nakamura *et al.*, 1999). Ob es in Gram-positiven Bakterien neben dem SRP weitere Wege zum „targeting“ an die Sec Translokase gibt, ist bislang unklar.

Für das *B. subtilis* SecA wurde neben seiner energieliefernden Funktion in *B. subtilis* eine Chaperonfunktion postuliert, wobei das SecA in seiner cytosolischen Form eventuell die Funktion des in Gram-positiven Bakterien nicht vorkommenden exportspezifischen Chaperons SecB übernimmt (Herbort *et al.*, 1999). Eine kürzlich gefundene Affinität von cytosolischem SecA zu RNCs führte zu der Hypothese, dass cytosolisches SecA cotranslational am „targeting“ von Exportproteinen an die Sec-Translokase beteiligt ist (Karamyshev und Johnson, 2005).

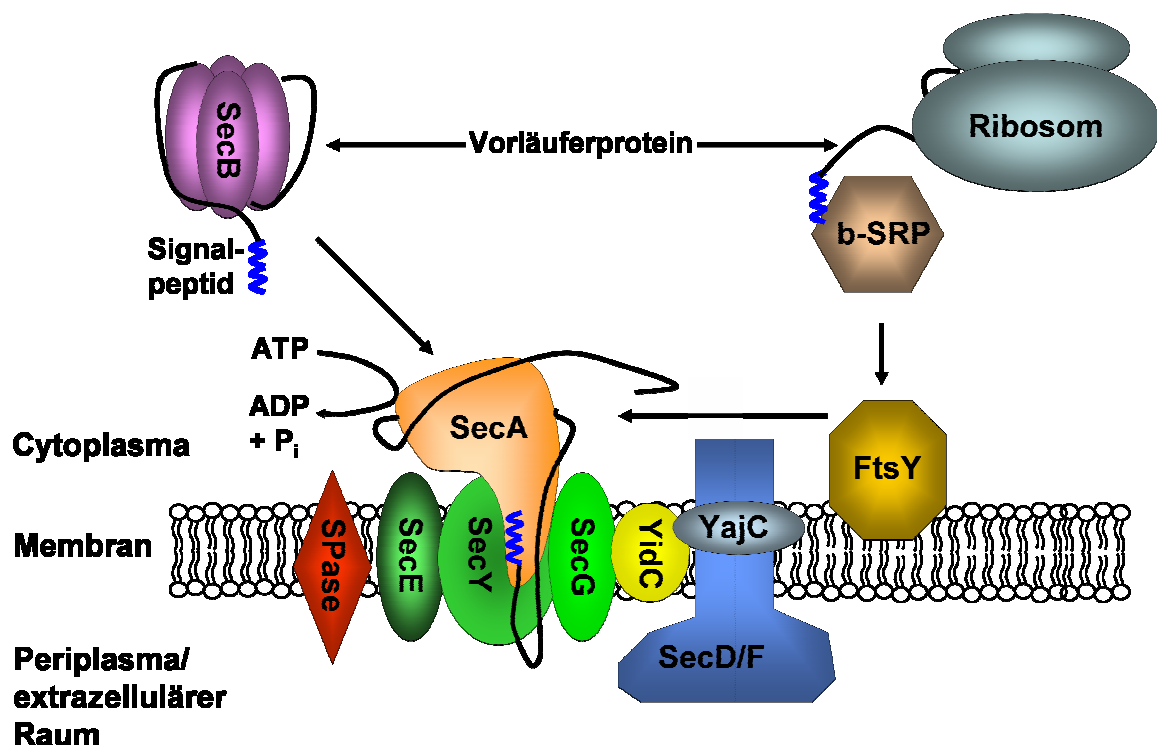


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Sec-Translokase. Die ATPase SecA, der Translokationsmotor, ist die zentrale Komponente der Translokase. SecY, E und G bilden den eigentlichen Translokationskanal aus. SecD/F, YajC und YidC stellen weitere akzessorische Komponenten der Translokase dar. Das „targeting“ von Exportproteinen kann über SecB oder den b-SRP-Weg erfolgen. Während oder kurz nach erfolgter Translokation spaltet die Signalpeptidase (SPase) das Signalpeptid (blau) vom reifen Teil des Vorläuferproteins (schwarz) ab. Weitere Erläuterungen finden sich im Text.

I.3 Aufbau der Sec-Translokase.

In *Escherichia coli* wurden die Komponenten der Sec-Translokase und deren Funktionsweise am gründlichsten untersucht. Prinzipiell sind aber sowohl Aufbau sowie Wirkungsmechanismus in allen Bakterien hoch konserviert.

Die zentrale, energieliefernde Komponente der Sec-Translokase ist das SecA-Protein, das oft als der Nanomotor bezeichnet wird, der die Proteintranslokation antreibt. Den Translokationskanal, durch den Exportproteine über die Cytoplasmamembran transloziert werden, bilden die Proteine SecY, SecE und SecG. Neben diesen Hauptkomponenten der Proteintranslokation, die mit Ausnahme von SecG alle essentiell für das Überleben der Zelle sind, spielen die Membranproteine SecD, SecF, YajC und YidC eine unterstützende Rolle. Die nachfolgenden Abschnitte behandeln die Komponenten der Sec-Translokase und ihre Funktionsweise im Detail.

I.3.1 SecA: Der Nanomotor der Proteintranslokation.

Das SecA-Protein stellt die zentrale Komponente der Sec-Translokase dar. Es ist eine ATPase, das heißt, es besitzt die Fähigkeit, ATP zu binden und zu hydrolysieren. Aufgrund dieser Fähigkeit ist es die energieliefernde Komponente der Proteintranslokation (den Blaauwen *et al.*, 1996) und wird als Translokations-ATPase oder Nanomotor der Proteintranslokation bezeichnet. Für einige Proteine ist neben der ATP-Hydrolyse an SecA die Beteiligung des Membranpotentials an der Energetisierung der Proteintranslokation gezeigt worden (Schiebel *et al.*, 1991).

SecA verfügt über verschiedene Bindungspartner. Es bindet sowohl an das Signalpeptid wie auch den reifen Teil des Vorläuferproteins (Cunningham und Wickner, 1989), möglicherweise an einer putativen Präprotein-Bindestelle (Kimura *et al.*, 1991; Papanikou *et al.*, 2005). Es besitzt Affinität zu Lipiden, besonders sauren Phospholipiden, und besonders hohe Affinität zum SecYEG-Komplex (Lill *et al.*, 1990). Darüber hinaus bindet SecA das exportspezifische Chaperon SecB (bei Gram-negativen Bakterien) und seine eigene mRNA (Hartl *et al.*, 1990; Dolan und Oliver, 1991).

Das SecA-Protein liegt in der Zelle in drei verschiedenen Formen vor: einer löslichen Form im Cytosol, einer peripher an die Membran gebundenen Form und einer Form als integrales Membranprotein (Economou und Wickner 1994; Ramamurthy und Oliver 1997). Die cytosolische Form hat eventuell eine Funktion beim „targeting“ von Exportproteinen an die Translokase (Karamyshev und Johnson, 2005) und die beiden anderen Formen treten während der Funktion als Nanomotor auf. Im Verlauf der Proteintranslokation durchläuft das SecA-Protein, in Abhängigkeit von ATP-Bindung und Hydrolyse, Zyklen von Insertion in und Deinsertion aus der Cytoplasmamembran. Diese zyklische Insertion und Deinsertion, die durch Konformationsänderungen des SecA-Proteins zustande kommt, erklärt das Auftreten

der sowohl membranassoziierten wie membranintegralen Form. Der Zyklus von Insertion und Deinsertion von SecA treibt die Translokation des an SecA gebundenen Vorläuferproteins durch den aus SecY, SecE und SecG gebildeten Kanal voran (Economou *et al.*, 1995).

Da SecA stabil in einer homodimeren Form vorliegt (Akita *et al.*, 1991; Doyle *et al.*, 2000) wurde lange angenommen, dass es auch während der Proteintranslokation als Dimer aktiv ist (Driessen, 1993). Einige Untersuchungen deuten jedoch an, dass SecA während der Proteintranslokation dissoziiert und möglicherweise als Monomer aktiv ist (Or *et al.*, 2002; Benach *et al.*, 2003; Or *et al.*, 2005). Da eine weitere Arbeit jedoch auch zeigt, dass membrangebundene SecA-Dimere für die Proteintranslokation essentiell sind (Jilaveanu *et al.*, 2005), kann die Frage über den oligomeren Zustand der translokationsaktiven SecA-Spezies bislang nicht eindeutig beantwortet werden.

Die seit wenigen Jahren verfügbaren Kristallstrukturen der SecA-Proteine aus *B. subtilis* (Hunt *et al.*, 2002) und *M. tuberculosis* (Sharma *et al.*, 2003) lieferten nicht nur eine genaue Darstellung der Struktur des SecA, sondern ermöglichten gemeinsam mit den bisher aus genetischen und biochemischen Untersuchungen gewonnenen Daten, ein besseres Gesamtverständnis der SecA-Funktionsweise.

Das SecA-Protein kann in drei primäre Domänen aufgeteilt werden: die zentrale DEAD-Motor-Domäne, die C-Domäne und die SSD („substrate specificity domain“) (Vrontou und Economou, 2004) (siehe Abbildung 3).

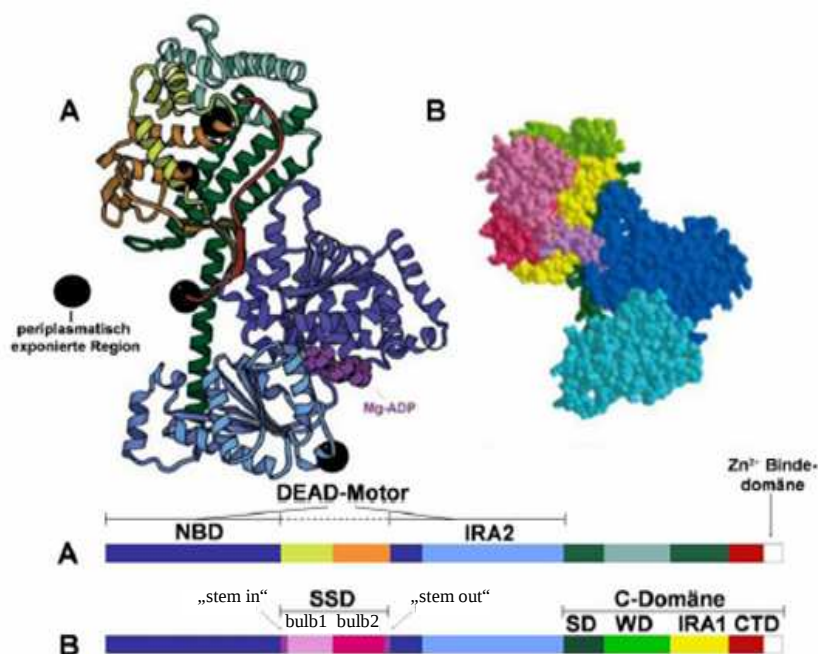


Abbildung 3: Kristallstruktur des *B. subtilis* SecA. (A) zeigt die Ribbon-Sichtweise des Proteins, während (B) eine raumfüllende Darstellung ist. Die zur jeweiligen Abbildung gehörenden linearen Darstellungen sind unterhalb dargestellt und definieren den Farbcode für (A) und (B). NBD: „nucleotide binding domain“; IRA2: „intramolecular regulator of ATPase activity“; SSD: „substrate specificity domain“; SD: „scaffold domain“; WD: „wing domain“; CTD: „carboxy terminal domain“; weitere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen (verändert nach Hunt *et al.*, 2002; Vrontou und Economou, 2004).

Die DEAD-Motor-Domäne ist aminoterminal lokalisiert und verfügt über eine für die Superfamilie 2 der RNA-Helikasen typische D-E-A-D/ D-E-x-H Struktur. Funktionell lässt sich die DEAD-Motor-Domäne in zwei Subdomänen gliedern: die NBD („nucleotide binding domain“) und die IRA2-(„inter-molecular regulator of ATPase activity“) Domäne. Die zyklische Bindung und Hydrolyse von ATP, welche die Translokation von Vorläuferproteinen ermöglicht, erfolgt an der NBD (Economou *et al.*, 1995). Sie besitzt die für ATPasen typischen, hochkonservierten Walker A- und Walker B-Motive (Walker *et al.*, 1982). Auf Ebene der Primärstruktur ist die NBD durch die SSD unterbrochen. Bei Betrachtung der Kristallstruktur ragt die SSD weit aus der NBD heraus. Die IRA2-Domäne wurde aufgrund der Anwesenheit von Walker-Motiven früher auch für eine zweite, niederaffine Nukleotidbindestelle des SecA-Proteins gehalten. Die Walker-Motive verfügen jedoch nur über einen Teil der funktionell bedeutenden, konservierten Aminosäurereste und eine direkte Nukleotidbindung konnte nie nachgewiesen werden. Neuere Ergebnisse zeigten auf, dass die IRA2 keine katalytische, sondern eine regulatorische Funktion besitzt. Die hochflexible IRA2-Domäne steuert durch ihre Bindung an die NBD die dort stattfindende Bindung und Hydrolyse von ATP (Nakatogawa *et al.*, 2000; Sianidis *et al.*, 2001).

Die C-Domäne von SecA kann in vier Subdomänen gegliedert werden: die SD („scaffold domain“), die IRA1-Domäne, die WD („wing domain“) und die CTD („carboxy terminal domain“). Die SD fungiert als „molekulares Gerüst“ als Bindeglied zwischen der DEAD-Motor-Domäne und dem IRA1-Teil der C-Domäne. Die IRA1-Domäne besitzt ihrerseits regulatorische Funktion. Neben der IRA2 ist sie der zweite intermolekulare Regulator der Bindung und Hydrolyse von ATP an der NBD des SecA-Proteins. Die IRA1 fungiert als eine Art Schalter, der ATP-Hydrolyse in Gegenwart von SecYEG und Vorläuferproteinen begünstigt, während die unproduktive ATP-Hydrolyse in cytosolischem SecA unterbunden wird (Karamanou *et al.*, 1999). Dies gewährleistet, dass ATP nur dann verbraucht wird, wenn eine Proteintranslokation aufgrund der Gegenwart von SecYEG und Vorläuferprotein stattfinden kann. Die IRA1 sorgt somit für eine Kopplung von ATP-Bindung und Hydrolyse an die Proteintranslokation. Hierbei steht die IRA1 nicht in direktem Kontakt zur NBD, sondern es wird angenommen, dass sie über den Kontakt zu verschiedenen anderen SecA-Subdomänen globale Konformationsänderungen bewirkt, die ATP-Bindung und Hydrolyse an der NBD steuern (Sianidis *et al.*, 2001). Für die flexible WD wird vermutet, dass sie an der Interaktion zwischen SecA und SecYEG beteiligt sein könnte, da sie eine proteaseresistente Form einnimmt, wenn SecYEG anwesend ist. Daher könnte sie für die Bindung von SecA an SecYEG eine wichtige Rolle spielen (Economou und Wickner, 1994; Eichler und Wickner, 1997). Die vierte Subdomäne der C-Domäne, die CTD, spielt in *E. coli* eine Rolle bei der Bindung von Lipiden und SecB (Breukink *et al.*, 1995).

Auf Ebene der Primärstruktur liegt die SSD innerhalb der NBD, ragt aber bei Betrachtung der Tertiärstruktur deutlich aus dieser heraus. Zwei antiparallele β -Faltblätter bilden eine Art Stängel (engl. „stem“; die beiden Faltblätter werden daher als „stem in“ und „stem out“

bezeichnet) an deren Ende ein zweiteiliger birnenförmiger Anhang (engl. „bulb“ und als „bulb1“ und „bulb2“ bezeichnet) lokalisiert ist. Nach neuesten Ergebnissen ist es wahrscheinlich, dass der „stem“ Signalpeptide und der „bulb“ den reifen Teil von Vorläuferproteinen bindet (Papanikou *et al.*, 2005). Diese Bindung von Vorläuferproteinen beeinflusst nicht nur die Konformation der SSD, sondern auch die der DEAD-Motor-Domäne und es ist daher möglich, dass so auch Einfluss auf die ATP-Bindung und Hydrolyse durch SecA genommen wird.

I.3.2 SecY, SecE und SecG: Der Translokationskanal.

Die drei membranintegralen Proteine SecY, SecE und SecG bilden in der Cytoplasmamembran einen heterotrimeren Komplex aus, der den eigentlichen Proteintranslokationskanal bildet (Brundage *et al.*, 1990; Akimaru *et al.*, 1991). Homologe zu SecYEG finden sich nicht nur in Gram-positiven und in Gram-negativen Bakterien, sondern auch in Archaea und sogar in Eukaryoten. Es handelt sich also um eine evolutionär sehr hoch konservierte Struktur. In Bakterien bilden SecY und SecE den essentiellen Kernkomplex aus (Taura *et al.*, 1993; Joly *et al.*, 1994), während dem nicht essentiellen SecG-Protein eine akzessorische Funktion zukommt.

SecY ist ein integrales Membranprotein, das in *E. coli* über 10 Transmembransegmente (TMS 1-10) in der Membran verankert ist (Ito, 1990). Sowohl der N- als auch der C-Terminus ragen ins Cytosol, mit den als C1 und C6 (C: cytoplasmatisch) bezeichneten Bereichen (Akiyama und Ito, 1987). Zwischen ihnen liegen vier weitere cytoplasmatisch exponierte Bereiche (C2-C5).

Das SecE in *E. coli* verfügt über drei TMS, in einigen anderen Bakterien wie z. B. in *B. subtilis* ist es jedoch nur über ein TMS in der Membran verankert. Bei *E. coli* scheint in der Tat auch nur das dritte TMS und der davor liegende cytoplasmatische Bereich funktionell von Bedeutung zu sein (Schatz *et al.*, 1991; Nishiyama *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1994).

Das SecA-Protein bindet bei der Translokationsinitiation direkt an den SecY/SecE-Komplex (Snyders *et al.*, 1997; Manting *et al.*, 1997), und diese Wechselwirkung ist essentiell für eine effiziente Proteintranslokation (Manting *et al.*, 1999).

Die dritte Komponente des SecYEG-Kanals, das SecG-Protein, ist nicht essentiell, sorgt aber für eine deutlich verbesserte Proteintranslokationseffizienz (Nishiyama *et al.*, 1996).

Über den Oligomerisierungszustand der in der Proteintranslokation aktiven SecYEG-Spezies gibt es verschiedene Ansichten. Modelle reichen von einer aktiven, monomeren Form (Yahr und Wickner, 2000), über eine dimere Form (Bessonneau *et al.*, 2002) bis zu einer tetrameren Form (Manting *et al.*, 2000).

Neue Studien, basierend auf der Röntgenkristallstruktur des SecYEG/β von *Methanococcus janaschii* (Van den Berg *et al.*, 2004) zeigten jedoch auf, dass sich der Translokationskanal höchstwahrscheinlich in einem einzigen Heterotrimer von SecYEG befindet. Zwar handelt es

sich bei *M. janaschii* um ein Archaeobakterium, doch zeigt die Anordnung der SecY-Transmembransegmente von *E. coli*, die über elektronenmikroskopische Aufnahmen ermittelt wurde, eine annähernd vollständige Übereinstimmung mit der *M. janaschii* Kristallstruktur (Breyton *et al.*, 2002; Van den Berg *et al.*, 2004; Bostina *et al.*, 2005). Dies macht es wahrscheinlich, dass die *M. janaschii* SecYEG-Kristallstruktur ebenfalls der der bakteriellen Translokationspore entspricht.

Nach der Kristallstruktur lässt sich das SecY-Protein grob in zwei Hälften teilen, gebildet von den TMS 1-5 und den TMS 6-10 (Abbildung 4 A und B).

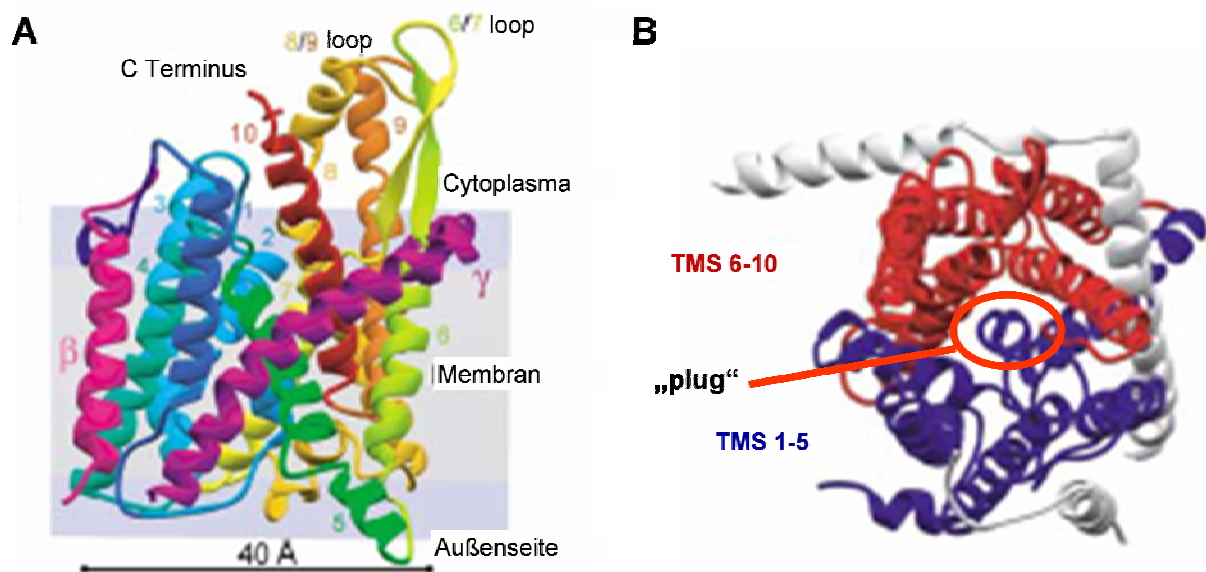


Abbildung 4: Kristallstruktur der *Methanococcus janaschii* Translokationspore. (A) zeigt eine seitliche Ansicht des SecY in der Membran; SecE (γ, dunkles Lila) umspannt die beiden Hälften des SecY-Proteins; SecG (β) ist in rosa dargestellt; (B) Aufsicht auf die Translokationspore aus dem Cytosol. In Blau und Rot dargestellt sind die beiden Hälften des SecY-Proteins (TMS 1-5 in blau und TMS 6-10 in rot). In der Mitte der Struktur ist der den Translokationskanal versperrende „plug“ zu sehen (verändert nach van den Berg *et al.*, 2004).

Diese Hälften werden neben einem kurzen „loop“ zwischen TMS 5 und 6 vor allem auch durch SecE zusammengehalten (Abbildung 4 A, γ- Untereinheit). Im Inneren der beiden SecY-Hälften befindet sich ein trichterförmiger Kanal, der sich von seiner mit 20-25 Angström weitesten Stelle von Außen nach Innen hin verengt. Die schmalste Stelle in der Mitte des Kanals hat nur noch einen Durchmesser von 5-8 Angström und wird von einem hydrophoben Ring aus 5 Isoleucinen gebildet (Abbildung 5). Darüber hinaus wird diese dünne Pore noch durch das TMS2a von SecY auf der periplasmatischen Seite des Kanals wie durch einen Stopfen (engl. „plug“) blockiert (Abbildung 4 B, Abbildung 5, Schritt 1 und 2). Dieser „plug“ verhindert die Passage von Proteinen und anderen Molekülen und muss zur Seite bewegt werden, wenn eine Proteintranslokation erfolgen soll. Dies geschieht möglicherweise durch eine Interaktion des Vorläuferproteins mit zwei TMS von SecY (Abbildung 5, Schritt 3). Tatsächlich konnte eine Bewegung des „plugs“ während der

Translokation aus dem Inneren des Kanals zum C-terminalen Ende von SecE durch *in vitro* „crosslinking“-Studien gezeigt werden (Tam *et al.*, 2005; Abbildung 5, Schritt 3). Anschließend kann eine durch SecA und das Membranpotential angetriebene Translokation des Vorläuferproteins durch den Kanal erfolgen (Abbildung 5, Schritt 4). Der enge Isoleucin-Ring fungiert hierbei als eine Dichtung, welche die ungewollte Diffusion anderer Moleküle durch den Kanal unterbindet. Dass es sich bei dieser trichterförmigen Struktur tatsächlich um den Proteintranslokationskanal handelt, wird durch *in vitro* „crosslinking“-Studien gestützt. Eine Vernetzung von Vorläuferproteinen während der Translokation führt in vielen Fällen zu einer Bindung an Aminosäuren des Isoleucin-Rings oder an sehr dicht benachbarte Reste (Cannon *et al.*, 2005).

Dass die eigentliche Translokation des Vorläuferproteins durch einen Kanal aus nur einem SecYEG-Heterotrimer geschieht, ist somit höchst wahrscheinlich geworden. Es scheint aber dennoch der Fall zu sein, dass eine Di- oder Oligomerisierung von SecYEG die Translokation durch die Pore in einem SecYEG-Monomer positiv beeinflusst (Tam *et al.*, 2005; Bostina *et al.*, 2005).

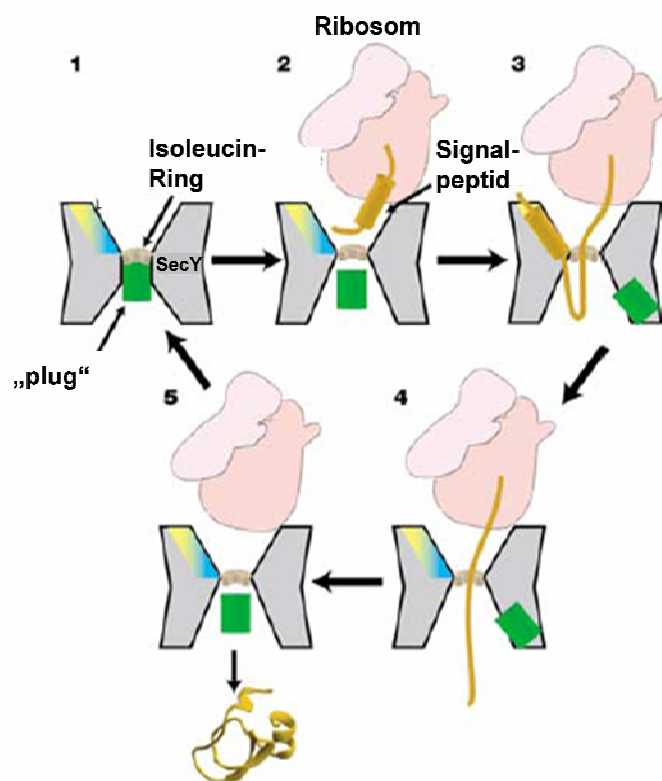


Abbildung 5: Modell der Translokation eines Vorläuferproteins durch den Translokationskanal von *Methanococcus janashchii*. Ein SecA-Protein ist in Archaeobakterien nicht vorhanden, der generelle Mechanismus der Interaktion des Vorläuferproteins mit der Translokase und der „plug“-Bewegung sollte in Eubakterien mit einem SecA jedoch analog verlaufen. Anstelle einer direkten Interaktion mit dem Ribosom ist hier jedoch eine Wechselwirkung mit dem SecA-Protein, welches das Vorläuferprotein bindet, vorstellbar. (1) geschlossener Translokationskanal; (2) das Vorläuferprotein wird vom Ribosom bzw. SecA an den Translokationskanal gebracht; (3) Wechselwirkung des Signalpeptides mit SecY führt zu einer Bewegung des „plug“ und einem Öffnen des Kanals; (4) Translokation durch den Kanal; hierbei fungiert der Isoleucin-Ring als eine Art Dichtung; (5) Freisetzung des translozierten Proteins; der Kanal ist wieder durch den „plug“ verschlossen (Verändert nach van den Berg *et al.*, 2004).

I.3.3 SecD, SecF, YajC und YidC: zusätzliche Komponenten der Sec-Translokase.

Neben SecYEG bilden SecD, SecF und YajC den zweiten heterotrimeren Proteinkomplex, der an der Sec-abhängigen Proteintranslokation beteiligt ist. SecD und SecF sind zwei große, integrale Membranproteine, die jeweils 6 TMS besitzen. In *B. subtilis*, wie auch in einigen anderen Organismen, sind SecD und SecF zu einem großen, als SecDF bezeichneten Membranprotein fusioniert, welches über 12 Transmembransegmente verfügt (Bolhuis *et al.*, 1998). SecD und SecF (bzw. SecDF) sind nicht essentiell für das Überleben der Zelle, Stämme mit einer Deletion der entsprechenden Gene zeigen jedoch einen schweren Wachstumsdefekt (Pogliano und Beckwith, 1994). SecD und SecF bilden einen Komplex mit YajC, einem Membranprotein, das keine bekannte Funktion in der Proteintranslokation besitzt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass YajC einen Komplex mit SecYEG und SecDF eingeht und somit möglicherweise das Bindeglied zwischen diesen beiden Teilkomplexen der Translokase darstellt (Duong und Wickner, 1997a). In *E. coli* wurde eine Rolle des SecDFYajC-Komplexes für die Modulation des katalytischen Zyklus von SecA impliziert (Economou *et al.*, 1995). Der SecDFYajC-Komplex stabilisiert möglicherweise die membranintegrale Form von SecA und verhindert so ein Zurückgleiten des unvollständig translozierten Vorläufers (Duong und Wickner, 1997b). Weiterhin gibt es Ergebnisse die andeuten, dass der SecDFYajC-Komplex mit seinen großen periplasmatischen Domänen an der Freisetzung der translozierten Vorläuferproteine von der Translokase beteiligt ist (Matsuyama *et al.*, 1993).

YidC stellt eine weitere Komponente der Sec-Translokase dar. Es ist ein essentielles Protein, welches mit der Translokase in einem SecYEG-SecD-SecF-YajC-Komplex assoziiert (Nouwen und Driessen, 2002) und eine Rolle beim Einbau von Sec-abhängigen Proteinen in die innere Membran spielt (Samuelson *et al.*, 2000; Scotti *et al.*, 2000).

I.4 Sec2: Eine zusätzliche Proteintranslokationsmaschinerie in Gram-positiven Bakterien.

Bis vor kurzem war man der Ansicht, dass in einem Bakteriengenom nur je ein *secA*- und ein *secY*-Gen vorhanden sind. Diese Gene sind für das Überleben der Zelle essentiell und in den meisten Bakterien sind ein SecA- und ein SecY-Protein ausreichend, um die Translokation aller Sec-abhängigen Vorläuferproteine zu gewährleisten. Daher war die Entdeckung eines zweiten *secA*- und in manchen Fällen zusätzlich eines zweiten *secY*-Gens im Genom verschiedener Gram-positiver Bakterien überraschend. Die Entdeckung dieser zusätzlichen Sec-Komponenten erfolgte entweder über die Analyse der vollständig sequenzierten Genome oder über die Analyse von Mutanten, deren Phänotyp auf Mutationen in den zusätzlichen

secA- oder *secY*-Genen zurückgeht (Braunstein *et al.*, 2001; Bensing und Sullam, 2002; Lenz und Portnoy, 2002; Chen *et al.*, 2004).

Das erste zusätzliche *secA*-Gen wurde in Mycobakterien entdeckt (Braunstein *et al.*, 2001). Inzwischen gibt es eine Vielzahl Gram-positiver Bakterien, in denen ein zweites *secA*, und in manchen Fällen zusätzlich ein zweites *secY*, gefunden wurde. Zu diesen zählen neben Mycobakterien unter anderem verschiedene *Listeria*-Arten, sowie Staphylokokken, Streptokokken und Corynebakterien (Braunstein *et al.*, 2001; Bensing und Sullam, 2002; Lenz und Portnoy, 2002; Chen *et al.*, 2004). Auffällig ist, dass diese zusätzlichen Sec-Komponenten nur in Gram-positiven Bakterien, und hier fast nur in pathogenen Vertretern, gefunden wurden. Tatsächlich scheinen die akzessorischen Sec-Komponenten oft direkt oder indirekt an der Pathogenität dieser Bakterien beteiligt zu sein (Lenz und Portnoy, 2002; Bensing und Sullam, 2002; Braunstein *et al.*, 2003). In Gram-negativen Bakterien wurden sie hingegen nicht identifiziert.

In Bakterien, die über zusätzliche Sec-Komponenten verfügen, kodiert eines der *secA*- bzw. *secY*-Gene für ein SecA- bzw. SecY-Protein, das große Homologie zu den SecA- bzw. SecY-Proteinen von *E. coli* und *B. subtilis* aufweist. Dies wurde als *secA1* bzw. *secY1* bezeichnet und das jeweilige SecA1- bzw. SecY1-Protein stellt wahrscheinlich das SecA- bzw. SecY-Ortholog in diesen Organismen dar. Das zweite *secA*- bzw. *secY*-Gen kodiert für ein SecA- bzw. SecY-Protein mit deutlich geringerer Homologie zu den SecA- bzw. SecY-Proteinen von *B. subtilis* und *E. coli* und wurde als *secA2* bzw. *secY2* bezeichnet.

Die bisher daraufhin untersuchten *secA2*- und *secY2*-Gene haben die Gemeinsamkeit, dass sie überraschenderweise nicht-essentiell sind. Sie stellen damit die einzigen bislang bekannten Beispiele nicht-essentieller *secA*- bzw. *secY*-Gene dar.

Wenngleich alle Bakterien mit zusätzlichen Sec-Komponenten die Anwesenheit eines *secA2* gemeinsam haben, so lassen sie sich doch in Hinblick auf die bislang vermutete Funktionsweise der akzessorischen Sec-Komponenten grob in zwei Gruppen einteilen: Bakterien, die nur über ein *secA2* verfügen (u.a. *Listerien*, Mycobakterien und Corynebakterien) und solche, die zusätzlich neben dem *secA2* auch noch ein *secY2* besitzen (u.a. Staphylokokken und Streptokokken). Auf diese beiden Gruppen wird im Folgenden detailliert eingegangen.

I.4.1 Die SecA2-abhängige Proteintranslokation.

Zu den bisher identifizierten Bakterien, in deren Genomen nur ein zweites *secA* aber kein zweites *secY* vorhanden ist, gehören verschiedene Stämme der Mycobakterien, *Listerien* und Corynebakterien. Bisher studiert wurde der SecA2-abhängige Proteinexport in *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis* und *Listeria monocytogenes* (Braunstein *et al.*, 2001; Braunstein *et al.*, 2003; Lenz und Portnoy, 2002; Lenz *et al.*, 2003;

Monk *et al.*, 2004; Machata *et al.*, 2005). Da neben dem SecA2 bislang keine anderen zusätzlich am Proteinexport beteiligten Proteine in diesen Stämmen detektiert wurden, ist es wahrscheinlich, dass SecA2 einige oder alle der restlichen Komponenten der Sec-Translokase (SecY,E,G,D,F,YajC und YidC) benötigt, um bei der Proteintranslokation aktiv zu sein. In allen drei bisher untersuchten Bakterienstämmen ist das *secA2* im Gegensatz zum „housekeeping“ *secA1* ein nicht-essentielles Gen.

In einer *secA2*-Mutante von *M. tuberculosis* werden zwei Proteine im Vergleich zum Wildtyp in deutlich geringerer Menge (5-30%) sekretiert. Hierbei handelt es sich um die Superoxid-Dismutase (SodA) und die Katalase (KatG). Beides sind Proteine, die beim Abbau reaktiver Sauerstoff-Zwischenstufen (ROI: „reactive oxygen intermediates“) beteiligt sind. ROI-Freisetzung stellt einen bedeutenden antimikrobiellen Mechanismus in Macrophagen des Wirts dar. Tatsächlich ist eine *secA2*-Mutante, die aufgrund reduzierten Exports von SodA und KatG wahrscheinlich weniger effizient ROIs abbauen kann, deutlich weniger virulent, als der *M. tuberculosis* Wildtyp (Braunstein *et al.*, 2003). Diese reduzierte Pathogenität ist besonders von Interesse, da die von *M. tuberculosis* verursachte Tuberkulose eine der bedeutendsten Bedrohungen für die menschliche Gesundheit weltweit darstellt, da sie für über zwei Millionen Tote pro Jahr verantwortlich ist („World Health Organization“, 2002) und etwa zwei Milliarden Menschen mit ihr infiziert sind. Eine genauere Betrachtung der beiden *secA2*-abhängig exportierten Proteine SodA und KatG zeigt eine auffällige Besonderheit: beide verfügen über kein klassisches Signalpeptid. Tatsächlich haben sie in vielen anderen Bakterien nachweislich eine cytoplasmatische Lokalisierung. Es ist daher verwunderlich, wie diese Proteine ohne Signalpeptid in den SecA2-Exportweg eingeschleust werden.

In *Listeria monocytogenes*, einem intrazellulären Pathogen, zeigt eine *secA2*-Mutante, wie in *M. tuberculosis*, eine deutlich verringerte Pathogenität (Lenz und Portnoy, 2002). So ist der LD₅₀-Wert einer *L. monocytogenes secA2*-Mutante in Mäusen im Vergleich zum Wildtyp mindestens um den Faktor 500 reduziert. In einer *secA2*-Mutante werden im Vergleich zum Wildtyp hauptsächlich zwei Autolysine, p60 und NamA, in deutlich reduziertem Maße exportiert. Beide sind in der Lage bakterielles Peptidoglycan abzubauen und verfügen über klassische Sec-Signalpeptide. Die Funktion von p60 und NamA bei der Pathogenität von *L. monocytogenes* könnte darauf zurückgehen, dass beide zu einem partiellen Abbau der *Listeria*-Zellwand führen, die zu einer Freisetzung einer großen Menge an Zellwandbruchstücken führt. Diese werden vom Immunsystem der Wirtszelle erkannt. Aufgrund der sehr großen Menge dieser Zellwandstücke könnte dies jedoch dazu führen, dass das Immunsystem nicht mehr aktiviert wird, sondern es zu einer Abstumpfung der Immunantwort kommt (Lenz *et al.*, 2003). Bleibt in einer *secA2*-Mutante dieser Effekt aufgrund eines reduzierten Exports von p60 und NamA teilweise oder komplett aus, so reagiert die Wirtszelle aggressiver auf die *L. monocytogenes*-Invasion und die Pathogenität des *Listeria*-Stammes ist deutlich reduziert.

Neben p60 und NamA werden einige weitere Proteine in der *secA2*-Mutante in reduziertem Maße in den extrazellulären Raum freigesetzt. Hierunter befinden sich auch einige Proteine, die über kein Signalpeptid verfügen und eine nachgewiesene cytosolische Funktion besitzen (z.B. GroEL, EF-Tu; sog. „moonlighting“- Proteine). Die SecA2-abhängige Freisetzung dieser Proteine könnte auf eine durch p60- und NamA-Export verursachte höhere Autolyse des Wildtyps im Vergleich zur *secA2*-Mutante zurückgehen. Eine solch erhöhte Autolyse konnte jedoch bislang nicht entdeckt werden.

Für die SecA2-abhängigen, signalpeptidlosen „moonlighting“- Proteine stellt sich wie bei den mycobakteriellen SecA2-Substraten SodA und KatG die Frage, wie ein „targeting“ dieser Proteine gewährleistet wird. Das „targeting“ von p60, NamA und der anderen SecA2-abhängig exportierten Proteine, die Signalpeptide besitzen, wirft ebenfalls eine Frage auf: hier ist unklar, wie ein spezifisches „targeting“ an SecA2 gewährleistet wird und ob bzw. wie ein falsches „targeting“ an SecA1 verhindert wird. Die Signalpeptide dieser Proteine weisen weder eine auffällige Gemeinsamkeit auf, noch unterscheiden sie sich in einer offensichtlichen Art und Weise von „klassischen“ Signalpeptiden von SecA1-abhängig exportierten Proteinen.

Die Ergebnisse aus Mycobakterien und *L. monocytogenes* deuten also an, dass in Bakterien, die nur über ein SecA2 verfügen, dieses am Export eines spezifischen Satzes an Proteinen beteiligt ist. Hierbei ist das SecA2 höchstwahrscheinlich auf die restlichen, nur in einzelner Kopie vorliegenden, Komponenten der Sec-Translokase angewiesen. Da der Export der SecA2-spezifischen Substrate in einer *secA2*-Mutante jedoch nur stark reduziert ist und nicht vollständig zum Erliegen kommt, scheint auch unabhängig von SecA2 ein Export dieser Substrate, wahrscheinlich über SecA1, möglich. SecA2 ist für den effizienten Export seiner spezifischen Substrate jedoch nötig. Wie nun ein spezifisches „targeting“ dieser Substrate an SecA2 erfolgt, ist, vor allem auch in Hinblick auf die Substrate ohne Signalpeptid, völlig unklar.

I.4.2 Die SecA2/SecY2-abhängige Proteintranslokation.

Die SecA2/SecY2-abhängige Proteintranslokation zeigt neben ein paar Gemeinsamkeiten sehr deutliche Unterschiede zu der SecA2-abhängigen Translokation. Ein *secA2*- und gleichzeitig ein *secY2*-Gen wurde bislang in den Genomen von einigen Staphylokokken und Streptokokken entdeckt. Interessanterweise liegen dort *secA2* und *secY2* immer in einem Operon mit einer ähnlichen Struktur (siehe Abbildung 6) vor. Neben *secA2* und *secY2* gibt es in diesem Operon immer ein Gen, das für ein sehr großes, Serin-reiches Protein (Srr: „serine rich repeat protein“) kodiert. Bei diesem Protein handelt es sich bei den bislang eindeutig daraufhin untersuchten Bakterien (*Streptococcus gordonii* und *Streptococcus parasanguinis*

[früher *parasanguis*]) um das SecA2/SecY2-abhängig exportierte Substrat (Bensing und Sullam, 2002; Chen *et al.*, 2004). Weitere Gene in diesem Operon kodieren Proteine, die entweder am Export (*secA2*, *secY2*, *asp1-5*) oder der Glykosylierung (*gtfA*, *gtfB*, *gly*, *nss*) des Srr-Proteins beteiligt sind.

Wie auch bei den bislang untersuchten Bakterien mit einem SecA2-Exportweg handelt es sich beim SecA2/SecY2-Exportweg um einen akzessorischen, nicht essentiellen Proteinexportmechanismus. Alle Gene im *secA2/secY2*-Operon sind deletierbar.

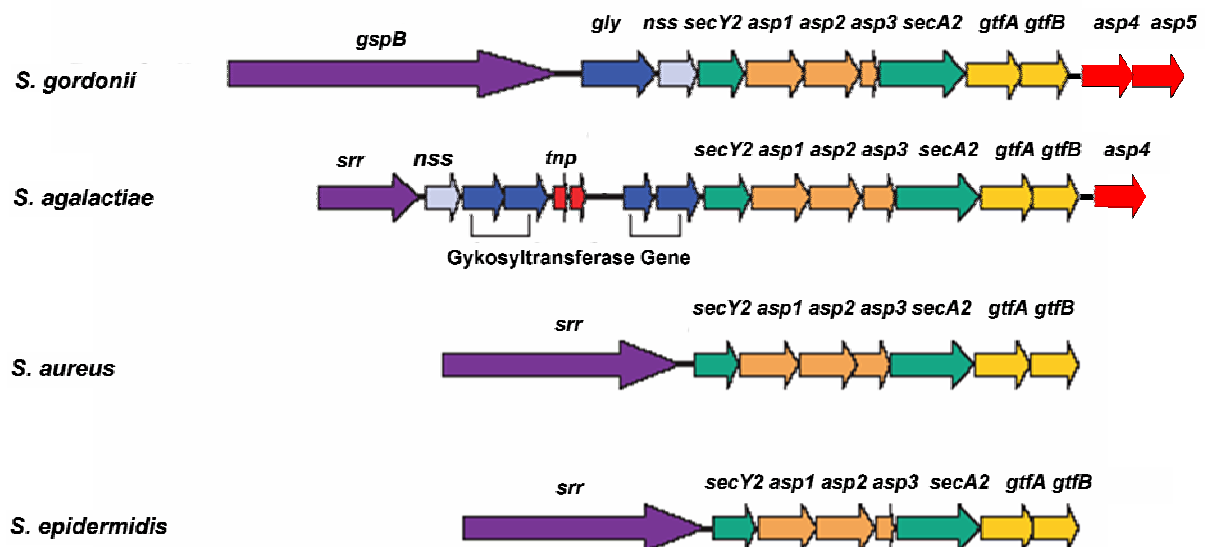


Abbildung 6: Vergleich der *secA2/secY2*-Genloci von *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*.

srr („serine rich repeat protein“): diese Gene kodieren die Sec2-Substrate; *gspB*: das *srr* von *S. gordonii*; *secY2*, *secA2* und *asp1-5* („accessory secretory proteins“): Deletion dieser Gene führt zu einem Verlust des Srr-Exports; *gtfA*, *gtfB* („glycosyl transferase“): Die Gene kodieren für Glykosyltransferasen, deren Deletion in *S. gordonii* zu einer Aggregation und einem Abbau von Srr führt. *Nss*, *gly* (*S. agalactiae* hat 4 Homologe): die Genprodukte sind an der Glykosylierung des Srr beteiligt. *tnp*: enkodiert eine putative Transposase (verändert nach Takamatsu *et al.*, 2004a).

Studien mit Deletionsmutanten von *secA2* oder *secY2* ermöglichten es anhand eines Exportdefekts des Srr-Proteins dieses als SecA2/SecY2-Substrat zu identifizieren. Hierbei wird, im Gegensatz zu den SecA2-Substraten von Mycobakterien oder Listerien, der Export des Srr in der Mutante komplett blockiert (Bensing und Sullam, 2002; Chen *et al.*, 2004). Darüber hinaus scheint das Srr das einzige Exportsubstrat des SecA2/SecY2-Weges zu sein, während für den SecA2-Weg mehrere Substrate in einem Bakterium entdeckt wurden. Eine mögliche Ausnahme bildet hier *S. parasanguinis*, bei dem eventuell FimA, ein Adhesin, ein zweites Substrat neben dem Srr darstellt (Chen *et al.*, 2004). Die Srr-Proteine sind sehr große, zellwandassoziierte Adhesine, die an der Bindung der Bakterienzellen an Wirtsoberflächen beteiligt sind (Takamatsu *et al.*, 2005a; Takamatsu *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2004; Chen

et al., 2004; Siboo *et al.*, 2005). Da sie somit an der Kolonisierung von Wirten beteiligt sind, haben sie bei pathogenen Bakterien auch Einfluss auf die Pathogenität des jeweiligen Bakterienstammes (Bensing und Sullam, 2002; Chen *et al.*, 2004; Seifert *et al.*, 2006). Neben der außergewöhnlichen Größe, den Serin-reichen Regionen und einem LPXTG-Zellwand-Verankerungsmotiv, haben die Srr-Proteine noch eine weitere Gemeinsamkeit: ihre aminoterminalen Region entspricht nicht einem klassischen Sec-Signalpeptid. Zwar kann mit dem SignalP-Algorithmus für einige der Srr-Proteine ein Signalpeptid vorausgesagt werden, doch ist dieses mit 90 Aminosäuren etwa dreimal so lang wie ein durchschnittliches Sec-Signalpeptid in Gram-positiven Bakterien (Bensing und Sullam, 2002). Für dieses außergewöhnliche „targeting“-Signal wird vermutet, dass es an der Einschleusung in den SecA2/SecY2-Weg beteiligt sein könnte. Ob und wie es hierbei ein „targeting“ an SecA1/SecY1 verhindert, ist jedoch noch ungeklärt.

Neben der Deletion von *secA2* oder *secY2* führte in *S. gordonii* die Deletion von fünf weiteren Genen zu einem Block des Srr-Exports. Diese werden als *asp1-5* (*asp*: accessory secretory proteins) bezeichnet. Die von *asp4* und *asp5* kodierten Proteine zeigen überraschenderweise in Bezug auf ihre Größe, Sekundärstruktur und in geringem Maße auch auf Ebene der Aminosäuresequenz, eine Ähnlichkeit zu den SecE- und SecG-Proteinen aus *B. subtilis* und anderen Bakterien (Takamatsu *et al.*, 2005b). Asp1, Asp2 und Asp3 hingegen zeigen keinerlei Ähnlichkeit zu bislang bekannten Proteinen. Während *asp1*, *asp2* und *asp3* in allen *secA2/secY2*-Operons gefunden wurden, sind *asp4* und *asp5* nicht universal konserviert (Takamatsu *et al.*, 2005 b).

Die weiteren Gene des *secA2/secY2*-Operons kodieren für Proteine, die nicht direkt am Export des Srr beteiligt sind, sondern dessen Glykosylierung beeinflussen. Dass Glykosylierung des Srr-Proteins stattfindet, konnte in mehreren Fällen gezeigt werden (Bensing *et al.*, 2004a; Bensing *et al.*, 2004b; Chen *et al.*, 2004; Siboo *et al.*, 2005). Die Glykosylierung scheint hauptsächlich an den Serin-reichen Regionen zu geschehen und erfolgt wahrscheinlich vor dem Export (Bensing *et al.*, 2004a). Ist die Glykosylierung schwerwiegend beeinflusst, wie es in einer *gtfA* oder *gtfB* Mutante der Fall ist, so aggregiert das Srr-Protein und wird abgebaut (Takamatsu *et al.*, 2004a). Eine Mutation von *gtf* oder *nss* führt ebenfalls zu einer veränderten Glykosylierung des Srr-Proteins, allerdings hat diese keinen signifikanten Einfluss auf Stabilität oder Export des Srr (Takamatsu *et al.*, 2004a; Takamatsu *et al.*, 2004b).

Im Gegensatz zur SecA2-abhängigen Proteintranslokation, die wahrscheinlich die Komponenten der klassischen Sec-Translokase für den Proteinexport benötigt, scheint aufgrund der Vielzahl funktionell wichtiger Komponenten des SecA2/SecY2-Exportes hier eine eigenständige Translokase zu existieren. Diese kann trotz einiger zuerst offensichtlicher Gemeinsamkeiten, wie dem Vorhandensein eines SecA- und SecY-Proteins, funktionell durchaus sehr unterschiedlich von der klassischen Sec-Translokase sein. Ein Hinweis hierauf ist z.B., dass die Srr-Proteine wahrscheinlich vor der Translokation glykosyliert werden

(Bensing *et al.*, 2004a). Ein Export eines solch extensiv modifizierten Proteins über einen Mechanismus, der dem klassischen Sec-Weg ähnelt ist praktisch ausgeschlossen, da dieser nur ungefaltete Proteine exportieren kann. Auch für den SecA2/SecY2-Weg ist unklar, wie ein spezifisches „targeting“ an die Sec2-Translokase stattfindet und auf welche Art ein falsches „targeting“ an Sec1 unterbunden wird. Besonders interessant ist, welche Rolle die für einige Srr-Proteine vorhergesagten, sehr langen Signalpeptide hierbei spielen.

I.5 : Zielsetzung dieser Arbeit

Trotz bisheriger Untersuchungen ist die zentrale Frage, warum in einigen Gram-positiven Bakterien ein zweites Sec-Translokationssystem vorliegt, nur unzureichend beantwortet. Inzwischen gilt es zwar als nahezu erwiesen, dass die zusätzlichen Sec-Proteine für den Export spezifischer Substrate zuständig sind. Es ist dennoch weiterhin völlig unklar, wieso der Export dieser spezifischen Substrate die Entwicklung zusätzlicher Sec-Komponenten erforderlich gemacht hat.

Für die Sec2-Translokation sind sowohl der Translokations- wie auch der „targeting“-Mechanismus unbekannt und es ist unklar, inwieweit hier Ähnlichkeiten und Unterschiede zur klassischen Sec-Translokation bestehen. Hierbei ist es von besonderem Interesse herauszufinden, wie das „targeting“ der spezifischen Sec2-Substrate vermittelt wird. Es ist unklar, ob analog der klassischen Sec1-Translokase eine spezielle Proteinsequenz für dieses „targeting“ zuständig ist. Ferner ist nicht bekannt ob, und wenn ja wie ein falsches „targeting“ an die Sec1-Translokase verhindert wird. Um dies zu untersuchen, soll das „targeting“ von authentischen Sec2-Substraten sowie von Fusionsproteinen aus Sec1- und Sec2-Substraten an die klassische Sec1-Translokase analysiert werden.

Für Bakterien, die nur über ein SecA2-Protein verfügen ist es höchstwahrscheinlich, dass das SecA2-Protein mit den Komponenten der klassischen Sec1-Translokase Wechselwirkungen eingeht, damit es in der Proteintranslokation aktiv werden kann. Die SecA2/SecY2-abhängige Proteintranslokation ist aufgrund der Vielzahl von beteiligten Komponenten, die teilweise eine Homologie zu den Komponenten der Sec1-Translokase aufweisen, wahrscheinlich von der Sec1-Translokase unabhängig. Dennoch ist es bislang nicht ausgeschlossen, dass auch hier Wechselwirkungen zwischen akzessorischen und klassischen Sec-Translokase Komponenten stattfinden können. Dies sollte für das SecA2-Protein aus *S. aureus*, einem Bakterium mit einem SecA2/SecY2-System, und der klassischen Sec-Translokase von *B. subtilis* untersucht werden.

Da in allen bislang daraufhin untersuchten Bakterien ein Zusammenhang zwischen Pathogenität und Sec2-Proteintranslokation besteht, ist es von Interesse herauszufinden, ob Sec2-Systeme in nicht-pathogenen Bakterien eine Funktion besitzen oder nicht. Daher sollte

untersucht werden, ob *S. carnosus*, ein nicht-pathogener Verwandter von *S. aureus*, über ein Sec2-System verfügt und ob dieses funktionell ist. Bereits veröffentlichte Ergebnisse deuten auf mögliche gravierende Unterschiede bei der Sec2-Proteintranslokation zwischen Bakterien, die ein SecA2/SecY2-System besitzen und solchen mit einem SecA2-System hin. Daher sollte die Sec2-Proteintranslokation ebenfalls in einem weiteren nicht-pathogenen Bakterium, *C. glutamicum*, das nur über ein SecA2-Protein verfügt, untersucht werden. Auch hier stellt sich die Frage, welche Bedeutung dem Sec2-System in einem nicht-pathogenen Bakterium zukommt.

II. Material und Methoden

II.1 Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Art	Stamm	Genotyp	Referenz bzw. Herkunft
<i>Escherichia coli</i>	JM109	<i>mcrA, recA1, supE44, endA1 hsdR17, gyrA96, relA1, thi-1, (Δlac-proAB) F'[traD36, proAB⁺, lacI^qZ, ΔM15]</i>	Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985
	DH5α	<i>supE44 ΔlacU169(φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan <i>et al.</i> , 1983
	MC4100	<i>araD39 (argF-lac, U169 relA51 rps150⁻ flbB5301 deoC1 ptsF25</i>	Casadaban, 1976
	BL21(DE3)	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻, m_B⁻) gal dcm (DE3)</i>	Studier und Moffatt, 1986
<i>Bacillus subtilis</i>	DB104	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3</i>	Kawamura und Doi, 1984
	NIG1152	<i>met, his, div341^{ts}</i>	Miyakawa und Komano, 1981
	NIGpX	<i>met, his, div341^{ts} ΔamyE::(xylA, xylR, cm^R)</i>	diese Arbeit
	NIGSaA1	<i>met, his, div341^{ts} ΔamyE::(xylA, xylR, cm^R, secA1_{S,a})</i>	diese Arbeit
	NIGSaA2	<i>met, his, div341^{ts} ΔamyE::(xylA, xylR, cm^R, secA2_{S,a})</i>	diese Arbeit
<i>Staphylococcus carnosus</i>	TM300		Schleifer und Fischer, 1982
	DeltaA2	<i>ΔsecA2</i>	diese Arbeit
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC13032	Wildtyp	Kinoshita <i>et al.</i> , 1957
	CgIntA2	Pk19CgsecA2-Integrationsmutante	diese Arbeit

	CgIntA1	Pk19CgsecA1- Integrationsmutante	diese Arbeit
	ptacA2	secA2-Promotoraustausch- mutante	diese Arbeit

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pEKEX3	spec ^R _{E.c., C.g.} , P _{tac} , lacI ^q	E. Radmacher, pers. Mitteilung
pK19mobsacB	Integrationsvektor für <i>C. glutamicum</i> , Kan ^R _{E.c., C.g.} oriV _{E.c.} , oriV _{E.c.} , oriT, mob, sacB	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pK19CgsecA1	pK19mobsacB Derivat mit den flankierenden Bereichen des <i>C.g.secA1</i> zur Herstellung einer Deletionsmutante	diese Arbeit
pK19CgsecA2	pK19mobsacB Derivat mit den flankierenden Bereichen des <i>C.g.secA2</i> zur Herstellung einer Deletionsmutante	diese Arbeit
pHSG575	cm ^R _{E.c.} , P _{tac}	Takeshita <i>et al.</i> , 1987
pHSGSaSrr	cm ^R _{E.c.} , P _{tac} Srr _{S.a.}	diese Arbeit
pCU3Ery	amp ^R _{E.c.} , ery ^R _{B.s.} , P _{lac}	Maren Hintz, pers. Mitteilung
pCU3SrrLip	amp ^R _{E.c.} , ery ^R _{B.s.} , P _{lac} , srrSPPProLip	diese Arbeit
pK18mob	kan ^R _{E.c., C.g.} oriV _{E.c.} , oriV _{E.c.} , oriT	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pK18CgsecA1	pK18mob Derivat mit 500bp interner <i>C.g.secA1</i> Sequenz zur Herstellung einer Disruptionsmutante	diese Arbeit
pK18CgsecA2	pK18mob Derivat mit 500bp interner <i>C.g.secA2</i> Sequenz zur Herstellung einer Disruptionsmutante	diese Arbeit
pK18tacA2	pK18mob Derivat mit Anfang der <i>C.g.secA2</i> Sequenz hinter P _{tac} ; lacI ^q	diese Arbeit
pVWEX2	tet ^R _{E.c.+C.g.} , P _{tac} , lacI ^q	V. Wendisch, pers. Mitteilung
pVA1	tet ^R _{E.c.+C.g.} , P _{tac} , lacI ^q , secA1 _{C.g.} , 6xHisTAG	diese Arbeit
pVA2	tet ^R _{E.c.+C.g.} , P _{tac} , lacI ^q , secA2 _{C.g.} , 6xHisTAG	diese Arbeit
pUC18	amp ^R _{E.c.} , P _{lacZ}	Vieira und Messing, 1982
pLipPS1kan	Lipase _{S.h.} , kan _{B.s.}	Popp, 1986

pXR100	$\text{amp}^R_{E.C.}, \text{cm}^R_{S.C.}, P_{xyl}, xylR$	Jochen Meens, pers. Mitteilung
pXRSrr _{SP} Lip	$\text{amp}^R_{E.C.}, \text{cm}^R_{S.C.}, P_{xyl}, xylR$	diese Arbeit
pXRSrr ₁₀₀ Lip	$\text{amp}^R_{E.C.}, \text{cm}^R_{S.C.}, P_{xyl}, xylR$	diese Arbeit
pXRSrr ₂₂₀₀ Lip	$\text{amp}^R_{E.C.}, \text{cm}^R_{S.C.}, P_{xyl}, xylR$	diese Arbeit
pXRScSrrTAG	$\text{amp}^R_{E.C.}, \text{cm}^R_{S.C.}, P_{xyl}, xylR$	diese Arbeit
pWH1520	$\text{amp}^R_{E.C.}, \text{tet}^R_{B.S.}, P_{xyl}, xylR$	Rygyus und Hillen, 1991
pMKL40	$\text{amp}^R_{E.C.}, \text{tet}^R_{B.S.}, P_{xyl}, xylR, \text{secA}_{B.S.}$	Klose <i>et al.</i> , 1993
pWSaA1	$\text{amp}^R_{E.C.}, \text{tet}^R_{B.S.}, P_{xyl}, xylR, \text{secA1}_{S.a.}$	Caspers, 2002
pWSaA2	$\text{amp}^R_{E.C.}, \text{tet}^R_{B.S.}, P_{xyl}, xylR, \text{secA2}_{S.a.}$	Caspers, 2002
pWSrrSPProLip	$\text{amp}^R_{E.C.}, \text{tet}^R_{B.S.}, P_{xyl}, xylR, \text{srrSPProLip}$	diese Arbeit
pX	$\text{amp}^R_{E.C.}, \text{cm}^R_{B.S.}, xylR$	Kim <i>et al.</i> , 1996
pXSaA1	$\text{amp}^R_{E.C.}, \text{cm}^R_{B.S.}, xylR, \text{secA1}_{S.a.}$	diese Arbeit
pXSaA2	$\text{amp}^R_{E.C.}, \text{cm}^R_{B.S.}, xylR, \text{secA2}_{S.a.}$	diese Arbeit
pXBsA	$\text{amp}^R_{E.C.}, \text{cm}^R_{B.S.}, xylR, \text{secA}_{B.S.}$	diese Arbeit

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
peKEx3 SbfTerm	CTCGTATAATGTGTGGAATTG	pEKEX2 u.3 Sequenzierprimer
pEKEX3 EcoTerm	CAGACCGCTTCTGCGTTC	pEKEX2 u.3 Sequenzierprimer
CgA1BNtermBamHI	CTGGGATCCGCGAAGTTATGATC GTTCGAC	Klonierung internes C.g. <i>secA1</i> Fragment zur Herstellung der Disruptionsmutante
CgA1Bcterm EcoRI	CTGGAATTCTGCCTCGTTTGGTC AACAGC	Klonierung internes C.g. <i>secA1</i> Fragment zur Herstellung der Disruptionsmutante
N- term LacIQKpnI	CGCGGTACCTCACTGCCCGCTTT CCAGTC	Konstruktion der C.g. <i>secA2</i> Promotor-Austauschmutante
Cterm PTaq	GATCCTCTAGAGTCGACCTG	Konstruktion der C.g. <i>secA2</i> Promotor-Austauschmutante
N-termCgsecA2	GCAGGTCGACTCTAGAGGATCGC TCACCGGAGGTATAACCG	Konstruktion der C.g. <i>secA2</i> Promotor-Austauschmutante

CtermCgsecA2BamHI	GACGGATCCGAAAAATTCGACC AATGGCCG	Konstruktion der C.g. <i>secA2</i> Promotor- Austauschmutante
SaSrr N- TermBamHI	GTCGGATCCGAATGTAAAGATAA TACAAGGAG	Amplifikation S.a. <i>srr</i>
SaSrrCterm XbaI	CAGTCTAGACCAGCTATAAATTC AATTTATGC	Amplifikation S.a. <i>srr</i>
SaSrrCterm PstI	GTCCTGCAGCCAGCTATAAATTC AATTTATGC	Amplifikation S.a. <i>srr</i>
CgA2B N-term BamHI	CTGGGATCCCGTCTTCCTCACCG ACAA	Klonierung internes C.g. <i>secA2</i> Fragment zur Her- stellung der Disruptions- mutante
CgA2B C-term EcoRI	CTGGAATTCCGCTTCAGCGGATG AT	Klonierung internes C.g. <i>secA2</i> Fragment zur Her- stellung der Disruptions- mutante
CgVerInt Nterm	CAACTGTGGAGCGGAGTAG	Verifikation pK19CgsecA2 Integration
CgVerInt Cterm	CACCTTCATTGATGCGGAAC	Verifikation pK19CgsecA2 Integration
CgA2Sq400	CGTCAATGATTATTTGGCG	Sequenzierung C.g. <i>secA2</i>
CgA2Sq900	CAAATTAGAGCAGCAGCTG	Sequenzierung C.g. <i>secA2</i>
CgA2Sq1400	CTCAACATCGAAGTAAGCG	Sequenzierung C.g. <i>secA2</i>
CgA2Sq1900	GTGATCATTGACGAGCG	Sequenzierung C.g. <i>secA2</i>
CgA2Sq2200	CAGCAACGTGGACCTAC	Sequenzierung C.g. <i>secA2</i>
CgA1Sq400	GAAAAGGCGTCCACGTTG	Sequenzierung C.g. <i>secA1</i>
CgA1Sq900	CAACCTCTACGCACCTG	Sequenzierung C.g. <i>secA1</i>
CgA1Sq1400	CAAACGAGGCATCAAGC	Sequenzierung C.g. <i>secA1</i>
CgA1Sq1900	GTCACCAACTCCATCAAG	Sequenzierung C.g. <i>secA1</i>
CgA1Sq2300	GATCCGCAACATCGAAC	Sequenzierung C.g. <i>secA1</i>
CgsecA2 NtermBamHI	GTCGGATCCGCTCACCGGAGGTA TAACC	Klonierung C.g. <i>secA2</i>
CgA2CtermTAGBamHI	GTCGGATCCTTAGTGATGGTGAT GGTGATGTCTAAAGATATTTCT ATGCCACTGATC	Klonierung C.g. <i>secA2</i> mit 6xHis Tag
CgsecA2 Cterm SacI	GTCGAGCTCCTGGAATTCATAG TTCTCAGG	Klonierung C.g. <i>secA2</i> in pEKEX3
CgA1VerIntN-term	GCAAAGTGAAGGCACGTCGC	Verifikation der C.g. <i>secA1</i> -Mutante
CgA1VerIntC-term	CTAGTACTCCAGCGTAGTCAAC	Verifikation der C.g. <i>secA1</i> -Mutante
C.g. <i>secA1</i> NtermPstI	GTCCTGCAGCGTATCGCTATTTA TAAGGACG	Klonierung C.g. <i>secA1</i>
CgA1CtermXbaTAG	CGCTCTAGATTAGTGATGGTGAT GGTGATGGTCAGCGACTTCCGCG TCTTG	Klonierung C.g. <i>secA1</i> mit 6xHis Tag
CgA1FragANtermEcoRI	CGCGAATTCGAGTCCCAAGAGGC ACGCGGTG	Klonierung der C.g. <i>secA1</i> flankierenden Bereiche für Deletionsmutante

CgA1FragACterm	CCCATCCACTAAACTTAAACACT TGGACAATCCAAACACGAGCAG TCGTC	Klonierung der C.g. <i>secA1</i> flankierenden Bereiche für Deletionsmutante
CgA1FragBNterm	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCA GTTTCATCAAGCAAGACGCGGAA GTCC	Klonierung der C.g. <i>secA1</i> flankierenden Bereiche für Deletionsmutante
CgA1FragBCtermPstI	CGCCTGCAGCTCTCAAGGAGATT TGTTGTGCTTGTTCCAATTCC	Klonierung der C.g. <i>secA1</i> flankierenden Bereiche für Deletionsmutante
CGFragANtermHind	GACAAGCTTGCTCAGTCCTGGGA AATCGAAACGCAG	Klonierung der C.g. <i>secA2</i> flankierenden Bereiche für Deletionsmutante
CGFragAC-term	CCCATCCACTAAACTTAAACACC AATCAAAACCGGCCACGGTTATA C	Klonierung der C.g. <i>secA2</i> flankierenden Bereiche für Deletionsmutante
CGFragCN-term	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGTC AGTGATCAGTGGCATAGGAAAT ATCTTTAGATAACCTG	Klonierung der C.g. <i>secA2</i> flankierenden Bereiche für Deletionsmutante
CGFragCC-termBam	CTGGGATCCGACATCATCAAGGA AGATGTCACCTTCTGGGTG	Klonierung der C.g. <i>secA2</i> flankierenden Bereiche für Deletionsmutante
ScSrrAForBamHI	GCGGGATCCGAGATTGGGGAAT GTGATGAATGTC	Klonierung des verkürzten S.c. <i>srr</i> Srr2 ohne Stop
ScSrrArev	ATAGCTTGATCCGCTTTCTGAAC TATC	Klonierung des verkürzten S.c. <i>srr</i> Srr2 ohne Stop
ScSrrBfor	GATAGTTCAGAAAGCGGATCAA GCTATAC	Klonierung des verkürzten S.c. <i>srr</i> Srr2 ohne Stop
ScSrrBrevSpHI	TCGGCATGCTCATTATACTGAAT TGCTCTTAGAAGTACTCGC	Klonierung des verkürzten S.c. <i>srr</i> Srr2 ohne Stop
ScSrrBrevSpHisTAG	TCGGCATGCTCATTAGTGATGGT GATGGTGATGTACTGAATTGCTC TTAGAAGTACTCGC	Klonierung des verkürzten S.c. <i>srr</i> Srr2 ohne Stop und mit 6xHisTag
ScSrrBrevSpHPCR2	TCGGCATGCTCATTAGTGATGGT G	Klonierung des verkürzten S.c. <i>srr</i> Srr2 ohne Stop und mit 6xHisTag
SaSrrfor (BamHI)	GCGGGATCCGTAAAGATAATAC AAGGAGTTATTACATG	Klonierung des verkürzten S.a. <i>srr</i> Srr2
SaSrrRevSpHI	TCGGCATGCTCATTAGCTATTTG AAATACTGATAGAGTCC	Klonierung des verkürzten S.a. <i>srr</i> Srr2
SaSrrRevSpHITAG	TCGGCATGCTCATTAGTGATGGT GATGGTGATGGCTATTTGAAATA CTGATAGAGTCC	Klonierung des verkürzten S.a. <i>srr</i> Srr2 mit 6xHisTag
SaA1N-term BamHI	CGCGGATCCATGGGATTTTTATC AAAAATTCTTGATGGC	Chromosmale Integration des S.a. <i>secA1</i> in das <i>B. subtilis</i> Genom über pX
SaA1C-term BamHI	CGCGGATCCTTATTTTCCATGGC AAT TTTTGAATTTTTTACCAC	Chromosmale Integration des S.a. <i>secA1</i> in das <i>B. subtilis</i> Genom über pX
SaA2N-term SmaI	TCC CCC GGG ATG AAA CAT AAA CTA GAT GTT ACG	Chromosmale Integration des S.a. <i>secA2</i> in das <i>B. subtilis</i> Genom über pX

SaA2C-term SmaI	TCCCCCGGGTTATGGAAAATGTA TAA CTGGCATACT	Chromosmale Integration des <i>S.a.secA2</i> in das <i>B. subtilis</i> Genom über pX
Srr SP RBS-term BamHI	CGCGGATCCGAAGGGACTGGTTT AATGAGTAAAAGACAGAAAGCA TTTCATGACAGCTTAGC	Konstruktion <i>srrSPPProLip</i> über “cross-over” PCR
Srr SP Reif term	CGCAAAAGCTTGCTGGTCATGCA A	Konstruktion <i>srrSPPProLip</i> über “cross-over” PCR
Pro Lip Sp term	TTGCATGACCAGCAAGCTTTTGC GAATGATTTCGACAACACAAACA ACGACACCAC	Konstruktion <i>srrSPPProLip</i> über “cross-over” PCR
Lipase C-term SphI	ACATGCATGCTCTGAATTTTGAA GGT	Konstruktion <i>srrSPPProLip</i> über “cross-over” PCR
Srr C-termNeu100	TGTGCTTTGTGAAGTGTTATTTG ATGCAG	Konstruktion <i>srr100ProLip</i> über “cross- over” PCR
ProLipSpterm100	CTGCATCAAATAACACTTCACAA AGCACAAATGATTTCGACAACAC AAACAACGACACCAC	Konstruktion <i>srr100ProLip</i> über “cross- over” PCR
Srr C-term2000	TCCTGATGTTGATACGGAATCAC TCATGC	Konstruktion <i>srr2000ProLip</i> über “cross-over” PCR
ProLipSPterm2000	GCATGAGTGATTCCGTATCAACA TCAGGAAATGATTTCGACAACACA AACAACGACACCAC	Konstruktion <i>srr2000ProLip</i> über “cross-over” PCR
Srr SP RBS-term PstI	GCCTGCAGGAAGGGACTGGTTTA ATGAGTAAAAGACAGAAAGCAT TTCATGACAGCTTAGC	Klonierung des <i>srrSPPProLip</i> in pCU3Ery
Lipase C- term PstI	GTCCTGCAGTCTGAATTTTGAAG GT	Klonierung des <i>srrSPPProLip</i> in pCU3Ery
ScA2ANtermKpnI	CGGGGTACCATGGCTAATATGAT GCAGCAAAGCG	Konstruktion einer <i>S. carnosus secA2</i> Integrationsmutante
ScA2ACterm	CTCCAGGCTGGTATTCATAATCA GG	Konstruktion einer <i>S. carnosus secA2</i> Integrationsmutante
ScA2CNterm	CCTGATTATGAATACCAGCCTGG AGCAAAGAACGTAATAATGTACT GGCCCTTAATG	Konstruktion einer <i>S. carnosus secA2</i> Integrationsmutante
ScA2CCtermBamHI	GCGGGA TCC GC CGA ATG TCA CCA TAC TCA AGC	Konstruktion einer <i>S. carnosus secA2</i> Integrationsmutante
POSecA1 N BamHI	GTCGGATCCTATGTGATATTTGA AAGGGCTCT	Klonierung des <i>S. carnosus secA1</i> - Promotors vor <i>lacZ</i>
POSecA1 Cterm	GTGAATCCGTAATCATGGTCATT CTGTTTCGCTCCT TTGGTATAA	Klonierung des <i>S. carnosus secA1</i> - Promotors vor <i>lacZ</i>

POSrr NBam	GTCGGATCCGTGAATTTAAGTAC AGATTGAAAC	Klonierung des <i>S. carnosus secA2/secY2</i> - Promotors vor <i>lacZ</i>
POSrr Cterm	GTGAATCCGTAATCATGGTCATT CATCACATTCCCCAATCTCTA	Klonierung des <i>S. carnosus secA2/secY2</i> - Promotors vor <i>lacZ</i>
POlacZ Nterm	ATGACCATGATTACGGATTAC	Amplifikation des promotorlosen <i>lacZ</i> -Gens
POlacZ Cterm XbaI	CAGTCTAGAGCGAAATACGGGC AGACATG	Amplifikation des promotorlosen <i>lacZ</i> -Gens

II.2 Chemikalien und Enzyme

Analysenreine Chemikalien	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe Merck AG, Darmstadt Serva GmbH & Co.KG, Heidelberg Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Biochemikalien, Enzyme incl. Puffer	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach
³⁵ S-L-Methionin	NEN DuPont (Deutschland), Bad Homburg
Fertigmedien, Medienkomponenten	Difco Laboratories, Detroit, USA
Nitrozellulosemembranen	Schleicher & Schüll, Dassel
PVDF Membranen	Immobilon P; Millipore; Fa. Carl Roth Karlsruhe

II.3 Medien und Lösungen

LB (Luria Broth) Medium (Miller, 1972):	pro l: 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl pH 7,0
--	--

Medien zur Transformation von *B. subtilis* (Hardy, 1985)

4 × SP-Medium: pro l: 56 g K_2HPO_4
 24 g KH_2PO_4
 8 g $(NH_4)_2SO_4$
 4 g $Na_3Citrat \times 7H_2O$
 0,8 g $MgSO_4 \times 7H_2O$
 0,8 g Casaminoacids
 pH 7,2

SPI-Medium: pro l: 250 ml 4 × SP-Medium
 0,5 mM $CaCl_2$
 2,5 mM $MgCl_2$
 50 µg/ml Tryptophan
 50 µg/ml Histidin
 0,5 % Glukose
 ad 1l Aqua bidest

Das fertige SPI-Medium wurde sterilfiltriert

Medium zur radioaktiven Markierung von *B. subtilis* (van Dijl *et al.*, 1991)

S7 Minimalmedium: 20 mM K-Phosphat-Puffer pH 7,0
 20 mM Na-Glutamat pH 7,0
 10 mM $(NH_4)_2SO_4$
 2 mM $MgCl_2$
 0,7 mM $CaCl_2$
 50 µM $MnCl_2$
 5 µM $FeCl_3$
 1 µM $ZnCl_3$
 2 µM Thiamin
 0,4 µg/ml Riboflavin
 28 µg/ml Uridin
 1 % Ribose
 50 µg/ml aller Aminosäuren außer Methionin

Lösungen zur Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli* (variiert nach Hanahan, 1983)

RF1: pro l: 12 g RbCl
9,9 g MnCl₂
1,5 g CaCl₂ × 2H₂O
2,9 g Kaliumacetat
121 ml Glyzerin (87%)
pH 5,8
sterilfiltriert

RF2: pro l: 2,1 g MOPS
1,2 g RbCl
11 g CaCl₂ × 2 H₂O
121 ml Glyzerin (87%)
pH 6,8
sterilfiltriert

BHIS Medium zur Anzucht und Regeneration von *C. glutamicum*

pro l 37 g Brain Heart Infusion (BHI)
91 g Sorbitol

CgXII Minimal-Medium (Keilhauer *et al.*, 1993) für die Anzucht von *C. glutamicum* in Minimal-Flüssigmedien

pro l: 20 g (NH ₄) ₂ SO ₄	Spurensalze: 1 g FeSO ₄ × 7H ₂ O
5 g Harnstoff	(pro 100ml) 1 g MnSO ₄ × H ₂ O
1 g KH ₂ PO ₄	0,1 g ZnSO ₄ × 7H ₂ O
1 g K ₂ HPO ₄	20 mg CuSO ₄
0,25 g MgSO ₄ × 7H ₂ O	2 mg NiCl ₂ × 6H ₂ O
42 g MOPS	zum Lösen mit HCl (konz.) ansäuern
1 ml CaCl ₂ (1 g/100 ml)	
1 ml Biotin (20 mg/100 ml)	

Auf etwa 800 ml mit Aqua bidest auffüllen und mit NaOH auf pH 7.0 einstellen. Anschließend mit Aqua bidest auf 920 ml auffüllen und 15 min autoklavieren. Zuletzt 80 ml 50%ige Glucose, 1 ml Protokatechusäure (30 mg/ml) und 1ml Spurensalze steril zuführen.

Medien für die Protoplastentransformation von *S. carnosus* (Götz und Schumacher, 1987)

PH-Medium:

pro l : 10 g Bacto-Pepton
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 1 g Glucose
 1 g K₂HPO₄

4x PAB:

7%(w/v) Difco Antibiotic
Medium No.4

2xSMM:

 1 M Saccharose
 40 mM Maleinsäure
 40 mM MgCl₂
pH 6.5 mit NaOH einstellen

40% PEG/SMM Lsg.:

40 g PEG 6000 in 50 ml 2xSMM
ad 100 ml Aqua bidest

CY-Medium:

 25 g Hefeextrakt
 25 g Casaminoacids
 14,75 g NaCl
 8 g Agar

SMMP-Lsg. (50 ml):

 25 ml 2x SMM
 9,5 ml 4x PAB
 2,5 ml 5% BSA (sterilfiltriert)

CY-Softagar:

 25 ml CY-Medium (frisch aufgekocht und auf 50°C abgekühlt)
 25 ml 1 M Na-Succinat (50°C)
 2 ml 1,5 M Na-Glycerophosphat
 1 ml 1 M MgCl
 0,5 ml Glucose (50%)
 0,5 ml BSA (5%)

DM3-Medium:

Die folgenden Lösungen wurden einzeln angesetzt und autoklaviert: 500 ml 1 M Na-Succinat pH7.3 (mit Bernsteinsäure eingestellt), 200 ml 5% Agar, je 150 ml 3,3% Casamino Acids und Hefeextrakt und je 100 ml 3,5% K₂HPO₄ und 1,5% KH₂PO₄. Nach dem Autoklavieren

wurden die Lösungen steril zusammengeführt und mit 20 ml MgCl₂, 10 ml 50% (w/v) Glucose und 10 ml 5% (w/v) BSA versetzt.

Antibiotikakonzentrationen :

Zur Selektion auf Antibiotika-Resistenz wurden den Medien Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Antibiotikum	Stamm	Wirkkonzentration (µg/ml)	Lösungsmittel
Ampicillin	<i>E. coli</i>	100	ddH ₂ O
Chloramphenicol	<i>B. subtilis</i>	10	Ethanol (100%)
Kanamycin	<i>E. coli</i>	10	ddH ₂ O
	<i>B. subtilis</i>	50	ddH ₂ O
	<i>C. glutamicum</i>	25	ddH ₂ O
Tetracyclin	<i>E. coli</i>	7,5	Ethanol (70%)
	<i>B. subtilis</i>	15	Ethanol (70%)
	<i>C. glutamicum</i>	3	Ethanol (70%)

Zur Herstellung fester Nährböden wurden den Medien 15 g/l Agar zugesetzt.

II.4 Mikrobiologische Methoden

II.4.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung sämtlicher Bakterienstämme erfolgte, soweit nicht anders aufgeführt, in LB-Vollmedium bzw. in BHIS Vollmedium für *C. glutamicum*. Die Inkubation in Flüssigmedium erfolgte bei einem Volumen von 5 ml in Reagenzgläsern bei 170 rpm. Die Kultivierung in Flüssigmedium ab einem Volumen von 10 ml erfolgte in Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler bei 120 rpm. *B. subtilis*, *S. carnosus* und *E. coli* werden standardmäßig bei 37°C, *C. glutamicum* bei 30°C inkubiert.

II.4.2 Stammhaltung

Die Stammhaltung sämtlicher Bakterienstämme erfolgte in Form von Glycerinkulturen. ÜNK wurden zu 50% mit Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –20°C

bzw. -70°C aufbewahrt. Die kurzfristige Aufbewahrung erfolgte auf LB-Agarplatten, entsprechend der Resistenz des Bakterienstammes mit Antibiotika supplementiert, bei 4°C .

II.4.3 Wachstumskurven

Die Aufnahme von Wachstumskurven erfolgte in 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit einem Kulturvolumen von 50 ml. Das Flüssigmedium wurde mit Übernachtskulturen, sofern nicht anders erwähnt, auf eine OD_{600} von 0,05 angeimpft und je nach Stamm bei 30°C oder 37°C und 120 rpm inkubiert.

II.4.4 Transformation von Bakterien

II.4.4.1 Transformation von *E. coli* Stämmen (Hanahan, 1983)

Der jeweilige Stamm wurde in 100 ml LB-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,6 angezogen und 15 min mit 5.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 17 ml eiskaltem RF1-Puffer gewaschen und nach einem zweiten Zentrifugationsschritt in 4 ml RF2-Puffer resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden in 100 μl Aliquots in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Transformation wurden kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, zu ca. 100 ng Plasmid-DNA pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Ein anschließender Hitzeschock erfolgte für 90 sek bei 42°C . Nach Zugabe von 1 ml LB zu den Zellen wurden diese zur Ausprägung der plasmidkodierten Antibiotika-Resistenz 1 h bei 37°C geschüttelt. Nach 10 min Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C wurde das Zellpellet in 100 μl LB-Medium resuspendiert und 1/10 bzw. 9/10 des Transformationsansatzes auf Selektionsagarplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C .

II.4.4.2 Transformation von *B. subtilis* Stämmen (variiert nach Sadaie und Kada, 1983)

Sämtliche verwendeten Gefäße wurden vor Gebrauch mit Aqua bidest autoklaviert. In einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurden 5 ml SPI-Medium, je nach bereits kodierter Antibiotika-Resistenz des Stammes mit entsprechenden Antibiotika versetzt, aus einer *B. subtilis* ÜNK zu einer OD_{600} von 0,05 beimpft und bei 37°C bei 130 rpm inkubiert. Bei Transformation der temperatursensitiven Mutante NIG1152 Mutante wurden die Zellen anstelle von 37°C bei 30°C inkubiert, sowohl bei diesem wie auch allen weiteren Schritten. Bei Erreichen der spätexponentiellen bis stationären Wachstumsphase wurden 1 ml der

Zellsuspension in einen 100 ml Erlenmeyerkolben ohne Schikanen übertragen, mit 5 μ l EGTA (0,1 M) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen je nach Stamm mit 1 μ g bis 10 μ g Plasmid-DNA versetzt und für eine Stunde bei 37°C mit 110 rpm geschüttelt. Zur Ausprägung der plasmidkodierten Antibiotika-Resistenz wurden 3 ml LB-Medium zum Transformationsansatz zugegeben und weitere 1,5 Stunden bei 37°C mit 130 rpm inkubiert. Die Zellen wurden dann 10 min mit 4.800 rpm bei 4°C abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810 R), in 100 μ l LB-Medium resuspendiert und auf Selektionsagarplatten ausplattiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C über Nacht. Inkubation von NIG1152 Stämmen erfolgte über Nacht bei 30°C.

II.4.4.3 Transformation von *C. glutamicum* Stämmen

Zur Transformation von *C. glutamicum* wurde die Methode der Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock angewandt (Tauch *et al.*, 2002). Dazu wurden 50 ml BHIS Medium mit einer Einzelkolonie von *C. glutamicum* angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml dieser Vorkultur in 250 ml BHIS-Medium überimpft (1 l Kolben mit Schikanen) und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen in zwei JA-10 Zentrifugenbecher überführt und durch Zentrifugation geerntet (20 min, 6000 rpm, 4°C). Die Zellen wurden nachfolgend dreimal mit 20 ml eiskaltem TG-Puffer (1 mM Tris pH 7,5, 10% Glycerin) und weitere zweimal mit 50 ml eiskaltem 10 %igem (v/v) Glycerin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem 10 %igem (v/v) Glycerin resuspendiert, in Aliquots von 100 μ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -70°C gelagert. Zur Elektroporation wurden 50 μ l Zellen mit der zu transformierenden DNA gemischt und luftblasenfrei in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (Typ 16 S 2086, Biorad, München) überführt. Der Ansatz wurde mit 0,8 ml 10 %igem (v/v) Glycerin überschichtet. Die Elektroporation wurde dann bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Parallelwiderstand von 200 W und einer Kondensatorkapazität von 25 μ F in einem BIORAD GENE PULSERTM (Biorad, München) durchgeführt. Sofort nach Beendigung des elektrischen Pulses wurde die Zellsuspension in 4 ml BHIS-Medium aufgenommen, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 6 min bei 46°C inkubiert. Dieser Hitzeschock inaktiviert vermutlich das Restriktionssystem von *C. glutamicum*, so dass bei Verwendung heterologer DNA eine höhere Transformationseffizienz erreicht werden kann (Schäfer *et al.*, 1994). Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen für 90 min bei 30°C unter Schütteln regeneriert, bevor die Zellsuspension auf BHIS-Selektionsagarplatten ausplattiert wurde.

II.4.4.4 Transformation von *S. carnosus* Protoplasten (Götz und Schumacher, 1987)

Die Transformation von Plasmid-DNA in *S. carnosus* erfolgte über Protoplasten. Hierzu wurde der jeweilige Stamm in 500 ml PH-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (6700 rpm, 15 min, 4°C) geerntet. Das Pellet wurde anschließend in 30 ml SMMP-Lösung resuspendiert, in einen sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit 30 µl Lysostaphin-Lösung (1 mg/ml) versetzt und 16-18 h bei 30°C stehend inkubiert. Die so hergestellten Protoplasten wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet (25 min, 7600 rpm, RT) und in 5 ml SMMP gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Protoplasten in 2,1 ml SMMP aufgenommen, in 300 µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -75°C gelagert. Für die Transformation wurden die Protoplasten auf Eis aufgetaut und je Aliquot mit 1-2 µg DNA versetzt. Nach Zugabe von 2 ml 40 %iger PEG/SMM-Lösung (40 g PEG 600 in 100 ml 2x SMM) und einer Inkubation von 2 min bei RT wurden 7 ml SMMP-Lösung zugesetzt, die Protoplastensuspension sanft vermischt und anschließend 15 min bei 7600 rpm, RT zentrifugiert. Die geernteten Protoplasten wurden in 250 µl SMMP resuspendiert, auf DM3-Platten ausplattiert und für 4-5 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die DM3-Platten mit 3 ml CY-Softagar (50°C), der das gewünschte Antibiotikum in 10-facher Konzentration enthielt, überschichtet und für 2-4 Tage bei 37°C inkubiert.

II.4.5 Durchführung von „plasmid-curing“-Experimenten

Um die Essentialität von *C. glutamicum* Genen zu verifizieren wurden „plasmid-curing“-Experimente durchgeführt. Hierzu war es zuerst erforderlich eine chromosomale Deletion des zu untersuchenden Gens durchzuführen, wenn das Gen *in trans* vom pVWEX2-Vektor exprimiert wird. Anschließend wurden ein solcher Deletionsstamm und der Wildtyp, die beide den entsprechenden pVWEX2-Expressionsvektor des zu untersuchenden Gens tragen, auf ihre Fähigkeit hin untersucht dieses Plasmid zu verlieren. Dazu erfolgte eine Anzucht von je drei unabhängigen Klonen beider Stämme in je 10 ml BHIS-Medium mit 100 µM IPTG, aber ohne das für die Selektion auf den Vektor verwendete Tetracyclin, in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 30°C und 120 rpm. Nach 10 (Übertag) bzw. 14 (Übernacht) Stunden Wachstum wurden je 150 µL der Stämme in 10 ml frisches BHIS-Medium mit 100 mM IPTG aber ohne Tetracyclin überimpft und weiter wie oben beschrieben inkubiert. Die OD₆₀₀ nach jedem Animpfen der Kolben und vor dem Überimpfen in den nächsten Kolben wurde jeweils ermittelt. Aus der Anzahl der von der Anfangs-OD₆₀₀ zur End-OD₆₀₀ nötigen Verdopplungen der Zellzahl wurden die verstrichenen Generationen errechnet. Der jeweilige Versuch wurde durchgeführt, bis mindestens 235 Generationen Wachstum für alle untersuchten Stämme erreicht waren. Nach 75, 115, 175 und 235 Generationen wurden Zellen der jeweils drei

unabhängigen Kulturen des Deletionsstamms und des Wildtyps auf BHIS-Agarplatten mit 100 μ M IPTG ausplattiert. Anschließend wurden von den ausplattierten Zellen der jeweils drei Kulturen des Deletionsstamms und des Wildtyps je 100 Klone auf BHIS-Agarplatten (insgesamt also je 300 Klone des Wildtyps und des Deletionsstamms) mit entweder nur 100 μ M IPTG oder 100 μ M IPTG und Tetracyclin gepickt. Das prozentuale Verhältnis der Klone, die noch Tetracyclin-resistent sind, in Bezug auf die Anzahl der Klone die auf Medium nur mit IPTG wachsen, wurde für die jeweiligen Stämme berechnet. Tetracyclin-Resistenz wurde mit der Anwesenheit des Vektors und Tetracyclin-Sensitivität mit einem Verlust des Vektors gleichgesetzt. Um zu verifizieren dass diese Annahme korrekt war, und um zu überprüfen, ob es sich bei dem jeweiligen Stamm noch um den Wildtyp oder den Deletionsstamm handelte, wurden zu jedem der 4 Zeitpunkte Zellen der beiden Stämme auf die Anwesenheit des Plasmids über Mini-Präparation und in Bezug auf den Genloкус des zu untersuchenden Gens über PCR kontrolliert. Da für die zu untersuchenden Deletionsstämme niemals Tetracyclin-sensitive Klone gefunden wurden, konnten hier nur die Tetracyclin-resistenten Klone untersucht werden. Zu den Zeitpunkten 75, 115 und 175 Generationen wurden 5 Tetracyclin-resistente und 10 Tetracyclin-sensitive Klone des Wildtyps und vom Deletionsstamm 5 Tetracyclin-resistente Klone auf diese Weise untersucht. Zum letzten Zeitpunkt wurden vom Wildtyp jeweils 20 Tetracyclin-resistente und Tetracyclin-sensitive Klone und vom Deletionsstamm 20 Tetracyclin-resistente Klone untersucht.

II.5 Gentechnische Methoden

II.5.1 Allgemeine gentechnische Methoden

II.5.1.1 Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989)

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe im elektrischen Feld wurden 0,8%ige Agarosegele angefertigt. Hierzu wurde Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf 50°C-60°C auf Gelträger gegossen. DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10x Probenpuffer versetzt und die Elektrophorese in TAE-Puffer bei 100 V durchgeführt. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die DNA-Banden 5 min in einer 1% Ethidiumbromidlösung gefärbt, und 5- 10 min in Wasser entfärbt.

10 $\times$ TAE-Puffer: pro l: 48,4 g Tris
 11,42 ml Essigsäure (96%)
 7,44 g EDTA/Na₂

10 × Probenpuffer: 0,05 % Bromphenolblau
 0,05 % Xylencyanol
 50 % Glycerin

II.5.1.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Der Verdau der DNA erfolgte in den von den Enzymherstellern (Firmen MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot und Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) mitgelieferten Puffern und nach Vorschrift des Herstellers.

II.5.1.3 Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Um die Religierung linearisierter Vektoren zu vermeiden, wurden vor dem Ansetzen der Ligation 5'-Phosphatreste des Vektors mit alkalischer Phosphatase entfernt. Die alkalische Phosphatase (shrimp alkaline phosphatase) wurde dabei nach Angaben des Herstellers verwendet.

II.5.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Im Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 eingestellt. Die Ligation erfolgte mit 1/10 Volumen 10× Ligationspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,6, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 6 mM ATP) und 1,0 Einheiten T4 DNA-Ligase bei 16°C über Nacht.

II.5.1.5 Umwandeln von überhängenden 5'-Enden in glatte Enden

Zum Auffüllen von überhängenden 5'-Enden wurde die ‚Klenow‘ - DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) benutzt. Bis zu 300 ng DNA wurden mit 1/10 Volumen Nick Translationspuffer, 1/10 Volumen dNTP- Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 2 mM) und 1µl ‚Klenow‘ - Enzym (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Hitze inaktiviert (10 min bei 70°C) und die DNA mit Hilfe des ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘ nach der Vorschrift ‚QIAquick PCR Purification Kit Protocol‘ gereinigt.

Nick Translationspuffer: 500 mM Tris/HCl, pH7,5
1 mM DTT
0,1 M MgSO₄
500 µl/ml BSA

II.5.1.6 Entsalzung von DNA- Lösungen

Zur Entsalzung von DNA, z. B. nach Restriktionsverdau oder PCR, wurde das ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘ nach der Vorschrift ‚QIAquick PCR Purification Kit Protocol‘ verwendet (Qiagen, Hilden).

II.5.1.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte bei DNA-Fragmenten mit einer Größe von 400bp bis 5kb über das ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘ nach Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden).

II.5.2 Präparation von DNA

II.5.2.1 Präparation chromosomaler DNA

Die Präparation chromosomaler DNA aus *B. subtilis*, *C. glutamicum* oder *S. carnosus* erfolgte mit Hilfe des ‚DNeasy Tissue Kit‘ (Qiagen) und wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt (DNeasy[®] Tissue Handbook; Seite 28/29 und 17-19). Im Falle von *S. carnosus* wurden anstelle von Lysozym Lysostaphin für den Zellaufschluss (15 µl einer 1 mg/ml Stocklösung pro Ansatz) verwendet.

II.5.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) verfahren. Hierzu wurde entweder das ‚QIAprep Spin Miniprep‘ oder das ‚Midi Plasmid Purification Kit‘ (Qiagen, Hilden) verwendet. Es wurden 2 ml ÜNK bei 13.000 rpm für 10 min (Eppendorf, RT) abzentrifugiert und anschließend wurde nach Protokoll des Herstellers verfahren. Die Präparation von Plasmid-DNA über das ‚Midi Plasmid Purification Kit‘ erfolgte nur, wenn große Mengen an DNA benötigt wurden oder wenn das Plasmid in einer sehr niedrigen Kopienzahl vorliegt (‚very low copy‘-Vector).

Die Isolierung von Plasmid DNA aus Gram-positiven Bakterien erfolgte analog zu der aus *E. coli*, doch wurden die Zellen hierzu nach dem Abzentrifugieren der ÜNK für 30 min in 250 µl des von Quiagen hergestellten P1-Resuspendierungspuffer mit 5 mg/ml (*B. subtilis*) bzw. 20 mg/ml (*C. glutamicum*) Lysozym bzw. 15 µl einer 1 mg/ml Lysostaphin Lösung (*S. carnosus*) bei 37°C lysiert. Die Inkubationszeit bei 37°C bei *C. glutamicum* betrug anstelle von 30 min 1,5-2 h. Anschließend wurde ebenfalls nach Protokoll des Herstellers verfahren.

II.5.2.3 Plasmidisolierung im präparativen Maßstab

Zur Isolierung von Plasmiden im präparativen Maßstab aus 150-500 ml Kulturen wurde das Nucleobond-Kit (Macherey und Nagel) mit Puffern und nach Angaben des Herstellers verwendet. Zellen einer Kultur bis 200 ml wurden in JA-14 Zentrifugenbechern, Zellen einer Kultur bis 500 ml in JA-10 Zentrifugenbechern 10 min bei 8.000 rpm abzentrifugiert (Beckmann, 4°C). Zur Plasmidisolierung aus *B. subtilis* wurden die Zellen nach Resuspendierung in S1-Puffer (Macherey und Nagel) 30-60 min durch Zugabe von 80 µl Lysozym (100 mg/ml) bei 37°C unter leichtem Schwenken aufgeschlossen.

II.5.3 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988)

Die *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988). Hierzu wurden zwei komplementäre, konvergierende Oligonukleotide (Primer) verwendet, die das zu amplifizierende Fragment flankieren. Die PCR-Reaktion wurde mit Hilfe der ‚HighFidelity‘-DNA-Polymerase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) durchgeführt. Für analytische PCRs wurde eine Taq Polymerase ohne „proof reading“-Aktivität (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet. Bei Fragmenten mit einer Größe von über 8 kB wurde die „Expand Long Template“ Polymerase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), bei Fragmenten über 12 kB die Polymerase des „Expand 20 kb^{PLUS}“ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) Systems verwendet.

Die Reaktion wurde im T3 Thermocycler von Biometra® durchgeführt. Hierbei wurde der erste Programm-Zyklus 10 mal, der zweite 20 mal mit einer Verlängerung der Elongationszeit von 5s/Zyklus wiederholt. Der PCR Produkt wurde über ein Agarosegel von Nebenprodukten getrennt und aufgereinigt (siehe 5.1.8).

Die Temperatur für das ‚Primer Annealing‘ errechnet sich nach folgender Formel:

$$TM = 69,3^{\circ}\text{C} + [0,41 \times (\text{GC-}\%) - (650/\text{Primerlänge in bp})]$$

II.5.4 Durchführung der „cross-over“-PCR

Um eine präzise Fusionierung von zwei DNA-Fragmenten zu erzielen, wurde die „cross-over“-PCR-Technik eingesetzt (Abbildung 7). In den ersten PCR-Reaktionen wurden hierzu die beiden zu fusionierenden DNA-Fragmente (Fragment 1 und 2) separat voneinander amplifiziert (Abbildung 7 A). Beim Design des Primers 3 wurde hierbei darauf geachtet, dass er als 5'-Überhang über einen Bereich verfügte, der dem 3'-Ende des Fragments 1 entsprach. Somit besaßen Fragment 1 und 2 einen überlappenden Bereich. Dieser überlappende Bereich war in der angeschlossenen „cross-over“-PCR von Bedeutung (Abbildung 7 B). Hier wurden in einer PCR-Reaktion mit den Primern P1 und P4 die Fragmente 1 und 2 gleichzeitig als „template“ eingesetzt. Ein PCR-Produkt konnte in dieser PCR nur erhalten werden, wenn es zu einem „annealing“ von Fragment 1 und 2 an dem überlappenden Bereich kam. Daher wurde die „annealing“ Temperatur dieses Bereichs bei Design des Primers 3 auch so gewählt, dass sie mit der von Primer 1 und Primer 4 übereinstimmte. Nach der „cross-over“-PCR wurde eine genaue Fusion des Fragments 1 an das Fragment 2 erhalten.

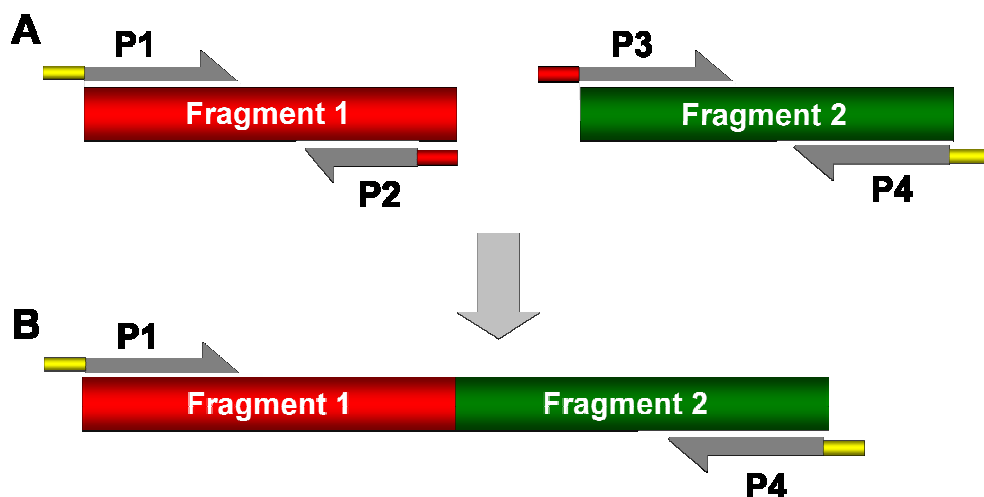


Abbildung 7: Schematische Darstellung der „cross-over“-PCR.

(A): PCR-Amplifikation der beiden zu fusionierenden Nucleotidsequenzen. Hierbei enthält Primer 3 als 5'-Überhang einen Bereich, der dem 3'-Ende von Fragment 1 entspricht (roter Anhang). Primer 1 und 4 enthalten Restriktionsschnittstellen für die spätere Klonierung (gelbe Anhänge).

(B): PCR zur Amplifikation der Genfusion. Fragment 1 und 2 werden gemeinsam als „template“ DNA in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Amplifikation erfolgt mit den Primern 1 und 4.

II.5.5 Nicht radioaktive DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode

Wie bei der klassischen radioaktiven Sequenziertechnik nach Sanger *et al.* (1977) wird auch bei dieser Methode der Abbruch der DNA-Polymerasereaktion beim Einbau von Didesoxynukleotiden genutzt. Hierzu wurden Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide als Primer (MWG Biotech) und zirkuläre Plasmid-DNA als Matrize verwendet. Die

Sequenzierung wurde mit der LI-COR- Apparatur der Firma MWG-Biotech nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Sequenzreaktion wurde das ‚Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit‘ (Amersham Pharmacia Biotech, England) verwendet. Die PCR-Reaktion wurde im T3-Thermocycler von Biometra® nach folgendem Protokoll durchgeführt:

30 x: 1. 95°C 3 min; 2. 95°C 15 sek; 3. 55°C 30 sek; 4. 70°C 40 sek, gehe zu 2

15 x: 5. 95°C 20 sek; 6. 70°C 30 sek; gehe zu 5.

Die Reaktion wurde durch Zusatz von 3 µl ‚stop solution‘ und 3-minütiges Erhitzen bei 95°C gestoppt. Die DNA-Fragmente wurden in einem 4,6%igem, 66cm langen und 0,25mm dicken ‚Long-Ranger‘ Polyacrylamidgel in 1x TBE Laufpuffer aufgetrennt. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Gel im Vorlauf für ca. 10 min auf 45°C vortemperierte. Es wurden jeweils 1,5 µl Probe auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte über Nacht bei 47 mA, 50 W, 2200 V und einer Temperatur von 45°C. Die fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente wurden mit der Software ‚Base ImageIR™‘ (Begleitsoftware zur Apparatur LI-COR) erfasst und ausgewertet.

Sequenzgel (4,6 %):	4,6	ml	Acrylamid (Long Ranger)
	21	g	Harnstoff
	5	ml	10x TBE-Puffer (Long Run)
	32	ml	Aqua dest.
	60	µl	TEMED
	350	µl	10% APS

10 x TBE-Puffer:	pro l	162	g	Tris
		27,5	g	Borsäure
		9,3	g	EDTA

Bei späteren Sequenzierungen stand der Kappilarsequencer „3100- Avant Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems) zur Verfügung, der das Sequenziervorhaben deutlich beschleunigte. Hier wurde die Sequenzier-PCR-Reaktion unter Verwendung normaler unmarkierter Oligonukleotide (OPERON Biotechnologies, Köln) mit dem „BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die vier verschiedenen Didesoxynukleotide waren hierbei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Aufreinigung der Sequenzreaktionen erfolgte mit dem „DyeEx 2.0 Spin Kit“ (Qiagen, Hilden). Abweichend von den Angaben des Herstellers wurden die „BigDye-Säulchen“ vorher zweimal mit je 20 µl HPLC-Wasser gewaschen. Die Sequenzierung mit dem „3100- Avant Genetic Analyzer“ erfolgte nach Angaben des Herstellers und wurde mit der zugehörigen „Data Collection Software 2.0“ ausgewertet.

II.5.6 DNA-DNA Hybridisierung nach Southern

Zur Hybridisierung wurde entsprechend der Vorschrift des „DNA-Labeling and Detection-Kits“ (Roche, Grenzach-Wyhlen) vorgegangen, der die Methode von Southern (1975) zugrunde liegt.

Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde

Die Digoxigenin-markierte DNA-Sonde wurde mittels PCR-Reaktion (s. II.5.3) hergestellt. Dazu wurde der zur DNA-DNA-Hybridisierung ausgewählte DNA-Bereich mit geeigneten Primern unter Zusatz von 20 μ M Digoxigenin-markierten dUTP (DIG-11-dUTP) amplifiziert. Die Digoxigenin-Markierung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft, da das markierte PCR-Fragment im Vergleich zum nicht markierten Fragment ein langsames Laufverhalten aufweist. Die Sonde wurde schließlich über ein Agarosegel aufgereinigt.

Hybridisierung von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA

Transfer der DNA auf Nylonmembranen

Die mit Restriktionsenzymen verdaute DNA (4-15 μ g DNA) wurde in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und mit einer Vakuum-Blot-Apparatur (LKB 2016 VacuGene, Pharmacia/LKB) auf Nylonmembranen übertragen. Dabei wurde das Gel abhängig von der Dicke jeweils für 20 bis 60 min nacheinander mit Depurinierungslösung (0,25 M HCl), Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und Neutralisierungslösung (1 M NH_4Ac) überschichtet. Die DNA wurde anschließend zur Fixierung auf der Membran mit einem Gerät der Firma Stratagene mit UV-Licht (Stratalinker: 1200 mJ) bestrahlt.

Hybridisierung der Ziel-DNA mit der Sonde

Für die im Folgenden beschriebenen Prähybridisierungs-, Hybridisierungs- und Waschschrte wurden die Membranen mit der jeweiligen Lösung in einem Glasröhrchen inkubiert. Das Glasröhrchen wurde dazu in einem Hybridisierungssofen gerollt. Das Abdecken unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Prähybridisierung der Membranen für 4 h bei 68°C in Prähybridisierungslösung (5x SSC, 0,1% N-Laurylsarkosinat, 0,02% SDS, 0,5% Blocking Reagenz [Roche]). Zur Hybridisierung wurde die Membran in Hybridisierungslösung (wie Prähybridisierungslösung mit 5 -10 ng DNA-Sonde pro ml) über Nacht bei 42°C inkubiert. Die Sonde wurde vor der Zugabe in die Hybridisierungslösung für 10 min bei 95°C denaturiert und in Eiswasser abgekühlt.

Nachweis der Sonde

Um ungebundene Sonden zu entfernen, wurden die Membranen zweimal für 10 min bei RT in 2x SSC, 0,1% SDS und zweimal für 25 min bei 68°C mit 0,1x SSC, 0,1% SDS gewaschen. Zur Vermeidung der unspezifischen Bindung des Antikörperkonjugates (s. u.) wurden die Membranen kurz in Puffer 1 (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7.5) äquilibriert und für 60 min in Blocking-Puffer (Puffer 1 mit 1% Blocking Reagenz) im Hybridisierungssofen bei RT gerollt. Die Lösung wurde entfernt und durch Blocking-Puffer, der Anti-Digoxigenin-Antikörper gekoppelt an alkalische Phosphatase (1:10000, Roche) enthielt, ersetzt und die Membranen für weitere 30 min inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimal 30-minütiges Waschen mit Puffer 2 (Puffer 1 mit 0,3% Tween20) bei RT entfernt. Nach 2-minütiger Äquilibration in Puffer 3 (100 mM Tris/HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2) wurden die Membranen mit 10 μl CSPD® in 1,5 ml Puffer 3 überschichtet und in einen Hybridisierungsbeutel eingeschweißt. CSPD® ist ein Chemilumineszenz-Substrat für die alkalische Phosphatase. Das als Folge der CSPD®-Dephosphorylierung emittierte Licht kann mit einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte jeweils für 12 min und für 1h.

20x SSC: 175,5 g NaCl; 88,23 g $\text{Na}_3\text{-Citrat} \times 2\text{H}_2\text{O}$ pro l

II.6 Proteinchemische Methoden

II.6.1 Isolierung von Proteinen aus Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen

II.6.1.1 Induktion der Genexpression

Zellen aus 2 ml einer ÜNK wurden 10 min bei 13.000 rpm (Eppendorf, RT) abzentrifugiert und anschließend zweimal mit dem Medium, in dem die Induktion stattfinden sollte, gewaschen. Mit der gewaschenen Kultur wurden 5 ml des Induktionsmedium (entsprechend der Resistenz des Bakterienstammes mit Antibiotika supplementiert) zu einer OD_{600} von 0,2 angeimpft und 4-5 h bei experimentell erforderlichen Temperaturen inkubiert. Wenn sich die zu exprimierenden Gene unter der Kontrolle eines induzierbaren Promoters befanden, wurde die Expression durch Zugabe des entsprechenden Induktors gezielt induziert. Der Xylose Promotor von pXR100 und pWH1520 wurde mit 0,5 % Xylose, der *lacZ*-Promotor von pUC18 sowie der *tac* Promoter von pEKEX2 und pVWEX2 wurden mit 1 bzw. 0,1 mM IPTG induziert.

II.6.1.2 Herstellung von *E. coli* Gesamtzellextrakten

2 ml der wie unter 6.1.1 behandelten Kultur wurden 10 min bei 13.000 rpm (Eppendorf, 4°C) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl 30 mM Tris/HCl, pH 8.0 resuspendiert. Es wurden Glaskugeln (Ø 0,1- 0,25 mm Fa. Clauss, Nidderau) zugegeben und für 10 min bei maximaler Schüttelfrequenz in der Retschmühle aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (10 min, 13.000 rpm, 4°C) und der Überstand abgenommen. Dieser wurde 1:1 mit 2× Laemmli Puffer (5 ml Tris/HCl pH 6,5, 2 g SDS, 11,4 ml Glycerin 87%, 1,6 g DTT, 0,25% Bromphenolblau, ad 50 ml Aqua bidest) versetzt und für 10 min bei 95°C inkubiert, wodurch die Proteine denaturiert wurden.

II.6.1.3 Herstellung von *B. subtilis* und *S. carnosus* Gesamtzellextrakten

2 ml der wie unter 6.1.1 behandelten Kultur wurden 10 min bei 13.000 rpm (Eppendorf, 4°C) abzentrifugiert, das Pellet in 50 µl Lysispuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 25 mM MgCl₂, 200 mM NaCl, entweder 5 mg/ml Lysozym für *B. subtilis* oder 15 µl einer 1mg/ml Lysostaphin Lösung für *S. carnosus*) resuspendiert und der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl 2 × Laemmli Puffer (5 ml Tris/HCl pH 6,5, 2 g SDS, 11,4 ml Glycerin 87%, 1,6 g DTT, 0,25% Bromphenolblau, ad 50 ml Aqua bidest) und 10 min Inkubation bei 95°C wurden die Proteine denaturiert.

II.6.1.4 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus *C. glutamicum*

2 ml der wie unter 6.1.1 behandelten Kultur wurden 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl Lysepuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 25 mM MgCl₂; 200 mM NaCl) plus 15 mg/ml Lysozym resuspendiert. Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C bei 250 rpm inkubiert und anschließend im Branson Sonifier 250 bei 20% Amplitude und Stufe 2 mittels Ultraschall komplett aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden 30 min bei 15300 rpm abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 100 µl 2x Probenpuffer nach Lämmli versetzt und 10 min bei 95°C erhitzt. Eine alternative und deutlich schnellere Aufschlussmethode stellt der Kugelmühlenaufschluss in der Retschmühle dar. Hierzu wurden die abzentrifugierten Zellen in 100 µl 30 mM Tris/HCl, pH 8.0 resuspendiert, Glaskugeln (Ø 0,1-0,25 mm Fa. Clauss, Nidderau) zugegeben und für 20 min bei maximaler Schüttelfrequenz in der Retschmühle aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (10 min, 13.000 rpm, 4°C), der Überstand abgenommen, 1:1 mit 2x Lämmli-Probenpuffer versetzt und zur Denaturierung der Proteine 10 min bei 95°C erhitzt.

II.6.1.5 Aufarbeitung von Kulturüberständen

Die Zellen aus 2 ml der wie unter 6.1.1 behandelten Kultur wurden 20 min bei 13.000 rpm (Eppendorf, 4°C) zentrifugiert und die Proteine aus 1,8 ml des Überstandes mit 200 µl TCA (100%) über Nacht bei 4°C gefällt. Die Proteine wurden 30 min bei 13.000 rpm (Eppendorf, 4°C) abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit Aceton (80%) gewaschen. Danach wurde das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet, in 50 µl 2 × Laemmli-Puffer aufgenommen und die Proteine bei 95°C für 10 min denaturiert.

II.6.1.6 Fraktionierung von *S. carnosus* in Protoplasten und Zellwand

Für die Fraktionierung von *S. carnosus* wurden 2 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 4 für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Kulturüberstand entfernt. Das Pellet wurde in 96 µl SMM-Lösung (500 mM Sucrose, 20 mM Maleinsäure, MgCl₂ (Navarre *et al.*, 1996) resuspendiert, mit 4 µl Lysostaphin (5 mg/ml in SMM gelöst) versetzt und 45 min bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann 10 min bei 15300 rpm zentrifugiert, um das Zellwandkompartiment (Überstand) von den protoplastierten Zellen (Pellet) zu trennen. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 10% TCA bei 4°C über Nacht gefällt. Das Pellet wurde mit 500 µl SMM gewaschen und schließlich in 500 µl 50 mM Tris/HCl pH 7.5 resuspendiert und ebenfalls mit 10% TCA bei 4°C über Nacht gefällt. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 15300 rpm zentrifugiert und jeweils 1x mit 500µl 100% Aceton und 80% Aceton gewaschen. Das Präzipitat wurde bei RT getrocknet und in 85 µl 2x Probenpuffer nach Laemmli aufgenommen und 10 min bei 95°C erhitzt.

II.6.1.7 Osmotischer Schock mit *E. coli*

Zur Fraktionierung von *E. coli* Zellen in Periplasma- und Cytoplasma/Membran-Fraktion wurde eine Osmoschock-Methode angewendet, die auf einer Destabilisierung der Zellwand durch Zugabe von EDTA und Lysozymbehandlung beruht. Dadurch können die Proteine im Cytoplasma und in der Zellmembran und die Proteine im Periplasma getrennt voneinander isoliert und mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht werden.

Die Zellen wurden in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C angezogen. 700 µl der Kultur wurden in 50 ml LB-Medium im Schüttelkolben pipettiert und bei 37°C für 2 bis 3 Stunden geschüttelt. Sobald die Kultur eine OD₆₀₀ von 1,1 – 2 erreicht hatte, wurde soviel der Kultur in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, dass die Gesamt-OD₆₀₀ 55 betrug. Die Zellen

wurden abzentrifugiert (10 min, 5000 rpm) und in 2,5 ml 30 mM Tris/HCl pH 8.0 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (siehe oben) wurde der Überstand sorgfältig abpipettiert, das Pellet in 40 µl Sucroslösung resuspendiert (Vortex) und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden 20 µl Lysozymbelösung dazu gegeben, kurz ‚gevortext‘ und sofort für 4 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4°C) wurde der Überstand (Periplasmafraktion) in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Das Pellet (Spheroplasten) wurde vorsichtig mit 80 µl Sucroslösung abgespült und in 1 ml 30 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert. Nach Zugabe von Glaskugeln (Ø 0,1-0,25mm, Fa. Clauss, Nidderau) wurden die Spheroplasten 10 min bei maximaler Schüttelfrequenz in der Retschmühle aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 13000 rpm). Der Überstand (Cytoplasma-/Membranfraktion) wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von (Bradford, 1976) bestimmt. Die Cytoplasma-/Membran- sowie die Periplasmafraktion wurden in 2x Probenpuffer nach Laemmli aufgenommen.

II.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli *et al.*, 1970)

Die Proteine wurden nach ihrer Größe im denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels lag bei 12,5%. Das Trenngel wurde mit einem 5%igen Sammelgel überschichtet.

Trenngel (12,5%): pro 30 ml:	12,5 ml Acrylamid: Bisacrylamid (30:0,8)
	7,5 ml 1,5M Tris/HCl pH 8,8
	0,3 ml 10%SDS
	3,2 ml 87%Glycerin
	6,2 ml H ₂ O
	0,3 ml 10% APS
	20 µl TEMED

Sammelgel (5%): pro 15 ml:	2,5 ml Acrylamid: Bisacrylamid (30:0,8)
	3,75 ml 0,5M Tris/HCl pH 6,8
	0,15 ml 10% SDS
	8,45 ml H ₂ O
	0,15 ml 10% APS
	20 µl TEMED

Die Proben wurden vor dem Auftragen in 2× Laemmli-Puffer aufgenommen und zur Denaturierung 10 min bei 95°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer (pro l:

6,08 g Tris, 28,86 g Glycin, 10 ml SDS 10%) über Nacht bei 10 mA pro Gel. Bei Verwendung von Minigelen von Biometra® wurde die Elektrophorese bei 20 mA/ Gel für 1 bis 2 Stunden durchgeführt.

II.6.3 Coomassie- Färbung von Proteingelen

Das zu färbende Gel wurde 1 h in Coomassie Brilliant Blue-Lösung (pro l: 1,75 g Serva Blau R, 454ml Methanol, 92 ml Eisessig) geschwenkt und der überschüssige Farbstoff mit Entfärber (30% Ethanol, 10% Eisessig) entfernt. Das Gel wurde anschließend in Geltrocknungsrahmen (Gel Drying Frames; Diversified Biotech) nach Anleitung des Herstellers getrocknet.

II.6.4 Silber-Färbung von Proteingelen

Für den sensitiveren Nachweis von Proteinen wurden diese mit Silber gefärbt. Hierzu wurde das „Serva Silver staining kit“ (Serva; Heidelberg) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Trocknung der Gele erfolgte wie unter II.6.3 beschrieben.

II.6.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern (Western Blot)

Die zu untersuchenden Proteine wurden vor der Übertragung auf Nitrozellulosemembranen oder PVDF Membranen im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Sämtliche verwendeten Filterpapiere (Whatmann 3MM) sowie die Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll, Dassel) wurden vor Gebrauch kurz im Transferpuffer (pro l: 3 g Tris, 14,4 g Glycin, 10% Methanol) getränkt. Das Acrylamidgel wurde ebenfalls 10 min in Transferpuffer equilibriert. Die anschließende Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte für 1,5 h bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gel. Hierfür wurde die Blot-Apparatur von Pharmacia/LKB verwendet und der Aufbau nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Alternativ wurde für Mini-Gele die Trans-Blot™ Kammer (Biorad) verwendet und der Blot bei 100 V für 1 h durchgeführt. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen 30 min bei 37°C in Blot-Puffer 1 (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,9% NaCl, 5% Magermilchpulver) geschwenkt. Danach wurde die Membran 1 h in Blot-Puffer 2 (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,9% NaCl, 0,5% Magermilchpulver, 0,1% Tween 20), in dem der Antikörper (primärer Antikörper) gegen das Zielprotein 1:1000 verdünnt wurde, geschwenkt. Zum Entfernen überschüssiger Antikörper wurde die Membran zweimal 30 min in Blot-

Puffer 2 gewaschen. Für den Nachweis der primären Antikörper wurde die Membran mit an alkalische Phosphatase gekoppelte sekundäre Antikörper inkubiert. Hierzu wurde entweder Anti-Rabbit IgG 1:15000, Anti-Mouse IgG 1:15000 oder Anti-Guinea Pig 1:30000 in Blot-Puffer 2 verdünnt. Die Membran wurde 1 h bei 37°C in der Lösung inkubiert. Durch erneutes zweimaliges Waschen (s.o.) wurde der überschüssige sekundäre Antikörper entfernt. Anschließend wurde die Membran in Entwicklungspuffer (100 mM Tris/HCL pH 9,0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) 10 min equilibriert und zum Starten der Farbreaktion mit 10 ml Entwicklungslösung (10 ml Entwicklungspuffer, 66 µl NBT [50 mg/ml in 70% Formamid], 66 µl BCIP [25 mg/ml]) überschichtet. Sobald die Proteinbanden ausreichend sichtbar waren, wurde die Reaktion durch Waschen der Membran mit 3%iger TCA-Lösung oder Wasser gestoppt. Beim Western Blot der SecY-Proteine wurde anstelle des Blot-Puffers 1 TBT-Puffer mit Magermilchpulver (50 mM TrisHCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween, 5 % Magermilchpulver) und anstelle von Blot-Puffer 2 TBT-Puffer ohne Magermilchpulver eingesetzt.

Verwendete Antikörper :

Anti-SecA	<i>S. carnosus</i>	(Dr. K-L Schimz)
Anti-SecA2	<i>S. aureus</i>	(diese Arbeit)
Anti-Lipase	<i>S. hyicus</i>	(Dr. K-L Schimz)
Anti-TalB	<i>E. coli</i>	(Eurogentec)
Anti-MalE	<i>E. coli</i>	(Dr. K-L Schimz)
Anti-5xHis		(Qiagen, Hilden)
Anti-SaSrr2200Lip	<i>S. aureus/S. hyicus</i>	(diese Arbeit)
Anti-LacZ	<i>E. coli</i>	(Dr. K-L Schimz)

II.6.6 Pulse-Chase mit *B. subtilis* (variiert nach van Dijl, 1991)

II.6.6.1 Markierung von *B. subtilis* WT

Aus einer *B. subtilis* ÜNK in S7-Medium (mit entsprechenden Antibiotika und 50 µg/ml Methionin supplementiert) wurden 5 ml S7-Medium zu einer OD₆₀₀ von 0,075 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 im Reagenzglas bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Dann wurde dem Ansatz ein Volumen entnommen, welches so groß war, dass die OD₆₀₀ nach Waschen und Resuspendieren in 2,5 ml Medium 0,6 entsprach. Diese Zellen wurden in 50 ml Falcon Tubes 10 min bei 5.000 rpm (Heraeus Minifuge, RT) zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit 5 ml S7-Medium ohne Methionin gewaschen und dann in 2,5 ml S7-Medium ohne Methionin resuspendiert. Der Zellansatz wurde weitere 45 min bei experimentell erforderlicher Temperatur mit 200 rpm inkubiert. Zur Induktion der Genexpression von

IPTG-induzierbaren Genen wurde den Kulturen 10 min vor der Markierung 1 mM IPTG zugesetzt. Die Markierung der Zellen erfolgte bei einer Versuchstemperatur von 37°C mit 100 μ Ci 35 S-Methionin. Die Markierung erfolgte für 1 min. Danach wurden 100 μ l Chase-Lösung (45 mg/ml Methionin, 2,5 mg/ml Puromycin) zugesetzt und zu verschiedenen Zeitpunkten 600 μ l Proben entnommen, die sofort in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen mit 150 μ l eiskalter TCA (40%) gemischt wurden. Die Zellen wurden über Nacht bei 4°C gefällt.

II.6.6.2 Markierung von *B. subtilis* NIG1152

Um den Einfluss verschiedener SecA-Proteine auf den Proteinexport von Vorläuferproteinen in *B. subtilis* zu untersuchen, wurde die temperatursensitive *B. subtilis* secA-Mutante NIG1152 verwendet. Bei der nicht-permissiven Temperatur von 42°C kommt es in dieser Mutante zu einem Block des Proteinexportes der es ermöglicht, den Einfluss von heterologen SecA Proteinen auf den Proteinexport zu untersuchen.

Aus einer ÜNK der temperatursensitiven *B. subtilis* secA-Mutante NIG1152 in S7-Medium (mit entsprechenden Antibiotika und 50 μ g/ml Methionin supplementiert) wurden 5 ml S7-Medium (mit entsprechenden Antibiotika und 50 μ g/ml Methionin) zu einer OD₆₀₀ von 0,3 angeimpft und in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9–1,0 bei 30°C und 160 rpm inkubiert.

Um Unterschiede des Proteinexportes bei der permissiven Temperatur von 30°C und der nicht-permissiven Temperatur von 42°C zu untersuchen, wurden Hunger in Abwesenheit von Methionin und Pulse-Chase für einen Teil der Zellen bei 30°C, für den anderen Teil bei 42°C durchgeführt. Für die Untersuchung des Proteinexports bei 42°C wurde dem Ansatz ein Volumen entnommen, welches so groß war, dass die OD₆₀₀ nach Waschen und Resuspendieren in 2,5 ml Medium 0,8 entsprach. Dieses Volumen wurde in 50 ml Falcon Tubes 5 min bei 4.800 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R) und Raumtemperatur abzentrifugiert, zweimal mit 5 ml S7-Medium ohne Methionin gewaschen und dann in 2,5 ml S7-Medium ohne Methionin resuspendiert, während die restlichen Zellen mit S7-Medium (mit entsprechenden Antibiotika und Methionin) auf eine OD₆₀₀ von 0,75 verdünnt und weiter bei 30°C und 160 rpm inkubiert wurden. Mit diesen restlichen Zellen wurden anschließend der Proteinexport bei 30°C untersucht. Die gewaschenen und resuspendierten Zellen wurden zur Untersuchung des Proteinexports bei 42°C 40 min bei der nicht-permissiven Temperatur von 42°C inkubiert. Zur Induktion der Genexpression von IPTG-induzierbaren Genen wurde den Kulturen 10 min vor der Markierung 1 mM IPTG zugesetzt. Die Markierung erfolgte mit 200 μ Ci 35 S-Methionin für 1 min. Danach wurden 100 μ l Chase-Lösung (45 mg/ml Methionin, 2,5 mg/ml Puromycin) zugesetzt und zu verschiedenen Zeitpunkten 600 μ l Proben entnommen, die sofort in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen mit 150 μ l eiskalter TCA (40%) gemischt wurden. Die Zellen wurden über Nacht bei 4°C gefällt.

Im Anschluss wurden zur Untersuchung des Proteinexportes bei 30°C die „restlichen“, weiterhin bei 30°C inkubierten Zellen, vollständig identisch behandelt wie die Zellen bei der Untersuchung des Proteinexportes bei 42°C, nur wurden Hungerperiode und Pulse-Chase bei 30°C durchgeführt.

II.6.6.3 Aufarbeitung der Proben

Die Proben wurden 20 min bei 13.000 rpm (Eppendorf, RT) abzentrifugiert und das Pellet dreimal mit Aceton (80%) gewaschen. Das Pellet wurde 2 min bei 95°C getrocknet und in 100 µl Lysispuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 25 mM MgCl₂, 200 mM NaCl, 5 mg/ml Lysozym) sorgfältig resuspendiert und 45-60 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 10 µl 10% SDS wurden die Zellen 10 min bei 95°C lysiert. Dann wurde dem Ansatz 1 ml IP-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,92% TritonX-100, 5 mM EDTA) zugegeben, unlösliche Bestandteile durch 20 min Zentrifugation abgetrennt und 1 ml Überstand zur Immunfällung in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 10 µl Antikörper gegen das Zielprotein wurde das Protein 1h bei 30°C unter leichtem Schwenken an den Antikörper gebunden. Zur Fällung des Komplexes aus Protein und Antikörper wurden 100 µl Pansorbinzellen (10%, fixierte *Staphylococcus aureus* Zellen mit exponiertem Protein A) zugefügt und der Ansatz 30 min bei 30°C leicht geschwenkt. Anschließend wurden die Pansorbinzellen 3 min bei 11.000 rpm (Eppendorf, RT) zentrifugiert und vollständig in Waschlösung 1 (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 M NaCl, 1% Triton X-100) resuspendiert. Der Vorgang wurde für Waschlösung 2 (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 M LiCl, 0,1% SDS) und Waschlösung 3 (50 mM Tris/ HCl pH 7,5) wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 50 µl 2× Laemmli-Probenpuffer resuspendiert und die Proben 10 min bei 95°C denaturiert. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden 5 µl der Proben entnommen, in einem Kunststoff-Szintillationsgefäß mit 5 ml Szintillations-Flüssigkeit (Ultima Gold XR, Packard Bioscience) vermischt und die Radioaktivität ausgezählt. Die Probenvolumina wurden auf einen Wert von 10.000 bis 15.000 cpm (counts per minute) normiert, auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. II.6.2.).

II.6.6.4 Gelaufarbeitung

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine zunächst 30 min mit 45% Isopropanol, 10% Essigsäure im Gel fixiert und anschließend 30 min mit EN³HANCE (NENTMLife Science Products, Belgium) unter leichtem Schwenken imprägniert. Das Gel wurde dreimal 15 min mit Wasser gewaschen und dann in einer Vakuum-Trockenapparatur 1,5 h bei 80°C auf Filterpapier getrocknet. Der Nachweis der radioaktiv markierten Banden erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms für mehrere Tage bei -70°C und nachfolgender Entwicklung.

Zusätzlich konnte durch Exposition eines „Screens“ (Fuji BAS-MP Imaging Plate) das markierte Proteinmuster mit Hilfe des Fuji BAS 1800 Bio Image Analysers sichtbar gemacht und die radioaktiv markierten Banden quantitativ ausgewertet werden. Hierzu wurde die Software „Advanced Image Data Analyser“ (Rytest) verwendet.

II.6.7 MALDI-TOF Massenspektroskopie

Für Peptidmassen-„Fingerprint“-Analysen wurden die Proteinbanden in Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen herausgeschnitten und mit Trypsin verdaut (Fountoulakis und Langen, 1997). Mit Silber gefärbte Protein-Gele wurden vorher nach dem „Destain“-Protokoll des ProteoSilverTM Plus-Kits der Firma Sigma entfärbt. Die Proteinbanden in den Gelstücken wurden nach zweimal 10 min Waschen mit 350 µl 0,1 M Ammoniumbicarbonat in 30% (v/v) Acetonitril (ACN) für 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend mit 1 µl 3 mM Tris/HCl-Puffer (pH8,8) mit 10 ng/µl Trypsin (Promega) rehydratisiert. Nach 20 min wurden weitere 2 µl 3mM Tris/HCl (pH8.8) ohne Trypsin zugegeben und die Proben bei 37°C über Nacht verdaut. Die Peptide wurden durch Zugabe von 6 µl Wasser, 15 min Inkubation, Zugabe von 5 µl 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in 30% (v/v) ACN und nochmals 10 min Inkubation aus den SDS-Polyacrylamidgel- Resten eluiert. Zum tryptischen Verdau von Proteinen in Lösung wurde die Proteinprobe durch Ultrafiltration (je nach Größe Microcon-30 oder -100) eingengt, in 10 µl 3 mM Tris/HCl (pH8.8) mit 10 ng/µl Trypsin aufgenommen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl 0,1% (v/v) TFA in 30% (v/v) ACN zugegeben. 0,5 µl der erhaltenen Peptidlösung wurden auf einer Probenplatte mit 0,5 µl einer gesättigten Lösung von α-Cyano- 4-hydroxy-trans-Zimtsäure in 50 % (v/v) ACN, 0,25 % (v/v) TFA gemischt. Eine externe Kalibrierung erfolgte für jede Probe mit Hilfe der Calibration Mixtures 1 und 2 des „Sequazyme Peptide Mass Standard Kits“ (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Proben wurden in einer Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems) im positiven Reflektor-Modus mit 20 kV Beschleunigungsspannung, 63% Gitterspannung und einer Verzögerungszeit von 125 ns analysiert. Zur Steuerung des Geräts und zur Datenanalyse wurden die Voyager Control Panel Software 5.0 und die Voyager Data Explorer Software 3.5 (Applied Biosystems) verwendet. Die erhaltenen Peptidmassen wurden zur Suche in einer lokalen Datenbank mit 3312 *C. glutamicum*-Proteinen (Degussa) mit Hilfe der GPMASoftware 4.0 (Lighthouse Data) oder dem MS-Fit-Programm (Clauser *et al.*, 1999) genutzt. Eine sichere Identifizierung wurde angenommen, wenn mindestens vier Peptidmassen mit den vorhergesagten Massen übereinstimmten, wobei die Unterschiede zwischen gemessener und theoretischer Masse maximal 100 ppm betragen durften und die Fehler der einzelnen Peptide einem Muster folgten, das auf eine ungenaue Kalibrierung zurückgeführt werden konnte. Wenn die Anzahl der zugeordneten Peptide für eine sichere

Identifizierung des Proteins nicht ausreichend war wurde versucht, einzelne dominante Peptide einer PSD-Analyse („Post Source Decay“) zu unterziehen. Peptide im Bereich zwischen 1 und 4 kDa wurden über einen „precursor ion selector“ (Fensterbreite ± 10 Da) isoliert und die Fragmentierung durch hohe Laserenergie induziert. Die Fragmentmassenspektren wurden in 12 Segmenten mit unterschiedlichen Verhältnissen von Beschleunigungs- zu Reflektorspannung aufgenommen („decrement ratio“ 0,75). Die Geräteparameter waren wie oben beschrieben außer, dass die Gitterspannung auf 75% und die Verzögerungszeit auf 150 ns eingestellt wurden. Eine Kalibrierung erfolgte über die Aufnahme eines Fragmentmassenspektrums von Angiotensin. Die erwartete Aminosäuresequenz des analysierten Peptids wurde mit den erhaltenen Fragmentmassen mit dem „Ion Fragmentation Calculator“ der Voyager Data Explorer Software verglichen.

II.6.8 Herstellung polyklonaler Antikörper

Für die Herstellung polyklonaler Antikörper wurde in Kaninchen (weibliche Chinchilla Bastard Kaninchen) das Protein injiziert, gegen welches der Antikörper gebildet werden sollte. Hierzu wurde zuerst in großem Maßstab (je nach Protein 2x oder 4x 250 ml Kultur) die Expression des Proteins in *E. coli* (*S. aureus* SecA2) oder *S. carnosus* (Srr2000ProLip) induziert und die Zellen nach Abzentrifugieren wie oben unter II.6.1.2 bzw. II.6.1.3 beschrieben aufgeschlossen. Nach einer Abschätzung der Konzentration des in den Proben enthaltenen Zielproteins gegen einen BSA-Standard wurde das benötigte Volumen auf eins, oder im Falle des Srr2000ProLip-Proteins auf zwei, präperative, 3 mm dicke SDS-Gele aufgetragen, um letztendlich mindestens 700 μ g des Zielproteins zu erhalten. Neben den Expressionsstämmen wurde jeweils auch noch eine Probe eines Stammes mit dem entsprechenden Leervektor aufgetragen, um nach durchgeführter SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung des Gels die Bande des gewünschten Zielproteins leicht erkennen zu können. Diese wurde aus dem Gel ausgeschnitten und in 50 ml Falcons gegeben. Es wurde zweimal mit 20-40 ml Aqua bidest für je 5 min auf dem Wippschüttler durch lineare auf und ab Bewegung gewaschen. Anschließend wurde zweimal mit 25 ml Triethanolaminacetat Puffer (100 mM TEA; pH 7,5 mit Acetat eingestellt) für je 10 min inkubiert. Daraufhin wurde zweimal 10 min mit 25 ml TEA Puffer (s.o) mit 6 M Harnstoff gewaschen. Nach erneutem zweimal 10 minütigem Waschen mit TEA-Puffer ohne Harnstoff, wurden die intakten Gelwürmer in eine kleine X-Press Zelle gegeben und über 2-3 Tage bei -25°C gelagert. Die Gelwürmer wurden in der X-Press zerkleinert, bis eine einheitliche, breiähnliche Masse entstand. Der Gelbrei wurde anschließend 1:1 mit Freund's Adjuvanz (7 Teile „Incomplete“ und 1 Teil „Complete“; Fa. Sigma) vermengt. Von dieser Mischung wurde mit einer sterilen Spitze ein Kaninchen mit dem Volumen injiziert, das mindestens 250 μ g des Zielproteins

enthält. 5-6 Wochen später erfolgte eine Nachimmunisierung mit mindestens 150 µg des Zielproteins. Das Serum wurde anschließend auf seine Reaktivität getestet. Falls die Reaktivität gering war, wurde nach weiteren zwei Wochen erneut mit 150 µg Protein nachimmunisiert. Bei guter Reaktivität des Serums wurde das Kaninchen ausgeblutet und das Serum lyophilisiert.

II.6.9 β-Galaktosidase-Aktivitäts-Test

Eine qualitative Ermittlung der β-Galaktosidase-Aktivität wurde auf LB-Platten mit X-Gal (100 µg/ml) durchgeführt. Für quantitative Studien wurde ein o-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid (ONPG) basierter Enzymtest durchgeführt. 1 ml einer 5 ml Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (10 min, 13000 rpm) und die Pellets in 1 ml Z-Puffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Die OD₆₀₀ wurde gemessen. 100 µl der Zellsuspension wurde mit 700 µl Z-Puffer verdünnt und 15 µl einer 1 mg/ml Lysostaphin-Lösung wurden hinzugegeben. Nach 10 min Inkubation bei 37°C wurden 8 µl einer 10% Triton X-100 Lösung hinzugefügt und die Zellen für 5 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl einer frisch angesetzten 4 mg/ml ONPG-Lösung (in Z-Puffer) zugefügt, und das Gemisch für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Zeit von ONPG-Zugabe bis zur Färbung wurde gemessen. 400 µl einer 1 M Na-Carbonat Lösung wurden hinzugefügt und die Zellen für 10 min bei 15000 rpm abzentrifugiert. Im Anschluss wurde die OD₄₂₀ und die OD₅₅₀ gemessen. Als Referenz bei der photometrischen Messung wurde ein Gemisch ohne Zellen exakt gleich behandelt. Die β-Galaktosidase-Aktivität in Miller-Units wurde nach der folgenden Formel berechnet (Miller, 1972):

$$1 \text{ Miller Unit} = 1000 * \frac{(A_{420} - 1,75 * OD_{550})}{OD_{600} * \text{Volumen}[ml] * 30}$$

Volumen: eingesetztes Zellvolumen in ml

II.6.10 Katalase-Aktivitäts-Test

Für die Bestimmung der Katalase-Aktivität wurde die H₂O₂-Abnahme photometrisch bei 240 nm verfolgt. Hierzu wurden von einer zu messenden Kultur die OD₆₀₀ bestimmt und 250 µl Kulturvolumen abzentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4°C). Von dem Stamm mit der niedrigsten OD₆₀₀ wurden bei einer OD₆₀₀ von 8-15 150 µl bzw. bei einer OD₆₀₀ von mehr als 15 67 µl des Überstands im Enzymtest eingesetzt und alle anderen Überstandsvolumina wurden entsprechend Ihrer OD₆₀₀ an diesen Stamm angepasst. Der Probe wurden mit 850 bzw. 933 µl H₂O₂-haltigen-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0, 0,3% KNO₃, 30 mM H₂O₂)

aufgefüllt, kurz gemischt und die Abnahme der OD_{240} photometrisch verfolgt. Über einen Zeitraum von 3 min wurden alle 10 sek Messwerte genommen. Die Extinktionsabnahme wurde als Maß der Katalase-Aktivität verwendet. Als Kontrolle wurde die Extinktionsabnahme des Reaktionsgemischs ohne Zugabe einer Überstandsprobe untersucht. Die OD_{240} in dieser Kontrolle war jedoch stets konstant, so dass ein spontaner Zerfall des H_2O_2 als Grund für die Extinktionsabnahme auszuschließen war.

III. Ergebnisse

III.1 Untersuchungen zum „targeting“ von SecA2/SecY2-Substraten in *B. subtilis*, *E. coli* und *S. carnosus*.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war es für die SecA2/SecY2-abhängige Proteintranslokation völlig ungeklärt, wie ein „targeting“ spezifischer Substrate an die SecA2/SecY2-Translokase vermittelt und ob ein falsches „targeting“ an die klassische Sec1-Translokase verhindert wird. Um dies zu analysieren, wurde die Translokation verschiedener putativer SecA2/SecY2-Substrate in *B. subtilis*, *E. coli* und *S. carnosus* untersucht. Hierbei wurden zum einen Versuche in *E. coli* und *B. subtilis* durchgeführt, den beiden Modellorganismen für Gram-negative bzw. Gram-positive Bakterien, in denen der „targeting“-Mechanismus an und die Translokation über die klassische Sec1-Translokase am ausführlichsten studiert wurde. Beide besitzen kein Sec2-System, so dass die Studien in diesen Organismen Aufschluss über eine Interaktion von SecA2/SecY2-Substraten mit der Sec1-Translokase liefern sollen. Als drittes Bakterium für diese Studien wurde *S. carnosus* gewählt, ein Gram-positives Bakterium, das einen hohen Verwandtschaftsgrad zu Bakterien mit einem SecA2/SecY2-System aufweist.

III.1.1 Untersuchungen zum SecA2/SecY2-„targeting“ in *E. coli*.

III.1.1.1 Ein authentisches SecA2/SecY2-Substrat wird in *E. coli* nicht exportiert.

Die Translokation der SecA2/SecY2-Substrate von *S. gordonii* und *S. parasanguinis* erfolgt ausschließlich über die SecA2/SecY2-Translokase (Bensing und Sullam, 2002; Chen *et al.*, 2004). Wie die Translokation dieser Substrate über den klassischen Sec-Weg unterbunden wird ist unklar. Es könnte z.B. in Bakterien mit einem SecA2/SecY2-System ein spezieller „targeting“-Faktor vorliegen, der SecA2/SecY2-Substrate nur an die SecA2/SecY2-Translokase heranführt und somit eine Translokation über den klassischen Sec-Weg unterbindet. Alternativ könnte es in den SecA2/SecY2-Substraten eine Determinante geben, die eine Translokation über den klassischen Sec-Weg verhindert. Um dies zu analysieren, wurde die Translokation eines authentischen SecA2/SecY2-Substrats in *E. coli* untersucht, der nur über eine Sec1-Translokase und kein SecA2/SecY2-System verfügt. Das SecA2/SecY2-Substrat von *S. gordonii* ist ein sehr großes Serin-reiches Protein (Srr; in *S. gordonii* als GspB bezeichnet), das in einem Operon mit *secA2* und *secY2* kodiert vorliegt. In *S. aureus* existiert ebenfalls ein solches *secA2/secY2*-Operon, in dem ein Gen für ein Srr-Protein kodiert ist (Abbildung 6). Es ist anzunehmen, dass es sich bei diesem Protein um das SecA2/SecY2-

Substrat von *S. aureus* handelt. Ob für dieses *S. aureus* SecA2/SecY2-Substrat eine Translokation über die Sec1-Translokase in *E. coli* möglich ist, wurde in einem ersten Experiment untersucht. Hierzu wurde das *S. aureus* *srr*-Gen in den *E. coli* „low-copy“-Vektor pHSG575 unter Kontrolle eines *lac*-Promotors kloniert. Da es sich bei *S. aureus* um ein Bakterium der Sicherheitsstufe 2 (S2) handelt, wurde die Amplifikation dieser und auch aller nachfolgenden *S. aureus* Gene mittels PCR ausgehend von chromosomaler *S. aureus* DNA von Dr. Jochen Meens (Universität Hannover) durchgeführt. Für das *srr*-Gen, wie auch für alle anderen in dieser Arbeit durch PCR amplifizierte Genprodukte, wurde die korrekte Sequenz nach Klonierung verifiziert. Die Expression des Srr-Proteins konnte in einem mit Coomassie Brilliant Blue gefärbtem Gel nicht nachgewiesen werden. Daher wurde für den Nachweis der Expression des *S. aureus* Proteins ein polyklonaler Antikörper hergestellt. Für die angewandte Methode zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers war es jedoch nötig, eine Bande des Proteins, gegen welches der Antikörper gerichtet werden soll, in einem mit Coomassie Brilliant Blue gefärbtem Gel zu visualisieren. Da dies für das authentische *S. aureus* Srr-Protein nicht möglich war, wurde ein Antikörper gegen ein Fusionsprotein produziert. Bei diesem Fusionsprotein wurde der aminoternale Bereich des *S. aureus* Srr-Proteins an die *S. hyicus* Pro-Lipase fusioniert. Um das Gen zu erhalten, welches das Fusionsprotein kodiert, wurde die „cross-over“-PCR-Technik (siehe II. 5.4 und Abbildung 7 A und B) angewandt. Der Bereich des *S. aureus* *srr*-Gen, der für die aminoternalen 671 Aminosäuren kodiert, wurde ausgehend von chromosomaler *S. aureus* DNA und die signalpeptidlose *S. hyicus* Pro-Lipase ausgehend vom Plasmid pLipPS1kan amplifiziert. Nach der „cross-over“-PCR wurde eine Genfusion erhalten, welche das gewünschte Srr-Pro-Lipase (Srr2000ProLip)-Fusionsprotein kodiert. Dieses Protein ist mit Coomassie Färbung detektierbar, und es konnte somit wie unter II.6.8 beschrieben ein polyklonaler Antikörper gegen dieses Protein hergestellt werden. Das erhaltene Antiserum wurde auf seine Reaktivität mit dem *S. aureus* Srr-Protein untersucht (Abbildung 8).

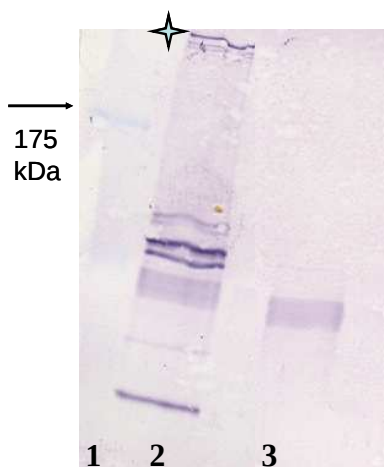


Abbildung 8: Western Blot-Analyse zum Test des Anti-Srr2000ProLip-Antikörpers in *E. coli*. Spur 1: BroadRange (BR)-Protein-Marker (New England BioLabs). Spur 2 und 3: aufgetragen ist die Cytoplasma/Membran (CM)-Fraktion der *E. coli* BL21(DE3) Stämme mit *S. aureus* Srr-Expressionsvektor (Spur 2) und Leervektor (Spur 3). Es sind jeweils 3 µg Gesamtprotein aufgetragen. Der Pfeil markiert die 175 kDa Bande des BR-Markers, der Stern zeigt die Laufhöhe des *S. aureus* Srr-Proteins an.

Hierzu wurde *E. coli* BL21(DE3) mit entweder dem Expressionsvektor für das *S. aureus* Srr oder dem Leervektor unter IPTG-Induktion angezogen und Proteine der Cytoplasma/Membran (CM)-Fraktion mit dem Srr2000ProLip-Antikörper durch Western Blot-Analyse untersucht. Wie in Abbildung 8 in der CM-Fraktion des Leervektorstammes zu erkennen, zeigt der Srr2000ProLip-Antikörper eine schwache Kreuzreaktivität mit mehreren *E. coli* BL21(DE3) Proteinen (Spur 3). Bei Expression des *S. aureus* Srr erkennt man neben diesen jedoch einige weitere Proteinbanden (Spur 2). Hierbei sind zwei Banden, die knapp oberhalb von 83 kDa laufen, besonders ausgeprägt. Bei diesen handelt es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte des sehr großen *S. aureus* Srr-Proteins. Dieses ist als eine schwächere, aber deutlich erkennbare Bande, die im SDS-Gel weit oberhalb von 175 kDa läuft, detektierbar (Abbildung 8, Spur 2, mit einem Stern markiert). Der hergestellte Srr2000ProLip-Antikörper ist folglich für den Nachweis des *S. aureus* Srr-Proteins geeignet. Um zu analysieren, ob für das *S. aureus* Srr-Protein eine Translokation in *E. coli* stattfindet, wurde ein osmotischer Schock durchgeführt. Hierbei erfolgt eine Fraktionierung von *E. coli* in Cytoplasma/Membran (CM)- und Periplasma (PP)-Fraktion und es ist nach SDS-PAGE und Western Blot-Analyse möglich zu untersuchen, ob der Export eines Proteins in das Periplasma stattgefunden hat. Für den osmotischen Schock wurde erneut *E. coli* BL21(DE3) mit entweder dem Expressionsvektor für das *S. aureus* Srr oder einem Leervektor unter IPTG-Induktion angezogen und anschließend fraktioniert. Die Ergebnisse des angeschlossenen Western Blots sind in Abbildung 9 zu sehen.

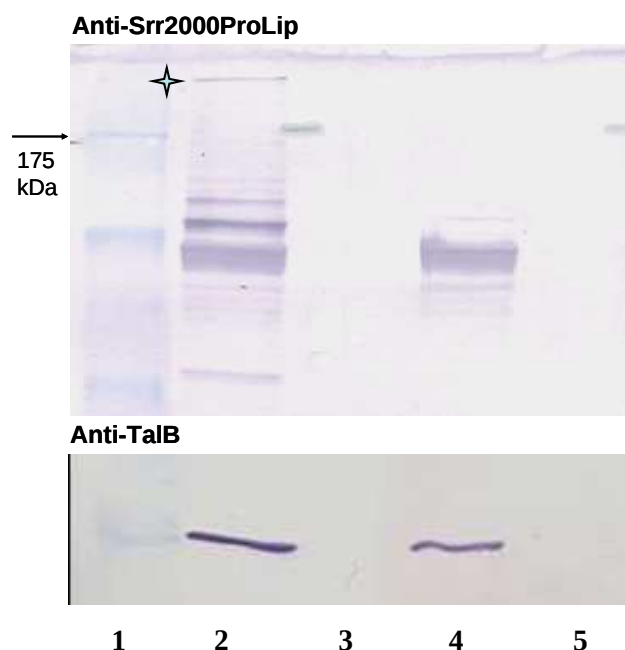


Abbildung 9: Untersuchung des *S. aureus* Srr-Exports in *E. coli* nach Fraktionierung über osmotischen Schock. Spur 1: BR Protein-Marker; Spur 2-5: aufgetragen sind die Cytoplasma/Membran (CM)-Fraktion (Spur 2 und 4) bzw. die Periplasma (PP)-Fraktion (Spur 3 und 5) der *E. coli* Stämme mit *S. aureus* Srr-Expressionsvektor (Spur 2 und 3) oder Leervektor (Spur 4 und 5). Die Western Blot-Analyse erfolgte mit Anti-Srr2000ProLip-Antikörper (oberes Feld) bzw. Anti-TalB-Antikörper als Zelllysis-Kontrolle (unteres Feld). Aufgetragen sind jeweils 3 µg (CM) bzw. 6 µg (PP) Gesamtprotein. Der Pfeil markiert die 175 kDa Bande des BR-Markers, der Stern zeigt die Laufhöhe des *S. aureus* Srr-Proteins an.

Als Kontrolle dafür, ob es während des Osmoschocks zu einer Lysierung der Zellen und einer Kontamination der Periplasma (PP)-Fraktion mit Cytoplasma/Membran (CM)-Fraktion gekommen ist, wurde die Lokalisierung des cytoplasmatischen Proteins Transaldolase B (TalB) untersucht (Abbildung 9, unteres Feld). Hier erkennt man, dass der durchgeführte Osmoschock zu keinerlei Kontamination der PP-Fraktion mit CM-Fraktion geführt hat, da das TalB-Protein ausschließlich in der CM-Fraktion (unteres Feld, Spur 2, und 4) lokalisiert ist. Bei Betrachtung der Lokalisierung des *S. aureus*-Srr ist erkennbar, dass in dem Stamm mit dem Expressionsvektor für das *S. aureus* Srr das gesamte Srr-Protein (mit einem Stern markiert) in der CM-Fraktion vorliegt (Abbildung 9, oberes Feld, Spur 2 im Vergleich zu Spur 3). In der PP-Fraktion finden sich weder das vollständige Srr-Protein, noch Abbaubanden des Proteins. Der Export des *S. aureus* Srr-Proteins kann in *E. coli* aus verschiedenen Gründen scheitern. Einer dieser Gründe ist, dass kein „targeting“ des *S. aureus* Srr-Proteins an die klassische Sec1-Translokase stattfindet. Eine plausible Erklärung für das Ausbleiben eines „targetings“ an die Sec1-Translokase wäre, dass das Signalpeptid des SecA2/SecY2-Substrats keine produktiven Wechselwirkungen mit den Komponenten der klassischen Sec1-Translokase eingehen kann. Um dies zu analysieren, wurde im Folgenden die Translokation eines klassischen Sec-Substrats, bei dem das Sec1-Signalpeptid gegen das eines SecA2/SecY2-Substrats ausgetauscht wurde, untersucht.

III.1.1.2 Ein SecA2/SecY2-Signalpeptid erlaubt ein „targeting“ an die klassische Sec-Translokase in *E. coli*.

In *E. coli* sollte analysiert werden, ob das Signalpeptid eines SecA2/SecY2-Proteins ein „targeting“ eines Proteins an die klassische Sec1-Translokase unterbindet. Bei Betrachtung der SecA2/SecY2-Substrate von *S. aureus* und *S. gordonii* ist auffällig, dass für beide ein 90 Aminosäuren langes Signalpeptid vorausgesagt wird. Dies entspricht etwa der dreifachen Länge typischer Sec-Signalpeptide Gram-positiver Bakterien. Daher ist es denkbar, dass dieses außergewöhnliche Signalpeptid für die spezifische Erkennung durch die jeweilige SecA2/SecY2-Translokase verantwortlich ist und ein falsches „targeting“ an die Sec1-Translokase verhindert. Um letzteres zu untersuchen, wurde ein Austausch des Signalpeptids der *S. hyicus* Pro-Lipase, eines klassischen Sec-Substrats das in *E. coli* effizient in das Periplasma transloziert wird (Meens, 1994), gegen das des *S. aureus* Srr durchgeführt. Um eine solche Fusion aus dem Signalpeptid des *S. aureus* Srr und der signalpeptidlosen *S. hyicus* Pro-Lipase herzustellen, wurde erneut die „cross-over“-PCR-Technik angewandt. Hierzu

wurde ausgehend von chromosomaler *S. aureus* DNA die Nukleotidsequenz amplifiziert, die für das 90 Aminosäuren lange Signalpeptid des *S. aureus* Srr kodiert und die Ribosomenbindestelle (RBS) des *srr*-Gens beinhaltet. Das Plasmid pLipPS1kan wurde als „template“ eingesetzt, um den Genbereich, der die signalpeptidlose *S. hyicus* Pro-Lipase kodiert, zu amplifizieren. Über die „cross-over“-PCR konnte eine präzise Genfusion, die für ein Srr-Signalpeptid-Pro-Lipase (SrrSPProLip)-Fusionsprotein kodiert, erhalten werden. Das *srrSPProLip*-Gen wurde in den Expressionsvektor pCU3Ery kloniert, in dem die Expression des Gens von einem *lac*-Promotor gesteuert wird. Zur Lokalisierung der Hybrid-Lipase wurde ein osmotischer Schock durchgeführt. Hierzu wurden Zellen von *E. coli* JM109 mit dem pCU3Ery-Leervektor, dem Lipase-Expressionsvektor pULS183K23 und dem pCU3SrrLip-Vektor mit IPTG angezogen und anschließend fraktioniert. Die Ergebnisse der angeschlossenen Western Blot-Analyse sind in Abbildung 10 A zu sehen.

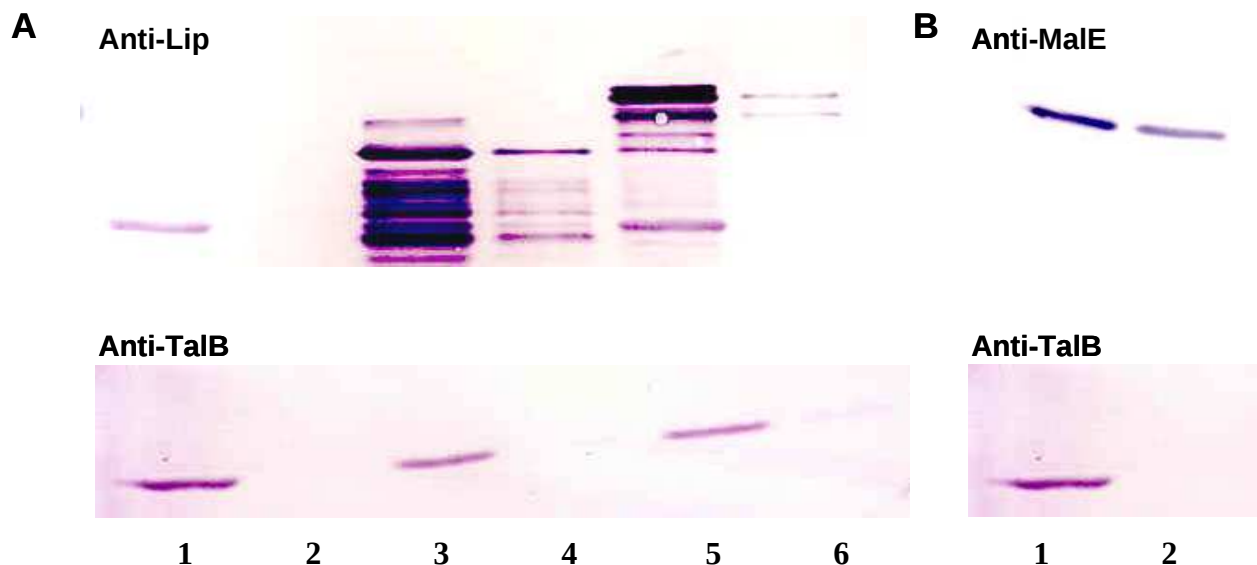


Abbildung 10: Untersuchung des SrrSPProLip-Exports in *E. coli* nach Fraktionierung über osmotischen Schock.

(A) Aufgetragen sind die Cytoplasma/Membran (CM)-Fraktion (Spur 1, 3 und 5) bzw. die Periplasma (PP)-Fraktion (Spur 2, 4 und 6) der *E. coli*-Stämme mit dem Leervektor (Spur 1 und 2), dem Wildtyp-Lipase Expressionsvektor (Spur 3 und 4) und dem SrrSPProLip-Expressionsvektor (Spur 5 und 6). Die Western Blot-Analyse erfolgte mit Anti-*S. hyicus* Lipase-Antikörper (oberes Feld) bzw. Anti-TalB-Antikörper als Zelllysis-Kontrolle (unteres Feld).

(B) Positivkontrolle der Qualität des Osmoschocks durch Überprüfung der Lokalisierung des MalE Proteins von *E. coli*. Aufgetragen sind die Cytoplasma/Membran- (Spur 1) und die Periplasma-Fraktion (Spur 2) des *E. coli*-Stamms mit dem Leervektor. Die Western Blot-Analyse erfolgte mit Anti-MalE- Antikörper (oberes Feld) bzw. Anti-TalB Antikörper als Zelllysis-Kontrolle (unteres Feld). Aufgetragen sind jeweils 3 µg (CM) bzw. 6 µg (PP) Gesamtprotein.

Als Zelllysis-Kontrolle wurde erneut die Lokalisierung des cytoplasmatischen TalB-Proteins in der Periplasma (PP)-Fraktion und der Cytoplasma/Membran (CM)-Fraktion untersucht (Abbildung 10 A und B, unteres Feld). Wie zu erkennen, findet sich in den PP-Fractionen des

Leervektor-Stammes und des Wildtyp-Lipase Expressionsstammes keinerlei TalB-Protein (Abbildung 10 A, Spur 2 bzw. 4, unteres Feld). Zelllyse ist hier folglich ausgeschlossen. Für den SrrSPPProLip-Expressionsstamm findet sich eine sehr geringe Menge an TalB-Protein in der PP-Fraktion (Abbildung 10 A, Spur 6, unteres Feld). Hier ist es zu einer sehr geringen Kontamination der PP-Fraktion mit CM-Fraktion gekommen. Im oberen Feld von Abbildung 10 A sind die Ergebnisse des Blots mit Anti-*S. hyicus* Lipase-Antikörper gezeigt. Es ist zu erkennen, dass der verwendete Lipase-Antikörper mit einem *E. coli*-Protein in der CM-Fraktion kreuzreagiert, da ein Stamm nur mit einem Leervektor eine Bande zeigt (Spur 1). Diese Bande läuft jedoch weit unterhalb der vorhergesagten Größen für die *S. hyicus* Lipase und das SrrSPPProLip-Protein und ist daher zu vernachlässigen. Bei Betrachtung der Lokalisierung der *S. hyicus* Wildtyp-Lipase erkennt man in der Cytoplasma/Membran-Fraktion eine Bande bei einer Größe von etwa 71 kDa, die in der Periplasma-Fraktion nicht vorhanden ist (Abbildung 10 A; Spur 3). Die exklusive Lokalisierung in der Cytoplasma/Membran-Fraktion und das Übereinstimmen mit der vorhergesagten Größe von 71,2 kDa machen es sehr wahrscheinlich, dass dies die unprozessierte Vorläuferform der *S. hyicus*-Lipase ist. In der PP-Fraktion findet sich hingegen hauptsächlich eine kleinere Form des Proteins, bei der es sich höchstwahrscheinlich um die prozessierte Pro-Lipase handelt (Abbildung 10 A; Spur 4). Eine große Menge dieses Proteins ist auch in der CM-Fraktion zu sehen (Spur 3). Weitere kleinere Banden in der CM- aber auch in der PP-Fraktion deuten einen starken Abbau der Wildtyp-Lipase an.

Bei Betrachtung der Lokalisierung des SrrSPPProLip-Protein ist dieses fast ausschließlich in der CM-Fraktion zu erkennen (Abbildung 10 A, Spur 5 und 6). Das SrrSPPProLip-Vorläuferprotein ist aufgrund des sehr großen Signalpeptids mit 77,3 kDa deutlich größer als die Wildtyp-Lipase. In der Periplasma-Fraktion finden sich zwei Proteine in sehr geringer Menge, die eine geringere Größe als das SrrSPPProLip-Vorläuferprotein besitzen. Dies deutet auf einen, wenn auch sehr ineffizienten, Export des Proteins hin. Die bei der TalB-Kontrolle beobachtete geringe Zelllyse kann nicht der Grund für diese Banden in der PP-Fraktion sein, da ansonsten alle in der CM-Fraktion gefundenen Banden mit gleicher Intensität in der PP-Fraktion vorliegen müssten. Auch für das SrrSPPProLip-Protein findet in der CM-Fraktion ein Abbau statt, doch ist dieser weit weniger stark ausgeprägt, als für die Wildtyp-Lipase (Abbildung 10 A; Spur 5).

Der in Abbildung 10 A (Spur 3 und 4) beobachtete Export der *S. hyicus* Lipase in das Periplasma ist für ein klassisches Sec-Substrat verhältnismäßig ineffektiv. Da es darüber hinaus zu einer Akkumulation einer sehr großen Menge an reifem Protein in der Cytoplasma/Membran-Fraktion kommt ist es möglich, dass der Osmoschock nicht zu einer Abtrennung der gesamten Periplasma-Fraktion von der Cytoplasma/Membran-Fraktion geführt hat. Um dies zu überprüfen, wurde die Lokalisierung des periplasmatischen Maltose-Bindeproteins (MalE) von *E. coli* kontrolliert (Abbildung 10 B). Bei der exemplarischen Untersuchung der MalE-Lokalisierung für die Osmoschock-Proben des Leervektor-Stamms

zeigte sich, dass nur etwa ein Drittel des MalE-Proteins in der Periplasma-Fraktion vorliegt (Abbildung 10 B, Spur 1 und 2). Dies zeigt, dass der Osmoschock zwar prinzipiell funktioniert hat, es aber nur zu einer Abtrennung von etwa 30% des Periplasmas von der Cytoplasma/Membran-Fraktion gekommen ist. Das Experiment kann folglich nur für eine qualitative und keine quantitative Aussage über den Lipase-Export herangezogen werden.

Bei Betrachtung des SrrSPProLip-Proteins war ein Export in das Periplasma zu beobachten was zeigt, dass ein SecA2/SecY2-Signalpeptid ein klassisches Sec1-Substrat in *E. coli* nicht von der Translokation über den Sec1-Weg ausschließt. Das außergewöhnliche Signalpeptid eines SecA2/SecY2-Substrats ist somit zumindest in *E. coli* nicht in der Lage, ein falsches „targeting“ an die klassische Sec-Translokase zu verhindern. Da es trotz vieler Gemeinsamkeiten auch Unterschiede in der Proteintranslokation zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien gibt, sollte auch in *B. subtilis*, dem Gram-positiven Modellorganismus, die Translokation des SrrSPProLip-Proteins über den Sec1-Weg untersucht werden.

III.1.2 Untersuchungen zum SecA2/SecY2-„targeting“ in *B. subtilis*.

III.1.2.1 Das SrrSPProLip-Protein wird in *B. subtilis* nicht exportiert.

In *B. subtilis* sollte untersucht werden, ob das SecA2/SecY2-Signalpeptid auch in einem Gram-positiven Bakterium eine Translokation über den klassischen Sec1-Weg ermöglicht. Hierzu wurde die Translokation des SrrSPProLip-Protein, das über ein solches SecA2/SecY2-Signalpeptid verfügt, analysiert. Das *srrSPProLip*-Gen wurde hierzu in den *E. coli/B. subtilis*-„shuttle“-Vektor pWH1520 umklont, in dem die Expression des Gens über einen *xylA*-Promotor reguliert ist. Der *xylA*-Promotor ermöglicht eine durch Xylose induzierbare und durch Glukose reprimierbare Expression von Genen unter seiner Kontrolle. Dieser Vektor wurde als pWSrrSPProLip bezeichnet und in den *B. subtilis* Wildtyp transformiert. Der *B. subtilis* Wildtyp mit pWH1520-Leervektor, pWSrrSPProLip und dem Expressionsvektor für die unveränderte *S. hyicus* Lipase (pLipPS1kan) wurde 5h lang in Gegenwart von 0,5% Xylose bzw. 0,5% Glukose angezogen. Zur Untersuchung des Lipase-Exports wurden die *B. subtilis*-Stämme in Gesamtzellextrakte und Überstandsproben fraktioniert. Nach SDS-PAGE wurde eine Western Blot-Analyse mit Anti-*S. hyicus* Lipase-Antikörper durchgeführt (Abbildung 11).

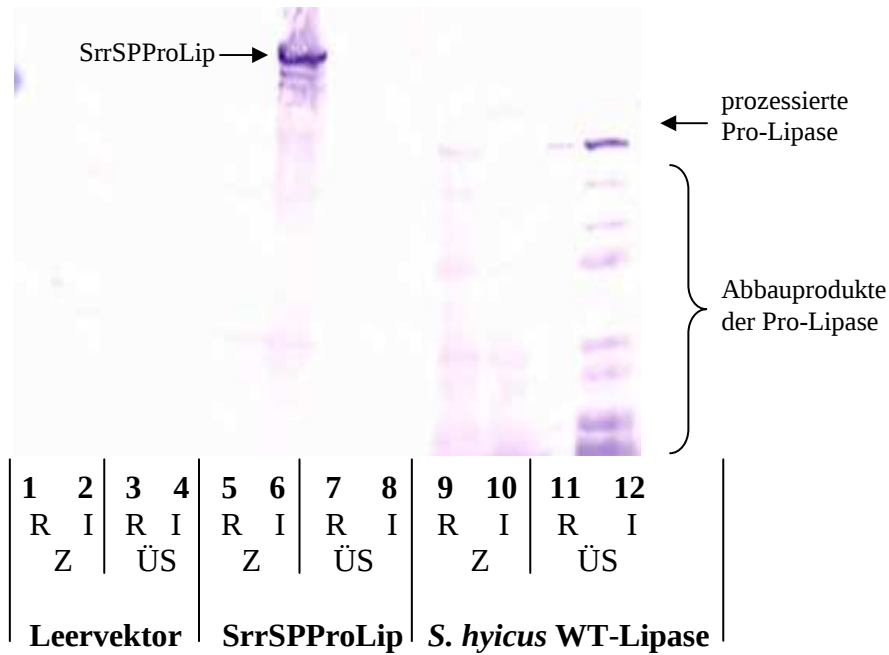


Abbildung 11: Analyse des SrrSPPProLip-Exports in *B. subtilis*. Fraktionierung von *B. subtilis* DB104 mit Leervektor (Spur 1-4), SrrSPPProLip-Expressionsvektor (Spur 5-8) und *S. hyicus* Wildtyp (WT)-Lipase Expressionsvektor (Spur 9-14) in Gesamtzellfraktion (Z) und Überstand (ÜS). Ein R bedeutet, dass Stämme in Gegenwart von 0,5% Glukose angezogen wurden, bei einem I in Gegenwart von 0,5% Xylose.

Wie in Abbildung 11 zu erkennen, reagiert der *S. hyicus* Lipase-Antikörper nicht mit Proteinen eines *B. subtilis*-Stamms mit dem Leervektor, unabhängig davon, ob eine Anzucht mit Glukose oder Xylose im Medium erfolgte (Spur 1-4). Hingegen ist die Expression der Wildtyp-Lipase (Spur 9-12) besonders bei Anzucht mit Xylose im Medium (Spur 10 und 12) deutlich zu erkennen. Hierbei fällt auf, dass die *S. hyicus* Wildtyp-Lipase fast vollständig in den Überstand sekretiert wird (Spur 11 und 12; die prozessierte Pro-Lipase ist durch einen Pfeil gekennzeichnet), wo sie in einer *B. subtilis*-Kultur durch extrazelluläre Proteasen in einige typische Abbauprodukte gespalten wird. Betrachtet man das SrrSPPProLip-Protein (Spur 5-8), so ist bei Xylose-Induktion (Spur 6 und 8) ebenfalls eine starke Expression sichtbar, während unter Repression des *xylA*-Promotors mit Glukose keine Expression zu sehen ist (Spur 5 und 7). Auffällig ist, dass das SrrSPPProLip-Protein vollständig als Prä-Pro-Form in den Zellen akkumuliert (Spur 6). Im Überstand ist keinerlei Lipase detektierbar (Spur 8). Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse stehen in Einklang mit Untersuchungen zur Lipase-Aktivität auf Tween80-Testplatten (Abbildung 12). Bei Sekretion der Lipase in den Überstand führt die Lipase-Aktivität auf diesen Platten zu einer Präzipitation von freigesetzten wasserunlöslichen Fettsäuren, was durch eine Hofbildung zu erkennen ist. Während die Wildtyp-Lipase eine deutliche Hofbildung verursacht, lässt sich bei Induktion der Hybrid-Lipase-Expression keine Aktivität nachweisen (Abbildung 12).

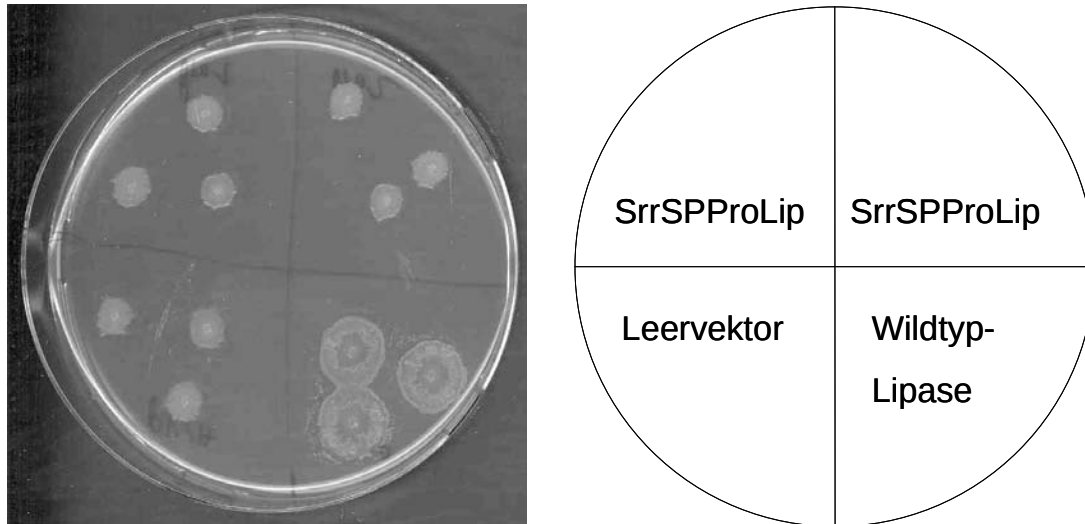


Abbildung 12: Lipase-Aktivitätstest in *B. subtilis* auf einer Tween80-Testplatte mit Xylose. Ergebnisse nach Auftropfen von *B. subtilis* Übernachtskulturen gleicher OD₆₀₀ und nach 24h Inkubation bei 37°C. Die Platte enthält 0,5% Xylose.

Das bedeutet, dass ein Protein mit einem SecA2/SecY2-Signalpeptid in *B. subtilis* von der Translokation über den Sec1-Weg ausgeschlossen wird. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen aus *E. coli* wo eine, wenn auch ineffektive, Translokation eines solchen Proteins möglich ist.

Neben *E. coli* und *B. subtilis* wurde das „targeting“ eines Proteins mit einem SecA2/SecY2-Signalpeptid an die Sec1-Translokase noch in einem dritten Bakterium, *S. carnosus*, untersucht.

III.1.3 Analyse des „targetings“ von SecA2/SecY2-Substraten in *S. carnosus*

III.1.3.1 Das SrrSPPProLip-Protein wird in *S. carnosus* über den Sec1-Weg transloziert.

Bei *S. carnosus* handelt es sich um einen nicht-pathogenen nahen Verwandten von *S. aureus*. Die Komponenten der klassischen Sec1-Translokase von *S. aureus* weisen zu den bislang identifizierten klassischen Sec-Proteinen (SecA1, SecY1, SecE) aus *S. carnosus* eine bedeutend größere Homologie auf, als zu den Komponenten der Sec1-Translokase aus *E. coli* und *B. subtilis*. Um Wechselwirkungen des SrrSPPProLip-Proteins, das über das außergewöhnliche SecA2/SecY2-Signalpeptid von *S. aureus* verfügt, mit der Sec1-Translokase zu untersuchen, stellt *S. carnosus* somit eine interessante Alternative dar.

In *S. carnosus* wurden im Verlauf dieser Arbeit die Gene für ein SecA2/SecY2-Translokationssystem identifiziert (siehe III.3.1). Es war unklar, ob dieses System in *S. carnosus* funktionell ist oder nicht. Da in *S. carnosus* jedoch zunächst das „targeting“ und

die Translokation über die klassische Sec-Translokase untersucht werden sollten musste ausgeschlossen werden, dass gleichzeitig eine Translokation des SrrSPProLip-Proteins über das SecA2/SecY2-System erfolgen kann. Um dies zu gewährleisten, wurde die Translokation auch in einer *secA2*-Disruptionsmutante (DeltaA2, siehe III.3.1.2) von *S. carnosus* untersucht, in der kein funktionelles SecA2/SecY2-System mehr vorliegen kann.

Für die Versuche in *S. carnosus* wurde zuerst das Gen, welches das SrrSPProLip-Protein kodiert, in den *E. coli*/*S. carnosus*-„shuttle“-Vektor pXR100 kloniert, in dem die Expression des Gens durch einen *xylA*-Promotor gesteuert wird. Der hieraus resultierende Expressionsvektor (pXRSrrSPProLip) wurde in den *S. carnosus* Wildtyp und die DeltaA2-Mutante transformiert. Um den Export des SrrSPProLip-Proteins zu untersuchen, wurden der *S. carnosus* Wildtyp und die DeltaA2-Mutante mit entweder dem Expressionsvektor für die *S. hyicus* Lipase oder pXRSrrSPProLip unter Xylose-Induktion 5 Stunden angezogen und anschließend in Überstands- und Gesamtzellfraktion aufgetrennt. In einer Western Blot-Analyse mit dem Anti-*S. hyicus* Lipase-Antikörper wurden die Fraktionen auf die Lokalisierung der Hybrid-Lipase hin untersucht (Abbildung 13).

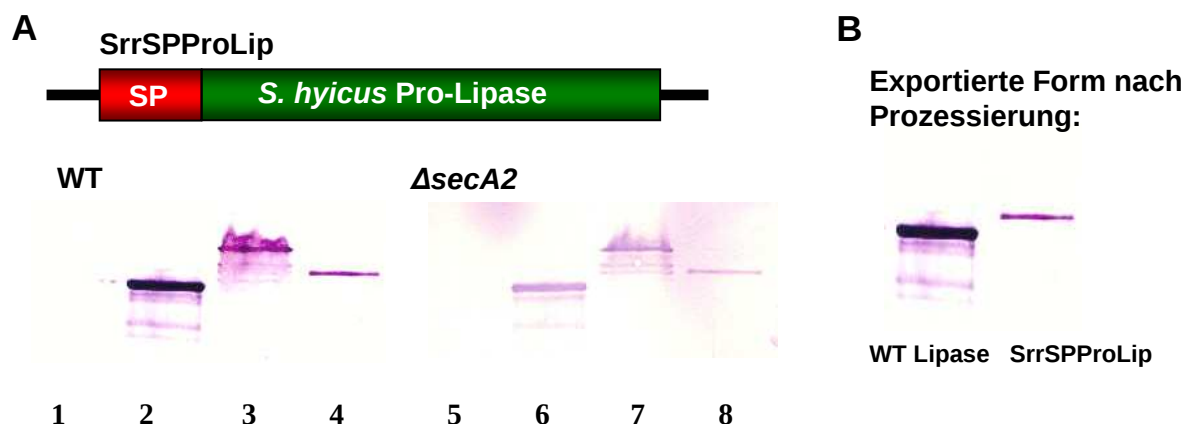


Abbildung 13: Export der *S. hyicus* Wildtyp-Lipase und des SrrSPProLip-Proteins in *S. carnosus*.

(A): Western Blot-Analyse zur Untersuchung der Lokalisierung der Lipasen unter Einsatz des Anti-*S. hyicus* Lipase-Antikörpers. Aufgetragen sind Proteine aus dem *S. carnosus* Wildtyp (Spur 1-4) und der DeltaA2-Mutante (Spur 5-8), welche in Gesamtzellen (Spur 1, 3, 5 und 7) sowie Überstände (Spur 2, 4, 6 und 8) fraktioniert wurden. Es wurde entweder die *S. hyicus* Wildtyp (WT)-Lipase (Spuren 1 und 2 bzw. 5 und 6) oder das SrrSPProLip-Protein (Spur 3 und 4 bzw. 7 und 8) exprimiert.

(B): Größendiskrepanz zwischen der prozessierten Form der Wildtyp (WT)-Lipase und der SrrSPProLip.

Wie für ein klassisches Sec-Substrat zu erwarten, wird die unveränderte *S. hyicus* Lipase sowohl im *S. carnosus* Wildtyp wie auch in der DeltaA2-Mutante mit sehr hoher Effizienz in den Überstand (Spur 2 und 6) exportiert und ist nicht in der Gesamtzellfraktion zu detektieren (Spur 1 und 5).

Die Hybrid-Lipase wird im *S. carnosus* Wildtyp in den Überstand exportiert (Spur 4), jedoch mit einer im Vergleich zur Wildtyp-Lipase deutlich geringeren Effizienz. Große Mengen an

Vorläuferprotein der Hybrid-Lipase akkumulieren in der Zelle (Spur 3). Die Hybrid-Lipase zeigt auch in der *secA2*-Deletionsmutante einen Export mit einer Effizienz, die mit der im Wildtyp vergleichbar ist (Spur 7 und 8 im Vergleich zu Spur 3 und 4). Da in der DeltaA2-Mutante kein funktionelles SecA2/SecY2-System vorhanden ist, deutet dieser Export mit gleicher Effizienz in beiden Stämmen auf einen Export des Fusionsproteins über den Sec1-Weg hin.

Bei den Untersuchungen des Lipase-Exports fiel darüber hinaus auf, dass die in den Überstand sekretierte Form der *S. hyicus* Wildtyp-Lipase kleiner war, als das prozessierte SrrSPProLip-Protein (Abbildung 13 A, Spur 2 und 4 bzw. Abbildung 13 B). Da der einzige Unterschied zwischen den beiden Proteinen das Signalpeptid ist und dieses nach Export in den Überstand ja vollständig entfernt wird, sollte es hier keine Größendiskrepanz geben. Es stellte sich bei einer Sequenzierung des bereits in dieser Form erhaltenen *S. hyicus* Lipase Expressionsplasmids pXRLipK23 heraus, dass hier kurz vor Ende des Leserahmens des Lipase-Gens aufgrund einer Mutation ein Stop-Codon vorliegt, das zu einer vorzeitigen Termination der Translation führt. Als Resultat ist das bei den Untersuchungen in *S. carnosus* eingesetzte „Wildtyp“-Lipase Protein leicht verkürzt. Da es jedoch nur als Positiv-Kontrolle für einen Export über den klassischen Sec-Weg verwendet wird und dieser, wie in Abbildung 13 A zu erkennen, mit einer sehr hohen Effizienz stattfindet, ist dies für die weiteren Untersuchungen ohne Belang.

Die Untersuchungen des Exports des SrrSPProLip-Proteins in *S. carnosus* ergaben somit, dass das *S. aureus* SecA2/SecY2-Signalpeptid ein „targeting“ an und einen Export über die Sec1-Translokase, wenn auch mit geringer Effizienz, vermittelt. Die authentischen SecA2/SecY2-Substrate von *S. gordonii* und *S. parasanguinis*, die Srr-Proteine, werden in *S. gordonii* und *S. parasanguinis* jedoch exklusiv über den SecA2/SecY2- und nicht über den Sec1-Exportweg transloziert. Sie müssen daher eine vom Signalpeptid abweichende Determinante besitzen, welche die Translokation über den Sec1-Weg unterbindet. Um dies genauer zu untersuchen, wurde im Folgenden die Translokation weiterer Fusionsproteine in *S. carnosus* untersucht.

III.1.3.2 Analyse der Translokation weiterer Fusionsproteine über den Sec1-Weg in *S. carnosus*.

Da ein SecA2/SecY2-Signalpeptid nicht die Translokation über den Sec1-Weg verhindert, sollte untersucht werden, ob es im authentischen Srr-Protein eine andere Sequenz gibt, die diese Translokation unterbindet. Hierzu wurden in zwei weiteren Fusionsproteinen größere Bereiche des *S. aureus* Srr-Proteins vor die *S. hyicus* Lipase fusioniert (Abbildung 14, Srr100ProLip und Srr2000ProLip).

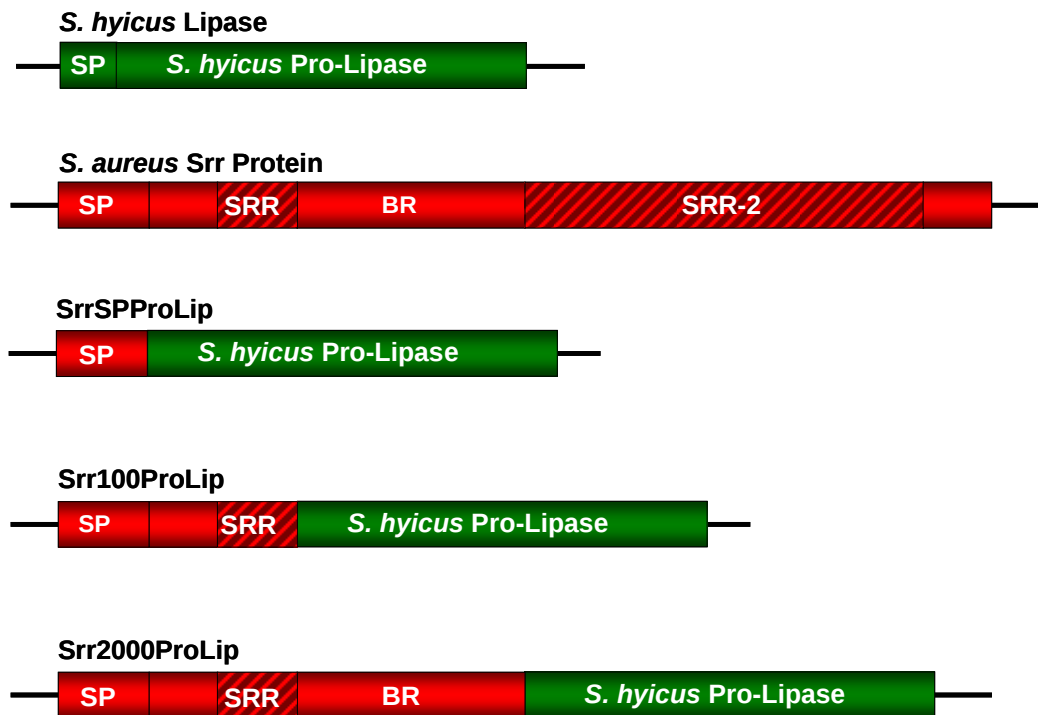


Abbildung 14: Fusionskonstrukte aus *S. aureus* Srr-Protein und *S. hyicus* Pro-Lipase.
 Bereiche in Grün stammen aus der *S. hyicus* Lipase, während Bereiche des *S. aureus* Srr-Proteins in Rot dargestellt sind. SP: Signalpeptid; SRR, SRR-2: Serin-reiche-Region; BR: basische Region.

Für manche Proteine wurde gezeigt, dass eine effiziente Translokation nicht nur das Signalpeptid, sondern zusätzlich noch die ersten etwa 30 Aminosäuren des reifen Teils des Proteins benötigt (Andersson und von Heijne, 1991; Yoshihisa und Ito, 1996). Spezifische Veränderungen in dieser so genannten Translokations-Initiations-Domäne führen dazu, dass eine Translokation über den klassischen Sec-Weg nicht mehr stattfindet. Daher wurde für das *S. aureus* Srr-Protein untersucht, ob dieser Bereich des SecA2/SecY2-Substrats die Translokation über den Sec1-Weg unterbindet. Ein weiteres über „cross-over“-PCR konstruiertes Gen kodiert daher für ein Protein, in dem neben dem Signalpeptid noch die ersten 122 Aminosäuren des Srr-Proteins vor die *S. hyicus* Pro-Lipase fusioniert sind (Srr100ProLip; Abbildung 14). Die Genfusion wurde in den *E. coli*/*S. carnosus*-„shuttle“-Vektor pXR100 kloniert und der hieraus resultierende Expressionsvektor (pXRSrr100ProLip) in den *S. carnosus* Wildtyp und die DeltaA2-Mutante transformiert. Anschließend wurde die Lokalisierung dieses Proteins und der *S. hyicus* Wildtyp-Lipase untersucht. (Abbildung 15).

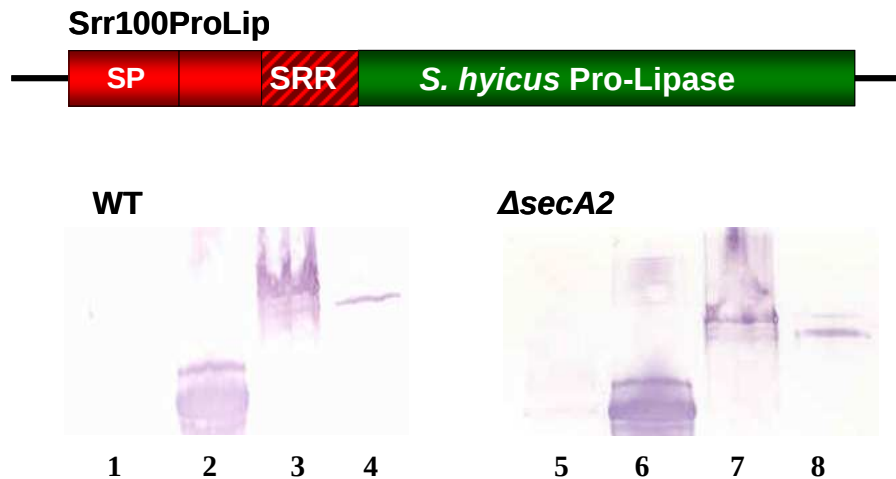


Abbildung 15: Export der *S. hyicus* Wildtyp-Lipase und des Srr100ProLip-Proteins in *S. carnosus*.

Western Blot-Analyse zur Untersuchung der Lokalisierung der Lipasen unter Einsatz des Anti-*S. hyicus* Lipase-Antikörpers. Aufgetragen sind *S. carnosus* Wildtyp (Spur 1-4) und die DeltaA2-Mutante (Spur 5-8), welche in Gesamtzellen (Spur 1, 3, 5 und 7) sowie Überstände (Spur 2, 4, 6 und 8) fraktioniert wurden. Es wurde entweder die *S. hyicus* Wildtyp-Lipase (Spuren 1 und 2 bzw. 5 und 6) oder das Srr100ProLip-Protein (Spuren 3 und 4 bzw. 7 und 8) exprimiert.

Auch das Srr100ProLip Fusionsprotein wird sowohl im Wildtyp (Abbildung 15, Spur 3 und 4) wie auch in der DeltaA2-Mutante (Spur 7 und 8) in den Überstand sekretiert. Diese Sekretion geschieht in beiden Stämmen mit vergleichbarer Effizienz, die deutlich geringer ist als die beim Export der unveränderten *S. hyicus* Lipase (Spur 1 und 2 bzw. 5 und 6). Der Export des Srr100ProLip-Proteins mit gleicher Effizienz in Wildtyp und DeltaA2-Mutante zeigt erneut, dass ein Export des Proteins über den Sec1-Weg möglich ist.

Es wurde weiterhin der Export eines dritten Fusionsproteins betrachtet. Hierbei wurden die ersten 671 Aminosäuren des *S. aureus* Srr vor die *S. hyicus* Pro-Lipase fusioniert. Diese 671 Aminosäuren beinhalten das Signalpeptid, die erste Serin-reiche Region (Srr-1) sowie die gesamte nicht-repetitive, basische Region zwischen Srr-1 und Srr-2. Erneut wurde für die Konstruktion die „cross-over“-PCR-Technik eingesetzt, und das resultierende Fusionsprotein wurde als Srr2000ProLip bezeichnet (Abbildung 14). Die für dieses Protein kodierende Genfusion wurde in pXR100 kloniert, der resultierende Vektor pXRSrr2000ProLip in den *S. carnosus* Wildtyp und die DeltaA2-Mutante transformiert und anschließend die Lokalisierung des Srr2000ProLip-Proteins in einer Western Blot-Analyse untersucht (Abbildung 16).

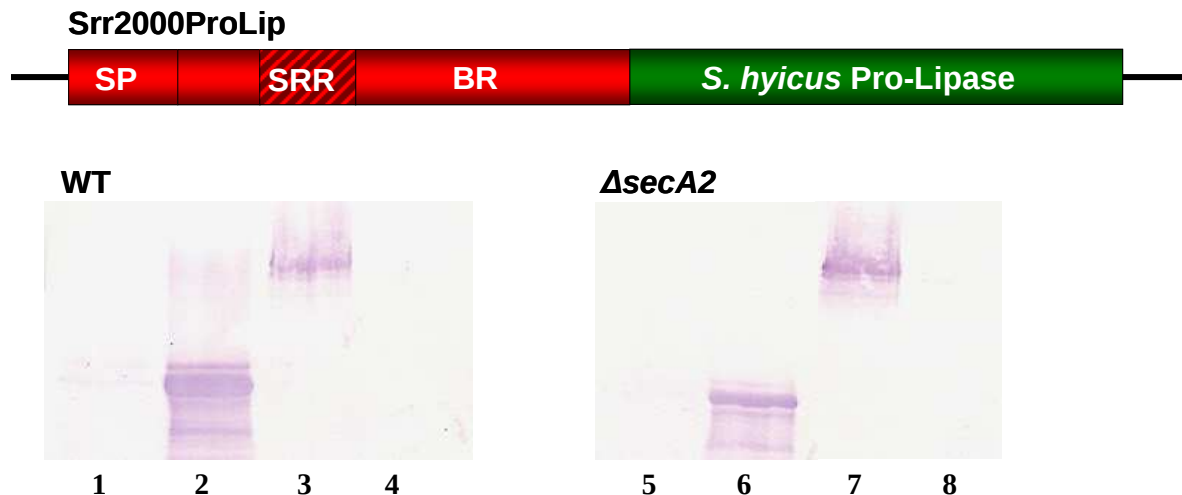


Abbildung 16: Export der *S. hyicus* Wildtyp-Lipase und des Srr2000ProLip-Proteins in *S. carnosus*.

Western Blot-Analyse zur Untersuchung der Lokalisierung der Lipasen unter Einsatz des Anti-*S. hyicus* Lipase-Antikörpers. Aufgetragen sind *S. carnosus* Wildtyp (Spur 1-4) und die DeltaA2-Mutante (Spur 5-8), welche in Gesamtzellen (Spur 1, 3, 5 und 7) sowie Überstände (Spur 2, 4, 6 und 8) fraktioniert wurden. Es wurde entweder die *S. hyicus* Wildtyp-Lipase (Spuren 1 und 2 bzw. 5 und 6) oder das Srr2000ProLip-Protein (Spur 3 und 4 bzw. 7 und 8) exprimiert.

Wie in Abbildung 16 zu erkennen, zeigt das Srr2000ProLip-Fusionsprotein einen vollständigen Exportblock, sowohl im *S. carnosus* Wildtyp (Spur 3 und 4) wie auch in der DeltaA2-Mutante (Spur 7 und 8). Dieses Fusionsprotein kann folglich in *S. carnosus* nicht über den klassischen Sec-Weg transloziert werden, möglicherweise weil diese Fusion den Bereich des *S. aureus* Srr-Proteins beinhaltet, der dies verhindert. Bei diesem Protein handelt es sich aufgrund der Fusion mit der *S. hyicus* Pro-Lipase jedoch um ein sehr großes Protein mit einem Molekulargewicht von 146,9 kDa. Ein Ausbleiben der Translokation könnte daher auch z.B. durch eine Faltung des sehr großen Fusionsproteins in eine exportinkompatible Form bedingt sein. Um genauer zu analysieren, ob der im Srr2000ProLip-Protein vorhandene Teil des Srr-Proteins zu einem Ausschluss von der Sec1-Translokation führt, wurde daher die Sekretion von verkürzten authentischen SecA2/SecY2-Substraten in *S. carnosus* untersucht.

III.1.3.3 Analyse der Translokation von verkürzten, authentischen SecA2/SecY2-Substraten in *S. carnosus*.

Das Srr2000ProLip-Fusionsprotein wird in *S. carnosus* nicht mehr über den Sec1-Weg transloziert. Dies könnte darin begründet liegen, dass in diesem Protein die Determinante des *S. aureus* Srr enthalten ist, die eine Translokation der SecA2/SecY2-Substrate über den klassischen Sec-Weg verhindert. Um dies genauer zu untersuchen, wurde die Translokation von verkürzten Versionen authentischer Srr-Proteine analysiert, die den in der Srr2000ProLip-Fusion vorhandenen Bereich des Srr-Proteins beinhalten. Hierzu wurde eine

verkürzte Version des *S. aureus* Srr, aber auch des in III.3.1.1 identifizierten *S. carnosus* Srr konstruiert. Neben Signalpeptid, Translokations-Initiations-Domäne, der ersten Serin-reichen Region (SRR) und der basischen, nicht-repetitiven Region besitzen diese Proteine auch noch die ersten 186 (*S. carnosus* Srr) bzw. die ersten 189 (*S. aureus* Srr) Aminosäuren der zweiten Serin-reichen Region (SRR-2) (Abbildung 17).

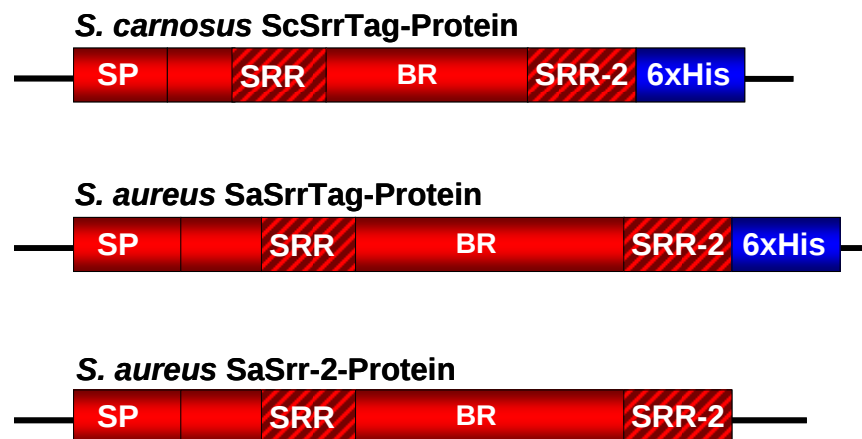


Abbildung 17: Verkürzte *S. carnosus* und *S. aureus* Srr-Proteine. SP: Signalpeptid; SRR, SRR-2: Serin-reiche-Region; BR: basische Region. 6xHis: angehangener 6xHis-Tag für die Detektion.

Da der zur Verfügung stehende Anti-Srr2000ProLip-Antikörper zwar das *S. aureus* Srr erkennt (Abbildung 8), seine Reaktivität mit dem *S. carnosus* Srr jedoch nicht sicher ist, wurden Versionen beider Srr-Proteine konstruiert, die über einen C-terminalen 6xHis-Tag verfügen. Bei der Sequenzierung des im *S. carnosus* Chromosom vorliegenden *srr*-Gen wurde wie unter III.3.1.5 beschrieben ein Stop-Codon an Position 729 festgestellt. Dieses Stop-Codon führt zu einem Abbruch der Synthese des *S. carnosus* Srr-Proteins noch vor der ersten Serin-reichen Region. Bei der Amplifikation des *S. carnosus* *srr*-Teilgens wurde dieses Stop-Codon daher über „cross-over“-PCR gegen ein für Tyrosin kodierendes Codon ausgetauscht (TAA wurde zu TAT umgewandelt). Das so konstruierte *scSrrTag*-Gen und das gewünschte *S. aureus* *srr*-Teilgen, *saSrrTag*, wurden in den *E. coli*/*S. carnosus*-„shuttle“-Vektor pXR100 kloniert und die Expression der kodierten Proteine wurde anschließend in *E. coli* über Western Blot mit Anti-Srr2000ProLip-Antikörper und Anti-5xHis-Antikörper überprüft (Abbildung 18).

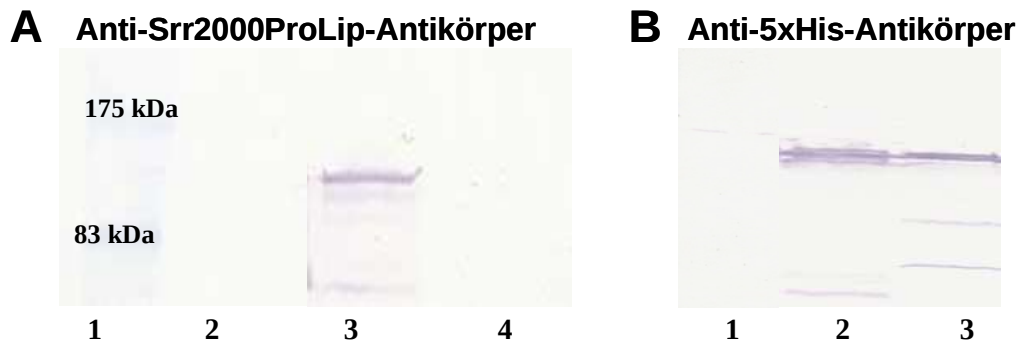


Abbildung 18: Expression der SaSrrTag- und ScSrrTag-Proteine in *E. coli* JM109.

(A) In Spur 1 ist der BR-Protein-Größenstandard aufgetragen. In Spur 2-4 sind *E. coli* Gesamtzellproteine aus dem Stamm mit dem Leervektor (Spur 2), dem SaSrrTag-Expressionsvektor (Spur 3) und dem ScSrrTag-Expressionsvektor (Spur 4) aufgetragen. Detektion im Western Blot erfolgte mit dem Anti-Srr2000ProLip-Antikörper.

(B) Aufgetragen sind *E. coli* Gesamtzellproteine aus dem Stamm mit dem Leervektor (Spur 1), dem ScSrrTag-Expressionsvektor (Spur 2) und dem SaSrrTag-Expressionsvektor (Spur 3). Detektion im Western Blot erfolgte mit dem Anti-5xHis-Antikörper.

Wie in Abbildung 18 zu erkennen, zeigt ein *E. coli* JM109-Stamm mit dem pXR100-Leervektor keinerlei Reaktion mit beiden verwendeten Antikörpern (Abbildung 18 A, Spur 2 und Abbildung 18 B, Spur 1). Mit dem Anti-Srr2000ProLip-Antikörper kann man die Expression des SaSrrTag-Proteins (Abbildung 18 A, Spur 3), aber nicht die des ScSrrTag-Proteins (Abbildung 18 A, Spur 4) detektieren. Betrachtet man hingegen die Reaktivität mit dem Anti-5xHis-Antikörper, so zeigen beide His-getaggten Proteine deutliche Banden im Western Blot (Abbildung 18 B, Spur 2 und 3). Die Tatsache, dass das ScSrrTag-Protein durch den 6xHis-Antikörper, jedoch nicht durch den Anti-Srr2000ProLip-Antikörper detektierbar ist, zeigt, dass trotz der Homologie der beiden Srr-Proteine der Antikörper gegen das *S. aureus*/*S. hyicus*-Fusions-Protein für die Detektion des verkürzten *S. carnosus* Srr ungeeignet ist. Da das SaSrrTag-Protein mit dem Anti-Srr2000ProLip-Antikörper reagiert, wurde auch eine Version des *S. aureus* Srr-Teilgens, die keinen 6xHisTag kodiert, auf pXR100 kloniert (*saSrr-2*, Abbildung 17). Hierdurch sollten mögliche negative Einflüsse des 6xHis-Tags auf das „targeting“ oder die Translokation des Srr-Teilproteins ausgeschlossen werden. Die Expressionsvektoren für das ScSrrTag- und das SaSrr2-Protein wurden in den *S. carnosus* Wildtyp und die DeltaA2-Mutante transformiert. Die kodierten Proteine ScSrrTag und SaSrr-2 verfügen beide nicht mehr über den für die Srr-Proteine charakteristischen LPXTG-Zellwand-Anker und sollten folglich in einem Gram-positiven Bakterium wie *S. carnosus* im Überstand zu finden sein, wenn ein „targeting“ und eine Translokation stattfinden. Daher wurden für beide Proteine in den beiden Stämmen die Überstands- und Gesamtzellproteine über Western Blot-Analyse untersucht (Abbildung 19).

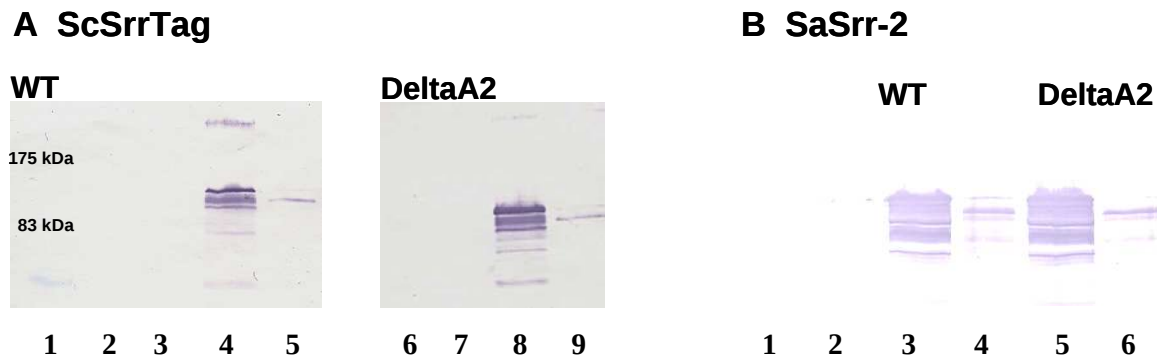


Abbildung 19: Lokalisation der ScSrrTag- und SaSrr-2 Proteine in *S. carnosus*.

(A) Lokalisierung des ScSrrTag-Proteins. Spur 1: BR-Protein-Größenstandard. Aufgetragen sind Proteine aus *S. carnosus* Wildtyp (Spur 2-5) und DeltaA2-Mutante (Spur 6-9), welche in Gesamtzellen (Spur 2, 4, 6 und 8) sowie Überstände (Spur 3, 5, 7 und 9) fraktioniert wurden. Die Stämme enthielten entweder den Leervektor (Spuren 2 und 3 bzw. 6 und 7) oder den ScSrrTag-Expressionsvektor (Spur 4 und 5 bzw. 8 und 9). Zur Detektion wurde der Anti-5xHis-Antikörper eingesetzt. Der Stern markiert das ScSrrTag-Vorläuferprotein.

(B) Lokalisierung des SaSrr-2 Proteins in *S. carnosus* Wildtyp (Spur 3 und 4) und DeltaA2-Mutante (Spur 5 und 6). Aufgetragen wurden Gesamtzellproteine (Spur 3 und 5) sowie Proteine des Überstands (Spur 4 und 6). Detektion im Western Blot erfolgte mit dem Anti-Srr2000ProLip-Antikörper. Als Negativ-Kontrolle dienen Gesamtzellfraktion (Spur 1) und Überstandsfraktion (Spur 2) eines *S. carnosus* Wildtyp Stamms mit dem Leervektor.

In Abbildung 19 A wurde die Lokalisierung des ScSrrTag-Proteins in *S. carnosus* Wildtyp (Spur 2-5) und DeltaA2-Mutante (Spur 6-9) untersucht. Proteine aus Gesamtzellen und Überständen aus beiden Stämmen mit nur dem Leervektor zeigen keinerlei Reaktivität mit dem Anti-5xHis-Antikörper (Spur 2 und 3 bzw. 6 und 7). Sowohl im Wildtyp wie auch in der DeltaA2-Mutante ist das ScSrrTag-Protein hauptsächlich intrazellulär lokalisiert (Spur 4 und 8, das Vorläuferprotein ist mit einem Stern markiert), wo ein proteolytischer Abbau eines Teils des Proteins stattfindet. Jedoch wird in beiden Stämmen auch ein geringer Teil des ScSrrTag-Proteins in den Überstand exportiert, wie die Anwesenheit einer Bande mit etwas geringerer Größe als die des Vorläuferproteins zeigt (Spur 5 und 9). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um die prozessierte, reife Form des ScSrrTag. Auffällig ist auch eine Bande mit sehr großer Laufhöhe in den Zellen (Spur 4 und 8). Bei dieser Bande könnte es sich um eine aggregierte Form des ScSrrTag-Proteins handeln.

Die Lokalisierung des SaSrr-2-Proteins ist in Abbildung 19 B zu erkennen. Für die Detektion wurde der Anti-Srr2000ProLip-Antikörper eingesetzt, der ebenfalls keine Reaktion mit Proteinen aus einem *S. carnosus* Stamm mit nur dem Leervektor (Abbildung 19 B, Spur 1 und 2) zeigt. Wie auch bei der Lokalisierung des ScSrrTag zeigt sich für das SaSrr-2, dass der Großteil des Proteins sowohl im *S. carnosus* Wildtyp wie auch in der DeltaA2-Mutante als Vorläuferprotein in der Zelle akkumuliert, wo dieses intrazellulär abgebaut wird (Abbildung 19 B, Spur 4 und 6). Jedoch ist auch für das SaSrr-2-Protein der Export eines geringen Teils in den Überstand beider Stämme erkennbar (Spur 4 und 6).

Die Translokation beider Srr-Teilproteine mit gleicher Effizienz in Wildtyp und DeltaA2-Mutante zeigt, dass ein Export dieser Proteine über den Sec1-Weg möglich ist. In diesen Proteinen ist die Determinante, die eine Translokation der SecA2/SecY2-Proteine über den klassischen Sec-Weg verhindert, folglich nicht enthalten.

III.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zum „targeting“ von SecA2/SecY2-Substraten in *B. subtilis*, *E. coli* und *S. carnosus*.

Bei Untersuchungen in *E. coli* konnte gezeigt werden, dass das authentische SecA2/SecY2-Substrat von *S. aureus* nicht über die klassische Sec-Translokase von *E. coli* transloziert werden kann. Die Untersuchungen der Translokation eines klassischen Sec-Substrats, bei dem das Signalpeptid gegen das eines SecA2/SecY2-Proteins ausgetauscht wurde, zeigten, dass das SecA2/SecY2-Signalpeptid in *E. coli* und *S. carnosus* eine Translokation über den klassischen Sec1-Weg mit geringer Effizienz vermitteln kann. In *B. subtilis* hingegen wird ein solches Protein nicht über den klassischen Sec1-Weg transloziert.

In *S. carnosus* konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass auch eine Fusion des Signalpeptids und der putativen Translokations-Initiations-Domäne eines SecA2/SecY2-Substrats vor ein klassisches Sec-Substrat zu einer Translokation dieses Proteins über den Sec1-Weg führt. Ferner wurde gezeigt, dass das „targeting“ an die Sec1-Translokase in *S. carnosus* nicht auf Hybrid-Substrate beschränkt ist, sondern auch für verkürzte authentische Srr-Proteine aus *S. carnosus* und *S. aureus* stattfindet. Hier wurde beobachtet, dass selbst Proteine, die über den gesamten nicht-repetitiven Bereich der Srr-Proteine und einen Teil der zweiten Serinreichen Region verfügen, immer noch über den Sec1-Weg transloziert werden können.

III.2 Untersuchung der Wechselwirkungen des *S. aureus* SecA2-Proteins mit Komponenten der Sec1-Translokase.

Für Mycobakterien und Listerien, in denen nur ein SecA2-Protein und keine weiteren akzessorischen Translokase-Komponenten vorhanden sind, ist es höchstwahrscheinlich, dass das SecA2-Protein mit den Komponenten der klassischen Sec1-Translokase Wechselwirkungen eingeht, damit es in der Proteintranslokation aktiv werden kann. Die SecA2/SecY2-abhängige Proteintranslokation in Staphylokokken und Streptokokken ist aufgrund der Vielzahl von beteiligten Komponenten, die teilweise eine Homologie zu den Komponenten der Sec1-Translokase aufweisen, wahrscheinlich von der Sec1-Translokase

unabhängig. Dennoch ist es bislang nicht ausgeschlossen, dass auch die SecA2-Proteine aus Staphylokokken und Streptokokken Wechselwirkungen mit der klassischen Sec-Translokase eingehen können. Dies wurde daher im Folgenden analysiert.

III.2.1 Das *S. aureus* SecA2 kann mit Komponenten der *B. subtilis* Sec1-Translokase und einem klassischen Sec-Substrat keine funktionellen Wechselwirkungen eingehen.

Es sollte untersucht werden, ob SecA2-Proteine aus Bakterien mit einem SecA2/SecY2-Translokationssystem in der Lage sind, mit der klassischen Sec-Translokase zu interagieren. Um dies zu analysieren, wurde zuerst die Aktivität des *S. aureus* SecA2 bei der Proteintranslokation der *S. hyicus* Lipase, eines klassischen Sec-Substrats, in einer SecA-Mutante von *B. subtilis* untersucht.

Für diese Untersuchungen wurde die temperatursensitive *B. subtilis* SecA-Mutante NIG1152 eingesetzt. In NIG1152 wird das SecA-Protein aufgrund einer Punktmutation bei der nicht-permissiven Temperatur von 42°C instabil, was zu einem Ausbleiben der Sec-abhängigen Proteintranslokation und einem Wachstumsdefekt führt (Takamatsu *et al.*, 1992). Dieser Block der Proteintranslokation ermöglicht es bei 42°C den Proteinexport in *B. subtilis* mit heterologen SecA-Proteinen zu untersuchen. In *B. subtilis* ist keine SecA2/SecY2-Translokase vorhanden. Daher kann das *S. aureus* SecA2 bei heterologer Expression in der NIG1152-Mutante nur eine Translokation der Lipase unter nicht-permissiven Bedingungen ermöglichen, wenn es mit den Komponenten der Sec1-Translokase wechselwirken kann.

Aus einer vorherigen Arbeit (Caspers, 2002) lagen Stämme von NIG1152 vor, die entweder bereits den pWH1520-Leervektor, oder Derivate für die Expression des *B. subtilis* SecA (pMKL40), des *S. aureus* SecA1 (pWSaA1) oder des *S. aureus* SecA2 (pWSaA2), trugen. Die durch Xylose induzierbare und durch Glukose reprimierbare Expression der verschiedenen auf pWH1520 klonierten *secA*-Gene war bereits in vorherigen Experimenten verifiziert worden (Caspers, 2002). Diese *B. subtilis* NIG1152-Stämme wurden mit dem Vektor pLipPS1kan transformiert, auf dem das *S. hyicus* Lipase-Gen unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors vorliegt. Eine Kinetik für den Export der *S. hyicus* Lipase wurde in diesen Stämmen mittels „Pulse-Chase“ ermittelt.

Für die Aufnahme der Exportkinetik wurden die Zellen unter Induktion mit Xylose bei 30°C bzw. 42°C inkubiert, um den Export der Lipase bei diesen Temperaturen vergleichen zu können. Für die spätere Immunopräzipitation wurde Anti-*S. hyicus* Lipase-Antikörper verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

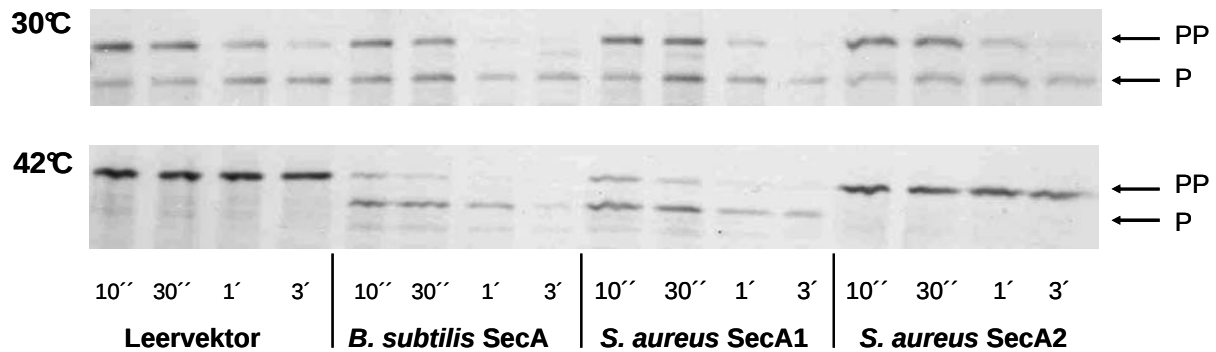


Abbildung 20: Kinetik des Proteinexports der *S. hyicus* Lipase in *B. subtilis* NIG1152. Untersuchungen in einem „Pulse-Chase“-Experiment erfolgten bei der permissiven Temperatur (30°C) sowie bei der nicht-permissiven Temperatur (42°C). Neben einem Stamm mit dem Leervektor pWH1520 wurden Stämme untersucht in denen entweder das *B. subtilis* SecA, das *S. aureus* SecA1 oder das *S. aureus* SecA2 exprimiert wurde. Bei Proteinexport findet eine Prozessierung des Vorläuferproteins, der Prä-Pro-Lipase (pp), in die kleinere Pro-Lipase (p) durch Abspaltung des Signalpeptids statt. Probenentnahme erfolgte nach 10 sek, 30 sek, 1 min und 3 min.

Wie in Abbildung 20 zu erkennen, erfolgt bei der permissiven Temperatur von 30°C in allen untersuchten Stämmen ein Proteinexport der *S. hyicus* Lipase. Dies wird durch eine Prozessierung des Prä-Pro-Lipase Vorläuferproteins (pp) in die reife Form der Pro-Lipase (p) erkennbar. Die Effizienz der Translokation ist in den verschiedenen Expressionsstämmen leicht unterschiedlich. Während die Prozessierung der Prä-Pro-Lipase in einem Stamm mit dem Leervektor am langsamsten verläuft, wird sie durch parallele Expression einiger der SecA-Proteine beschleunigt. Hierbei zeigt das *S. aureus* SecA2 keinen Effekt, während die Expression des *S. aureus* SecA1 und vor allem des *B. subtilis* SecA zu einer deutlicheren Beschleunigung der Translokation bei der permissiven Temperatur führen.

Betrachtet man im Vergleich den Export der *S. hyicus* Lipase bei der nicht-permissiven Temperatur von 42°C, so ist als erstes der erwartete vollständige Exportblock im Stamm mit dem Leervektor zu erkennen. Es findet keine Prozessierung des Vorläuferproteins in die reife Form statt. Dieser Exportdefekt wird bei Expression des *B. subtilis* SecA vollständig komplementiert. Aufgrund der höheren Temperatur erfolgt die Prozessierung sogar deutlich schneller als bei der permissiven Temperatur. Das *S. aureus* SecA1 komplementiert den Exportdefekt der *S. hyicus* Lipase genauso effizient wie das *B. subtilis* SecA. Im Gegensatz zum *S. aureus* SecA1 kann die Expression des *S. aureus* SecA2 den Exportdefekt der *S. hyicus* Lipase bei nicht-permissiver Temperatur nicht komplementieren. Wie in dem Stamm mit dem Leervektor findet hier keine Prozessierung statt. Das *S. aureus* SecA2 ist folglich nicht in der Lage, die benötigten produktiven Wechselwirkungen mit der *B. subtilis* Translokase und einem klassischen Sec-Substrat einzugehen. Vorherige Arbeiten haben gezeigt, dass an der Ausbildung eines Translokations-Initiations-Komplexes, der für die Translokation essentiell ist, SecA, SecY und das Vorläuferprotein als gleichwertige Partner beteiligt sind (Tippe, 2001). Es ist denkbar, dass die Wechselwirkung zwischen dem SecA2-

Protein und sowohl der Sec1-Translokase wie auch dem klassischen Sec-Substrat gestört sind. Es ist aber ebenfalls möglich, dass die Translokation des klassischen Sec-Substrats nicht aufgrund mangelnder Wechselwirkung des SecA2-Proteins mit der Sec1-Translokase, sondern durch ein Ausbleiben der Interaktion des SecA2 mit dem klassischen Sec-Substrat verhindert wird. Dies ist vorstellbar, da das *S. aureus* SecA2 evolutionär an die Translokation eines oder weniger spezifischer Substrate angepasst ist und daher auch möglicherweise nur noch ein solches Substrat erkennt. Bei dem in den vorherigen Versuchen eingesetzten SrrSPProLip-Protein handelt es sich wahrscheinlich um ein solches Substrat. Daher sollte untersucht werden, ob das *S. aureus* SecA2 gemeinsam mit den klassischen Sec-Komponenten von *B. subtilis* die Translokation dieses Proteins ermöglichen kann.

III.2.2 Chromosomale Integration der *S. aureus* secA-Gene in *B. subtilis* NIG1152.

Es sollte untersucht werden, ob das *S. aureus* SecA2 in der Lage ist, funktionelle Wechselwirkungen mit der Sec1-Translokase von *B. subtilis* und einem Protein mit einem SecA2/SecY2-Signalpeptid einzugehen. Dies sollte anhand der Translokation des SrrSPProLip-Proteins untersucht werden. Hierzu mussten sowohl SecA2 wie auch SrrSPProLip gleichzeitig in *B. subtilis* exprimiert werden. Um dies zu ermöglichen, wurde die Integration des *S. aureus* secA2 und als eine Kontrolle ebenfalls des *S. aureus* secA1 in das Chromosom von *B. subtilis* NIG1152 durchgeführt. In diese Integrations-Stämme sollte dann für die parallele Expression des SrrSPProLip-Proteins der entsprechende Expressionsvektor eingebracht werden. Für die chromosomale Integration wurde ein von Kim *et al.* (1996) entwickeltes System verwendet, mit dem eine Integration in den *amyE*-Lokus von *B. subtilis* ermöglicht wird. Bei diesem System findet der pX-Vektor Anwendung, der in *B. subtilis* nicht replizieren kann. Nach Transformation in *B. subtilis* und Selektion auf die Chloramphenicol-Resistenzkassette des Vektors erhält man folglich nur Klone, wenn eine Integration des Vektors in das Chromosom stattfindet. Diese chromosomale Integration kann über Bereiche, die zum *amyE*-Gen von *B. subtilis* homolog sind und auf dem Vektor vorliegen, erfolgen. Diese Bereiche flankieren die Resistenzkassette, das Gen für den XylR-Repressor, die „Multiple Cloning Site“ (MCS) des Vektors und einen *xylA*-Promotor, der die Expression von in die MCR klonierten Genen steuert. Gene, die in die MCS kloniert werden, integrieren folglich mit in das *B. subtilis* Chromosom. Das *S. aureus* secA1 und secA2-Gen wurden in den pX-Vektor kloniert und die resultierenden Vektoren pXSaA1 und pXSaA2 sowie der pX-Leervektor in *B. subtilis* NIG1152 über natürliche Kompetenz transformiert. Es wurde auf Chloramphenicol-resistente Klone selektioniert und von den erhaltenen Klonen

chromosomale DNA präpariert. Über PCR wurde die Anwesenheit des *S. aureus secA1*- bzw. *secA2* Gens im *B. subtilis* Chromosom verifiziert (Abbildung 21).

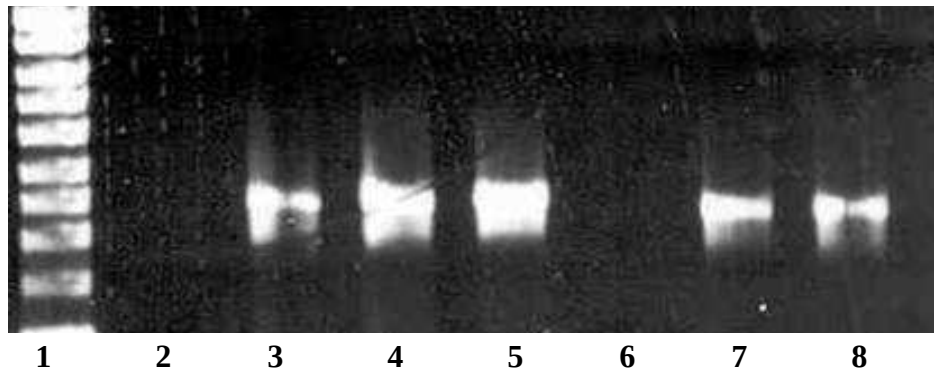


Abbildung 21: PCR- Verifikation der Anwesenheit der *S. aureus secA*-Gene in den NIG1152 pX-Integrationsstämmen. Spur 1: „Smart Ladder“ Größenstandard; In Spur 2-5 wurden PCR-Reaktionen aufgetragen, die mit *S. aureus secA1*-spezifischen Primern durchgeführt worden sind. Hierbei wurde als „template“ chromosomale DNA von NIG1152 (Spur 2), der pUCSaA1-Vektor (Spur 3) oder chromosomale DNA von potentiellen *secA1*-Integrationsmutanten von NIG1152 (Spur 4 und 5) eingesetzt. In Spur 6-8 wurden PCR-Reaktionen aufgetragen, die mit *S. aureus secA2*-spezifischen Primern durchgeführt worden sind. Hierbei wurde als „template“ chromosomale DNA von NIG1152 (Spur 6), der pUCSaA2-Vektor (Spur 7) oder chromosomale DNA einer potentiellen *secA2*-Integrationsmutanten von NIG1152 (Spur 8) eingesetzt.

Wie in Abbildung 21 zu erkennen, liefert eine PCR-Analyse mit Primern, die für das *S. aureus secA1* (Spur 2-5) oder das *S. aureus secA2* (Spur 6-8) spezifisch sind, mit chromosomaler DNA aus NIG1152 (Spur 2 und 6) kein Produkt. PCR-Reaktionen mit einem *S. aureus secA1*- (Spur 3) oder einem *S. aureus secA2*-Expressionsvektor (Spur 7) als „template“ wurden als Positiv-Kontrollen durchgeführt. Hierbei ergibt sich für das *secA1* ein Produkt von 2,5 kB Größe (Spur 3) und für das *secA2* ein 2,4 kB großes Produkt (Spur 7). Den jeweiligen Positiv-Kontrollen entsprechend große Produkte werden ebenfalls amplifiziert, wenn chromosomale DNA der potentiellen *S. aureus secA1* (Spur 4 und 5)- oder *S. aureus secA2* (Spur 8)-Integrationsmutanten von NIG1152 als „template“ eingesetzt wird. Dies zeigt, dass das *S. aureus secA1* bzw. *secA2* erfolgreich in das Chromosom von NIG1152 integriert wurde. Die Integrationsmutanten werden im Folgenden als NIGSaA1 und NIGSaA2 bezeichnet.

Bei einer Integration in das *amyE*-Gen wird dieses disruptiert. Integrationsstämme exprimieren folglich keine funktionelle α -Amylase mehr und bilden keine Höfe auf stärkehaltigen Agarplatten. Um eine Integration von pX, pXSaA1 und pXSaA2 am korrekten Ort im *B. subtilis* Chromosom zu verifizieren, wurden die NIG1152-Integrationsstämme und der NIG1152-Ausgangsstamm daher auf stärkehaltige Agarplatten aufgetropft. Die Integrations-Stämme zeigten im Gegensatz zu NIG1152 keine Hofbildung, was die Integration an der korrekten Stelle im Chromosom beweist (ohne Abbildung).

Um die Expression des *S. aureus* SecA1 und SecA2 in den Integrationsstämmen untersuchen zu können, wurde eine Western Blot-Analyse mit Anti-*S. carnosus* SecA1-Antikörpern

durchgeführt (Abbildung 22). Der Anti-*S. carnosus* SecA1-Antikörper wurde verwendet, da keine direkt gegen die *S. aureus* SecA-Proteine gerichteten Antikörper verfügbar waren. Darüber hinaus war bekannt, dass der *S. carnosus* SecA1-Antikörper mit dem *S. aureus* SecA1 stark reagiert und auch mit den *S. aureus* SecA2 eine, wenn auch sehr schwache Reaktivität zeigt. Hierzu wurden die *B. subtilis* NIG1152-Integrationsmutanten in Gegenwart von 0,5% Xylose oder 0,5% Glukose bei 30°C angezogen und nach 5h Gesamtzellextrakte hergestellt.

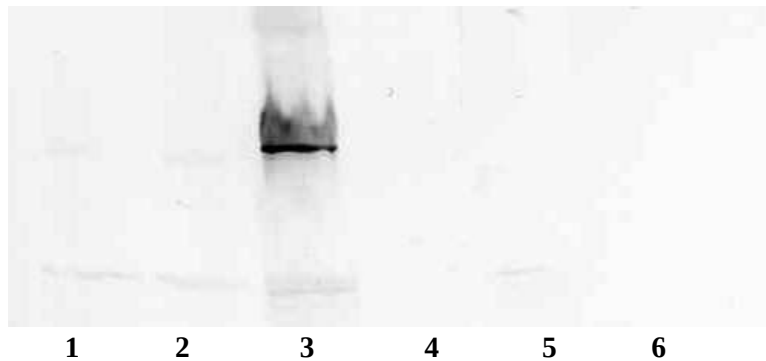


Abbildung 22: Western Blot zum Nachweis der SecA-Expression in *B. subtilis* NIG1152.

Anzucht der Zellen erfolgte entweder unter Induktion mit 0,5% Xylose (Spur 1, 3 und 5) oder Repression mit 0,5% Glukose (Spur 2, 4 und 6) für 5h bei 30°C. In Spur 1 und 2 sind Gesamtzellextrakte des Ausgangsstammes NIG1152 aufgetragen, in Spur 3 und 4 Gesamtzellextrakte der *S. aureus secA1*-Integrationsmutante und in Spur 5 und 6 Gesamtzellextrakte der *S. aureus secA2*-Integrationsmutante. Proteinmengen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,5 normiert. Als primärer Antikörper wurde Anti-*S. carnosus* SecA1-Antikörper eingesetzt.

In Abbildung 22 erkennt man, dass der eingesetzte Anti-*S. carnosus* SecA1-Antikörper nicht mit dem chromosomalen *B. subtilis* SecA des NIG1152-Stammes reagiert, da in den Spuren 1 und 2 keine Bande zu erkennen ist. Bei Induktion des *xylA*-Promotors mit Xylose ist es jedoch in dem Stamm mit der *S. aureus secA1*-Integration möglich, eine deutliche Bande oberhalb von 83 kDa zu detektieren (Spur 3). Hierbei handelt es sich um das *S. aureus* SecA1- Protein, das eine vorausgesagte Masse von 96 kDa besitzt. Unter Repression der Genexpression (Spur 4) ist kein SecA1 zu sehen. In dem Stamm mit der *S. aureus secA2*-Integration ist das *S. aureus* SecA2 jedoch weder unter Induktion noch Repression detektierbar. Dies kann möglicherweise daran liegen, dass der verwendete Anti-*S. carnosus* SecA1-Antikörper bereits mit einer sehr großen Menge an *S. aureus* SecA2, wie es bei plasmidgekoppelter Expression gebildet wird, kaum reagiert (Caspers, 2002). Für eine deutlich geringere Menge, wie sie höchstwahrscheinlich von nur einer chromosomalen Kopie synthetisiert wird, ist es daher gut vorstellbar, dass eine Reaktion komplett ausbleibt. Ein Nachweis der *S. aureus* SecA2-Expression ist jedoch zwingend erforderlich, und daher wurde ein polyklonaler Antikörper gegen das *S. aureus* SecA2 hergestellt.

Hierzu musste das *S. aureus* SecA2-Protein sauber isoliert werden. In einem *E. coli* JM109-Stamm mit dem *S. aureus secA2*-Expressionsvektor ist das *S. aureus* SecA2 eine der dominanten Banden im Gesamtzellextrakt und es wandern in einem SDS-Gel auf Höhe des

S. aureus SecA2 auch keine weiteren, *E. coli* spezifischen, Proteine (Abbildung 23; markiert durch einen Pfeil).

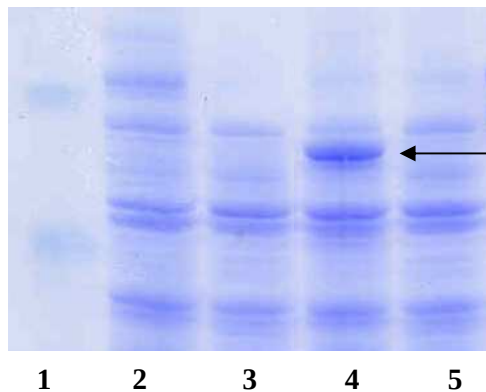


Abbildung 23: Expression des *S. aureus* SecA2 in *E. coli* JM109. Die Anzucht der Zellen erfolgte entweder mit 1 mM IPTG (Spur 2 und 4) oder ohne weiteres Supplement (Spur 3 und 5). Spur 1: BR Protein Größenstandard; Spur 2 und Spur 3: Gesamtzellextrakte von *E. coli* JM109 mit pUC18 Leervektor; Spur 4 und 5: Gesamtzellextrakte von *E. coli* JM109 mit pUCSaA2 (SecA2-Expressionsvektor). Der Pfeil markiert die Bande, die dem *S. aureus* SecA2-Protein entspricht.

Daher konnte die benötigte große Menge an *S. aureus* SecA2-Protein aus Gesamtzellextrakten dieses Stammes nach SDS-PAGE isoliert werden. Anschließend wurde wie unter II.6.8 beschrieben verfahren. Die Reaktivität des Antikörpers wurde in einem Western Blot getestet. Hierzu wurden Gesamtzellextrakte von *E. coli*-Stämmen mit dem Leervektor oder Expressionsvektoren für das *secA1* und *secA2* von *S. aureus* untersucht (Abbildung 24 A).

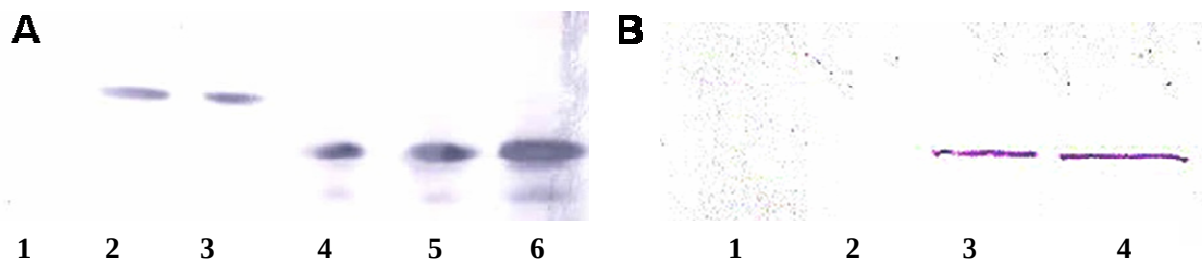


Abbildung 24: Western Blots mit Anti-*S. aureus* SecA2-Antikörper.

(A) Test der Reaktivität des SecA2-Antikörpers. Aufgetragen sind *E. coli* JM109 Gesamtzellextrakte nach 5h Induktion mit 1 mM IPTG. Spur 1: pUC18-Leervektorstamm (aufgetragene OD₆₀₀:0,4); Spur 2 und 3: Stamm mit *S. aureus secA1*-Expressionsvektor (OD₆₀₀: 0,2 bzw. 0,4); Spur 4, 5 und 6: Stamm mit *S. aureus secA2*- Expressionsvektor (OD₆₀₀: 0,05; 0,1; 0,2).

(B) Analyse der *S. aureus* SecA2-Expression in NIG1152 Integrationsstämmen. Aufgetragen sind *B. subtilis* Gesamtzellextrakte nach 6,5 h Induktion mit 0,5% Xylose bei 30°C. Spur 1 und 2: NIG1152 mit pX-Leervektorintegration (NIGpX); Spur 3 und 4: NIGSaA2 (*S. aureus secA2*-Integrationsstamm). Das aufgetragene Volumen wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,8 normiert.

Wie in Abbildung 24 A in Spur 1 zu erkennen, gibt es keine Kreuzreaktivität des Anti-*S. aureus* SecA2-Antikörpers mit den Proteinen aus dem Gesamtzellextrakt eines *E. coli*-Leervektorstammes. Der Antikörper zeigt starke Reaktivität mit dem *S. aureus* SecA2 (Abbildung 24 A, Spur 4-6) und eine geringe Reaktivität mit dem *S. aureus* SecA1 (Spur 2 und 3). Die Größe der detektierten Proteine entspricht hierbei den berechneten Größen von etwa 96 kDa (*S. aureus* SecA1) und 91 kDa (*S. aureus* SecA2). Die Reaktivität des Antikörpers mit dem *S. aureus* SecA1 liegt darin begründet, dass es immerhin 37% Identität zum *S. aureus* SecA2 aufweist.

Es wurde somit ein spezifischer Antikörper hergestellt, der eine starke Reaktivität mit dem *S. aureus* SecA2 aufweist. Dieser Antikörper wurde nun eingesetzt, um das *S. aureus* SecA2 in der NIGSaA2-Integrationsmutante zu detektieren. Hierzu wurden Gesamtzellextrakte des NIGSaA2-Stammes und eines NIG1152-Stammes mit Integration des pX-Leervektors (NIGpX) hergestellt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western Blot durchgeführt (Abbildung 24 B). Der Anti-*S. aureus* SecA2-Antikörper reagiert nicht mit *B. subtilis* eigenen Proteinen, wie das Fehlen einer Bande in den Spuren des NIGpX-Kontrollstammes zeigt (Abbildung 24 B, Spur 1 und 2). Es ist jedoch mit diesem Antikörper möglich die Expression des *S. aureus* SecA2 in NIGSaA2 zu detektieren (Spur 3 und 4).

Wie beschrieben, führt die Instabilität des mutierten SecA-Proteins der NIG1152-Mutante bei 42°C zu einem Wachstumsdefekt. Dieser Wachstumsdefekt kann nur durch die Expression eines SecA-Proteins, welches das *B. subtilis* SecA funktionell ersetzen kann, komplementiert werden. In den Integrationsstämmen wurde daher als nächstes der Einfluss der Expression der *S. aureus* SecA-Proteine auf den Wachstumsdefekt untersucht (Abbildung 25).

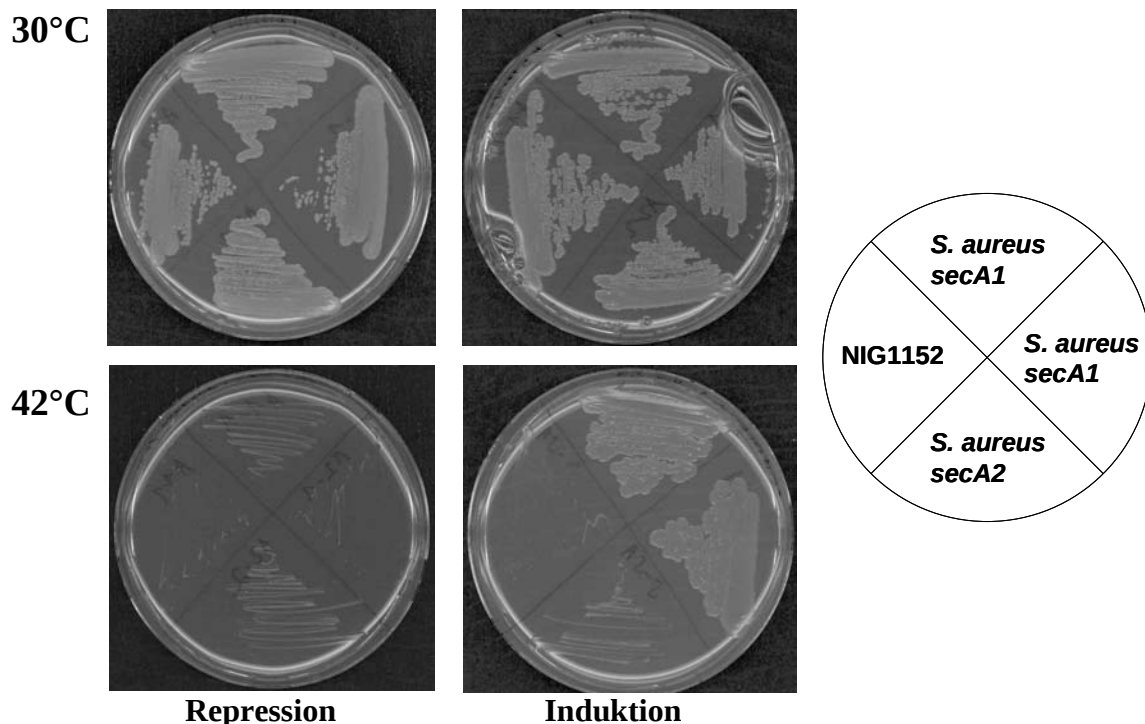


Abbildung 25: Einfluss der chromosomal integrierten *S. aureus* secA-Gene auf den Wachstumsdefekt von *B. subtilis* NIG1152. Verglichen ist das Wachstum bei der permissiven Temperatur von 30°C und der nicht-permissiven Temperatur von 42°C. Hierbei wurde dem Festmedium entweder 0,5% Glukose (Repression) bzw. 0,5% Xylose (Induktion) zugefügt um die xylA-abhängige Genexpression der integrierten secA-Gene zu induzieren oder zu reprimieren.

Wie in Abbildung 25 zu erkennen, können bei der permissiven Temperatur von 30°C alle untersuchten Stämme wachsen, unabhängig davon, ob Glukose zur Repression oder Xylose zur Induktion der integrierten secA-Gene im Medium vorhanden ist. Ebenso unabhängig von der Anwesenheit von Glukose oder Xylose zeigt der NIG1152-Ausgangsstamm bei der nicht-permissiven Temperatur von 42°C einen Wachstumsdefekt. Das *S. aureus* SecA1 kann diesen

Defekt komplementieren, allerdings nur, wenn seine Expression durch Xylose induziert wird. Das *S. aureus* SecA2 hingegen komplementiert den Wachstumsdefekt selbst bei Induktion der Expression durch Xylose nicht. Diese Unfähigkeit des *S. aureus* SecA2 den Wachstumsdefekt zu komplementieren zeigt, dass es zu keiner produktiven Wechselwirkung des SecA2, der klassischen *B. subtilis* Sec1-Translokase und den *B. subtilis* Vorläuferproteinen, deren Export für das Wachstum essentiell ist, kommt. Wie bereits oben erwähnt kann dies jedoch bereits daran scheitern, dass das *S. aureus* SecA2 nicht in der Lage ist, mit Exportsubstraten mit klassischen Sec-Signalpeptiden zu interagieren. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob eine funktionelle Wechselwirkung zwischen *S. aureus* SecA2, *B. subtilis* Sec-Translokase und einem Protein mit einem SecA2/SecY2-Signalpeptid möglich ist.

III.2.3 Funktionelle Wechselwirkungen zwischen *S. aureus* SecA2, Komponenten der *B. subtilis* Sec1-Translokase und einem Protein mit SecA2/SecY2-Signalpeptid finden nicht statt.

Um zu untersuchen, ob die Wechselwirkungen zwischen dem *S. aureus* SecA2, der *B. subtilis* Sec1-Translokase und den klassischen Sec-Substraten auf Ebene der Erkennung des Signalpeptids durch das SecA2 scheiterten, wurde die Translokation eines Substrats mit einem SecA2/SecY2-Signalpeptid untersucht.

Hierzu wurde erneut das SrrSPProLip-Protein eingesetzt. Das SrrSPProLip-Expressionsplasmid wurde in den Stamm NIGSaA2, bei dem die chromosomale Integration des *S. aureus* secA2 vorliegt, transformiert. Da in *B. subtilis* eine Translokation dieses Proteins über den Sec1-Weg nicht möglich ist (siehe III.1.2.1), würde eine Sekretion in den Überstand von NIGSaA2 zeigen, dass das *S. aureus* SecA2 gemeinsam mit der klassischen *B. subtilis* Sec-Translokase diesen Export vermittelt hat. Durch Anzucht bei 30°C unter Zugabe von 0,5% Xylose wurden gleichzeitig die *S. aureus* SecA2- und die SrrSPProLip-Expression induziert. Die in Gesamtzellfraktion und Überstand getrennten Proben wurden aufgearbeitet und nach SDS-PAGE in einem Western Blot mit Anti-*S. hyicus* Lipase-Antikörper auf den Export der Hybrid-Lipase untersucht (Abbildung 26).

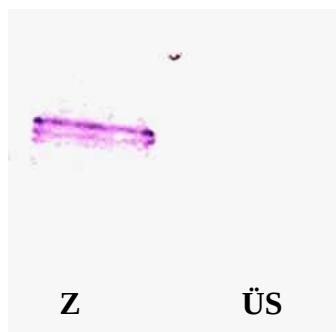


Abbildung 26: Analyse des SrrSPProLip-Exports in *B. subtilis* NIGSaA2. Aufgetragen sind Gesamtzellfraktion (Z) und Überstandsfraktion (ÜS) nach 6 h Induktion mit 0,5% Xylose bei 30°C. Die Proteinmengen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,4 normiert. Zur Detektion wurde der Anti-*S. hyicus* Lipase-Antikörper eingesetzt.

Wie in Abbildung 26 zu erkennen, akkumuliert die Hybrid-Lipase vollständig in der Gesamtzellfraktion (Z) und es findet keine Translokation in den Überstand (ÜS) statt. Das *S. aureus* SecA2-Protein ist folglich auch nicht in der Lage, produktive Wechselwirkungen mit Komponenten der *B. subtilis* Sec1-Translokase und einem Protein mit einem SecA2/SecY2-Signalpeptid einzugehen.

III.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der Wechselwirkungen des *S. aureus* SecA2-Proteins mit Komponenten der Sec1-Translokase von *B. subtilis*.

Bei der Expression der SecA-Proteine von *S. aureus* in einer temperatursensitiven SecA-Mutante von *B. subtilis* zeigte sich, dass das *S. aureus* SecA2 den Proteinexport- und Wachstumsdefekt dieser Mutante nicht komplementieren konnte. Funktionelle Wechselwirkungen des *S. aureus* SecA2 mit der *B. subtilis* Sec-Translokase und klassischen Sec-Substraten blieben aus. Um zu untersuchen, ob diese Wechselwirkungen daran scheiterten, dass das *S. aureus* SecA2 ein klassisches Sec-Substrat nicht mehr erkennen kann, wurde die Translokation eines Proteins mit einem SecA2/SecY2-Signalpeptid untersucht. Auch hier zeigte sich jedoch, dass das *S. aureus* SecA2 gemeinsam mit der Sec1-Translokase von *B. subtilis* eine solche Translokation nicht ermöglichen konnte.

III.3 Studium der Bedeutung der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in nicht-pathogenen Bakterien.

Die akzessorischen Sec2-Systeme wurden bislang fast ausschließlich in pathogenen Bakterien gefunden. In allen bislang daraufhin untersuchten Bakterien besteht ein Zusammenhang zwischen Pathogenität und Sec2-Proteintranslokation. Daher ist es von Interesse herauszufinden, ob Sec2-Systeme in nicht-pathogenen Bakterien eine Funktion besitzen. Für *S. carnosus*, einen nicht-pathogenen Verwandten von *S. aureus*, sollte untersucht werden, ob er über ein SecA2/SecY2-System verfügt und ob dieses funktionell ist. Bereits veröffentlichte Ergebnisse deuten daraufhin, dass gravierende Unterschiede in der Sec2-abhängigen Proteintranslokation von Bakterien mit nur einem SecA2- und solchen mit einem SecA2/SecY2-System bestehen. Daher soll die Bedeutung der Sec2-abhängigen Proteintranslokation auch in einem nicht-pathogenen Bakterium mit einem SecA2-System untersucht werden. Für diese Versuche wurde *C. glutamicum* ausgewählt, aus dessen veröffentlichter Genomsequenz ersichtlich war, dass er zu dieser Gruppe von Bakterien gehört.

III.3.1 Untersuchung der SecA2/SecY2-abhängigen Proteintranslokation in *S. carnosus*.

Die Komponenten für eine SecA2/SecY2-abhängige Proteintranslokation wurden bislang nur in pathogenen Gram-positiven Bakterien entdeckt. In der Tat scheint das SecA2/SecY2-System an der Pathogenität direkt oder indirekt beteiligt zu sein. Ein pathogenes Bakterium mit einem SecA2/SecY2-System ist *S. aureus*. Ein naher, aber nicht-pathogener Verwandter von *S. aureus* ist *S. carnosus*, der schon seit langem in der Lebensmittelindustrie als Starterkultur in der Wurstfermentation eingesetzt wird (Liepe, 1982). Für *S. carnosus* sollte untersucht werden, ob er wie sein pathogener Verwandter über ein SecA2/SecY2-System verfügt und wenn ja, welche Bedeutung diesem System in einem nicht-pathogenen Bakterium zukommt.

III.3.1.1 In *S. carnosus* liegt ein *secA2/secY2*-Operon vor.

Da das Genom von *S. carnosus* noch nicht vollständig sequenziert ist, war es nicht bekannt, ob hier ein *secA2/secY2*-Operon, wie es in pathogenen Staphylokokken und Streptokokken vorkommt, vorliegt. Um dies zu untersuchen, wurden Southern Blots durchgeführt. Da *S. aureus* und *S. carnosus* über einen hohen Verwandtschaftsgrad verfügen, ist auch auf Ebene der Genomsequenz eine hohe Ähnlichkeit vorhanden. Daher wurden das *S. aureus* *secA1*- und *secA2*-Gen als Sonden bei der Suche nach homologen Genen im *S. carnosus* Genom eingesetzt. Hierbei wurden die vollständigen Gene als DIG-markierte Sonden amplifiziert. Vor dem Southern Blot wurde chromosomale DNA von *S. carnosus* TM300 einem Restriktionsverdau mit entweder HindIII, EcoRI oder PstI unterzogen.

Die Ergebnisse des Southern Blots mit den *S. aureus* *secA1*- und *secA2*-Sonden ist in Abbildung 27 dargestellt.

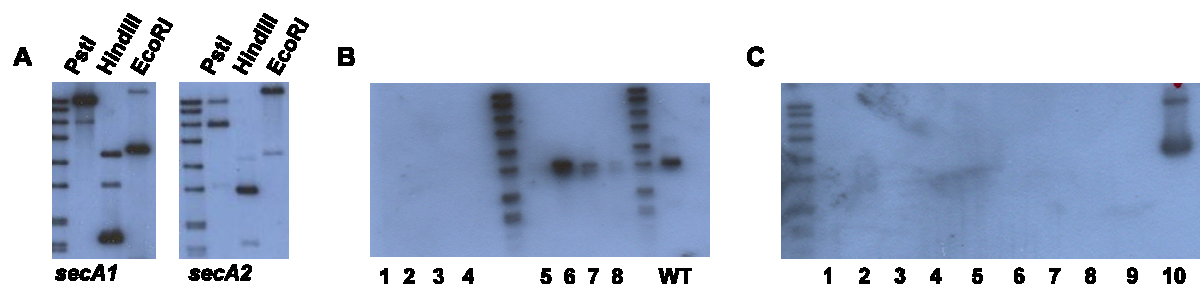


Abbildung 27: Southern Blots zur Identifizierung des *S. carnosus* *secA2*.

(A) Southern Blot der *S. aureus* *secA1*- bzw. *secA2*-Sonde mit PstI, HindIII oder EcoRI verdauter chromosomaler *S. carnosus* TM300 DNA

(B) Southern Blot der mit HindIII verdauten „pool“-Minipräparationen der *E. coli* pUC18-Klone, die potentiell das gesuchte 2,8 kB HindIII-Fragment enthalten; Spur 1-8: HindIII verdaute „pool“-Minipräparations-DNA wurde mit der *S. aureus* *secA2*-Sonde hybridisiert; WT: als Positivkontrolle wurde für die Hybridisierung HindIII verdaute chromosomale DNA des *S. carnosus* WT eingesetzt.

(C) Southern Blot mit den aus den zehn einzelnen Klonen aus „pool“ 6 isolierten Plasmiden und der *S. aureus* *secA2*-Sonde.

In Abbildung 27 A erkennt man, dass beide *secA*-Sonden mit der chromosomalen *S. carnosus* DNA aus allen drei Restriktionsverdau hybridisieren. Beide Sonden hybridisieren hierbei mit den gleichen DNA-Fragmenten, d. h. sie besitzen eine Affinität zu den gleichen Bereichen der chromosomalen DNA. Die Intensität der Reaktion und somit die Affinität der beiden *secA*-Sonden zu den verschiedenen Abschnitten der chromosomalen DNA ist jedoch stark unterschiedlich. So sind z. B. bei der Hybridisierung mit HindIII verdauter chromosomaler DNA für die *secA1*-Sonde zwei sehr starke Banden bei einer Größe von 4 kB und 1,6 kB und eine schwache Bande bei 2,8 kB erkennbar, während bei der *secA2*-Sonde die 2,8 kB Bande sehr intensiv ist und die anderen beiden Banden kaum zu erkennen sind. Diese unterschiedliche Affinität der beiden Sonden zu verschiedenen Abschnitten der chromosomalen DNA von *S. carnosus* wäre dadurch zu erklären, dass auf diesen unterschiedlichen Abschnitten verschiedene Kopien des *secA*-Gens vorliegen, von denen die eine hohe Homologie zum *S. aureus secA1* und die andere eine hohe Homologie zum *S. aureus secA2* besitzt. Ein solcher Abschnitt mit einer hohen Affinität zur *secA2*-Sonde stellt das 2,8 kB große Fragment nach dem HindIII-Verdau der chromosomalen DNA dar. Um dieses zu isolieren, wurden aus dem HindIII-Verdau der chromosomalen *S. carnosus* DNA-Fragmente mit einer Größe von 2,5-3 kB isoliert und in den pUC18-Vektor ligiert. Nach Transformation der Ligationsansätze in *E. coli* wurden von den erhaltenen Klonen achtmal jeweils 10 Klone in einer „pool“-Übernachtskultur angeimpft und die isolierten Plasmide nach HindIII-Verdau auf die Reaktivität mit der *S. aureus secA2*-Sonde hin in einem Southern Blot untersucht (Abbildung 27 B). Bei den „pools“ mit den Nummern 6, 7 und 8 zeigte sich eine Reaktivität auf der Höhe, bei der auch die HindIII verdaute chromosomale DNA (Abbildung 27 B, WT im Vergleich zu Spuren 6, 7 und 8) reagierte. Dies zeigte an, dass in diesen „pools“ zumindest einer der gepickten Klone den Vektor mit dem gesuchten 2,8 kB Fragment besitzt. Da „pool“ 6 die stärkste Reaktivität zeigte, wurden die 10 Klone, mit denen „pool“ 6 angeimpft worden war, vereinzelt, Plasmid-DNA aus ihnen isoliert und erneut ein Southern Blot mit der *S. aureus secA2*-Sonde durchgeführt (Abbildung 27 C). Wie zu erkennen, zeigt nur Klon 10 eine deutliche Reaktion mit der Sonde. Daher wurde aus diesem Klon erneut Plasmid-DNA isoliert und das Insert sequenziert. Bei einem „alignment“ des von der erhaltenen Nukleotidsequenz kodierte Proteins gegen das *S. carnosus* SecA1-Protein zeigte sich, dass die Nukleotidsequenz des HindIII-Fragments tatsächlich für einen Teil eines SecA-Proteins kodiert. Dieses SecA-Protein zeigt jedoch nur eine signifikante Homologie und keine vollständige Identität zum *S. carnosus* SecA1. Es konnte somit gezeigt werden, dass *S. carnosus* ein zweites *secA*-Gen, im Folgenden als *secA2* bezeichnet, besitzt.

In pathogenen Staphylokokken und Streptokokken liegt das *secA2*-Gen in einem Operon vor, welches die Gene enthält, die für die Komponenten des SecA2/SecY2-Translokationsapparats kodieren. Um zu untersuchen, ob ein solches Operon in *S. carnosus* ebenfalls vorliegt, wurden weitere Southern Blots durchgeführt. Als erstes wurden zwei neue Sonden ausgehend

entweder von der Sequenz des 5'- oder des 3'-Endes des im ersten Southern Blot „gefischten“ HindIII-Fragments hergestellt (Abbildung 28).

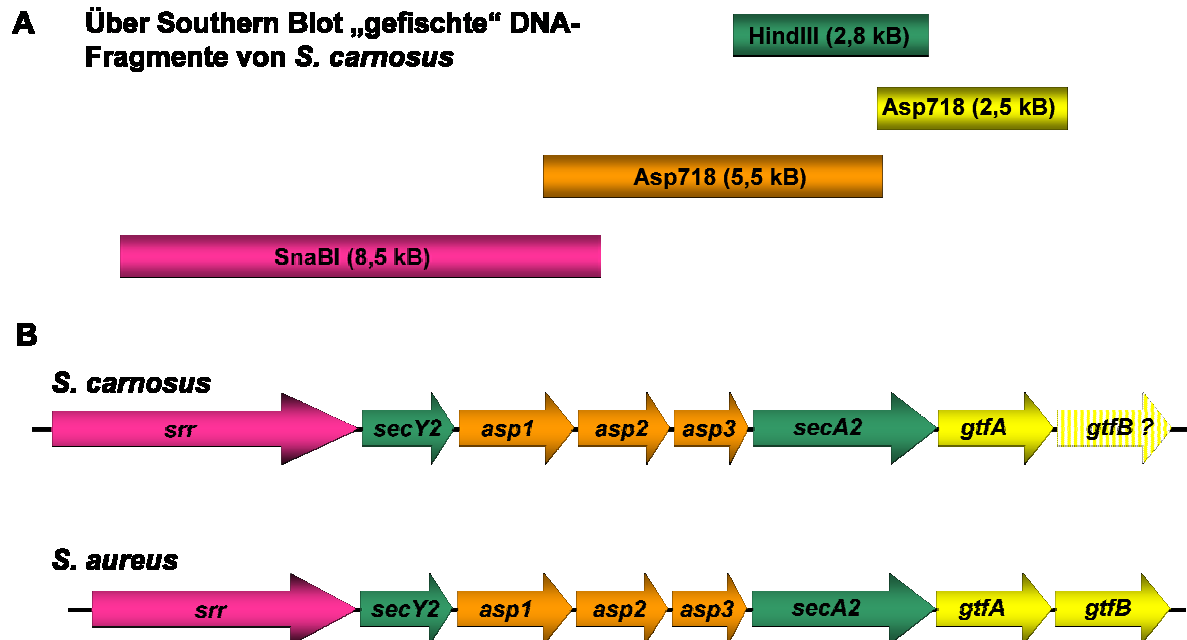


Abbildung 28: Das *S. carnosus* secA2/secY2-Operon.

(A) Die durch Southern Blots „gefischten“ DNA-Fragmente des *S. carnosus* TM300 secA2/secY2-Operons.

(B) Das *S. carnosus* secA2/secY2-Operon im Vergleich zum *S. aureus* secA2/secY2-Operon. Die Abkürzungen entsprechen denen in Abbildung 6.

Die 5'-Sonde hybridisierte in einem Southern Blot mit einem 5,5 kB Fragment aus einem Asp718-Verdau von chromosomaler *S. carnosus* DNA (Abbildung 28 A, oranger Balken). Die 3'-Sonde hingegen hybridisierte in einem Southern Blot mit der Asp718-verdauten chromosomalen DNA von *S. carnosus* mit einem 2,5 kB großen Fragment (Abbildung 28 A, gelber Balken). Diese Fragmente wurden wie oben beschrieben isoliert und in pUC18 kloniert. Die Enden der beiden Asp718-Fragmente wurden sequenziert und die von diesen Nukleotidsequenzen kodierte Aminosäuresequenzen mit den Komponenten der *S. aureus* SecA2/SecY2-Translokase verglichen. Tatsächlich wurde eine signifikante Homologie zu diesen Komponenten gefunden. Um weitere Gene die für Komponenten eines SecA2/SecY2-Systems in *S. carnosus* kodieren zu finden, wurde eine weitere Sonde hergestellt. Hierzu wurde die Sequenz des 5'-Endes des 5,5 kB großen Asp718-Fragments eingesetzt. Diese Sonde reagierte in einem Southern Blot mit SnaBI-geschnittener chromosomaler *S. carnosus* DNA mit einem 8,5 kB großem Fragment (Abbildung 28 A, rosa Balken). Dieses Fragment wurde in pHSG575 kloniert und die Enden sequenziert.

Anhand der Nukleotidsequenz dieser vier über Southern Blot „gefischten“ DNA-Fragmente (Abbildung 28 A) konnte *S. carnosus* als das erste nicht-pathogene Bakterium identifiziert werden, das über die Gene für ein SecA2/SecY2-Translokationssystem verfügt. Das *S. carnosus* *secA2/secY2*-Operon zeigt eine sehr große Ähnlichkeit zu dem Operon aus *S. aureus* (Abbildung 28 B). Wie in Abbildung 28 A zu erkennen, war jedoch das sehr große *srr*-Gen, welches das putative SecA2/SecY2-Substrat von *S. carnosus* kodiert, nicht vollständig auf dem letzten klonierten Fragment enthalten. Die für den Aminoterminal des Srr-Proteins kodierende Sequenz wurde von Dr. Ralf Rosenstein (Universität Tübingen), der an der Sequenzierung des *S. carnosus* Genoms beteiligt ist, zur Verfügung gestellt. Weiterhin ist es nicht sicher, ob *S. carnosus* über ein *gtfB*-Gen verfügt, da die Sequenz für ein solches Gen ebenfalls nicht auf den klonierten Fragmenten vorhanden war. Aufgrund der großen Homologie des *S. carnosus* *secA2/secY2*-Operons zu dem aus *S. aureus* (Abbildung 28 B) ist das Vorhandensein eines *gtfB*-Gens in *S. carnosus* jedoch wahrscheinlich. Beim sequentiellen „Fischen“ und Klonieren des *secA2/secY2*-Operons, sowie der hierfür erforderlichen Sequenzierung über „primer-walking“, handelte es sich um einen sehr zeitintensiven Prozess. Daher wurde schon direkt nach der Identifikation des *secA2*-Gens von *S. carnosus* mit weiteren Experimenten in diesem Organismus begonnen. Als erstes wurde im Folgenden eine *secA2*-Mutante hergestellt um zu untersuchen, ob in dieser Mutante ein Unterschied in der Proteintranslokation im Vergleich zum Wildtyp besteht.

III.3.1.2 Das *S. carnosus* *secA2* ist nicht essentiell.

Das SecA2-Protein ist in den bislang untersuchten Streptokokken eine für den akzessorischen Exportweg essentielle Komponente. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit des *S. carnosus* *secA2/secY2*-Operons zu dem Operon aus diesen Streptokokken (Abbildung 6) ist es wahrscheinlich, dass die Inaktivierung des *secA2*-Gens auch in *S. carnosus* zu einem vollständigen Ausfall dieses Weges führt. Zuerst wurde daher eine *secA2*-Inaktivierungsmutante von *S. carnosus* hergestellt, um die Proteintranslokation in dieser im Vergleich zum Wildtyp untersuchen zu können. Zur Herstellung der Inaktivierungsmutante wurde ein von Madsen *et al.* (2002) entwickeltes System in leicht modifizierter Form eingesetzt (Abbildung 29).

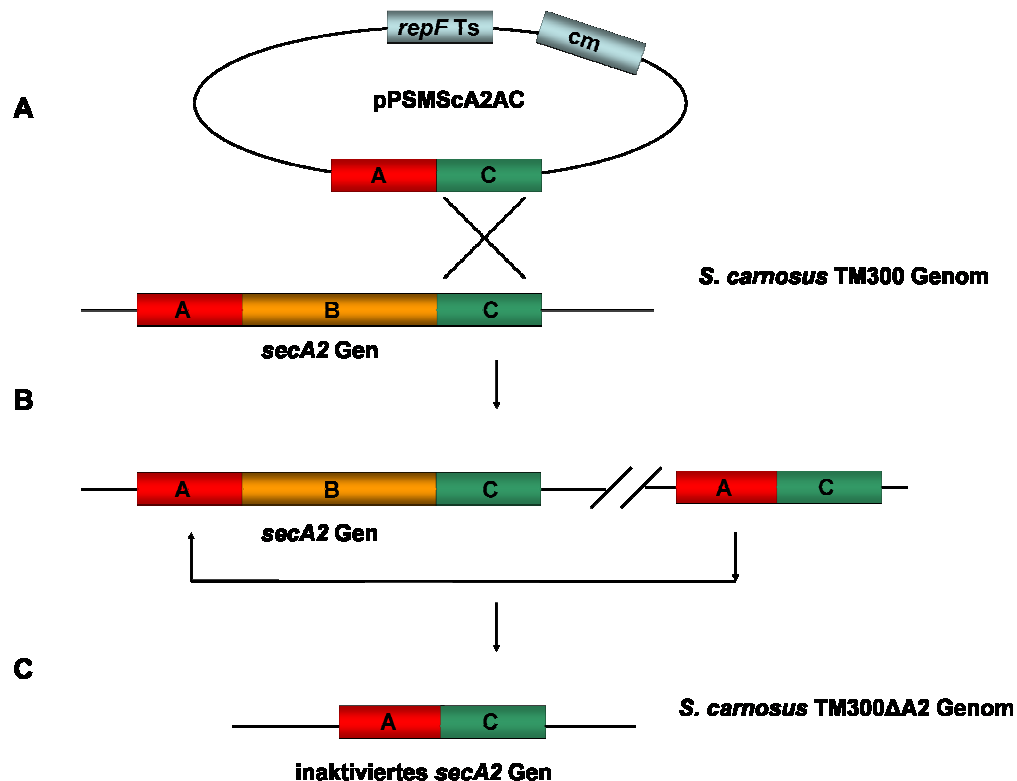


Abbildung 29: Konstruktion einer *secA2*-Mutante von *S. carnosus*.

(A) Über homologe Rekombination an den terminalen Bereichen des *S. carnosus secA2*-Gens kann der Integrationsvektor in das *S. carnosus* Chromosom integrieren.

(B) Eine homologe Rekombination zwischen dem inaktivierten *secA2*-Gen und der Wildtyp-Kopie führt zu einer Excision des Plasmids.

(C) Eine der beiden Plasmid-Excissionsmöglichkeiten führt zur Inaktivierung des *secA2*-Gens auf dem Chromosom.

cm: Chloramphenicol- Resistenzkassette; *repF Ts*: temperatursensitiver Replikationsursprung

Grundbestandteil dieses Systems ist ein Vektor (pPSM1058), der über eine Chloramphenicol-Resistenzkassette sowie einen temperatursensitiven Replikationsursprung verfügt, welcher eine Replikation des Plasmids bei 40°C verhindert. Über „cross-over“-PCR wurden 510 bp des 5'-Endes des *S. carnosus secA2*-Gens mit 510 bp des 3'-Endes des *secA2* fusioniert (in Abbildung 29 als A und C bezeichnet). Dieses Fragment wurde in den Vektor pPSM1058 kloniert. Der erhaltene Vektor pPSMScA2AC wurde bei 30°C, einer Temperatur bei welcher der Vektor replizieren kann, nach *S. carnosus* transformiert und Klone auf Chloramphenicol-Resistenz selektiert. Durch homologe Rekombination an A oder C kann es zu einer Integration des Plasmids in das *S. carnosus* Chromosom kommen (Abbildung 29 A). Eine solche Integration wird durch eine Inkubation des Stammes bei 40°C, der Temperatur bei welcher der Vektor nicht mehr replizieren kann, forciert, solange weiterhin ein Selektionsdruck in Form von Chloramphenicol-Zugabe aufrecht erhalten wird. Da der Vektor nicht mehr replizieren kann, können nun nur noch Zellen mit einer chromosomalen Integration des Vektors in Gegenwart von Chloramphenicol wachsen. Die Integration des

Vektors wurde anschließend über PCR-Analysen verifiziert (ohne Abbildung). Nach Verifikation der Plasmidintegration wurden die Zellen bei 30°C in Anwesenheit von Chloramphenicol inkubiert. Bei dieser Temperatur kann es zu einer Excission des integrierten Plasmids aus dem Chromosom über homologe Rekombination an A oder C kommen (Abbildung 29 B). Dies führt dazu, dass entweder eine Wildtyp-Kopie von *secA2* (bei homologer Rekombination über C) oder eine partiell deletierte Form des *secA2* (bei Rekombination über A) im Chromosom von *S. carnosus* verbleibt. Durch anschließende Inkubation bei 40°C in Abwesenheit von Chloramphenicol kann es zu einem Verlust des frei in der Zelle vorliegenden Plasmids kommen, da die kodierte Resistenz nun nicht mehr benötigt wird. Über Replikaplattierung ließen sich Chloramphenicol-sensitive Klone identifizieren. Bei diesen hat eine Plasmidexcission und der anschließende Verlust des Plasmids stattgefunden. Da es zwei unterschiedliche Excissionsmöglichkeiten gibt und nur eine zur gewünschten Erzeugung einer *secA2*-Inaktivierungssmutante führt, wurden potentielle Mutanten zuerst über PCR-Analyse mit *S. carnosus secA2* spezifischen Primern untersucht (Abbildung 30 A).

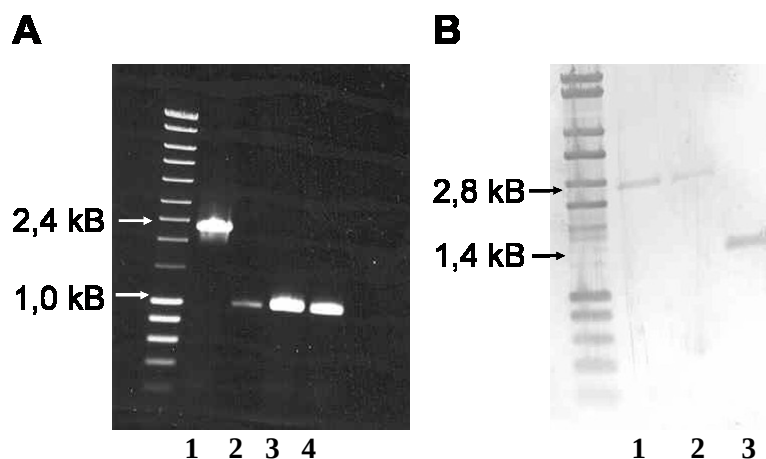


Abbildung 30: Verifikation der *secA2*-Mutante von *S. carnosus*

(A) PCR-Überprüfung von Klonen, bei denen die Plasmidexcission stattgefunden hat. Spur 1: Wildtyp; Spur 2: pPSMScA2AC-Plasmid; Spur 3 und 4: potentielle Inaktivierungsmutanten. (B) Überprüfung der Plasmid-Excissions-Klone über Southern Blot der *S. carnosus secA2*-Sonde mit HindIII verdauter chromosomaler DNA des entsprechenden Stamms; Spur 1: Wildtyp; Spur 2 und 3: potentielle Inaktivierungsmutanten.

Die PCR mit chromosomaler *S. carnosus* Wildtyp DNA als „template“ ergibt eine 2,4 kB große Bande, was der Größe des Wildtyp *secA2*-Gens entspricht (Abbildung 30 A, Spur 1). Wird das pPSMScA2-Plasmid, welches die inaktivierte Form des *secA2* trägt, als „template“ eingesetzt, so erhält man eine Bande von etwas über 1 kB Größe (Abbildung 30 A, Spur 2). Bei zwei der untersuchten potentiellen Inaktivierungsmutanten (Abbildung 30 A, Spur 3 und 4) ist nach PCR ebenfalls ausschließlich eine Bande von etwa 1 kB Größe zu erkennen. Dies ist ein sehr deutlicher Hinweis darauf, dass in diesen Stämmen eine Inaktivierung des *secA2*-

Gens stattgefunden hat. Um dies weiter zu verifizieren, wurde eine Southern Blot-Analyse durchgeführt (Abbildung 30 B).

Für den Southern Blot wurde eine *S. carnosus* *secA2* spezifische Sonde eingesetzt. Bei Einsatz von HindIII-verdauter chromosomaler *S. carnosus* DNA hybridisiert diese Sonde mit einem 2,8 kB großen Fragment (Abbildung 30 B, Spur 1). Wird bei Excision des pPSMScA2AC-Vektors das Wildtyp *secA2* wiederhergestellt, so ergibt sich ebenfalls dieses Fragment (Abbildung 30 B, Spur 2). Bei Untersuchung einer der potentiellen *secA2*-Deletionsmutanten im Southern Blot ergab sich hingegen ein nur 1,5 kB großes Fragment (Spur 3). Diese Differenz von 1,3 kB entsprach genau der zu erwartenden Deletion im *secA2*-Gen. Dies beweist, dass die *secA2*-Inaktivierungsmutante (DeltaA2) erfolgreich hergestellt werden konnte. Bei dem *secA2*-Gen von *S. carnosus* handelt es sich folglich, wie bei allen bislang bekannten *secA2*-Genen, um ein nicht essentielles Gen. Mit Hilfe der *secA2*-Inaktivierungsmutante wurde mit der Suche nach SecA2/SecY2-abhängigen Proteinen in *S. carnosus* begonnen.

III.3.1.3 Die Deletion des *secA2* hat keinen Effekt auf die Proteintranslokation in *S. carnosus*.

Um die Bedeutung der SecA2/SecY2-abhängigen Proteintranslokation in *S. carnosus* zu untersuchen, wurde analysiert, ob das akzessorische Sec-System funktionell ist. Eine Möglichkeit, die Funktionalität des SecA2/SecY2-Systems von *S. carnosus* nachzuweisen besteht darin, einen Defekt im Export eines oder mehrer Proteine in der *secA2*-Inaktivierungsmutante (DeltaA2) zu identifizieren. Sollte ein Exportdefekt in der DeltaA2-Mutante auftreten, so würde dies bedeuten, dass im Wildtyp eine Aktivität des SecA2/SecY2-Systems vorliegt.

Daher wurden in einem ersten Versuch die Proteine aus den Überständen von Zellkulturen des *S. carnosus* Wildtyps und der DeltaA2-Mutante mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt, über SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie Brilliant Blue Färbung visualisiert (Abbildung 31 A).

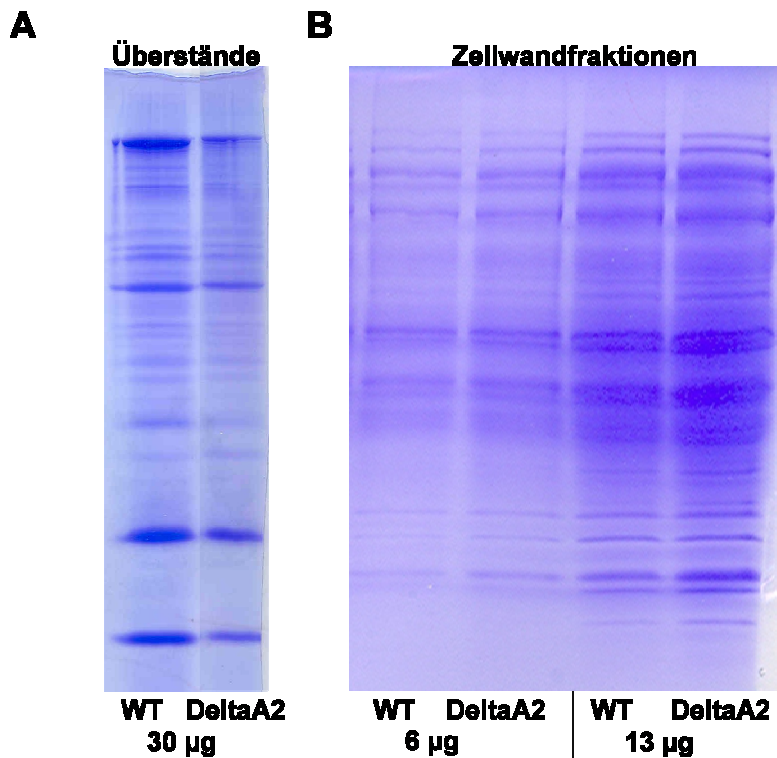


Abbildung 31: Vergleich der von *S. carnosus* Wildtyp und DeltaA2-Mutante exportierten Proteine.

(A) TCA-gefällte Proteine aus den Überständen von bei 37°C über Nacht angezogenem Wildtyp (WT) und DeltaA2-Mutante. Es wurden 30 µg Gesamtprotein aufgetragen.

(B) Proteine aus der Zellwandfraktion von *S. carnosus* Wildtyp und DeltaA2-Mutante. Es wurden 6 bzw. 13 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Wie in Abbildung 31 A zu erkennen, finden sich in den Überständen des *S. carnosus* Wildtyps und der DeltaA2-Mutante keine erkennbaren Abweichungen im Proteinbandenmuster. Srr, das potentielle SecA2/SecY2-Substrat von *S. carnosus*, welches „upstream“ von *secY2* kodiert ist, besitzt ein LPXTG-Zellwand-Sortierungssignal. Für die homologen Srr-Proteine von *S. gordonii* und *S. parasanguinis* ist eine Lokalisierung in der Zellwand nachgewiesen worden. Daher wurden in einem folgenden Experiment die Zellwandfraktionen des *S. carnosus* Wildtyps und der DeltaA2-Mutante isoliert und die enthaltenen Proteine verglichen (Abbildung 31 B). Auch bei Vergleich der Zellwandfraktionen fanden sich zwischen *S. carnosus* Wildtyp und DeltaA2-Mutante keine Unterschiede im Proteinbandenmuster. Dies bedeutet jedoch nicht zwingend, dass die Deletion von *secA2* keinen Einfluss auf den Proteinexport von *S. carnosus* hat. In *S. gordonii* ist es in einer *secA2*-Deletionsmutante erst über Western Blot-Analyse gelungen, das SecA2/SecY2-abhängige Substrat (GspB, das zum Srr homologe Protein) zu identifizieren (Bensing & Sullam, 2002). Für die Detektion des *S. carnosus* Srr-Protein stand kein solcher Antikörper zur Verfügung. Daher wurde zuerst untersucht, ob ein Antikörper gegen ein Fusionsprotein aus *S. aureus* Srr und *S. hyicus* Pro-Lipase (Anti-Srr2000ProLip; siehe III.1.1.1) eine Reaktivität mit Proteinen des *S. carnosus* Wildtyp und der DeltaA2-Mutante zeigt (Abbildung 32).

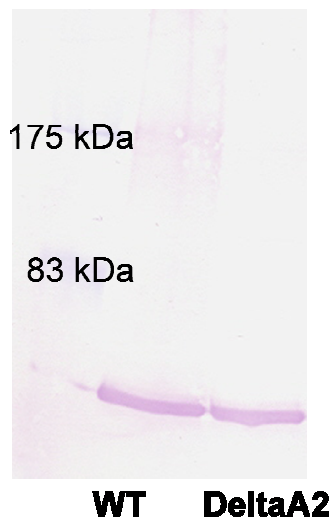


Abbildung 32: Analyse von *S. carnosus* Gesamtzellproteinen mit dem Anti-Srr2000ProLip-Antikörper. Aufgetragen sind die Gesamtzellproteine eines *S. carnosus* TM300-Wildtypstamms bzw. der *S. carnosus* DeltaA2-Mutante. Der Anti-Srr2000ProLip-Antikörper wurde als primärer Antikörper im Western- Blot eingesetzt.

Wie in Abbildung 32 zu erkennen, reagiert der Anti-Srr2000ProLip-Antikörper sowohl im Wildtypstamm wie auch in der DeltaA2-Mutante stark mit einem ungefähr 70 kDa großen Protein. Dieses Protein ist jedoch viel kleiner, als das geschätzte Molekulargewicht des *S. carnosus* Srr-Proteins, welches über 300 kDa beträgt. Bei dieser Bande kann es sich also entweder um ein Abbauprodukt des *S. carnosus* Srr oder eine Kreuzreaktivität handeln. In den Überständen beider Stämme konnte keine Reaktivität mit dem Anti-Srr2000ProLip-Antikörper beobachtet werden (ohne Abbildung).

Dass kein Srr-Protein in *S. carnosus* detektiert werden konnte kann daran liegen, dass der verwendete Antikörper nicht mit dem *S. carnosus* Srr reagiert. Es ist jedoch ebenfalls gut möglich, dass das *S. carnosus* Srr nicht exprimiert wird. Daher wurde in einem folgenden Experiment getestet, ob der Promotor des *secA2/secY2*-Operons von *S. carnosus* aktiv ist.

III.3.1.4 Der Promotor des *secA2/secY2*-Operons von *S. carnosus* ist aktiv.

Da in *S. carnosus* kein SecA2/SecY2-abhängiges Exportsubstrat entdeckt werden konnte ist es möglich, dass keine Expression des *secA2/secY2*-Operons stattfindet. Daher wurde die Aktivität des Promotors des *secA2/secY2*-Operons analysiert. Hierzu wurde eine Fusion des Promotors an ein promotorloses *E. coli* β -Galaktosidase-Gen (*lacZ*) hergestellt. Nur bei der Fusion mit einem aktiven Promotor findet eine Expression des *lacZ*-Gens statt. Die Aktivität der so exprimierten β -Galaktosidase kann in einem Enzymaktivitäts-Test quantitativ ermittelt werden. Als Positiv-Kontrolle wurde der Promotor des *S. carnosus* *secA1*-Gens ebenfalls vor das *lacZ*-Gen fusioniert. Hierzu wurde die komplette Region zwischen dem Start-Codon des *srr*- bzw. *secA1*-Gens und dem „upstream“ gelegenen Gen amplifiziert. Über „cross-over“-PCR wurden diese Promotorbereiche mit dem *lacZ*-Gen fusioniert (Abbildung 33).

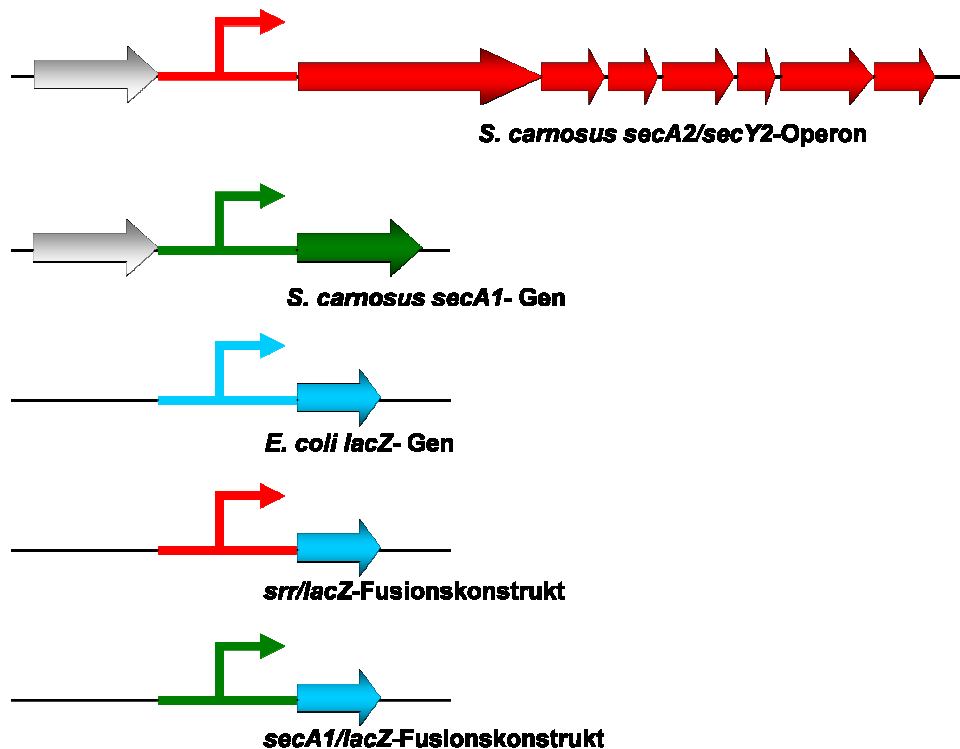


Abbildung 33: lacZ-Promotorfusionen zur Untersuchung der *srr*- und *secA1*-Promotoraktivität. Die Bereiche zwischen dem jeweils „upstream“ gelegenen Gen und dem Startcodon des *srr*-Gens (rot) bzw. *secA1*-Gens (grün) wurden über PCR amplifiziert. In dieser PCR wurde ein 3'-Überhang an den jeweiligen Bereich angehängt, der dem 5'-Ende des *E. coli lacZ*-Gens (blau) entspricht. Aufgrund eines „annealing“ dieser identischen Bereiche war es in einer zweiten PCR möglich die Fusionskonstrukte des *srr*- bzw. *secA1*-Promotors mit dem *lacZ*-Gen zu amplifizieren.

Das *secA1/lacZ*- und das *srr/lacZ*-Fusionskonstrukt wurden in den „mid-copy“ *E. coli*/*S. carnosus*-„shuttle“-Vektor pRB573 kloniert. Die MCS des pRB573-Vektors verfügt über keinen eigenen Promotor und besitzt an beiden Seiten Terminatoren, die eine von genetischen Elementen des Vektors eingeleitete Transkription des *lacZ*-Gens verhindern. Als erster qualitativer Hinweis auf *lacZ*-Aktivität wurden *E. coli* JM109-Stämme mit den beiden *lacZ*-Fusionskonstrukten und dem Leervektor auf X-Gal-Platten ausplattiert. Da *E. coli* JM109 keine funktionelle β -Galaktosidase exprimiert, zeigen Zellen mit nur dem Leervektor weiße Kolonien auf X-Gal-Agar, während sowohl das *secA1/lacZ*- und das *srr/lacZ*-Fusionskonstrukt blaue Kolonien bilden (ohne Abbildung). Dies war ein erstes Indiz dafür, dass beide Promotoren zumindest in *E. coli* aktiv sind. Im Anschluss wurden der Leervektor und die Vektoren mit den Fusionskonstrukten in den *S. carnosus* Wildtyp TM300 transformiert. Bei X-Gal-Plattentests in *S. carnosus* zeigten alle Stämme, auch der mit dem Leervektor, blaue Kolonien. Da in dem zu *S. carnosus* nahe verwandten *S. aureus* ein β -Galaktosidase-Gen vorliegt, ist es wahrscheinlich, dass auch in der *S. carnosus* Genomsequenz ein solches Gen vorhanden ist. Dies würde die β -Galaktosidase-Aktivität in einem Stamm mit dem Leervektor erklären. In *S. carnosus* wurden im Anschluss Western

Blot-Analysen von Proteinen aus Gesamtzellfraktionen des Leervektorstammes und der beiden Stämme mit den Fusionskonstrukten durchgeführt. Hierbei wurde ein gegen das *E. coli* LacZ-Protein gerichteter Antikörper eingesetzt (Abbildung 34).



Abbildung 34: Western Blot zur Untersuchung der LacZ-Expression in *S. carnosus*.

Aufgetragen ist in Spur 1 eine Gesamtzellfraktion des *E. coli* JM109-Stamms mit pUC18-Leervektor zur α -Komplementation. In Spur 2-9 sind Gesamtzellfraktionen von *S. carnosus* mit dem *secA1/lacZ*-Expressionsvektor (Spur 2-4), dem pRB573-Leervektor (Spur 5-7) und dem *srr/lacZ*-Expressionsvektor (Spur 8 und 9) aufgetragen. Für die Detektion wurde Anti-*E.coli* LacZ-Antikörper eingesetzt.

Als Positivkontrolle wurden Zellfraktionen eines *E. coli* JM109-Stamms, der den pUC18-Vektor für die α -Komplementation trägt, eingesetzt. Da in diesem Stamm im chromosomalen *lacZ*-Gen eine Deletion vorliegt, wird hier das LacZ-Protein als das etwas verkürzte so genannte β -Peptid synthetisiert. Dieses erkennt man als eine Bande bei etwa 110 kDa (Abbildung 34, Spur 1). Hingegen erkennt man kein LacZ-Protein in dem *S. carnosus* Stamm mit dem pRB573-Leervektor (Spur 5, 6 und 7). In Stämmen mit dem *secA1/lacZ*-Fusionskonstrukt (Spur 2, 3 und 4) sieht man eine deutliche Bande etwas oberhalb der Höhe des β -Peptids. Hierbei handelt es sich um das intakte LacZ-Protein, das etwa 5 kDa größer ist, als das β -Peptid. Eine schwächere, aber dennoch deutliche Bande auf dieser Höhe ist auch in den Stämmen mit dem *srr/lacZ*-Konstrukt detektierbar (Spur 8 und 9). Eine Expression des *lacZ*-Gens in *S. carnosus* findet also sowohl unter Kontrolle des *secA1*- wie auch des *srr*-Promotors statt. Beide Promotoren sind folglich aktiv. Da die Western Blot-Analyse vermuten lässt, dass der *srr*-Promotor zur Expression wesentlich geringerer Mengen an LacZ-Protein führt als der *secA1*-Promotor, wurde im Folgenden eine quantitative Messung der Promotoraktivität über einen LacZ-Aktivitäts-Assay durchgeführt. Hierbei wurde die Spaltung des Substrats Ortho-Nitrophenyl-beta-D-galaktopyranosid (ONPG) in ein gelbes Reaktionsprodukt photometrisch verfolgt und hieraus wie unter II.6.10 beschrieben die LacZ-Aktivität berechnet (Abbildung 35).

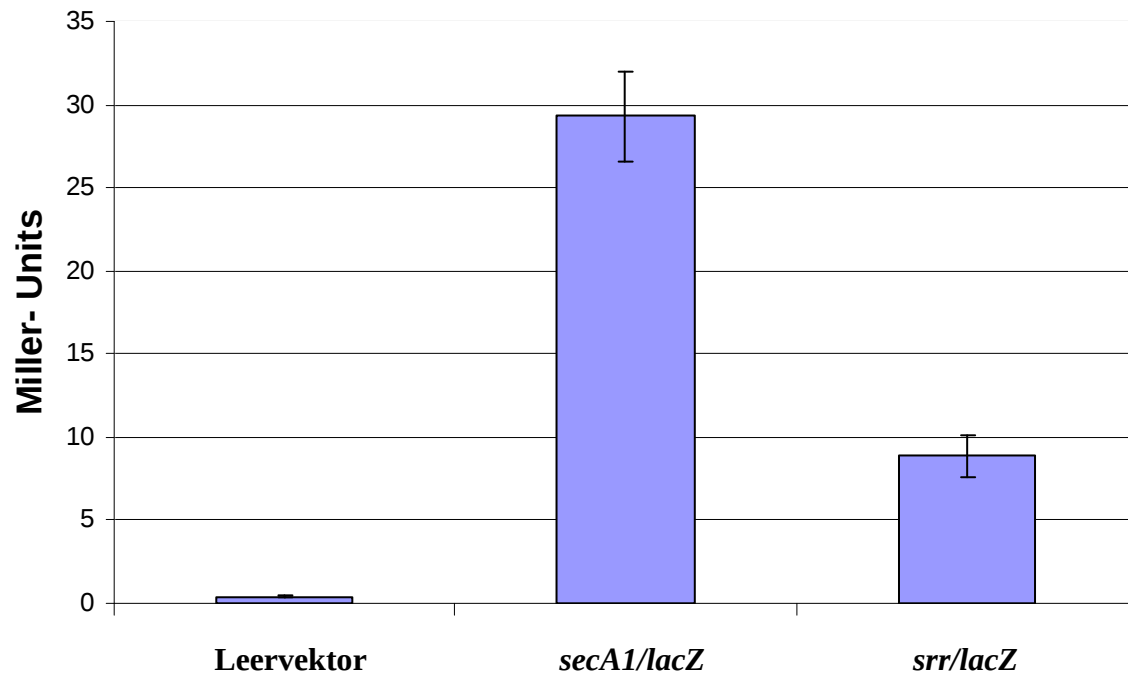


Abbildung 35: β -Galaktosidase-Aktivität der *S. carnosus* Stämme mit den *lacZ*-Promotor-fusionen. Angegeben sind die Mittelwerte aus den Messungen von drei Klonen des Stamms mit dem Leervektor, neun Klonen des Stamms mit dem *secA1/lacZ*-Fusionskonstrukt und zehn Klonen mit dem *srr/lacZ*-Fusionskonstrukt. Angaben in Miller-Units.

Wie in Abbildung 35 zu sehen, zeigt ein *S. carnosus* Stamm mit dem Leervektor eine sehr geringe β -Galaktosidase-Aktivität von 0,41 Miller-Units. Hingegen zeigt der Stamm mit dem *secA1/lacZ*-Fusionskonstrukt eine sehr hohe β -Galaktosidase-Aktivität von 29,3 Miller-Units. Die Aktivität in dem Stamm mit dem *srr/lacZ*-Fusionskonstrukt ist mit 8,9 Miller-Units zwar deutlich geringer, aber immer noch fast 22-mal so hoch wie in dem Stamm mit dem Leervektor. Die Ergebnisse mit den *lacZ*-Promotor-Fusionen zeigen deutlich, dass der *srr*-Promotor, der für die Expression des gesamten *secA2/secY2*-Operons zuständig ist, aktiv ist. Dies ist zumindest ein notwendiges, wenn auch noch kein hinreichendes Kriterium für die Aktivität des *SecA2/SecY2*-Systems von *S. carnosus*. Die Tatsache, dass bislang kein *Srr*-Protein in *S. carnosus* detektierbar war, könnte auch daran liegen, dass das entsprechende *srr*-Gen über ein Stop-Codon verfügt, welches die Translation unterbindet. Daher wurde eine Sequenzierung des *secA2/secY2*-Operons von *S. carnosus* durchgeführt.

III.3.1.5 Das *S. carnosus* SecA2/SecY2-System ist nicht funktionell.

Die bisherigen Experimente lieferten unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die mögliche Aktivität des *S. carnosus* SecA2/SecY2-Systems. Während eine Aktivität des Promotors des Operons nachgewiesen wurde, konnte dennoch keine Expression des *Srr*-Proteins in *S. carnosus* detektiert werden. Eine Erklärung hierfür ist, dass das *Srr*-Protein in *S. carnosus*

nicht synthetisiert wird. Daher wurde eine Sequenzierung des gesamten *secA2/secY2*-Operons durchgeführt, um abschließend zu klären, ob sich Stop-Codons in der Sequenz befinden. Hierzu wurden die insgesamt etwa 20 kB des Operons in vier Teil-Fragmenten amplifiziert. Diese vier PCR-Produkte wurden jeweils mindestens dreimal in unabhängigen PCR-Reaktionen amplifiziert. Durch die Sequenzierung von drei unabhängig erhaltenen Produkten sollte ausgeschlossen werden, dass möglicherweise während der PCR von der DNA-Polymerase eingebaute Fehler anschließend fälschlicherweise für die korrekte auf dem Chromosom vorliegende Sequenz gehalten wurden. Nur bei einer Übereinstimmung der Sequenz von mindestens zwei der drei unabhängig amplifizierten PCR-Produkte wurde diese als authentisch angesehen. Die drei unabhängig amplifizierten PCR-Produkte der vier Teilbereiche des *secA2/secY2*-Operons wurden anschließend über überlappende Primer jeweils mindestens dreimal durchsequenziert. Bei Unstimmigkeiten wurde die Sequenzierungsreaktion für den strittigen Bereich wiederholt. So war es möglich, die Nukleotid-Sequenz des *S. carnosus secY2/secA2*-Operons beginnend mit dem *srr*-Gen bis zum *secA2*-Gen vollständig zu erhalten. Hierbei konnten verschiedene Stop-Codons in für die Funktionalität des SecA2/SecY2-Systems zwingend erforderlichen Genen festgestellt werden. Bereits im *srr*-Gen befindet sich ein Stop-Codon an Position 729, das zu einem Abbruch der Synthese des Srr-Proteins nach Aminosäure 242 führt. Darüber hinaus befindet sich im Leserahmen des *secA2*-Gens ein Stop nach 1296 bp, wodurch die Synthese des SecA2-Proteins nach 432 von 797 Aminosäuren abgebrochen wird. Das in *S. carnosus* gebildete SecA2-Protein ist somit fast um die Hälfte verkürzt, wobei auch Bereiche fehlen, die in allen SecA1- und SecA2-Proteinen hoch konserviert sind. Das *S. carnosus* SecA2-Protein ist somit mit allergrößter Wahrscheinlichkeit nicht funktionell. Das Stop-Codon im *secA2*-Gen alleine ist daher bereits ausreichend, um die Funktionsfähigkeit des SecA2/SecY2-Systems von *S. carnosus* zu unterbinden. Darüber hinaus finden sich ebenfalls Stop-Codons in den Genen für SecY2, Asp2 und Asp3. Folglich kann in *S. carnosus* kein funktionelles SecA2/SecY2-System vorliegen. Diese Vielzahl von Stop-Codons zeigt an, dass in *S. carnosus* das SecA2/SecY2-System im Gegensatz zu seinen nahen, pathogenen Verwandten offensichtlich nicht benötigt wird und daher im Verlauf der Evolution eine „Stilllegung“ des *S. carnosus secA2/secY2*-Operons erfolgt ist.

III.3.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der SecA2/SecY2-abhängigen Proteintranslokation in *S. carnosus*.

S. carnosus wurde als das erste nicht-pathogene Bakterium identifiziert, das die Gene für ein SecA2/SecY2-System besitzt. Aufgrund des vielfach berichteten Zusammenhangs zwischen den akzessorischen Sec-Komponenten und der Pathogenität, war dies überraschend. Bei

Untersuchungen der Proteintranslokation einer *secA2*-Mutante von *S. carnosus* wurde kein Exportdefekt gefunden. Es stellte sich heraus, dass das SecA2/SecY2-System von *S. carnosus* trotz geringer, aber dennoch nachweislicher Promotoraktivität nicht aktiv ist, da sich in den Genen für einige der zentralen Komponenten, wie z. B. dem *secA2* und dem *secY2*, Stop-Codons befinden, die zu einer Termination der Translation und somit zu einem Ausbleiben der Synthese funktionell wichtiger Proteine führen. Die Tatsache, dass das SecA2/SecY2-System eines nicht-pathogenen Bakteriums wie *S. carnosus* nicht aktiv ist, steht im Einklang mit den Beobachtungen, dass die akzessorischen Sec-Komponenten an der Pathogenität von Bakterien beteiligt sind.

III.3.2 Studium der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in *C. glutamicum*

C. glutamicum ist ein Gram-positives, nicht-pathogenes Bakterium, das schon seit langer Zeit zur biotechnologischen Gewinnung von Aminosäuren eingesetzt wird (Sahm *et al.*, 2000). Die Proteintranslokation in *C. glutamicum* ist hingegen bislang kaum studiert worden. Da das Genom von *C. glutamicum* bereits vollständig sequenziert und annotiert ist, konnte sehr einfach festgestellt werden, dass *C. glutamicum* über zwei *secA*-Gene verfügt. Ein zweites *secY* oder Gene, welche die akzessorischen Komponenten des SecA2/SecY2-Translokationsapparat kodieren, wurden jedoch nicht entdeckt. Bei *C. glutamicum* handelt es sich also wie bei seinem Verwandten *M. tuberculosis* um ein Bakterium, welches nur über ein zusätzliches *secA*-Gen verfügt. Da das SecA2-Protein von *M. tuberculosis* an der Pathogenität dieses Bakterium beteiligt ist, ist es von Interesse herauszufinden, ob die SecA2-abhängige Proteintranslokation in einem nicht-pathogenen Bakterium wie *C. glutamicum* eine Funktion besitzt.

III.3.2.1 Die SecA-Proteine von *C. glutamicum*.

Um die Bedeutung der SecA2-abhängigen Proteintranslokation in *C. glutamicum* studieren zu können, war es zuerst nötig zuzuordnen, welches der beiden *C. glutamicum* *secA*-Gene für das SecA2-Protein kodiert. Die beiden *secA*-Gene von *C. glutamicum* ATCC13032 werden in der Genomsequenz mit NCgl0726 und NCgl1384 benannt (in einer späteren Version der Genomsequenz erfolgte eine Umbenennung in Cg0868 und Cg1629). NCgl0726 kodiert ein 845 Aminosäuren großes Protein, während das von NCgl1384 kodierte Protein 763 Aminosäuren lang ist. Da in allen bislang bekannten Fällen das SecA2-Protein immer kleiner

ist als das SecA1-Protein des entsprechenden Bakteriums, ist dies bereits ein erster Hinweis darauf, dass es sich bei NCgl0726 um das *secA1*-Gen und bei NCgl1384 um das *secA2*-Gen von *C. glutamicum* handelt. Um diesen Hinweis zu kräftigen, wurde mit Hilfe des „BlastP“-Algorithmus (Tatusova und Madden, 1999) ein Vergleich der Aminosäuresequenz der von den beiden *C. glutamicum* *secA*-Genen kodierten Proteine mit SecA1- und SecA2-Proteinen aus anderen Bakterien durchgeführt (Tabelle 4).

	<i>C. glutamicum</i> NCgl0726		<i>C. glutamicum</i> NCgl1384	
	Identität	Homologie	Identität	Homologie
<i>C. glutamicum</i> NCgl0726	100%	100%	35%	49%
<i>C. glutamicum</i> NCgl1384	35%	49%	100%	100%
<i>M. tuberculosis</i> SecA1	70%	80%	35%	47%
<i>M. tuberculosis</i> SecA2	34%	50%	55%	68%
<i>M. smegmatis</i> SecA1	70 %	81%	34%	48%
<i>M. smegmatis</i> SecA2	35%	51%	55%	68%
<i>L. monocytogenes</i> SecA1	47%	65%	35%	51%
<i>L. monocytogenes</i> SecA2	39%	58%	34%	51%
<i>S. aureus</i> SecA1	47%	66%	34%	51%
<i>S. aureus</i> SecA2	33%	54%	31%	48%
<i>S. gordonii</i> SecA1	47%	64%	35%	51%
<i>S. gordonii</i> SecA2	36%	53%	34%	51%
<i>B. subtilis</i> SecA	48%	65%	36%	51%
<i>E. coli</i> SecA	50%	66%	33%	48%

Tabelle 4: „BlastP“-Analyse der Homologie der von den beiden *secA*-Genen von *C. glutamicum* kodierten Proteine mit SecA-Proteinen aus anderen Bakterien. Ein „BlastP“ wurde jeweils paarweise für eins der *C. glutamicum* Proteine und eins der anderen SecA-Proteine durchgeführt. Angegeben sind Prozentwerte für die Identität und die Homologie der Aminosäurereste.

Wie in Tabelle 4 zu erkennen, zeigt das von NCgl0726 kodierte Protein in allen Fällen eine höhere Homologie zu den klassischen SecA- bzw. SecA1-Proteinen als NCgl1384. Beim Vergleich der Homologie zu SecA2-Proteinen aus anderen Bakterien zeigt sich, dass NCgl1384 zu den SecA2-Proteinen aus den nahe Verwandten Mycobakterien eine hohe Identität von 55% besitzt, während NCgl0726 mit 34% bzw. 35% eine deutlich geringere Identität zu diesen aufweist. Beim Vergleich mit den SecA2-Proteinen aus weniger nah verwandten Bakterien wie *L. monocytogenes*, *S. aureus* oder *S. gordonii* zeigt sich sowohl für NCgl0726 wie auch NCgl1384 nur eine geringe Homologie. Es ist jedoch aus vorherigen Vergleichen verschiedener SecA2-Proteine bekannt, dass sich diese weniger durch besondere Gemeinsamkeiten auf Sequenzebene, sondern vielmehr durch ihre Unterschiede zu den klassischen SecA-Proteinen in eine Gruppe einteilen lassen (Caspers, 2002). Folglich ist es wahrscheinlich, dass es sich bei NCgl1384 um das SecA2-Protein von *C. glutamicum* handelt, da es zu den klassischen SecA-Proteinen deutlich geringere Ähnlichkeit besitzt, als NCgl0726. Besonders deutlich wird dies beim Vergleich mit den SecA-Proteinen aus

Mycobakterien. Um weiter zu kräftigen, dass NCgl1384 tatsächlich das SecA2-Protein von *C. glutamicum* ist, wurde ein direktes Sequenz-„alignment“ der SecA-Proteine aus *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* und *C. glutamicum* mit dem „ClustalW“-Programm (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt (Abbildung 36). Zur Vereinfachung wurde hierbei NCgl1384 bereits als SecA2 und NCgl0726 als SecA1 bezeichnet.

	10	20	30	40	50	60
SecA1Mtu	-----	-----	-----	-----	-----	-----
SecA1Msm	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CgsecA1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
SecA2Msm	-----	-----	-----	-----	-----	-----
SecA2Mtu	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CgsecA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Prim.cons.	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	70	80	90	100	110	120
SecA1Mtu	LKKVADYVGTLSDDVEKLTDAELRAKTEDEFKRRRLADQKNPETLDDLLPEAFVAREAAWR					
SecA1Msm	LRKVADYVNALSDVEKLSDAELRAKTEEFKKRVADG---EDLDDLLPEAFVAREAAWR					
CgsecA1	LHKIADQVIALEDKAFANLTDEELKAKTAEFKERIAGG---EGLDEIFLEAFATAREAAWR					
SecA2Msm	SLSEVKGAADEFKKAADLDDEQLTKAAKLLKLEDLAG-----ASDITQFLAIAREAAER					
SecA2Mtu	SLADVKTASAEYDKAADLSDEKLRKAGLLNDDLAEE-----SADIPQFLAIAREAAER					
CgsecA2	SVAIYNQVENHAAELDALDDVALAQRK---DLASGGR-----IDNHAEFLLILGVASQR					
Prim.cons.	2LK2D2DVAAL2D32A2L3DEELRAK2KEFKLRDA3GKNPE3LDD22PE22AIAAREAAWR					
	130	140	150	160	170	180
SecA1Mtu	VLDQRPFDVQVMGAAALHGLNVAEMKTGEGKTLTCLVPAYLNALAGNVHIVTVNDYLAK					
SecA1Msm	VLNQRFHFDVQVMGGAALHFGNVAEMKTGEGKTLTAVLPSYLNALSGKGVHVVTVNDYLAR					
CgsecA1	VLGQKHVHVQIMGGAALHFGNVAEMRTGEGKTLTCLVPAYLNALLEGKGVHVVTVNDYLAK					
SecA2Msm	TTGLRPFDDVQLLALRMLAGDVVEMATGEGKTLGAIAGGYALGRRVHVIITINDYLAR					
SecA2Mtu	RTGLRPFDDVQLLALRMLAGDVVEMATGEGKTLGAIAGGYALGRRVHVIITINDYLAR					
CgsecA2	TLGLKYPYPVQSQAVALRLIEGDVVHMATGEGKTLVGAMATGLGLMGRVHSITVNDYLAV					
Prim.cons.	VLG2RPFDDVQ2MGA22LH2G2VAEMATGEGKTLTG2L2AY2NALAGKGVHVVTVNDYLAR					
	190	200	210	220	230	240
SecA1Mtu	RDSEWMGRVHRFLGLQVGVILATMTDPERRVAYNADITYGTNEFGFDYLRDNMAHSLDD					
SecA1Msm	RDSEWMGRVHRFLGLDVGVILSGMTDPERRAAYAADITYGTNEFGFDYLRDNMAHSDVD					
CgsecA1	RDAEWMGRVHRYLGLGVILSDMRPDERREAYAADITYGTNELGFDYLRDNMAHSLSD					
SecA2Msm	RDAEWMGPLLKALGLTVGWITADSTADERREAYQCDVYASVNEIGFDVLRDQLVTDVAD					
SecA2Mtu	RDAEWMGPLLDMAGLTVGWITADSTDPERRAYDRDVYASVNEIGFDVLRDQLVTDVND					
CgsecA2	RDAEWMRPLVEFGLSVASISEKMDAGERRQAYKAAIVYGPVNEIGFDVLRDQLITRRED					
Prim.cons.	RDAEWMG22HRFLGLTVGVILADMTDPERRAAYAADITYGTNEIGFD2LRD22ATSVD					
	250	260	270	280	290	300
SecA1Mtu	LVQRGHYAIIVDEVDSILIDEARTPLIISGPADGASNWYTEFARLAPLMEKD---VHYEV					
SecA1Msm	MVQRGHNFIVDEVDSILIDEARTPLIISGPADGASHWYQEFARIVPMMEKD---VHYEV					
CgsecA1	LVQRGHYAIIVDEVDSILIDEARTPLIISGPVDGTSQFYNVFAQIVPRMTKD---VHYEV					
SecA2Msm	LVSPNPDVALIDEADSVLVDEALVPLVLGTSHTRETPRVEIIRVMGELEAGK---HYDT					
SecA2Mtu	LVSPNPDVALIDEADSVLVDEALVPLVLGTSHTRETPRVEIIRLVAELVGDKDADEYFAT					
CgsecA2	AVQHGADVAIIDEADSVLVDEALVPLVLGTSHTRETPRVEIIRVSLKEND---DYTI					
Prim.cons.	LVQRGHDAI2DE2DS2L2DEA22PL222GPADG2SPRYEIFARV2PLMEKDDADVHYEV					
	310	320	330	340	350	360
SecA1Mtu	DLRKRVTG---VHEKGVFEVVDQLGIDNLYEAANS-PLVSYLNNALKAKELFSRDKDYI					
SecA1Msm	DLRKRVTGVHVGVELGVFEVVDQLGIDNLYEAANS-PLVSYLNNALKAKELFQRDKDYI					
CgsecA1	DERKKTG---VKEEGVFEVVDQLGIDNLYAPEHS-QLVSYLNNAIKAKELFTRDKDYI					
SecA2Msm	DAESRNVH---LTEAGARVMEAKLGGIDLYSEEHVGTTLTEINVVALHAHVLLQRDVHYI					
SecA2Mtu	DSDRNVH---LTEHGARKVEKALGGIDLYSEEHVGTTLTEVNVVALHAHVLLQRDVHYI					
CgsecA2	DDDRNVF---LTDKGAAKLEQQLGISSLYDDEHVGTSLVQVNLALHAQALLIRDIHYI					
Prim.cons.	DLRKR2VGVHVG2TEKG2E2VEDQLGIDNLY2EH2G222SYLNNAL2A3EL2QRDK2YI					

III. Ergebnisse

	370	380	390	400	410	420
SecA1Mtu	VRDGEVLIVDEFTGRVLIGRRYNEGMHQAIEAKEHVEIKAE	NQTLATITLQNYFRLYDKL				
SecA1Msm	VRNGEVLIVDEFTGRVLMGRRYNEGMHQAIEAKERVEIKAE	NQTLATITLQNYFRLYDKL				
CgsecA1	VRNGEVMIVDGFTGRVLAGRRYNEGMHQAIEAKERVEIKEN	NQTLATVTLQNYFRLYTKL				
SecA2Msm	VRDDAVHLINASRGRIASLQRPDGLQA AVEAKEGIETETGEVLD	ITITVQALINRYPRV				
SecA2Mtu	VRDDAVHLINASRGRIASLQRPDGLQA AVEAKEGIETETGEVLD	ITITVQALINRYATV				
CgsecA2	VRDSKVLIDASRGRIASLQRPDGLQA AVEAKEGLAVSEGKILD	ITITLQALIGRYPMA				
Prim.cons.	VRDGEVL22DA22GRV2622R222G222A2EAKEGVEIKEE2QTL2TITLQ222R2Y2KL					
	430	440	450	460	470	480
SecA1Mtu	AGMTGTAQTEAAELHEIYKLGVSIPNMPMIREDDQSDLIYKTEEAKYIAV	VDDVAERYA				
SecA1Msm	SGMTGTAETEAALHEIYKLGVPPIPTNKPVRQDQSDLIYKTEEAKFLAV	VDDVAERHA				
CgsecA1	AGMTGTAETEAALNQIYKLDVIAIPTNRPNQREDLTDLYKTQEAKFAAV	VDDIAERTE				
SecA2Msm	CGMTGTALAAGEQLRQFYKLGVSIPNTPNIRKDEPDRVYITAAKIDA	IVEHIAEVHK				
SecA2Mtu	CGMTGTALAAGEQLRQFYKLGVSIPNTPNIRKDEPDRVYITAAKNDG	IVEHITVHQ				
CgsecA2	CGMTGTAVEATDQLRTFYDLHVSVERNHPKRFDEADRIYATMAEK	NRAIIDIAILLHS				
Prim.cons.	CGMTGTA2T2AA2LRQ2YKLGVSIPNTPNIREDE2D22YKTE2AK2DA2VDDIAERHA					
	490	500	510	520	530	540
SecA1Mtu	KGQPVLTIGTTSVERSEYLSRQFTKRRIPHNVLNAKYHEQEATIIAV	AGRRGGVTVATNMA				
SecA1Msm	KGQPVLTIGTTSVERSEYLSKMLTKRRVPHNVNLNAKYHEQEANIIA	EAGRRGAVTVATNMA				
CgsecA1	KGQPVLTIGTTSVERSEYLSQLLTKRGIKHNVLNAKHHEQEAQIVA	QAGLPGAVTVATNMA				
SecA2Msm	TGQPVLTIGTTHDVAESEELEHKLKAGVPAVVLNAKNDAAEA	AVIAEAGKLGAVTVSTQMA				
SecA2Mtu	RGQPVLTIGTTHDVAESEELEHKLKAGVPAVVLNAKNDAAEA	RVIAEAGKYGAVTVSTQMA				
CgsecA2	TGQPVLTIGTTHDVAESEELEHKLKAGVPAVVLNAKNDAAEA	QIIAEAGDIGRTVSTQMA				
Prim.cons.	KGQPVLTIGT22V22SE2LSE6LTKRG2PHNVNLNAKN222EAQIIAEAG2RGAVTV2T2MA					
	550	560	570	580	590	600
SecA1Mtu	GRGTDIVLGGNVDFLTDQRLRERGLDPVETPEEYEA	AHSELPIVKEEASKEAKEVIEAG				
SecA1Msm	GRGTDIVLGGNVDFLADKRLRERGLDPVETPEEYEA	AHVELPQVKAECAKEAEQVIEAG				
CgsecA1	GRGTDIVLGGNVDFLADKRLRERGLDPFEDEESYQEA	WDAELPAMKQRCERGDVREAG				
SecA2Msm	GRGTDIVLGGSD-----	VGDDDAEKKVAELG				
SecA2Mtu	GRGTDIVLGGSD-----	DE-ADHDRVVAELG				
CgsecA2	GRGTDIVLGGSD-----	DEADYDEVVKLG				
Prim.cons.	GRGTDIVLGGNVDFL3D3RLRERGLDPVETPEEYEA	AH3ELP3VK422EAEAD2V2E2G				
	610	620	630	640	650	660
SecA1Mtu	GLYVLGTERHESRRIDNQLRGRSGRQDGPESRFYLSL	GDLMRRFNGAALETLLTRLNL				
SecA1Msm	GLYVLGTERHESRRIDNQLRGRSGRQDGPESRFYLSL	GDLMRRFNGATLETLLTRLNL				
CgsecA1	GLYVLGTERHESRRIDNQLRGRSGRQDGPSTRFYLS	MRDLMVRFVGPPTMENMMNRLNV				
SecA2Msm	GLHVVGTGRHHTERLDNQLRGRAGRQDGPSSVFFS	WEDDVVAHLERSKLPMTDTP-D				
SecA2Mtu	GLHVVGTGRHHTERLDNQLRGRAGRQDGPSSVFFS	WEDDVVAANLDHNKLPMTD---				
CgsecA2	GLAVIGTARHRSQRLDNQLRGRAGRQDGPLSLFFV	SLDDVVVSGSGESVSAQPD---				
Prim.cons.	GLYVLGTERHESRR2DNQLRGR2GRQDGPSSRF2LSL2DD223RF2GAT2E2MLT2LNL					
	670	680	690	700	710	720
SecA1Mtu	PDDVPTEAKMVTIAIKSAQTQVEQQNFVVRKNVLY	DEVNQQRKVITYAERRRILEGENL				
SecA1Msm	PDDVPTEAKMVSRAIKSAQTQVEQQNFVVRKNVLY	DEVNQQRKVITYAERRRILEGENL				
CgsecA1	PDDVPTEAKTVTNSIKGAQAVENQNFEMRKNVLY	DEVNMQQRKVITYSERREILESADI				
SecA2Msm	AGDGRTEIPRAASLLDHAQRVAEGRLLDVHANTWR	YNQLIAQQRRAIVERRETLR----				
SecA2Mtu	-ENGRIVSPRTGSLLDHAQRVAEGRLLDVHANTWR	YNQLIAQQRRAIVERRETLR----				
CgsecA2	-ATGLTIDSDRIRDWGHGQRVTEGQLLEIHSQSWN	YNKLLADQRVIDERRERLLD----				
Prim.cons.	PDD2PIE2KRV22IKHAQR2VEGQ22EV2KNV2KY2E2M2QQRK2IYE2RRR2LEGENL					
	730	740	750	760	770	780
SecA1Mtu	KDQALDMVRDVTITAYVDGATGEGYAEDWDL	DALWTALKTLYPVGITADSLTRKDHEFERD				
SecA1Msm	AEQAHKMLVDVTITAYVDGATGEGYAEDWDL	ETLWTALKTLYPVGIDHRDLIDSDAVGEPG				
CgsecA1	SRYIQNMIEETVSAYVDGATANGYVEDWDL	DKLWNALEALYDPSINWTDLVEGSEYKPG				
SecA2Msm	-----	T-----				
SecA2Mtu	-----	T-----				
CgsecA2	-----	T-----				
Prim.cons.	33QA33M33DVITAYVDGATAEGYAEDWDL3LWTALKTLYPVGI333DLT33D33GEPG					

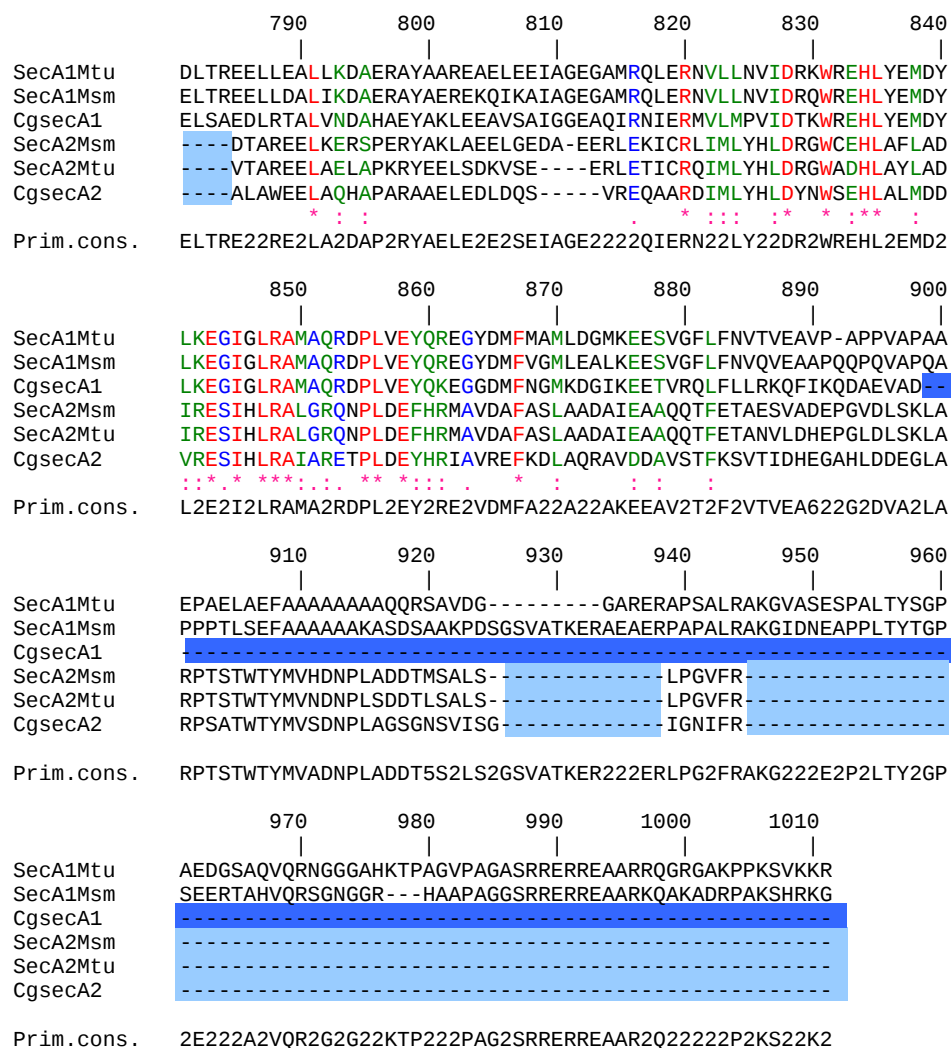


Abbildung 36: „Alignment“ der SecA-Proteine aus *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* und *C. glutamicum*. Das „alignment“ wurde mit dem „ClustalW“-Programm (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt. Aminosäuren in rot sind in allen SecA Proteinen identisch (durch Sterne (*) unterhalb der Sequenzen gekennzeichnet), grüne Farbe deutet sehr hohe Ähnlichkeit der Reste an (durch zwei Punkte unterhalb der Sequenz gekennzeichnet), blaue Farbe schwache Ähnlichkeit (hier dient ein Punkt unterhalb der Sequenz zur Verdeutlichung). Mtu: *M. tuberculosis*; Msm: *M. smegmatis*; Cg: *C. glutamicum*. Hellblaue Kästchen um Aminosäuren geben die Bereiche an, die in den SecA2-Proteinen nicht vorhanden sind, ein dunkelblauer Kasten markiert den im *C. glutamicum* SecA1 fehlenden Bereich. Rosafarbene Kästchen kennzeichnen die Walker-Motive der NBD der SecA-Proteine.

Wie in Abbildung 36 zu sehen, gibt es Bereiche auf Ebene der Aminosäuresequenz, die in allen SecA-Proteinen hoch konserviert sind. Hierzu zählen unter anderem die für die ATPase-Funktion wichtigen Walker-Motive der Nukleotid-Bindedomäne (NBD; rosafarbene Kästchen). Es gibt jedoch Bereiche, die in den SecA1-Proteinen der Mycobakterien vorhanden sind, in den SecA2-Proteinen jedoch völlig fehlen (hellblaue Kästchen). Diese Bereiche fehlen ebenfalls in NCgl1384 (CgsecA2), sind jedoch in fast allen Fällen in NCgl0726 (CgsecA1) konserviert. Dies verdeutlicht, dass NCgl1384 das *C. glutamicum* SecA2 und NCgl0726 das SecA1 kodiert und im Folgenden werden die beiden nur noch als

C. glutamicum SecA1 und SecA2 bezeichnet. Bei Betrachtung des „alignments“ des *C. glutamicum* SecA1-Proteins fällt darüber hinaus auf, dass hier etwa die letzten 100 Aminosäuren des C-Terminus, die in anderen SecA1-Proteinen konserviert sind, fehlen (dunkelblauer Kasten).

Nachdem unterschieden werden konnte, welches *secA*-Gen von *C. glutamicum* das SecA1- bzw. das SecA2-Protein kodiert, wurde mit Untersuchungen zur Aufklärung der Bedeutung der SecA2-abhängigen Proteintranslokation in *C. glutamicum* begonnen.

III.3.2.2 Das *secA2*-Gen von *C. glutamicum* ist essentiell.

Um Erkenntnisse über die Bedeutung und Funktion der SecA2-Translokation von *C. glutamicum* zu erhalten, sollten SecA2-abhängig exportierte Substrate identifiziert werden. Hierzu hat sich bei anderen, pathogenen Bakterien mit einem SecA2-System der Vergleich der von einer *secA2*-Mutante exportierten Proteine mit denen, die von einem Wildtyp-Stamm exportiert werden, bewährt (Lenz und Portnoy, 2002; Bensing und Sullam, 2002; Braunstein *et al.*, 2003). Proteine, die in einer *secA2*-Mutante nicht mehr oder weniger effizient exportiert werden, stellen SecA2-abhängig exportierte Proteine dar. Daher sollte im Folgenden eine *secA2*-Mutante von *C. glutamicum* hergestellt werden. Hierzu wurde das in *C. glutamicum* bewährte pK19*mobsacB*-System (Schäfer *et al.*, 1994) eingesetzt. Dieses System basiert auf dem pK19*mobsacB*-Vektor, einem pUC19-Derivat, der eine Kanamycin-Resistenzkassette trägt. Da dieser Vektor in *C. glutamicum* nicht replizieren kann, vermittelt er nur Kanamycin-Resistenz, wenn er in das *C. glutamicum* Chromosom über homologe Rekombination integriert. Für diese homologe Rekombination werden Nukleotid-Sequenzen, die etwa 400 bp großen Bereichen „upstream“ und „downstream“ des zu deletierenden Gens entsprechen, in diesen Vektor kloniert. Der pK19*mobsacB*-Vektor trägt darüber hinaus das *sacB*-Gen, das für die Levansucrase kodiert. Die Levansucrase bildet aus Sucrose Heteropolymere, die aufgrund ihrer Akkumulation toxisch auf die Zellen wirken. Als Konsequenz können Stämme mit dem *sacB*-Gen nicht auf Medien mit Sucrose wachsen.

Um die *secA2*-Mutante von *C. glutamicum* herstellen zu können, wurden über PCR der „upstream“ (A2USR)- und „downstream“ (A2DSR)-Bereich des *secA2*-Gens amplifiziert, und über „cross-over“-PCR fusioniert. Das Endprodukt wurde in den pK19*mobsacB*-Vektor kloniert und der resultierende Vektor (pK19Cg*secA2*) in den *C. glutamicum* Wildtyp transformiert. Nur *C. glutamicum* Zellen, bei denen eine Integration des Vektors über homologe Rekombination an den „upstream“ bzw. „downstream“ des *secA2*-Gens liegenden Bereichen stattgefunden hat, können auf Kanamycin-haltigen Agarplatten wachsen (Abbildung 37 A).

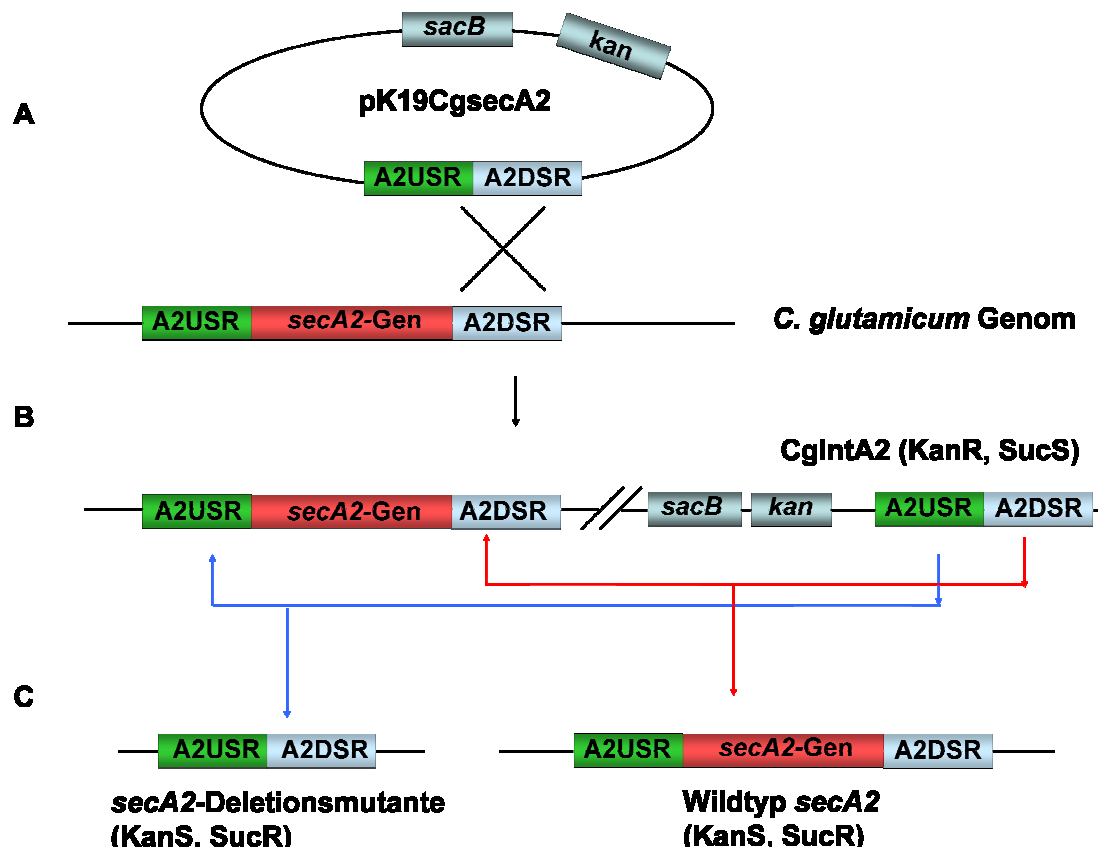


Abbildung 37: Schematische Darstellung des Versuchs zur Deletion des *C. glutamicum* *secA2*-Gens über das pK19mobsacB-System.

(A) Über homologe Rekombination am „upstream“(A2USR)- oder „downstream“(A2DSR)-Bereich des *secA2*-Gens kann der pK19CgsecA2-Vektor in das *C. glutamicum* Chromosom integrieren.

(B) Die CgIntA2-Mutante: dieser Stamm ist aufgrund des integrierten Vektors Kanamycin-resistent (KanR), aber Sucrose-sensitiv (SucS). Über homologe Rekombination an A2USR (blau) oder A2DSR (rot) kann es zu einer Plasmid-Excission kommen.

(C) Nach Plasmid-Excission kann es theoretisch mit gleicher Wahrscheinlichkeit zur Wiederherstellung des Wildtyp *secA2*-Gens oder zur Erzeugung einer *secA2*-Deletionsmutante kommen. Beide nach Excission entstehenden Stämme sind Kanamycin-sensitiv (KanS) und Sucrose-resistent (SucR). *sacB*: Levansucrase-Gen; *kan*: Kanamycin-Resistenzkassette

Es liegen nach Vektorintegration ein *secA2*-Lokus mit der Wildtyp-Version des *secA2*-Gens und ein Lokus mit einer *secA2*-Deletion im Chromosom von *C. glutamicum* vor (Abbildung 37 B). Diese Integration in das *C. glutamicum* Chromosom wurde über PCR verifiziert und der resultierende Stamm als CgIntA2 bezeichnet.

Durch eine Übernacht-Kultivierung von CgIntA2 ohne Kanamycin kann es zu einer Excission aus dem Chromosom und einem Verlust des Vektors kommen. Diese Excission erfolgt entweder über homologe Rekombination zwischen den „upstream“ (A2USR)- oder den „downstream“ (A2DSR)-Bereichen des Lokus mit der *secA2*-Deletion und dem Wildtyp *secA2*-Lokus (Abbildung 37 B). Je nachdem, an welchem Bereich die homologe Rekombination stattfindet, liegt nach der Excission entweder ein Wildtyp *secA2*-Gen oder eine *secA2*-Deletion im Chromosom vor (Abbildung 37 C). Zellen, bei denen eine Excission

des Plasmids stattgefunden hat, sind aufgrund des Verlusts des Levansucrase-Gens wieder in der Lage auf Sucrose zu wachsen. Das Gen für die Levansucrase mutiert jedoch mit einer sehr hohen Frequenz und somit treten häufig auch Klone auf, die auch trotz des noch integrierten Vektors auf Sucrose-Platten wachsen können. Um diese von den Klonen mit der Plasmid-Excision unterscheiden zu können, wurden sie auf Kanamycin-Resistenz untersucht. Klone, bei denen der Vektor noch integriert vorliegt und die Levansucrase mutiert ist, können in Gegenwart von Kanamycin wachsen, während Klone bei denen eine Plasmid-Excision stattgefunden hat mit dem Plasmid auch die Kanamycin-Resistenz verloren haben. Bei diesen Sucrose-resistenten aber Kanamycin-sensitiven Klonen handelt es sich um *C. glutamicum*-Zellen, bei denen nach Plasmid-Excision entweder eine Wildtyp-Kopie des *secA2*-Gens oder eine *secA2*-Mutante im Chromosom vorliegen. Theoretisch ist die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen der Wildtyp-Situation oder der *secA2*-Mutante jeweils 50%. Aus Klonen bei denen eine Plasmid-Excision stattgefunden hatte wurde chromosomale DNA präpariert und über PCR der *secA2*-Lokus im *C. glutamicum* Chromosom analysiert (Abbildung 38). Bei dieser PCR wurden Primer eingesetzt, die „up“- bzw. „downstream“ der auf dem Integrationsvektor vorhandenen Bereiche im *C. glutamicum* Chromosom binden.

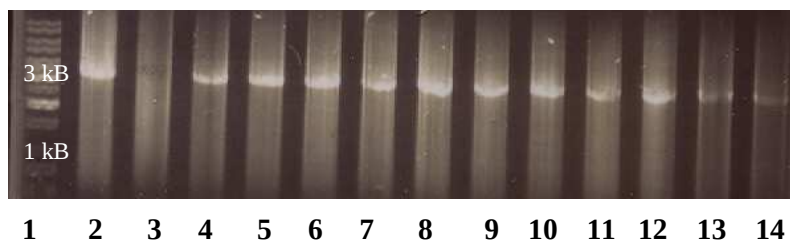


Abbildung 38: PCR zur Überprüfung des *secA2*-Lokus auf das Vorliegen einer Deletion. Aufgetragen sind in Spur 1 der 1kB DNA Größenstandard (MBI Fermentas), in Spur 2 eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA des Wildtyps, in Spur 3 die PCR-Reaktion mit dem pK19CgsecA2-Vektor und in den Spuren 4-14 PCRs mit chromosomaler DNA aus verschiedenen Sucrose-resistenten aber Kanamycin-sensitiven Klonen.

Eine PCR mit dem Integrationsvektor als „template“ ergab kein Produkt (Abbildung 38, Spur 3), während ausgehend von chromosomaler *C. glutamicum* Wildtyp-DNA eine Bande von etwas über 3 kb erhalten wurde (Spur 2). In allen getesteten Klonen (Spur 4-14) wurde jedoch ebenfalls nur die gleiche Situation wie im Wildtyp vorgefunden. Insgesamt wurden mehr als 120 Klone auf diese Art analysiert, doch eine *secA2*-Mutante konnte in keinem Fall identifiziert werden. Dieser Befund spricht dafür, dass es sich bei dem Gen, das deletiert werden sollte, wahrscheinlich um ein essentielles Gen handelt. Neben einer vollständigen *secA2*-Deletion wurde ebenfalls versucht, das *secA2*-Gen durch die Integration eines Vektors in das Gen zu inaktivieren. Hierzu wurde der Vektor pK18mob, ein pUC18-Derivat, das in *C. glutamicum* ebenfalls nicht replizieren kann, verwendet. In diesen Vektor wurde ein internes Fragment des *secA2*-Gens von *C. glutamicum* kloniert. Der hieraus resultierende Vektor pK18CgsecA2 kann in *C. glutamicum* nur Kanamycin-Resistenz vermitteln, wenn

eine Integration des Vektors durch homologe Rekombination über die Sequenz des internen *secA2*-Fragments erfolgt. Hierbei würde es zu einer Disruption des *secA2*-Leserahmens kommen und somit zu einer Inaktivierung des *secA2*-Gens. Der pK18CgsecA2-Vektor wurde in den *C. glutamicum* Wildtyp transformiert und es wurde auf Kanamycin-resistente Klone selektioniert. Es konnten jedoch auch nach mehrfacher Wiederholung der Transformation keine Kanamycin-resistenten Klone erhalten werden. Eine Herstellung einer Inaktivierungsmutante war folglich ebenfalls nicht möglich. Es wäre jedoch denkbar, dass eine Deletion oder Disruption des *C. glutamicum secA2*-Gens aufgrund polarer Effekte scheiterte. Daher wurde versucht, das *secA2*-Gen zu deletieren, wenn *secA2* gleichzeitig *in trans* von einem Plasmid exprimiert wird. Da keiner der verfügbaren SecA-Antikörper mit dem *C. glutamicum* SecA2-Protein in einem Western Blot reagierte (ohne Abbildung), wurde über PCR eine Version des *secA2*-Gens amplifiziert, die einen C-terminal angehängenen 6xHis-Tag für die Detektion kodiert. Das erhaltene *secA2Tag*-Gen wurde in den *C. glutamicum*/E.coli-„shuttle“-Vektor pVWEX2 kloniert. Die Expression des *C. glutamicum secA2Tag*-Gens ist auf pVWEX2 unter der Kontrolle eines modifizierten *lac*-Promotors, bei dem die Genexpression durch IPTG-Zugabe induziert werden kann, aber durch Glukose nicht mehr reprimiert wird. Der resultierende Expressionsvektor für das *C. glutamicum secA2Tag*-Gen, pVA2, sowie der pVWEX2-Leervektor, wurden in den CgIntA2-Stamm, bei dem der pK19CgsecA2-Vektor chromosomal integriert vorliegt, transformiert. Die Expression des *C. glutamicum* SecA2Tag-Proteins wurde in den erhaltenen Klonen nach Anzucht unter IPTG-Induktion im Western Blot mit Anti-5xHis-Antikörper untersucht (Abbildung 39).

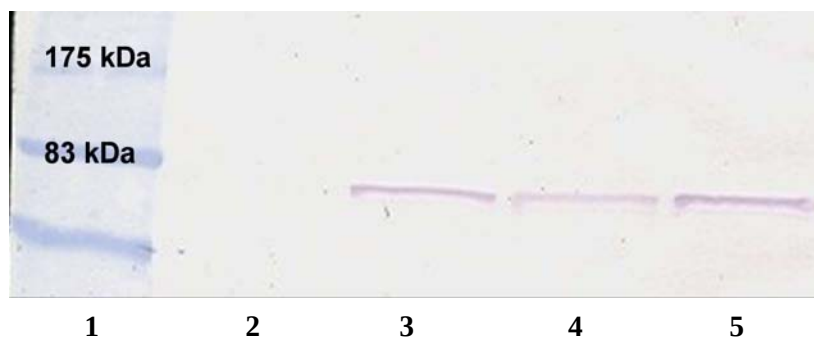


Abbildung 39: Expression des *C. glutamicum* SecA2Tag-Proteins in CgIntA2.

Spur 1: BR-Größen-Standard; Spur 2-5: auf eine OD₆₀₀ von 0,5 normierte Gesamtzellproteine von CgIntA2 mit dem pVWEX2-Leervektor (Spur 2) bzw. dem pVA2-Expressionsvektor (Spur 3-5). Zur Detektion wurde der Anti-5xHis-Antikörper eingesetzt. Anzucht der Zellen erfolgte bei 30°C und unter Induktion mit 100 µM IPTG.

Wie in Abbildung 39, Spur 2 zu erkennen, zeigt der CgIntA2-Stamm mit dem Leervektor keinerlei Reaktivität mit dem verwendeten Anti-5xHis-Antikörper. In Stämmen mit dem pVA2-Expressionsvektor hingegen sieht man eine deutliche Reaktion des Antikörpers mit einer etwas unterhalb von 83 kDa laufenden Bande. Bei diesem Protein handelt es sich um

das *C. glutamicum* SecA2Tag-Protein, das eine etwas geringere Laufhöhe aufweist, als die vorhergesagte Masse von 84,2 kDa erwarten lässt. Die Expression des SecA2Tag-Proteins wurde folglich nachgewiesen. Anschließend wurden die Versuche zur chromosomalen Deletion des *C. glutamicum* *secA2* mit Stämmen, die entweder den pVWEX2-Leervektor oder den SecA2Tag-Expressionvektor tragen, wiederholt. Die Isolierung potentieller Deletionsmutanten beider Stämme erfolgte wie oben beschrieben, jedoch wurde bei allen Schritten dem Medium Tetracyclin für die Selektion auf die Anwesenheit des Leer- bzw. SecA2Tag-Expressionsvektors zugegeben. Aus potentiellen *secA2*-Deletionsmutanten der Stämme mit dem Leervektor oder dem SecA2Tag-Expressionvektor wurde chromosomale DNA präpariert und der *secA2*-Genlocus durch PCR untersucht (Abbildung 40).

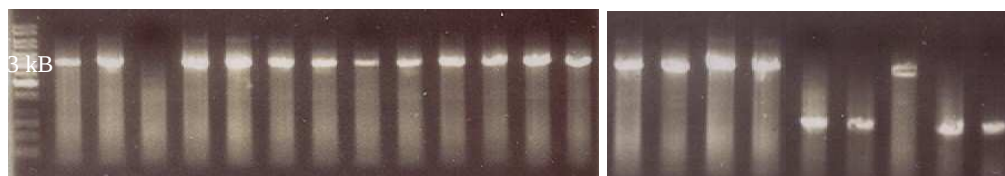


Abbildung 40: PCR zur Überprüfung des *secA2*-Lokus auf das Vorliegen einer Deletion in den CgIntA2-Stämmen mit dem Leervektor oder dem *secA2Tag*-Expressionsvektor. Aufgetragen sind in Spur 1 der 1kDa DNA Größenstandard (MBI Fermentas), in Spur 2 und 3 PCR-Reaktionen mit chromosomaler DNA des Wildtyps, in Spur 4 die PCR-Reaktion mit dem pK19CgsecA2-Vektor und in den Spuren 5-23 PCRs mit chromosomaler DNA aus verschiedenen Sucrose-resistenten aber Kanamycin-sensitiven Klonen aus entweder Stämmen mit dem Leervektor (Spur 5-14) oder mit dem *secA2Tag*-Expressionvektor (Spur 15-23).

Wie in Abbildung 40 zu erkennen, zeigt sich bei allen 10 Klonen die den Leervektor tragen (Spur 5-14) die 3,2 kDa große Bande des Wildtyp-*secA2*-Gens (Spur 1 und 2). Im Gegensatz hierzu ist in vier der neun untersuchten Klone mit dem *secA2tag*-Expressionsvektor die 0,99 kDa große Bande zu sehen, die bei *secA2*-Deletion zu erwarten ist (Spur 19, 20, 22 und 23). In den restlichen fünf Klonen ist die Wildtyp-Bande vorhanden. Es ist demnach möglich, eine chromosomale Deletion des *C. glutamicum* *secA2* zu erzielen, wenn das SecA2Tag *in trans* exprimiert wird. Die Deletion bei Anwesenheit des Leervektors alleine ist offensichtlich nicht möglich. Um dies noch weiter zu stützen, wurden noch weitere 20 potentielle *secA2*-Deletionsmutanten des CgIntA2-Stammes mit dem Leervektor untersucht. Bei allen ergab die PCR die Bande des Wildtyp-*secA2*. Zusammengefasst sind die bisher gewonnen Ergebnisse bereits ein sehr deutlicher Hinweis darauf, dass das als *secA2*-bezeichnete Gen in *C. glutamicum* essentiell ist.

Um diese Aussage noch weiter zu kräftigen, wurden „plasmid-curing“-Experimente durchgeführt. Hierbei wurden Stämme mit dem pVA2-Vektor eingesetzt, die auf dem Chromosom entweder das Wildtyp *secA2*-Gen oder die *secA2*-Deletion aufwiesen. Sollte das *secA2*-Gen essentiell sein, so sollte bei einer Kultivierung ohne Tetracyclin eine *secA2*-Deletionsmutante nicht in der Lage sein, den pVA2-Vektor zu verlieren, während der Vektor für einen Wildtyp-Stamm verzichtbar sein sollte. Das „plasmid-curing“ wurde wie unter II.4.5 beschrieben durchgeführt. Das prozentuale Verhältnis der Klone, die in Bezug auf die Gesamtanzahl der Zellen noch über Tetracyclin-Resistenz verfügt (und somit das Plasmid noch besitzen), wurde zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt und ist in Abbildung 41 grafisch aufgetragen.

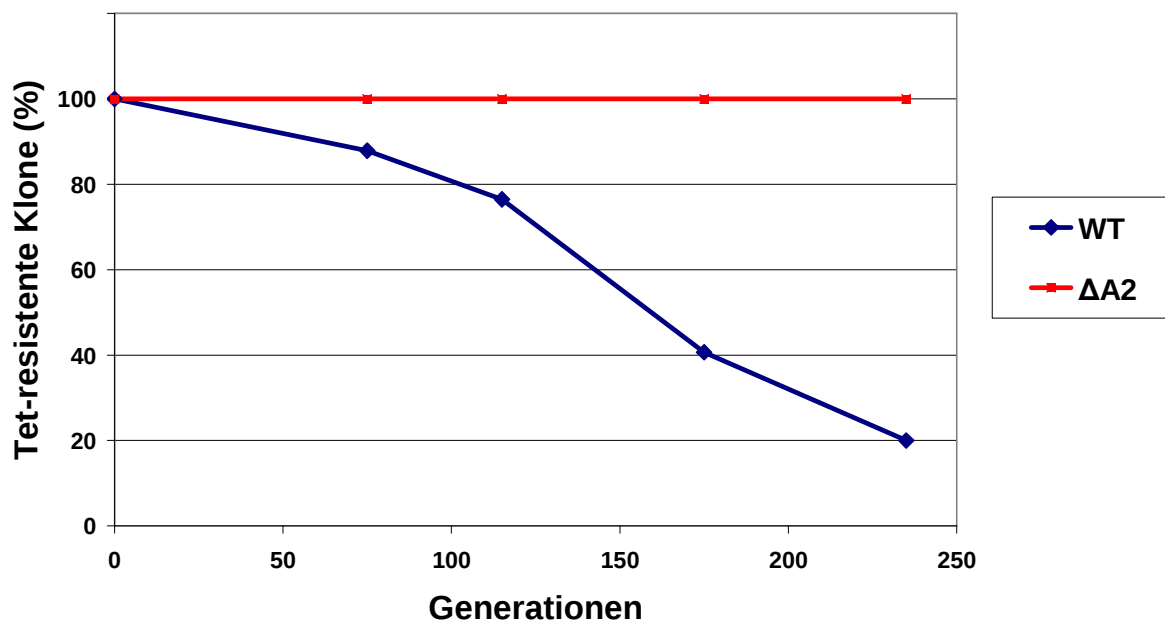


Abbildung 41: Prozentualer Anteil der Tetracyclin-resistenten Klone nach „plasmid-curing“ von *C. glutamicum*. *C. glutamicum* Wildtyp (WT, Blau) und *secA2*-Mutante ($\Delta A2$, Rot), beide mit dem pVA2-Plasmid, wurden über 235 Generationen in BHIS-Medium mit IPTG aber ohne Tetracyclin angezogen. Nach 75, 115, 175 und 235 Generationen wurde der Anteil der Klone, die noch über Tetracyclin-Resistenz verfügen, ermittelt.

Wie in Abbildung 41 zu sehen, nimmt der Anteil der Tetracyclin-resistenten Klone des Wildtyps (Blau) über die Zeit kontinuierlich ab. Nach 235 Generationen sind lediglich noch 20% der gesamten Klone resistent gegenüber dem Antibiotikum. In diesem Stamm kommt es in Abwesenheit des Tetracyclin-Selektionsdrucks zu einem Verlust des pVA2-Plasmid in den Zellen. Über Isolierung von Plasmid-DNA wurde wie unter II.4.5 beschrieben für einige Klone verifiziert, dass Zellen mit Tetracyclin-Resistenz tatsächlich noch über das SecA2Tag-Expressionsplasmid verfügen, während in Tetracyclin-sensitiven Klonen kein Plasmid mehr nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zum Wildtyp ist der Anteil der Klone der *secA2*-

Mutante (Rot), die das pVA2-Plasmid behalten, über die gesamten 235 Generationen konstant bei 100%. Die *secA2*-Mutante kann folglich das Plasmid nicht verlieren. Somit lässt sich aussagen, dass das *C. glutamicum secA2*-Gen, im Gegensatz zu allen anderen bislang bekannten und untersuchten *secA2*-Genen, essentiell ist.

Da es sich beim *secA2*-Gen von *C. glutamicum* um ein essentielles Gen handelt, ist es möglich, dass *C. glutamicum* das erste Bakterium mit zwei essentiellen *secA*-Genen ist. Um dies zu verifizieren, wurde im Folgenden untersucht, ob das *secA1* von *C. glutamicum* ebenfalls essentiell ist.

III.3.2.3 *C. glutamicum* besitzt zwei essentielle *secA*-Gene.

In allen bekannten Bakterien ist nur ein essentielles *secA*-Gen vorhanden und das von diesem Gen kodierte Protein ist ausreichend um die Translokation aller für das Überleben essentiellen Sec-Substrate zu gewährleisten. Wenn in einem Bakterium ein zusätzliches *secA2*-Gen vorhanden ist, so ist dieses in allen bislang untersuchten Fällen nicht essentiell. Der Befund, dass das *secA2*-Gen von *C. glutamicum* essentiell ist, lässt es möglich erscheinen, dass es sich bei *C. glutamicum* um das erste Bakterium mit zwei essentiellen *secA*-Genen handelt. Dies würde die Frage aufwerfen, warum die Translokation essentieller Sec-Vorläuferproteine in *C. glutamicum* im Gegensatz zu allen anderen bekannten Bakterien zwei verschiedene SecA-Proteine benötigt. Als erstes sollte daher untersucht werden, ob das hier vorliegende *secA1*-Gen ebenfalls essentiell ist. Hierzu wurde analog zur Ermittlung der Essentialität des *secA2*-Gens verfahren.

Als erstes wurde versucht, eine Disruptionsmutante des *secA1*-Gens mit dem pK18*mob*-System herzustellen. Hierzu wurde über PCR ein internes Fragment des *secA1*-Gens amplifiziert, in den pK18*mob* Vektor kloniert und der hieraus resultierende Vektor (pK18Cg*secA1*) in den *C. glutamicum* Wildtyp transformiert. Es konnten jedoch auch nach mehrfacher Wiederholung der Transformation keine Kanamycin-resistenten Klone erhalten werden. Dass folglich keine Disruption des *C. glutamicum secA1*-Leserahmens durch Integration des Vektors in das Chromosom möglich war, war ein erster Hinweis darauf, dass auch das *secA1*-Gen von *C. glutamicum* essentiell ist. Als zweiter Schritt wurde eine Deletion des *secA1* über das pK19*mobsacB*-System versucht. Hierzu wurden über PCR der „upstream“ und „downstream“-Bereich des *secA1*-Gens amplifiziert und über eine „cross-over“-PCR fusioniert. Das erhaltene Fusionsprodukt wurde in den pK19*mobsacB*-Vektor kloniert und mit dem erhaltenen Integrationsvektor (pK19Cg*secA1*) der *C. glutamicum* Wildtyp transformiert. Die Integration des Vektors in das *C. glutamicum* Chromosom an der korrekten Stelle wurde in den Kanamycin-resistenten Klonen über PCR verifiziert und der erhaltene Stamm als CgIntA1 bezeichnet. Im Gegensatz zum *secA2*-Gen wurde jedoch nicht direkt versucht, eine Deletion des *secA1* in diesem Stamm zu erhalten, sondern eine Deletion wurde erst in

Anwesenheit eines *C. glutamicum* *secA1*-Expressionsvektors angestrebt. Für die *in trans*-Expression des *C. glutamicum* SecA1 wurde eine Version des *secA1*-Gens, die für die Detektion zusätzlich einen C-terminalen 6xHisTag kodiert (*secA1Tag*), in den pVWEX2-Vektor kloniert. Der hierdurch erhaltene Vektor, pVA1, und der pVWEX2-Leervektor wurden in den *C. glutamicum* CgIntA1-Stamm transformiert. Nach erfolgreicher Transformation wurde die Expression des *C. glutamicum* SecA1Tag-Proteins nach IPTG-Induktion über einen Western Blot mit Anti-5xHis-Antikörper untersucht (Abbildung 42).

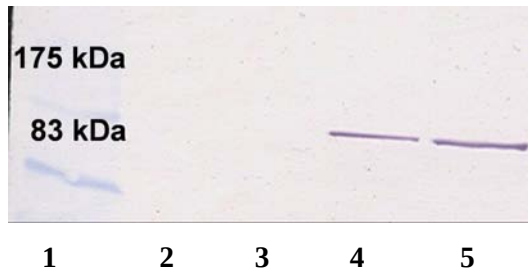


Abbildung 42: Expression des *C. glutamicum* SecA1Tag-Proteins in CgIntA1.

Spur 1: BR-Größenstandard; Spur 2-5: auf eine OD₆₀₀ von 0,5 normierte Gesamtzellproteine von CgIntA1 mit dem pVWEX2-Leervektor (Spur 2 und 3) bzw. dem pVA1-Expressionsvektor (Spur 4 und 5). Zur Detektion wurde der Anti-5xHis-Antikörper eingesetzt. Anzucht der Zellen erfolgte bei 30°C und unter Induktion mit 100 µM IPTG.

Wie in Abbildung 42 (Spur 2 und 3) zu erkennen, reagiert der Anti-5xHis-Antikörper nicht mit Proteinen aus dem CgIntA1-Stamm mit dem pVWEX2-Leervektor. Bei Expression des *C. glutamicum* SecA1Tag hingegen ist eine Proteinbande oberhalb der 83 kDa-Bande des Proteinstandards zu erkennen (Spur 4 und 5). Bei dieser Bande handelt es sich um das SecA1Tag-Protein, das ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 96,2 kDa besitzt. Nachdem die Expression des SecA1Tag-Proteins in CgIntA1 nachgewiesen war, wurde ein Versuch zur Deletion des chromosomalen *secA1*-Gens durchgeführt. Aus potentiellen *secA1*-Deletionsmutanten des CgIntA1-Stamm mit dem pVWEX2-Leervektor oder dem SecA1Tag-Expressionsvektor wurde chromosomale DNA präpariert und in einer Kontroll-PCR auf ihren *secA1*-Genloкус untersucht (Abbildung 43).

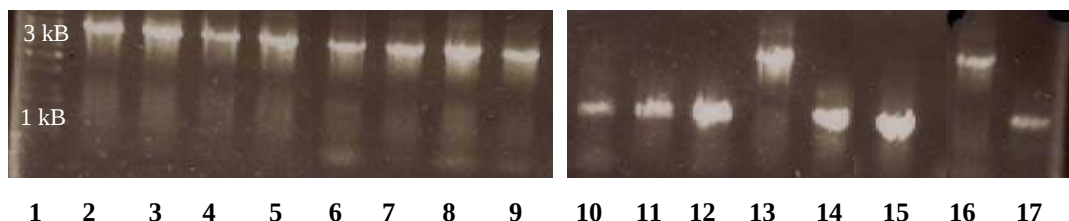


Abbildung 43: PCR zur Überprüfung des *secA1*-Lokus auf das Vorliegen einer Deletion in den CgIntA1-Stämmen mit dem Leervektor oder dem *secA1Tag*-Expressionsvektor. Aufgetragen sind in Spur 1 der 1kB DNA Größenstandard (MBI Fermentas), in Spur 2 die PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA des Wildtyps und in den Spuren 3-17 PCRs mit chromosomaler DNA aus verschiedenen Sucrose-resistenten aber Kanamycin-sensitiven Klonen aus entweder Stämmen mit dem Leervektor (Spur 3-9) oder mit dem *secA1Tag*-Expressionvektor (Spur 10-17).

Wie in Abbildung 43 zu erkennen, wurde für alle untersuchten Klone mit dem Leervektor (Spur 3-9) die Bande des Wildtyp *secA1*-Gens gefunden (Spur 2). Ist jedoch der pVA1-Vektor in den Zellen vorhanden, so lieferte die PCR für 2 Klone die Bande des Wildtyps (Spur 13 und 16), aber für 6 Klone die für eine *secA1*-Mutante zu erwartende 1,2 kB große Bande (Spur 10, 11, 12, 14, 15 und 17). Bei *in trans* Expression des SecA1Tag-Proteins ist es also möglich, eine Deletion des *C. glutamicum secA1* zu erzielen. Ist nur der Leervektor vorhanden, so kann eine Deletion nicht erfolgen. Dies wurde durch die Untersuchung von 20 weiteren potentiellen *secA1*-Mutanten des Leervektor-Stamms, bei denen ebenfalls nur die Wildtyp-Situation gefunden wurde, bestätigt. Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dem *secA1*-Gen von *C. glutamicum* mit allergrößter Wahrscheinlichkeit ebenfalls um ein essentielles Gen handelt. Um dies weiterhin zu bekräftigen, wurden hier ebenfalls „plasmid-curing“-Experimente durchgeführt. Bei diesen wurde genau wie bei den „curing“-Experimenten des *secA2*-Vektors beschrieben verfahren. Stämme des Wildtyps und der *secA1*-Deletionsmutante, in denen das pVA1-Plasmid vorhanden war, wurden über einen Zeitraum von 235 Generationen in BHIS-Medium ohne Tetracyclin angezogen und zu verschiedenen Zeitpunkten auf Tetracyclin-Resistenz und somit auf eine Anwesenheit des Plasmids überprüft. Abbildung 44 zeigt eine grafische Auftragung des prozentualen Anteils der Tetracyclin-resistenten Klone bezogen auf die Gesamtzahl der Klone zu den jeweiligen Zeitpunkten für Wildtyp (Blau) und *secA1*-Deletionsmutante (Rot).

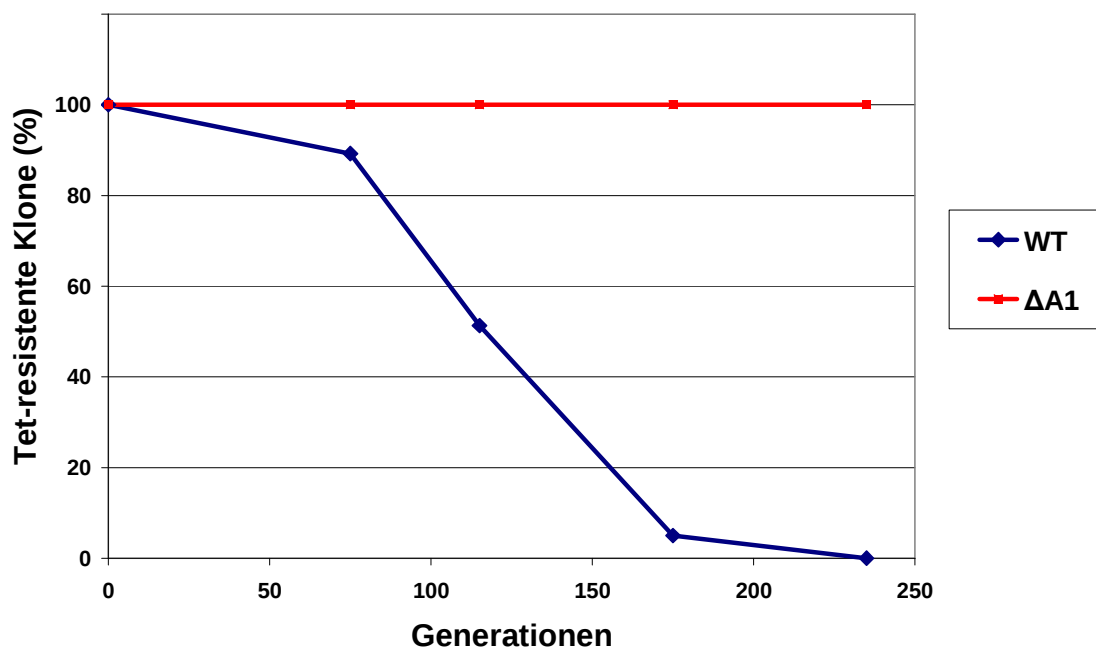


Abbildung 44: Prozentualer Anteil der Tetracyclin-resistenten Klone nach „plasmid-curing“ von *C. glutamicum*. *C. glutamicum* Wildtyp (WT, Blau) und *secA1*-Mutante ($\Delta A1$, Rot), beide mit dem pVA1-Plasmid, wurden über 235 Generationen in BHIS-Medium mit IPTG aber ohne Tetracyclin angezogen. Nach 75, 115, 175 und 235 Generationen wurde der Anteil der Klone, die noch über Tetracyclin-Resistenz verfügen ermittelt.

Wie in Abbildung 44 zu erkennen, nimmt im Wildtyp der Anteil an Tetracyclin-resistenten Klonen über die Zeit kontinuierlich ab (Blau). Das heißt, es kommt zu einem Verlust des pVA1-Plasmid. Nach 235 Generationen haben alle Zellen das *secA1Tag*-Expressionsplasmid verloren. In der *secA1*-Mutante (Rot) hingegen zeigen auch nach 235 Generationen noch 100% der Klone Tetracyclin-Resistenz. Die *secA1*-Mutante kann das pVA1-Plasmid folglich nicht verlieren. Dies zeigt, dass auch das *secA1*-Gen von *C. glutamicum* wie das *secA2*-Gen essentiell ist. *C. glutamicum* ist somit das erste und bislang einzige bekannte Bakterium mit zwei essentiellen *secA*-Genen. Dieser Fund macht es umso interessanter herauszufinden, welche Funktion der SecA2-abhängigen Proteintranslokation in *C. glutamicum* zukommt. Um dies zu analysieren, wurde in *C. glutamicum* eine Suche nach Substraten für diesen Translokationsmechanismus durchgeführt.

III.3.2.4 Konstruktion einer *C. glutamicum* *secA2*-Promotoraustauschmutante.

Die Essentialität des *secA2*-Gens von *C. glutamicum* zeigt bereits, dass der SecA2-abhängigen Proteintranslokation in diesem nicht-pathogenem Bakterium eine große Bedeutung zukommt. Um die Funktion des SecA2-Wegs genauer zu untersuchen, sollten SecA2-abhängig exportierte Substraten in *C. glutamicum* identifiziert werden. Da eine Deletion des essentiellen *secA2*-Gens nicht möglich war, wurde hierzu ein chromosomaler Austausch des *secA2*-Promotors gegen einen regulierbaren Promotor durchgeführt. Ohne Induktion sollten in einem solchen Stamm SecA2-abhängige Substrate nicht mehr, oder mit reduzierter Effizienz, exportiert werden. Für ein anderes essentielles *C. glutamicum* Gen, *glyA* (kodiert die SHMT: Serin-Hydroxy-Methyl-Transferase), führte ein Austausch des authentischen Promotors gegen den *tac*-Promotor zu einem Stamm, der in Abwesenheit der Induktors IPTG sehr schlecht wächst (Simic *et al.*, 2002). Mit diesem System ist es folglich möglich, eine durch IPTG-Zugabe regulierbare Expression eines gewünschten Gens zu erreichen. Daher wurde analog zur Konstruktion der *glyA*-Promotoraustauschmutante vorgegangen, um einen Austausch des *secA2*-Promotors zu erreichen. Hierzu wurde *lacI^q*, das Gen für den Lac-Repressor, und der *tac*-Promotor ausgehend vom Plasmid pVWEX2 und die ersten 400 bp des *secA2*-Gens ausgehend von chromosomaler *C. glutamicum* DNA amplifiziert und über „cross-over“-PCR fusioniert. Das Produkt, welches ein verkürztes *secA2*-Gen unter der Kontrolle des *tac*-Promotors sowie das *lacI^q*-Gen kodiert, wurde in den Vektor pK18*mob* kloniert. Der resultierende pK18*tacA2* Vektor kann in *C. glutamicum* nicht replizieren und es werden daher nach Transformation in *C. glutamicum* nur Kanamycin-resistente Klone erhalten, wenn eine Integration des Vektors über homologe Rekombination an den ersten 400 bp des *secA2*-Gens stattfindet. Dieses Rekombinationsereignis ist in Abbildung 45 dargestellt.

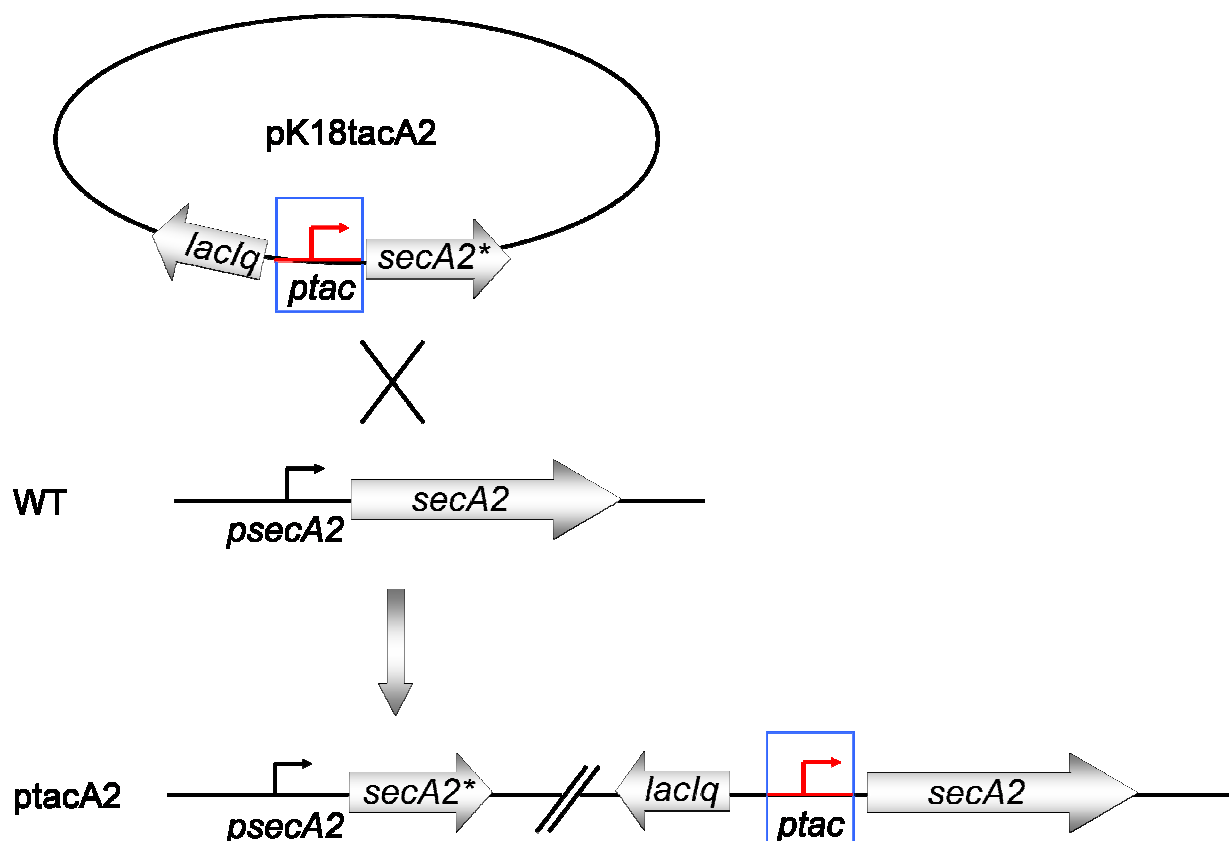


Abbildung 45: Konstruktion der *C. glutamicum* secA2-Promotoraustauschmutante über homologe Rekombination. pK18tacA2 kann in *C. glutamicum* nicht replizieren, und folglich werden nur Kanamycin-resistente Klone erhalten, wenn eine Integration über homologe Rekombination an den ersten 400 bp des secA2-Gens stattfindet. Nach diesem Integrations-Ereignis liegen im resultierenden Stamm ptacA2 zwei Versionen des secA2-Gens vor. Zum einem die verkürzte, 400 bp secA2*-Version, die unter Kontrolle des secA2-Promotors (*psecA2*) steht und ein nicht funktionelles SecA2-Protein kodiert, und zum anderen das Wildtyp secA2-Gen, dessen Expression unter der Kontrolle des tac-Promotors (*ptac*) steht.

Nach der Integration des pK18tacA2-Vektors in das Chromosom liegen in *C. glutamicum* zwei Versionen des secA2-Gens vor. Das verkürzte secA2*-Gen, das unter Kontrolle des secA2-Promotors (*psecA2*) steht und eine nicht-funktionelle Version des SecA2 kodiert, und das Wildtyp secA2-Gen, dessen Expression über den tac-Promotor (*ptac*) gesteuert wird. Die Expression der einzigen funktionellen Version des essentiellen SecA2-Proteins wird folglich über den tac-Promotor kontrolliert. Da mit dem pK18tacA2-Vektor ebenfalls das Gen für den Lac-Repressor, *lacI^q*, in das *C. glutamicum* Chromosom integriert wurde, ist die Expression des secA2-Gen in Abwesenheit eines Induktors wie z.B. IPTG, reprimiert. Weil die Expression des secA2-Gens jedoch essentiell ist, wurde bereits während der Transformation des *C. glutamicum* Wildtyps mit dem pK18tacA2-Vektor bei allen Schritten IPTG (100 µM) hinzugegeben. Aus den nach Transformation des pK18tacA2-Vektors in *C. glutamicum* erhaltenen Kanamycin-resistenten Klonen wurde chromosomale DNA präpariert und die Integration des Vektors über PCR verifiziert. Hierzu wurden die Primer so gewählt, dass ein Primer in der Sequenz des Vektors und der andere im *C. glutamicum* Chromosom hinter der potentiellen Integrationsstelle bindet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 46 dargestellt.

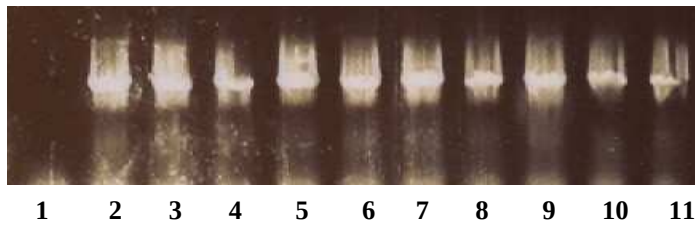


Abbildung 46: PCR zur Überprüfung der Integration des pK18tacA2-Vektors. Aufgetragen ist in Spur 1 die PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA des Wildtyps und in den Spuren 2-11 PCRs mit chromosomaler DNA aus Kanamycin-resistenten Klonen nach Transformation mit pK18tacA2.

Wie in Abbildung 46 zu erkennen, ergibt eine PCR ausgehend von chromosomaler Wildtyp DNA kein Produkt (Spur 1). Hingegen zeigen alle nach Transformation mit dem pK18tacA2-Vektor erhaltenen Kanamycin-resistenten Klone eine Bande der zu erwartenden Größe (Spur 2-11). Da eine solche Bande nur bei Integration des Vektors an der korrekten Stelle in das Chromosom von *C. glutamicum* zu erwarten ist, wurde somit die Konstruktion der *secA2*-Promotoraustauschmutante verifiziert.

Die *secA2*-Promotoraustauschmutante von *C. glutamicum* wurde als *ptacA2* bezeichnet und es wurde zuerst das Wachstum dieser Mutante im Vergleich zum Wildtyp in CGXII-Minimalmedium mit und ohne IPTG verglichen (Abbildung 47).

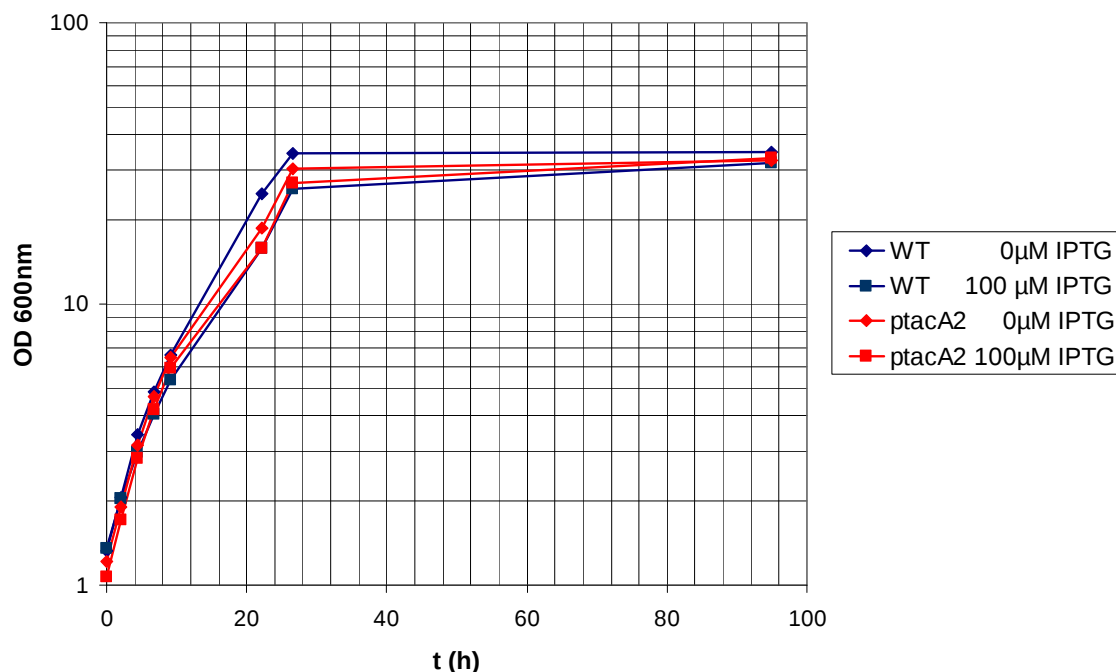


Abbildung 47: Wachstum von *C. glutamicum* *secA2*-Promotoraustauschmutante und Wildtyp in Gegenwart und Abwesenheit von IPTG. Die Stämme wurden zuerst in BHIS-Medium mit 100 μM IPTG 8 Stunden angezogen, zweimal mit CGXII-Medium gewaschen, und anschließend eine CGXII-Vorkultur mit 10 μM IPTG zu einer OD₆₀₀ von 1 beimpft und über Nacht wachsen gelassen. Nach erneutem, zweimaligem Waschen mit CGXII-Medium ohne IPTG, wurde von Wildtyp (Blau) und *ptacA2*-Mutante (Rot) jeweils ein Kolben mit CGXII mit 100 μM IPTG (Quadrate) und ein Kolben mit CGXII ohne IPTG (Diamanten) zu einer OD₆₀₀ von 1 beimpft und das Wachstum verfolgt.

Wie in Abbildung 47 zu erkennen, zeigen sowohl der Wildtyp wie auch die *ptacA2*-Mutante annähernd gleiches Wachstum, unabhängig davon, ob IPTG im Medium vorhanden ist oder nicht. Für die *ptacA2*-Mutante wäre zu erwarten gewesen, dass in Abwesenheit von IPTG ein Wachstumsdefekt auftritt, da die Expression des essentiellen *secA2*-Gens nicht mehr induziert wird. Es ist jedoch vorstellbar, dass in Abwesenheit von IPTG durch eine Restaktivität des *tac*-Promotors eine geringe Menge an SecA2-Protein gebildet wird. Diese könnte ausreichend sein, um die Translokation der Vorläuferproteine zu gewährleisten, die die Essentialität des *secA2*-Gens in *C. glutamicum* begründen. Im Folgenden wurde daher versucht, die Aktivität des vor dem *secA2*-Gen befindlichen *tac*-Promotors in Abwesenheit von IPTG weiter zu reduzieren. Eine Möglichkeit hierzu stellt die Überexpression des Lac-Repressors dar. Zwar ist eine Kopie des *lacI^q*-Gens mit dem Integrationsvektor beim Promotoraustausch in das *C. glutamicum* Chromosom integriert worden, doch wahrscheinlich ist die ausgehend von diesem Gen synthetisierte Menge an Lac-Repressor unzureichend, um eine vollständige Repression des *tac*-Promotors in Abwesenheit von IPTG zu erzielen. Es ist durchaus vorstellbar, dass eine höhere Menge an Lac-Repressor Molekülen zu einer stärkeren Repression führt. Die einfachste Methode für die Überexpression des Lac-Repressors stellt die Transformation der *ptacA2*-Mutante mit einem Vektor, auf dem das *lacI^q*-Gen vorhanden ist, dar. Hierzu wurde der Vektor pVWEX2 gewählt, der in *C. glutamicum* eine Kopienzahl von etwa 20 aufweist. Durch das Einbringen dieses Vektors in *C. glutamicum* sollte folglich die Menge an Lac-Repressor im Vergleich zu nur einer chromosomalen Kopie deutlich gesteigert werden. Wenn diese gesteigerte Menge an Lac-Repressor in der *ptacA2*-Mutante zu einer starken Repression der *secA2*-Expression in Abwesenheit von IPTG führt, sollte sich dies in einem Wachstumsdefekt bemerkbar machen. Daher wurde das Wachstum von *ptacA2*-Mutante und Wildtyp mit dem pVWEX2-Leervektor in CGXII-Medium in An- bzw. Abwesenheit von IPTG über 35 Stunden verfolgt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 48 zu sehen.

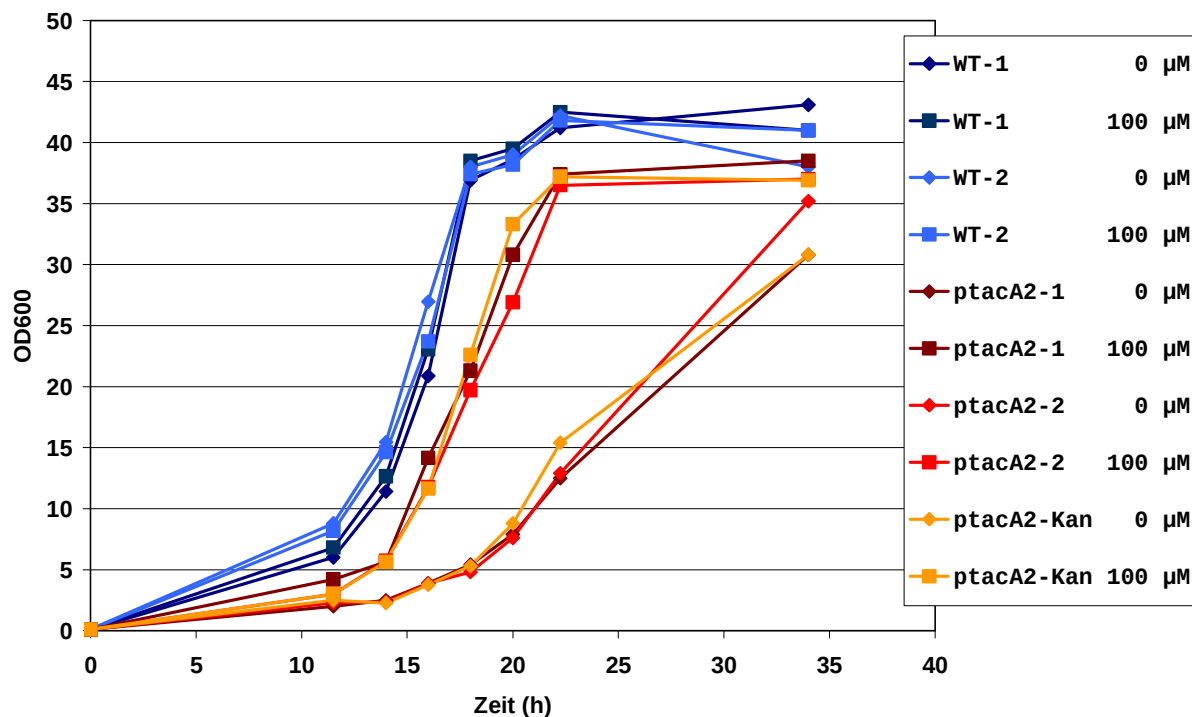


Abbildung 48: Vergleich des Wachstums der pVWEX2-Klone von *C. glutamicum* Wildtyp und ptacA2-Mutante bei Kultivierung unter verschiedenen IPTG-Konzentrationen. Alle verwendeten Stämme tragen den pVWEX2-Leervektor. Je zwei Klone der beiden Stämme wurden zuerst in BHIS-Medium mit 100 μ M IPTG über Tag kultiviert, zweimal mit CGXII-Medium gewaschen, und anschließend wurde eine CGXII-Vorkultur mit 10 μ M IPTG zu einer OD₆₀₀ von 1 beimpft und über Nacht wachsen gelassen. Nach erneutem, zweimaligem Waschen mit CGXII-Medium ohne IPTG, wurde von den beiden Klonen des Wildtyps (dunkel- bzw. hellblau) und der ptacA2-Mutante (dunkel- bzw. hellrot) jeweils ein Kolben mit CGXII mit 100 μ M IPTG (Quadrate) und ein Kolben mit CGXII ohne IPTG (Diamanten) zu einer OD₆₀₀ von 1 beimpft und das Wachstum verfolgt. Als Kontrolle wurden von Klon 1 der ptacA2-Mutante auch Kolben mit 0 μ M IPTG und 100 μ M IPTG aber ohne Kanamycin beimpft und gemessen (orange).

In Abbildung 48 ist der Verlauf des Wachstums von zwei Klonen des *C. glutamicum* Wildtyps (hell- bzw. dunkelblau) und der ptacA2-Mutante (hell- bzw. dunkelrot) in Anwesenheit (Quadrate) oder Abwesenheit (Diamanten) von IPTG aufgetragen. Alle untersuchten Stämme tragen den pVWEX2-Leervektor. Beide Klone des Wildtyps wachsen unabhängig von der An- oder Abwesenheit von IPTG mit der gleichen Effizienz. Für die ptacA2-Mutante lässt sich jedoch eine deutliche Diskrepanz des Wachstums beider Klone bei den unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen feststellen. Ohne IPTG zeigt sich besonders im Zeitraum zwischen 12 und 24 Stunden ein deutlicher Wachstumsdefekt. Die OD₆₀₀ der ohne IPTG im Medium angezogenen Stämme ist zu diesem Zeitpunkt etwa um den Faktor 2-3 geringer als die der entsprechenden Stämme mit IPTG im Medium. Allerdings erreichen auch die Stämme mit IPTG nicht die OD₆₀₀ des Wildtyps mit dem Leervektor. Da ein Klon der ptacA2-Mutante, bei dessen Kultivierung kein Kanamycin im Medium vorhanden war (orange Linie), ebenfalls dieses langsamere Wachstum zeigt, ist dieses nicht darauf zurückzuführen, dass die ptacA2-Mutante mit zwei Antibiotika im Medium angezogen wurde und der Wildtyp hingegen nur mit einem. Der Wachstumsdefekt der ptacA2-Mutante in

Abwesenheit von IPTG zeigt deutlich, dass eine verstärkte Repression der *tac*-Promotoraktivität bei Überexpression des Lac-Repressors stattfindet.

Die Wachstumsexperimente zeigten, dass sich die Expression des *secA2*-Gens in der Promotoraustauschmutante IPTG-abhängig regulieren lässt. Daher wurde in diesem Stamm mit der Suche nach SecA2-abhängig exportierten Substraten begonnen.

III.3.2.5 Die Lokalisierung der Katalase ist in *C. glutamicum* SecA2-abhängig.

Die Identifikation von SecA2-abhängig exportierten Substraten kann Erkenntnisse über die Bedeutung dieses akzessorischen Translokationswegs in *C. glutamicum* liefern.

Um solche Substrate in *C. glutamicum* zu identifizieren, wurden die Proteine von Wildtyp und *ptacA2*-Mutante, die in Gesamtzellfraktion und Überstand bei Kultivierung unter verschiedenen IPTG-Konzentrationen vorhanden sind, verglichen. Hierbei wurde die Promotoraustauschmutante ohne den Leervektor eingesetzt. In diesem Stamm zeigte das Ausbleiben eines Wachstumsdefekts in Abwesenheit von IPTG eine deutliche Restaktivität des *secA2*-Promotors. Es ist jedoch dennoch möglich, dass andere SecA2-Substrate, deren Translokation keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten unter den getesteten Bedingungen hat, in Abwesenheit von IPTG bereits signifikant in ihrer SecA2-abhängigen Translokation beeinträchtigt sind. Bei der Durchführung des Experiments zum Vergleich der in Wildtyp und *ptacA2*-Mutante bei verschiedenen IPTG-Konzentrationen translozierten Proteine, wurde nach dem Schema vorgegangen, das in Abbildung 49 zu sehen ist.

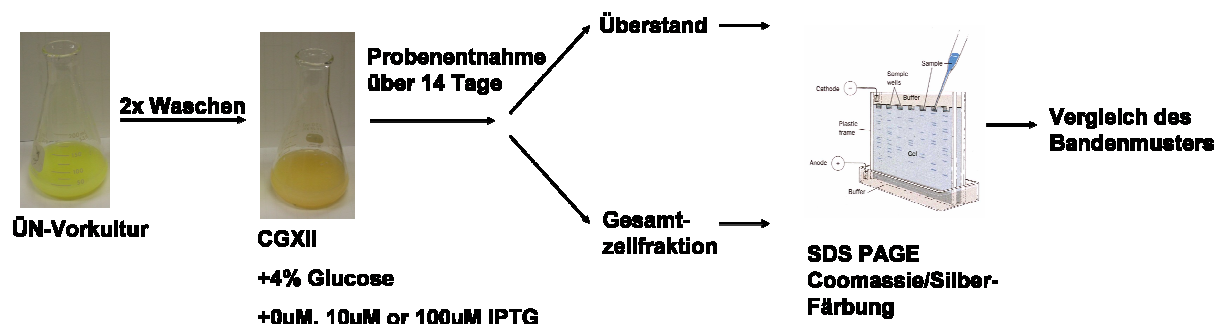


Abbildung 49: Schematische Darstellung des Versuchs zum Vergleich der von *C. glutamicum* Wildtyp und *ptacA2*-Mutante bei verschiedenen IPTG-Konzentrationen translozierten Proteine. Eine BHIS-Übernachtskultur von Wildtyp und *ptacA2*-Mutante wurde zweimal mit CGXII-Medium ohne IPTG gewaschen und anschließend wurden für beide Stämme drei Kolben mit CGXII-Medium + 4% Glukose und entweder 0, 10 oder 100 µM IPTG auf eine OD₆₀₀ von 1,0 angeimpft. Die Stämme wurden bei 30°C und 120 rpm für 14 Tage inkubiert, wobei alle drei Tage erneut 4% Glukose und 0, 10 oder 100 µM IPTG hinzugefügt wurden. Die zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Proben wurden in Gesamtzellen und Überstand fraktioniert, Proteine isoliert und nach SDS-PAGE mit Coomassie Brilliant Blue oder Silber angefärbt. Die Bandenmuster zwischen den verschiedenen IPTG-Konzentrationen und zwischen Wildtyp und *ptacA2*-Mutante wurden anschließend verglichen.

Die Entnahme von Proben der beiden Stämme, die in CGXII-Medium mit entweder 0, 10 oder 100 μM IPTG angezogen wurden, erfolgte hierbei über einen Zeitraum von 14 Tagen. Ein so langer Zeitraum wurde gewählt, da in einer *secA2*-Mutante von *M. tuberculosis* Unterschiede in der SecA2-abhängigen Proteintranslokation erst zu sehr späten Zeitpunkten deutlich wurden (Braunstein *et al.*, 2003). Alle drei Tage wurde den verschiedenen Stämmen erneut 4% Glukose als C-Quelle und entsprechend 0, 10 oder 100 μM IPTG zugegeben. Nach Probenentnahme, Fraktionierung in Gesamtzellen und Überstand sowie anschließender SDS-PAGE und Visualisierung der Proteine über Coomassie Brilliant Blue- oder Silber-Färbung, wurden die Bandenmuster zwischen den verschiedenen IPTG-Konzentrationen und zwischen Wildtyp und *ptacA2*-Mutante verglichen. Zur Identifikation von SecA2-abhängig exportierten Proteinen wurde zuerst nach Proteinen gesucht, die bei Repression der SecA2-Expression in der *ptacA2*-Mutante nicht mehr im Überstand zu finden sind. Die Identifikation solcher Proteine war jedoch nicht möglich. Es wurden jedoch einige andere interessante Unterschiede beobachtet. Solche Bandenmuster-Unterschiede konnten in drei Gruppen eingeteilt werden: (1) Proteine, die in der Gesamtzellfraktion fehlen, wenn die SecA2-Expression mit IPTG induziert wird; (2) Proteine, die in der Gesamtzellfraktion verbleiben, wenn die SecA2-Expression in Abwesenheit von IPTG reprimiert wird; (3) Proteine, die vermehrt im Überstand vorliegen, wenn die SecA2-Expression induziert wird. Bei Proteinen aus diesen drei Gruppen handelt es sich nun um potentielle SecA2-Substrate von *C. glutamicum*. In Abbildung 50 ist exemplarisch ein Protein aus Gruppe 1 dargestellt.

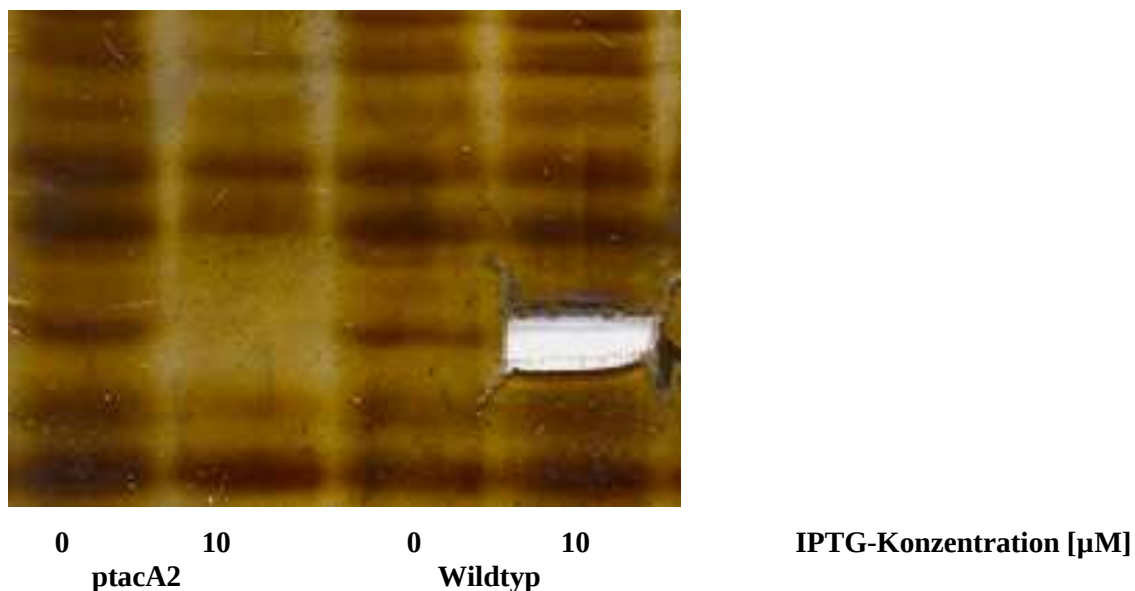


Abbildung 50: Vergleich der von *C. glutamicum* Wildtyp und *ptacA2*-Mutante bei verschiedenen IPTG-Konzentrationen in der Gesamtzellfraktion verbleibenden Proteine nach Silber-Färbung. Auffällig ist eine Proteinbande, die in *ptacA2* bei Anzucht mit 0 μM IPTG sowie dem Wildtyp bei Anzucht unter 0 und 10 μM IPTG in den Gesamtzellen vorhanden ist, aber bei Induktion der SecA2-Expression in *ptacA2* fehlt. Diese Bande wurde aus der Spur der Gesamtzellfraktion des mit 10 μM IPTG angezogenen Wildtyp Stammes ausgeschnitten, entfärbt und anschließend über MALDI-TOF identifiziert.

Insgesamt wurden zehn Unterschiede im Bandenmuster identifiziert, die den oben beschriebenen Gruppen zuzuordnen waren. Diese Banden wurden ausgeschnitten und im Falle von mit Silber gefärbten Gelen entfärbt. Anschließend wurde ein Verdau mit Trypsin und eine Peptidmassenbestimmung über MALDI-TOF MS („Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight“ Massenspektrometrie) durchgeführt. Die erhaltenen Peptidmassenmuster wurden mit einer lokalen Datenbank, welche 3312 *C. glutamicum* Proteine beinhaltet, verglichen. In 6 von 10 untersuchten Fällen wurde das Protein, dessen Lokalisierung SecA2-abhängig beeinflusst wurde, als die Katalase von *C. glutamicum* identifiziert. Dies ist besonders interessant, da in *M. tuberculosis* die Katalase eines der beiden hauptsächlichen SecA2-Substrate ist. Bei den weiteren in *C. glutamicum* untersuchten Banden handelte es sich in allen vier Fällen um unterschiedliche Proteine mit nachgewiesener cytosolischer Funktion, die wahrscheinlich keine SecA2-Substrate darstellen.

Über den Vergleich der Lokalisierung von Proteinen der *ptacA2*-Mutante unter Anzucht bei verschiedenen IPTG-Konzentrationen war es möglich, die Katalase als ein SecA2-abhängig exportiertes Protein in *C. glutamicum* zu identifizieren. Weitere SecA2-abhängig exportierte Proteine konnten in diesem Versuch nicht identifiziert werden. Da es sich bei der Katalase jedoch nicht um ein essentielles Protein handelt, das SecA2 jedoch für das Überleben von *C. glutamicum* unentbehrlich ist, ist es wahrscheinlich, dass es neben der Katalase noch mindestens ein weiteres SecA2-Substrat existiert. Daher wurden weitere Experimenten zur Identifikation von SecA2-abhängig exportierten Proteinen unternommen.

III.3.2.6 Überexpression des *C. glutamicum* SecA2-Proteins führt zu erhöhter Katalase-Sekretion.

Bei den Versuchen mit der *C. glutamicum* Promotoraustauschmutante führte eine Induktion der SecA2-Expression zu einer erhöhten Sekretion der Katalase. Eine Erhöhung der SecA2-Expression zeigte folglich zumindest für die Katalase einen positiven Einfluss auf die Sekretion. Es ist daher vorstellbar, dass bei einer noch deutlicher erhöhten SecA2-Expression ein solcher positiver Einfluss auch auf die Translokation anderer, bislang nicht auffälliger SecA2-Substrate, auftritt. Um dies untersuchen zu können, wurde das SecA2-Protein in *C. glutamicum* stark überexprimiert. Hierzu wurde das *secA2*-Gen auf den *E. coli*/*C. glutamicum*-„shuttle“-Vektor pEKEX3 unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors kloniert. Mit dem hieraus resultierenden Vektor *pekA2* und dem pEKEX3-Leervektor wurde der *C. glutamicum* Wildtyp transformiert. Um zu untersuchen, ob die SecA2-Überexpression einen Effekt auf die Proteintranslokation besitzt, wurde wie in Abbildung 49 beschrieben vorgegangen. Die *C. glutamicum* Stämme mit dem Leervektor oder dem *secA2*-Expressionsvektor wurden in CGXII-Medium mit 0, 10 oder 100 μ M IPTG im Medium angezogen und zu verschiedenen Zeitpunkten die in den Überstand sekretierten

oder in der Gesamtzellfraktion verbleibenden Proteine über SDS-PAGE verglichen. Unterschiede im Proteinbandenmuster zwischen dem Leervektor-Stamm und dem Stamm mit dem SecA2-Expressionsvektor wurden über MALDI-TOF MS analysiert. Bei diesen Versuchen wurde nur ein einziges Protein mehrfach in erhöhter Menge in den Überständen des SecA2-Überexpressionsstamms gefunden. Bei diesem Protein handelte es sich erneut um die Katalase (Abbildung 51 A). Die erhöhte Katalase-Menge in einem Stamm mit dem pekA2-Vektor im Vergleich zu einem Stamm mit dem Leervektor findet sich unabhängig von der An- oder Abwesenheit von IPTG (Abbildung 51 A). Für den *tac*-Promotor des pEKEX3-Vektors ist eine hohe Aktivität auch in Abwesenheit von IPTG bekannt, was diesen Effekt erklären würde. In dem SecA2-Überexpressionsstamm fand sich nicht nur auf Proteinebene im Vergleich zu einem Stamm mit dem Leervektor eine größere Menge an Katalase im Überstand, sondern es konnte dort auch eine erhöhte Katalase-Aktivität festgestellt werden (Abbildung 51 B). Die Katalase-Aktivität wurde hierbei über die Abnahme an H_2O_2 , die sich photometrisch bei 240 nm verfolgen lässt, in einem Enzym-Aktivitäts-Assay ermittelt.

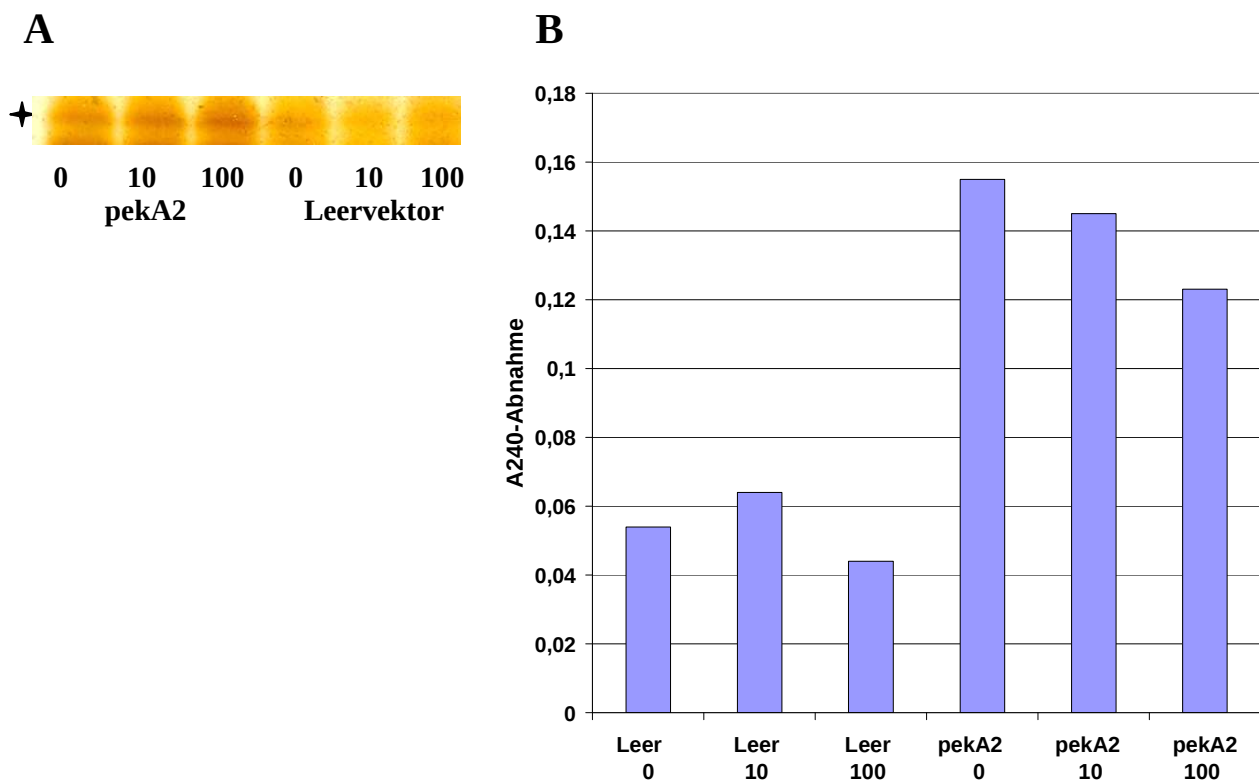


Abbildung 51: Vergleich der Katalase-Aktivität und Mengen im Überstand von *C. glutamicum* mit Leervektor oder dem pekA2-Vektor bei verschiedenen IPTG-Konzentrationen.

(A) Katalase-Bande (mit einem Stern markiert) im Überstand der Stämme mit dem pekA2-Expressionsvektor oder dem Leervektor nach 7 Tagen Wachstum in CGXII-Medium mit 4% Glukose und 0, 10 oder 100 μM IPTG (als 0, 10 oder 100 bezeichnet). Identifikation der Bande als Katalase erfolgte über MALDI-TOF MS-Analyse.

(B) Katalase-Aktivität als Funktion der A_{240} -Abnahme. Die Stämme wurden für 14 Tage in CGXII-Medium mit 4% Glukose und 0, 10 oder 100 μM IPTG (als 0, 10 oder 100 bezeichnet) angezogen. Alle drei Tage wurden erneut 4 % Glukose und die entsprechende Menge IPTG hinzugegeben. Die Messung der A_{240} -Abnahme erfolgte über 3 min. Leer: Leervektorstämme

Wie in Abbildung 51 B zu erkennen, ist die Katalase-Aktivität im Überstand des SecA2-Überexpressionsstammes mindestens doppelt so hoch, wie in einem Stamm mit dem Leervektor. Dieser Effekt ist unabhängig von der An- oder Abwesenheit von IPTG. Zusammengenommen stärken die bei SecA2-Überexpression im Überstand gefundene Erhöhung der Katalase-Menge und die ebenfalls im Überstand beobachtete Zunahme der Katalase-Aktivität die Ergebnisse aus der ptacA2-Mutante, bei denen sich die Lokalisierung der Katalase ebenfalls als SecA2-abhängig zeigte. Weitere in *C. glutamicum* SecA2-abhängig exportierte Proteine konnten jedoch auch bei der Untersuchung der SecA2-Überexpression nicht identifiziert werden.

III.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Studium der Bedeutung der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in *C. glutamicum*.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der von den beiden *secA*-Genen von *C. glutamicum* kodierten SecA-Proteine mit SecA-Proteinen aus anderen Bakterien ermöglichte eine klare Zuordnung, welches der *secA*-Gene das SecA1- und welches das SecA2-Protein kodiert. Bei der anschließenden Untersuchung der Bedeutung der SecA2-abhängige Proteintranslokation in *C. glutamicum*, stellte sich überraschend heraus, dass das *C. glutamicum* *secA2*-Gen essentiell ist. Da auch für das *secA1*-Gen von *C. glutamicum* gezeigt werden konnte, dass dieses essentiell ist, macht dies *C. glutamicum* zum ersten und bislang einzigen Bakterium mit zwei essentiellen *secA*-Genen.

Für die Suche nach SecA2-abhängig exportierten Proteinen wurde eine *secA2*-Promotoraustauschmutante hergestellt. Diese Promotoraustauschmutante zeigt bei einer Repression der Promotoraktivität einen Wachstumsdefekt. Bei der Untersuchung der Proteintranslokation in dieser Mutante und bei Experimenten zur Überexpression des *C. glutamicum* SecA2 wurde die Katalase als ein Protein identifiziert, dessen Lokalisierung abhängig von der SecA2-Expression ist. Weitere SecA2-Substrate konnten in *C. glutamicum* bisher nicht identifiziert werden.

IV.Diskussion

Bei der Sec2-abhängigen Proteintranslokation handelt es sich um einen bislang exklusiv in Gram-positiven Bakterien gefundenen Protein-Exportweg. In allen bislang daraufhin untersuchten Bakterien ist Sec2 ein nicht-essentieller, akzessorischer Weg der Proteintranslokation, der für den Export eines Satzes spezifischer Substrate zuständig und in vielen Fällen an der Pathogenität von Bakterien beteiligt ist. Für die Sec2-Translokation sind sowohl der Translokations- wie auch der „targeting“-Mechanismus unbekannt und es ist unklar, inwieweit hier Ähnlichkeiten und Unterschiede zur klassischen Sec-Translokation bestehen. Um weitere Informationen über die Sec2-abhängige Proteintranslokation zu erhalten, wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zum „targeting“ von SecA2/SecY2-Substraten an die klassische Sec-Translokase und der Wechselwirkung eines SecA2-Proteins mit den restlichen Komponenten der klassischen Sec-Translokase durchgeführt. Darüber hinaus wurde aufgrund des in mehreren Bakterien bekannten Zusammenhangs zwischen Pathogenität und Sec2-Proteintranslokation die Bedeutung der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in nicht-pathogenen Bakterien analysiert.

IV.1 Untersuchungen zum „targeting“ von SecA2/SecY2-Substraten in *E. coli*, *B. subtilis* und *S. carnosus*.

Die SecA2/SecY2-Substrate von *S. gordonii* und *S. parasanguinis* werden exklusiv über den SecA2/SecY2-Weg transloziert (Bensing und Sullam, 2002; Chen *et al.*, 2004). Daher müssen SecA2/SecY2-Substrate über eine Determinante verfügen, die eine Translokation über den klassischen Sec-Weg verhindert. Hierfür kann es mehrere Möglichkeiten geben. Eine Möglichkeit ist, dass in SecA2/SecY2-Substraten auf Ebene der Aminosäuresequenz spezifische Veränderungen in solchen Bereichen vorliegen, die für eine Wechselwirkung mit der klassischen Sec-Translokase wichtig sind. Eine andere Möglichkeit für das Ausbleiben der Translokation über den klassischen Sec-Weg wäre, dass in Bakterien mit einem SecA2/SecY2-System ein SecA2/SecY2-„targeting“-Faktor vorliegt, der spezifisch SecA2/SecY2-Substrate bindet, diese an die SecA2/SecY2-Translokase heranführt und somit eine Translokation über die Sec1-Translokase verhindert. Da aufgrund des sehr engen von SecYEG gebildeten Kanals nur ungefaltete Proteine über den klassischen Sec-Weg transloziert werden können ist es ebenfalls möglich, dass eine Modifikation der SecA2/SecY2-Substrate erfolgt, die eine Translokation über den Sec1-Weg aus sterischen Gründen unmöglich macht. Bei einer solchen Modifikation könnte es sich beispielsweise um eine Glykosylierung handeln.

IV.1.1 Das authentische SecA2/SecY2-Substrat von *S. aureus* wird in *E. coli* nicht transloziert.

Bei den Untersuchungen der Translokation des authentischen SecA2/SecY2-Substrats von *S. aureus*, dem Srr-Protein, zeigte sich in *E. coli* kein Export über den klassischen Sec-Weg in das Periplasma (Abbildung 9). Ein solches Ausbleiben der Translokation kann bedeuten, dass in *S. aureus* kein spezifischer SecA2/SecY2-„targeting“-Faktor oder eine Modifikation über ein spezifisches System die Translokation des SecA2/SecY2-Substrats über den klassischen Sec-Weg unterbinden, da in *E. coli*, einem Bakterium ohne ein SecA2/SecY2-System, ein solcher Faktor oder ein spezifisches Modifikationssystem nicht vorliegen. Es ist jedoch zu beachten, dass in *E. coli* das *S. aureus* Srr-Protein aufgrund der heterologen Expression in eine für den Sec1-Weg inkompatible Form falten könnte, die es in *S. aureus* nicht annehmen würde. Es ist zumindest für GspB, das Srr-Protein von *S. godronii*, bekannt, dass es über ein spezifisches System glykosyliert werden muss, um eine Aggregation des Proteins in einer unlöslichen Form zu verhindern (Takamatsu *et al.*, 2004a und b). Für diese Glykosylierung sind GtfA und GtfB essentiell, zwei im *secA2/secY2*-Operon kodierte Glykosyltransferasen, die auch in *S. aureus* vorhanden sind. Da dieses Glykosylierungssystem in *E. coli* nicht vorliegt, könnte ein Export des *S. aureus* Srr-Proteins über den klassischen Sec-Weg durch eine hieraus resultierende Aggregation des Srr-Proteins scheitern. Für eine solche Aggregation spricht, dass die im Western Blot für das *S. aureus* Srr beobachtete Laufhöhe für das vorausgesagte Molekulargewicht von 227 kDa zu hoch ist (Abbildung 8 und 9). Bei Untersuchungen zur heterologen Expression des Srr-Proteins von *S. agalactiae* in *E. coli* läuft dieses Srr-Protein ebenfalls aberrant hoch in einem SDS-Gel (Seifert *et al.*, 2006). Bei Zugabe von 9 M Harnstoff läuft das Srr-Protein jedoch bei der vorhergesagten Größe, was dafür spricht, dass es bei Expression des Srr in *E. coli* zu einer Aggregation kommt, die sich nur unter sehr starken denaturierenden Bedingungen auflösen lässt. Als alternative Erklärung geben Seifert *et al.* an, dass das abnormale Laufverhalten durch die hochgradig-repetitive Natur des Srr-Proteins hervorgerufen wird und nicht aus einer Aggregation resultieren muss. Für das *S. aureus* Srr ist es folglich ebenfalls möglich, dass es in *E. coli* zu einer Aggregation kommt und diese eine Translokation über den Sec1-Weg verhindert. Dass in *S. aureus* ein „targeting“-Faktor oder eine Modifikation des SecA2/SecY2-Substrats die Translokation über den klassischen Sec-Weg verhindern, lässt sich nach den Ergebnissen der Translokation des *S. aureus* Srr in *E. coli* somit nicht ausschließen.

IV.1.2 Ein SecA2/SecY2-Signalpeptid erlaubt ein „targeting“ an die klassische Sec-Translokase.

Klassische Sec-Substrate gehen mit dem Signalpeptid und mit dem reifen Teil des Proteins Wechselwirkungen mit der Sec1-Translokase ein (Akita *et al.*, 1990; Lill *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2004; Papanikou *et al.*, 2005). Veränderungen in der Aminosäuresequenz dieser Bereiche können Sec-Substrate von der Translokation über den klassischen Sec-Weg ausschließen (Chou und Kendall, 1990; Andersson und von Heijne, 1991; Nilsson *et al.*, 1994; Yoshihisa und Ito, 1996; Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004). Daher ist es vorstellbar, dass in den SecA2/SecY2-Substraten in diesen für die Interaktion mit der Sec1-Translokase wichtigen Bereichen Veränderungen auf Ebene der Aminosäuresequenz vorliegen, die eine Translokation über den klassischen Sec-Weg unterbinden.

Die SecA2/SecY2-Substrate von *S. gordonii* und *S. aureus* besitzen zwar Signalpeptide an ihrem Aminoterminus, doch sind diese mit einer vorhergesagten Länge von 90 Aminosäuren etwa dreimal so lang wie durchschnittliche Signalpeptide in Gram-positiven Bakterien (Bensing und Sullam, 2002). Um zu untersuchen, ob das außergewöhnlich lange Signalpeptid des SecA2/SecY2-Substrats Srr von *S. aureus* die diskriminierende Komponente ist, die ein „targeting“ an die klassische Sec-Translokase verhindert, wurde dieses vor eine signalpeptidlose Version der *S. hyicus* Lipase fusioniert. Bei der Prä-Pro-Lipase aus *S. hyicus* handelt es sich um ein klassisches Sec-Substrat, das in *E. coli*, *B. subtilis* und *S. carnosus* mit hoher Effizienz transloziert wird (Götz *et al.*, 1985; Demleitner und Götz, 1994; Meens, 1994; Klein, 1995; Klein *et al.*, 1995).

Für das Fusionsprotein aus *S. hyicus* Lipase und SecA2/SecY2-Signalpeptid, SrrSPProLip, wurde in *B. subtilis* ein vollständiger Exportblock beobachtet (Abbildung 11), während in *E. coli* (Abbildung 10) und *S. carnosus* (Abbildung 13) eine Translokation des Proteins, wenn auch mit geringer Effizienz, stattfindet.

Der Export des SrrSPProLip-Proteins in *E. coli* zeigt, dass das SecA2/SecY2-Signalpeptid prinzipiell ein „targeting“ an und eine Translokation über den klassischen Sec-Weg erlaubt. Allerdings ist die Translokationseffizienz für dieses Protein deutlich geringer als die der *S. hyicus* Lipase mit dem authentischen Signalpeptid. Da die beiden Proteine mit der Ausnahme des Signalpeptids identisch sind, muss das SecA2/SecY2-Signalpeptid für die geringere Translokationseffizienz verantwortlich sein. Dies kann auf verschiedenen Ebenen geschehen. Bei der Initiation der Translokation über den klassischen Sec-Weg tritt das Signalpeptid des Exportsubstrats mit dem SecA- und dem SecY-Protein in Wechselwirkung (Tippe, 2001; Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004). Es ist vorstellbar, dass diese Wechselwirkungen für das außergewöhnlich lange SecA2/SecY2-Signalpeptid nur mit einer sehr geringen Effizienz stattfinden. Als Konsequenz würde die Initiation der Translokation nur sehr langsam erfolgen und erklären, warum für das Fusionsprotein nur eine geringe Menge der Lipase in das Periplasma exportiert wird.

Ein weiterer Punkt, an dem das Signalpeptid einen direkten Einfluss auf die Effizienz des Exports eines Proteins über den klassischen Sec-Weg haben kann, ist die Prozessierung. So bewirkt bei klassischen Sec-Substraten eine Mutation in der Signalpeptidase-Erkennungsstelle oder eine Verlängerung des hydrophoben Kerns des Signalpeptids, dass diese nicht mehr oder nur sehr ineffizient prozessiert werden können (Fikes and Bassford, 1987; Chou und Kendall, 1990; Nilsson *et al.*, 1994). Für die Abspaltung des Signalpeptids vom reifen Teil des Proteins über die Signalpeptidase I ist es nötig, dass kleine, aliphatische Aminosäurereste an den Positionen -1 und -3 des Signalpeptids vorhanden sind („-3, -1 Regel“; von Heijne, 1985; Izard und Kendall, 1994). An diesen Positionen befinden sich im Signalpeptid des *S. aureus* SecA2/SecY2-Substrats zwei Alanine, was auch in den Signalpeptiden klassischer Sec-Substrate die am häufigsten an diesen Stellen gefundene Aminosäure ist. Dafür, dass es dennoch zu einer gestörten Prozessierung des SecA2/SecY2-Signalpeptids in *E. coli* kommt, sprechen die Ergebnisse die beim Export des SrrSPProLip-Proteins beobachtet wurden (Abbildung 10). Es befinden sich im Periplasma zwei Formen des Proteins, die beide kleiner sind als das Vorläuferprotein, jedoch ist selbst die kleinere der Beiden noch so groß wie das unprozessierte Vorläuferprotein der authentischen *S. hyicus* Lipase (Abbildung 10). Das heißt selbst bei der kleineren der beiden Formen hat nur eine Abspaltung von ca. 50-60 der 90 Aminosäuren des Signalpeptids stattgefunden. Eine Abspaltung des vollständigen Signalpeptids an der vorhergesagten Schnittstelle zwischen den Aminosäuren 90 und 91 erfolgt nicht. Dies könnte dadurch begründet sein, dass sich diese Spaltstelle nicht in Reichweite der Signalpeptidase I von *E. coli* befindet. Bei der Signalpeptidase I von *E. coli* handelt es sich um ein integrales Protein der Cytoplasmamembran, dessen katalytisch aktive Domäne im Periplasma lokalisiert ist (Wolfe *et al.*, 1983; Paetzel *et al.*, 2002). Signalpeptide orientieren sich aufgrund der „positive-inside-rule“ so, dass die N-Region auf der cytoplasmatischen Seite verbleibt, während der C-terminus mit der Spaltstelle periplasmatisch exponiert ist („N_{in}-C_{out}“-Orientierung; von Heijne, 1986; Dalbey, 1990). Daher befindet sich das aktive Zentrum der Signalpeptidase ideal zum Wirkungsort positioniert. Kommt es zu einer Verlängerung des hydrophoben Kerns des Signalpeptids, zum Beispiel durch den Einschub einer Poly-Leucin-Sequenz, so kann es passieren, dass die Spaltstelle des Signalpeptids aus der Reichweite der Signalpeptidase hinausgeschoben wird (Chou und Kendall, 1990). Aufgrund der außergewöhnlichen Länge des SecA2/SecY2-Signalpeptids ist es vorstellbar, dass es zu einer Insertion des Signalpeptids kommt, welche die vorhergesagte Spaltstelle zwischen Aminosäure 90 und 91 außerhalb der Reichweite der Signalpeptidase positioniert. Die Verlängerung des *S. aureus* SecA2/SecY2-Substrats betrifft im Vergleich zu klassischen Signalpeptiden besonders die N-Region. Es gibt jedoch innerhalb der N-Region auch einen kurzen, sieben Aminosäuren umfassenden Bereich mit einer hohen Hydrophobizitätsdichte, der als eine „zweite“ h-Region des Signalpeptids fungieren könnte. Dieser Bereich wird von zwei putativen Erkennungsstellen für die Signalpeptidase gefolgt, und eine Prozessierung an einer dieser könnte das kleinere der beiden im Periplasma

gefundenen Proteine, das um etwa 50-60 Aminosäuren verkürzt ist, erklären. Das größere Spaltprodukt im Periplasma könnte durch Prozessierung an einer potentiellen Schnittstelle nach den ersten 13 Aminosäuren des Signalpeptids entstehen. Eine solche Prozessierung an alternativen Schnittstellen, wenn die eigentliche Schnittstelle nicht zugänglich ist, ist auch für andere Signalpeptide bekannt (Barkocy-Gallagher und Bassford, 1992). Die gestörte Prozessierung des SecA2/SecY2-Signalpeptids ist in *E. coli* somit höchstwahrscheinlich einer der Gründe für die niedrige Exporteffizienz des SrrSPPProLip-Proteins. Es ist dennoch möglich, dass neben der Prozessierung auch noch die Interaktion des SecA2/SecY2-Signalpeptids mit der klassischen Sec-Translokase gestört ist. Dies ist wahrscheinlich, da es bei einer effizienten Einschleusung des nur sehr ineffizient prozessierbaren SrrSPPProLip-Proteins in den klassischen Sec-Weg zu einer langfristigen Blockierung (oft als „jamming“ bezeichnet) der Sec-Translokase kommen sollte. Aufgrund der hohen Syntheserate des SrrSPPProLip-Proteins sollte dieses „jamming“ einen großen Teil der in der Zelle vorliegenden Sec-Translokasen betreffen. Ein solches „jamming“ hat in einigen Fällen einen toxischen Effekt auf das Wachstum der Zelle (Plückthun und Knowles, 1987; Khatib und Belin, 2002), da die Translokation der essentiellen Vorläuferproteine aufgrund einer Sättigung der Sec-Translokase mit einer großen Menge an langsam prozessierbaren Vorläuferproteinen nicht mehr gewährleistet werden kann. Ein solcher negativer Effekt auf das Wachstum der *E. coli*-Zellen wurde jedoch bei Induktion der SrrSPPProLip-Expression nicht beobachtet. Es ist daher denkbar, dass es aufgrund des SecA2/SecY2-Signalpeptids nur zu einer ineffizienten Wechselwirkung des SrrSPPProLip-Proteins mit den Komponenten der klassischen Sec-Translokase kommt, folglich nur ein geringer Teil des SrrSPPProLip-Proteins in den klassischen Sec-Weg eingeschleust wird und daher die langsame Prozessierung nur einen Teil der Sec-Translokasen blockiert.

In *B. subtilis* findet keine Translokation des SrrSPPProLip-Proteins über den klassischen Sec-Weg statt. Es ist vorstellbar, dass die gleichen Gründe, die in *E. coli* zu einer geringen Exporteffizienz des Proteins führen in *B. subtilis* eine Translokation gänzlich ausschließen. Eventuell ist die Qualitäts-Kontrolle der Sec-Translokase von *B. subtilis* zumindest in Bezug auf das SecA2/SecY2-Signalpeptid stringenter als die von *E. coli* und schließt daher ein Protein mit einem solchen Signalpeptid vollständig von der Translokation aus. Es gibt ein Beispiel dafür, dass ein außergewöhnliches Signalpeptid die Translokation eines Proteins in *E. coli*, aber nicht in *B. subtilis* gewährleisten kann (Zanen *et al.*, 2005). Modifikationen des Signalpeptids des AmyQ-Proteins, die zu einer geringeren Hydrophobizität führen, schließen das Protein von einer Translokation in *B. subtilis*, jedoch nicht in *E. coli* aus. Die Sec-Translokationsmaschine in *B. subtilis* ist im Gegensatz zu der in *E. coli* schlecht an die Interaktion mit Signalpeptiden mit einer geringen Hydrophobizität angepasst (Zanen *et al.*, 2005). Da die Hydrophobizitätsdichte innerhalb der putativen h-Regionen des SecA2/SecY2-Signalpeptids deutlich niedriger ist als die der h-Region des *S. hyicus* Lipase Signalpeptids,

könnte dies ein Grund dafür sein, dass die Translokation in *B. subtilis*, aber nicht in *E. coli* scheitert.

Die Sekretion des SrrSPProLip-Proteins in den Überstand des *S. carnosus* Wildtyps und der *secA2*-Mutante zeigt, dass auch hier das SecA2/SecY2-Signalpeptid ein „targeting“ an und eine Translokation über den klassischen Sec-Weg erlaubt (Abbildung 13). Zwar ist die Translokationseffizienz auch hier deutlich geringer als die der authentischen *S. hyicus* Lipase, doch findet sich immerhin ein signifikanter Anteil in Bezug auf das gesamte SrrSPProLip-Protein als prozessierte Form im Überstand. Darüber hinaus findet sich hier nur eine Proteinbande, die etwa 10 kDa kleiner ist als das SrrSPProLip-Vorläuferprotein. Diese Reduktion des Molekulargewichts entspricht einer Verkürzung, die nach Prozessierung an der vorhergesagten Schnittstelle des Signalpeptids nach 90 Aminosäuren entsteht. Die reife Form des SrrSPProLip-Proteins ist etwas größer als das nach Prozessierung der „Wildtyp“-Lipase im Überstand gefundene Protein (Abbildung 13 B). Wie bereits unter III.1.3.1 erwähnt, ist das in diesem Versuch als „Wildtyp“-Lipase eingesetzte Protein jedoch aufgrund eines Stop-Codons im entsprechenden Gen leicht verkürzt, was erklärt, warum die prozessierte Form der „Wildtyp“-Lipase etwas kleiner ist als die des SrrSPProLip-Proteins. Folglich ist es wahrscheinlich, dass es sich bei der in den Überstand sekretierten Form des SrrSPProLip-Proteins tatsächlich um die an der vorhergesagten Spaltstelle prozessierte reife Form handelt. Dies würde bedeuten, dass die Prozessierung des SecA2/SecY2-Signalpeptids in *S. carnosus* korrekt erfolgt und daher als Grund für eine geringere Translokationseffizienz ausgeschlossen werden kann. Dass die Prozessierung des SecA2/SecY2-Signalpeptids in *S. carnosus* im Gegensatz zu *E. coli* korrekt erfolgen kann, ist möglicherweise dadurch bedingt, dass *S. carnosus* evolutionär noch an die Prozessierung der außergewöhnlichen Signalpeptide angepasst ist. *S. carnosus* besitzt die Gene für ein SecA2/SecY2-System (siehe IV.1.3.1). Das *S. carnosus* *secA2/secY2*-Operon ist zwar durch eine Vielzahl von Stop-Codons im Verlaufe der Evolution stillgelegt worden, doch zeigt dies, dass eine SecA2/SecY2-Translokation in einem evolutionärem Vorfahren möglich gewesen ist. Für die SecA2/SecY2-Translokation ist es unbekannt, ob die außergewöhnlich langen Signalpeptide der SecA2/SecY2-Substrate durch die Signalpeptidase I abgespalten werden, oder ob es eine spezifische Signalpeptidase gibt (Bensing *et al.*, 2005). Findet eine Prozessierung durch die Signalpeptidase I statt, so ist es möglich, dass die Signalpeptidase I von *S. carnosus* hierzu ebenfalls noch in der Lage ist. Existiert für die Prozessierung eine spezifische bislang unbekannte Signalpeptidase, so ist es vorstellbar, dass diese in *S. carnosus* noch vorhanden ist. In beiden Fällen würde dies erklären, warum in *S. carnosus* im Gegensatz zu *E. coli* eine korrekte Prozessierung des SecA2/SecY2-Signalpeptids erfolgt.

Für die im Vergleich zur authentischen *S. hyicus* Lipase deutlich verringerte Translokationseffizienz des SrrSPProLip-Proteins in *S. carnosus* ist folglich die wahrscheinlichste Erklärung, dass die Wechselwirkungen des Signalpeptids mit den Komponenten der klassischen Sec-Translokase nicht optimal erfolgen kann.

Trotz der geringen Translokationseffizienz zeigt der Export des SrrSPProLip-Proteins in *E. coli* und *S. carnosus* deutlich, dass das Signalpeptid der SecA2/SecY2-Substrate ein „targeting“ an den klassischen Sec1-Weg erlaubt. Es kann daher alleine nicht dafür verantwortlich sein, dass die authentischen SecA2/SecY2-Substrate von einer Translokation über den klassischen Sec-Weg ausgeschlossen werden. Die geringe Translokationseffizienz in *E. coli* und *S. carnosus* und das vollständige Ausbleiben der Translokation in *B. subtilis* zeigen jedoch, dass die außergewöhnlichen Signalpeptide evolutionär so verändert wurden, dass ein „targeting“ an die SecA2/SecY2-Translokase begünstigt wird und als Konsequenz die Affinität der SecA2/SecY2-Substrate zur klassischen Sec-Translokase verringert wurde.

IV.1.3 Nicht-glykosylierte SecA2/SecY2-Substrate können über die klassische Sec-Translokase transloziert werden.

Für einige Proteine ist gezeigt worden, dass bestimmte Veränderungen im reifen Teil des Proteins eine Translokation über den klassischen Sec-Weg unterbinden (Li *et al.*, 1988; Summers *et al.*, 1989). Es ist daher vorstellbar, dass Veränderungen in diesen Bereichen die authentischen SecA2/SecY2-Substrate von der Translokation über den Sec1-Weg ausschließen. Der am besten untersuchte dieser Bereiche ist die so genannte Translokations-Initiations-Domäne. Diese Translokations-Initiations-Domäne ist in manchen klassischen Sec-Substraten für eine effiziente Translokation über den Sec1-Weg von Bedeutung (Andersson und von Heijne, 1991; Yoshihisa und Ito, 1996). Positive Ladungen in den ersten 30 Aminosäuren des reifen Teils eines Sec1-Substrats (der Translokations-Initiations-Domäne), wie z. B. durch die Insertion von 6 Lysin-Resten, führen zu einem Block der Translokation dieses Proteins. Eine Erklärung hierfür ist, dass dieser Bereich direkt mit Komponenten der klassischen Sec-Translokase, möglicherweise dem SecYEG-Komplex, interagiert und diese Wechselwirkung anfällig gegenüber einer Häufung positiver Ladungen ist (Yoshihisa und Ito, 1996). Daher ist es denkbar, dass in diesem Bereich des *S. aureus* SecA2/SecY2-Substrats eine Veränderung vorliegt, die eine Interaktion mit der klassischen Sec-Translokase unterbindet. Es finden sich in der putativen Translokations-Initiations-Domäne des *S. aureus* Srr jedoch wie in klassischen Sec-Substraten ebenfalls keine positiven Ladungen. Für das Srr100ProLip-Protein, bei dem neben dem Signalpeptid noch die ersten 122 Aminosäuren des *S. aureus* Srr-Proteins vor die *S. hyicus* Pro-Lipase fusioniert sind, wurde in *S. carnosus* jedoch ebenfalls ein Export über den Sec1-Weg gefunden (Abbildung 15). Da in dieser Fusion die putative Translokations-Initiations-Domäne des SecA2/SecY2-Substrats beinhaltet ist, kann dieser Bereich nicht der Grund dafür sein, dass authentische SecA2/SecY2-Substrate in ihren Herkunftsorganismen nicht über den klassischen Sec-Weg transloziert werden. Darüber hinaus deutet das explizite Fehlen von positiven Ladungen in diesem Bereich des

S. aureus Srr-Proteins und die Translokation des Srr100ProLip-Proteins über den Sec1-Weg in den heterologen Wirten *E. coli* und *S. carnosus* an, dass der Schritt des Translokationsmechanismus, der die Interaktion von Translokations-Initiations-Domäne und Sec-Translokase benötigt, für den Sec1-Weg und den SecA2/SecY2-Weg konserviert ist.

Bei den Untersuchungen der Translokation des Srr2000ProLip-Proteins, bei dem das Signalpeptid, die erste Serin-reiche Region (SRR) sowie die gesamte nicht-repetitive, basische Region zwischen SRR und SRR-2 des *S. aureus* SecA2/SecY2-Substrats vor die *S. hyicus* Lipase fusioniert wurden, zeigte sich in *S. carnosus* ein Block der Translokation über den klassischen Sec-Weg (Abbildung 16). Eine Erklärung hierfür wäre, dass in dieser Fusion die Determinante der SecA2/SecY2-Substrate vorhanden ist, die eine Translokation über den klassischen Sec-Weg verhindert. Dies kann jedoch nicht der Fall sein, da verkürzte authentische Srr-Proteine, welche die im Srr2000ProLip-Protein vorhandenen Bereiche des SecA2/SecY2-Substrats enthalten, in *S. carnosus* über den klassischen Sec-Weg exportiert werden (Abbildung 19 und siehe unten). Die Translokation des Srr2000ProLip-Proteins in *S. carnosus* scheitert höchstwahrscheinlich daran, dass es für das sehr große Fusionsprotein zu einer vorzeitigen Faltung und einer damit verbundenen Inkompatibilität für einen Export über den Sec1-Weg kommt.

Für verkürzte Versionen der authentischen Srr-Proteine von *S. aureus* (SaSrr-2) und *S. carnosus* (ScSrrTag) wurde in *S. carnosus* ebenfalls ein Export über den Sec1-Weg gefunden (Abbildung 19). Diese Proteine besitzen neben Signalpeptid, Translokations-Initiations-Domäne, der ersten Serin-reichen Region (SRR) und der basischen, nicht-repetitiven Region auch noch die ersten 186 (ScSrrTag) bzw. die ersten 189 (SaSrr-2) Aminosäuren der zweiten Serin-reichen Region. Dies bedeutet, dass dieser gesamte Bereich nicht über die Determinante verfügt, die bei authentischen SecA2/SecY2-Substraten eine Translokation über den klassischen Sec-Weg verhindert. Bei den verkürzten Srr-Proteinen fehlt im Vergleich zu den vollständigen Srr-Proteinen nur ein großer Teil der zweiten Serin-reichen Region und das C-terminal lokalisierte LPXTG-Zellwandanker-Motiv. Das C-terminale Zellwandsortierungssignal der Srr-Proteine stimmt mit dem von klassischen Sec-Substraten überein und scheidet daher höchstwahrscheinlich als ein Bereich aus, der eine Translokation über den klassischen Sec-Weg verhindert. Die zweite Serin-reiche Region besteht hauptsächlich aus „repeats“ des Motivs „SX“, von denen eine große Anzahl bereits in den verkürzten Srr-Proteinen enthalten ist. Es ist vorstellbar, dass die noch viel größere Anzahl dieser SX-„repeats“ in den unverkürzten Srr-Proteinen eine Faltung der Srr-Proteine bedingt, die eine Translokation über den klassischen Sec-Weg ausschließen kann. Es ist jedoch weiterhin vorstellbar, dass nicht das Srr-Protein *per se* inkompatibel für eine Translokation über den Sec1-Weg ist, sondern dass bestimmte Modifikationen des Proteins dies bewirken. Wie bereits beschrieben ist für einige Srr-Proteine bekannt, dass sie über Glykosyltransferasen, die im *secA2/secY2*-Operon kodiert sind, glykosyliert werden (Takamatsu *et al.*, 2004a und b). Diese Glykosylierung erfolgt an den Serin- und Threonin-

Resten der Srr-Regionen. In einer *gtfA*-Mutante, in der das Glykosylierungssystem nicht mehr funktionell ist, kommt es in *S. gordonii* für das Srr-Protein GspB zu einer Aggregation in einer unlöslichen Form, was zeigt, dass die Glykosylierung nötig ist, um das Srr-Protein in einer löslichen Form zu halten (Takamatsu *et al.*, 2004a und b; Bensing *et al.*, 2005). Ein kleineres Srr-Protein (GspB₇₃₆), das analog zu dem hier untersuchten ScSrrTag und dem SaSrr-2 nach einem kurzen Teil der zweiten Serin-reichen Region verkürzt ist, aggregiert hingegen auch in einer *gtfA*-Mutante nicht. Die Glykosylierung an den Srr-Regionen erfolgt vor der Translokation (Bensing *et al.*, 2004a) und daher ist es vorstellbar, dass diese Glykosylierung, bei der es sich um eine extensive Modifikation handelt, die Translokation über den klassischen Sec-Weg verhindert. In *S. carnosus* ist im *gtfA*-Gen ein Stop-Codon vorhanden welches dazu führt, dass kein funktionelles GtfA-Protein synthetisiert wird. Folglich sollten die verkürzten Srr-Proteine in *S. carnosus* nicht glykosyliert werden. Hierfür spricht, dass für das ScSrrTag-Protein in der *S. carnosus* Gesamtzellfraktion neben einer Bande bei der für das ScSrrTag-Protein vorhergesagten Größe eine geringere Menge einer sehr großen Proteinbande detektiert wurde. Dies könnte bedeuten, dass es trotz der Verkürzung des ScSrr-Proteins aufgrund der fehlenden Glykosylierung zu einer Aggregation eines Teils des Srr-Proteins kommt. Falls die Glykosylierung der SecA2/SecY2-Substrate die Translokation über den klassischen Sec-Weg unterbindet, würde das in *S. carnosus* defekte Glykosylierungssystem erklären, warum die Translokation hier noch stattfinden kann.

Tatsächlich wurde in *S. gordonii* für GspB₇₃₆, das verkürzte Srr-Protein, gezeigt, dass eine glykosylierte Form von einer Translokation über den klassischen Sec-Weg ausgeschlossen wird, während eine unglykosylierte Form mit geringer Effizienz über diesen exportiert werden kann (Bensing *et al.*, 2005). Die für die verkürzten Srr-Proteine von *S. carnosus* und *S. aureus*, die aufgrund des Fehlens eines funktionellen GtfA-Proteins in *S. carnosus* nicht glykosyliert werden können, beobachtete Translokation mit geringer Effizienz über den Sec1-Weg von *S. carnosus* entspricht genau diesen Ergebnissen. Dies bedeutet, dass SecA2/SecY2-Substrate noch über den klassischen Sec-Weg transloziert werden können, dass die Glykosylierung dieser Proteine dies jedoch unmöglich macht. Offensichtlich ist die Glykosylierung vor der Translokation für die physiologische Funktion der Srr-Proteine jedoch von so enormer Bedeutung, dass daher extra ein spezielles Translokationssystem, der SecA2/SecY2-Weg, entwickelt wurde.

Eine Erklärung dafür, warum für die Srr-Proteine ein „targeting“ an die klassische Sec-Translokase stattfinden kann, obwohl diese in der authentischen, glykosylierten Form für eine Translokation über den Sec1-Weg inkompatibel sind, ist ein „rerouting“-Modell. Möglicherweise kommt es zu einem „targeting“ der SecA2/SecY2-Substrate an die Sec1-Translokase, die Substrate werden dann jedoch aufgrund ihrer Exportinkompatibilität an die SecA2/SecY2-Translokase „weitergereicht“. Dies würde jedoch eine Interaktion zwischen der klassischen und der akzessorischen Sec-Translokase benötigen.

Eine andere Erklärung ist, dass sowohl SecA2/SecY2-Translokase wie auch Sec1-Translokase über den gleichen „targeting“-Mechanismus verfügen, und SecA2/SecY2-Substrate somit an beide Translokasen herangeführt werden. Da die SecA2/SecY2-Signalpeptide jedoch evolutionär an die Wechselwirkungen mit der SecA2/SecY2-Translokase angepasst sind, besitzen sie eine geringere Affinität zur klassischen Sec-Translokase. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einem korrekten „targeting“ an den akzessorischen Exportweg kommt. Dies ist sinnvoll, da in der authentischen Situation nur die SecA2/SecY2-Translokase die Translokation der glykosylierten und daher für die Translokation über den Sec1-Weg inkompatiblen Substrate gewährleisten kann. Diese verringerte Affinität der SecA2/SecY2-Signalpeptide zur klassischen Sec-Translokase würde erklären, warum auch für die unglykosylierten Srr-Proteine und die Fusionsproteine mit Signalpeptid und Translokations-Initiations-Domäne die Translokation über den klassischen Sec-Weg nur mit einer geringen Effizienz erfolgt.

IV.2 Untersuchungen der Wechselwirkungen des *S. aureus* SecA2-Proteins mit Komponenten der Sec1-Translokase.

In Bakterien, in denen nur ein SecA2-Protein vorliegt und keine weiteren akzessorischen Translokase-Komponenten vorhanden sind, wie z. B. *M. tuberculosis* und *L. monocytogenes*, ist es höchstwahrscheinlich, dass das SecA2 mit den restlichen Komponenten der Sec1-Translokase interagieren muss, um in der Proteintranslokation aktiv zu werden. In *M. smegmatis* wurde bei der Untersuchung der Translokation von Fusionen aus verschiedenen *M. smegmatis* Proteinen, die über klassische Sec-Signalsequenzen verfügen, vor den reifen Teil des *E. coli* PhoA-Proteins gezeigt, dass in einer *secA2*-Mutante die Translokation mancher, aber nicht aller dieser Fusionsproteine gegenüber dem Wildtyp reduziert ist. Dies deutet möglicherweise auf eine unterstützende Funktion des SecA2 bei der Translokation von manchen klassischen Sec-Substraten in Zusammenarbeit mit der klassischen Sec-Translokase hin (Braunstein *et al.*, 2001). Bakterien, die über ein SecA2/SecY2-System verfügen, besitzen neben dem SecA2 und dem SecY2 noch eine Vielzahl zusätzlicher an der SecA2/SecY2-Translokation beteiligter Komponenten, von denen manche sogar eine Homologie zu Komponenten der Sec1-Translokase aufweisen (Takamatsu *et al.*, 2004a; Takamatsu *et al.*, 2005a und b). Hierzu zählen in *S. gordonii* sogar zwei Proteine, die eine Homologie zu den klassischen SecE- und SecG-Proteinen besitzen und für die Sec2-Translokation von essentieller Bedeutung sind (Takamatsu *et al.*, 2005b). Daher ist es wahrscheinlich, dass bei der SecA2/SecY2-abhängigen Translokation eine eigenständige Translokase ausgebildet wird, die unabhängig von der klassischen Sec1-Translokase funktioniert. Für SecA2-Proteine aus Bakterien mit einem SecA2/SecY2-System war es

jedoch unbekannt, ob sie wie die SecA2-Proteine aus Bakterien mit einem SecA2-System, dennoch mit den restlichen Sec1-Translokase Komponenten Wechselwirkungen eingehen können. In *S. aureus* sind keine zusätzlichen SecE- und SecG-Homologe vorhanden. Ein Vorliegen solcher homologer Proteine in *S. gordonii* impliziert jedoch, dass auch die SecA2/SecY2-Translokase SecE- und SecG-ähnliche Proteine für Ihre Funktionsweise benötigt. Da in *S. aureus* jedoch nur die klassischen SecE und SecG-Proteine vorliegen ist es möglich, dass diese Proteine bei der SecA2/SecY2-abhängigen Proteintranslokation beteiligt sind. Dies würde bedeuten, dass in *S. aureus* eine Wechselwirkung zwischen klassischen und akzessorischen Translokasekomponenten erfolgt. Dies machte das SecA2 von *S. aureus* zu einem interessanten Kandidaten für das Studium von Wechselwirkungen mit Komponenten der klassischen Sec-Translokase.

IV.2.1 Das *S. aureus* SecA2 kann mit Komponenten der *B. subtilis* Sec1-Translokase und klassischen Sec-Substraten keine funktionellen Wechselwirkungen eingehen.

Um Wechselwirkungen zwischen dem *S. aureus* SecA2 und der klassischen Sec-Translokase von *B. subtilis* studieren zu können, wurde die Proteintranslokation in einer konditionalen *B. subtilis* SecA-Mutante studiert. Bei dieser *B. subtilis* Mutante handelt es sich um NIG1152 [secA(div341^{ts})] (Takamatsu *et al.*, 1992). In diesem Stamm wird bei der nicht-permissiven Temperatur von 42°C das SecA-Protein aufgrund einer Mutation instabil. Als Konsequenz findet keine Sec-abhängige Proteintranslokation mehr statt und der Stamm ist nicht mehr in der Lage zu wachsen.

In dieser Mutante wurde in einem „Pulse-Chase“-Experiment untersucht, ob das *S. aureus* SecA2 anstelle des *B. subtilis* SecA mit den Komponenten der Sec1-Translokase die Translokation der Prä-Pro-Lipase aus *S. hyicus* gewährleisten kann.

Bei der permissiven Temperatur von 30°C zeigte sich eine effiziente Translokation der Lipase, unabhängig davon, ob NIG1152 den Leervektor oder einen Expressionsvektor für das *B. subtilis* SecA, das *S. aureus* SecA1 oder das *S. aureus* SecA2 trägt (Abbildung 20, oben). Die Expression des *B. subtilis* SecA und des *S. aureus* SecA1, nicht aber die des *S. aureus* SecA2, führt hierbei sogar zu einer leichten Beschleunigung der Translokation der Lipase. Eine solche Beschleunigung der Translokation der *S. hyicus* Lipase in *B. subtilis* bei einer Überexpression eines funktionellen SecA-Proteins ist ein bekannter Effekt (Klein, 1995).

Bei der nicht-permissiven Temperatur liegt in der NIG1152-Mutante mit dem Leervektor ein vollständiger Exportblock vor (Abbildung 20, unten). *B. subtilis* SecA wie auch *S. aureus* SecA1 komplementieren diesen Exportdefekt mit der gleichen, hohen Effizienz. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist, dass das *S. aureus* SecA1 in *B. subtilis* ebenso

effizient Wechselwirkungen mit den Komponenten der Sec1-Translokase und der *S. hyicus* Lipase eingehen kann, wie das *B. subtilis* eigene SecA-Protein. Dies ist wahrscheinlich, da es sich beim *S. aureus* SecA1 um das „housekeeping“ SecA-Protein von *S. aureus* handelt, das die generelle Proteintranslokation in diesem Bakterium gewährleistet. Da der Mechanismus der generellen Proteintranslokation in Bakterien hoch konserviert ist, kann in vielen Fällen ein heterologes SecA-Protein die Funktion eines anderen SecA-Proteins übernehmen (Klein *et al.*, 1995; Blanco *et al.*, 1996). Dies wird dadurch bestätigt, dass das *S. aureus* SecA1 den Wachstumsdefekt der NIG1152-Mutante bei der nicht-permissiven Temperatur von 42°C komplementieren kann (Abbildung 25). Dies zeigt, dass das *S. aureus* SecA1 mit der Sec1-Translokase zumindest bei der Translokation aller Vorläuferproteine, dessen Sekretion essentiell ist, funktionell zusammenwirken kann. Da das SecA-Protein in der Zelle in einer dimeren Form vorliegt (Akita *et al.*, 1991; Doyle *et al.*, 2000) und möglicherweise auch in dieser aktiv ist (Driessen, 1993), ist eine alternative Erklärung, dass es zu einer Ausbildung von Heterodimeren aus mutiertem *B. subtilis* SecA und *S. aureus* SecA1 kommt, in denen das mutierte *B. subtilis* SecA stabilisiert wird. Somit wäre das *B. subtilis* SecA auch bei der eigentlich nicht-permissiven Temperatur von 42°C in der Lage, im Proteinexport aktiv zu sein und die Translokation der *S. hyicus* Lipase zu gewährleisten.

Bei Expression des *S. aureus* SecA2 zeigte sich, genau wie in einem Stamm mit dem Leervektor, ein vollständiger Exportblock der *S. hyicus* Lipase bei der für *B. subtilis* NIG1152 nicht-permissiven Temperatur (Abbildung 20). Das *S. aureus* SecA2 kann folglich das *B. subtilis* SecA bei der Translokation der *S. hyicus* Lipase nicht funktionell ersetzen.

In *S. gordonii* und *S. parasanguinis*, zwei Bakterien die wie *S. aureus* über ein SecA2/SecY2-System verfügen, ist gezeigt worden, dass das SecA2 im Zusammenspiel mit einigen anderen Komponenten exklusiv an der Translokation spezifischer Substrate beteiligt ist (Bensing und Sullam, 2002; Takamatsu *et al.*, 2004a; Takamatsu *et al.*, 2005a; Chen *et al.*, 2004). Aufgrund der hohen Homologie des *S. aureus* SecA2/SecY2-Systems zu dem aus Streptokokken ist wahrscheinlich auch das *S. aureus* SecA2 evolutionär an die Translokation dieser spezifischen Substrate angepasst und kann daher die Translokation klassischer Sec-Substrate nicht gewährleisten. Dies wird durch die Untersuchungen der *S. aureus* SecA2-Expression auf den Wachstumsdefekt von NIG1152 bei 42°C bestätigt (Abbildung 25). Trotz der nachgewiesenen Expression des *S. aureus* SecA2-Proteins (Abbildung 24) kommt es nicht zu einer Komplementation des Wachstumsdefekts. Das *S. aureus* SecA2 kann folglich zumindest die Translokation eines essentiellen Vorläuferproteins von *B. subtilis* nicht gewährleisten. Dies zeigt, wie schon das Ausbleiben der Translokation der *S. hyicus* Lipase, dass es im Falle des *S. aureus* SecA2 nicht zur Ausbildung von produktiven Wechselwirkungen mit den Komponenten der *B. subtilis* Sec1-Translokase und/oder einem Sec1-Vorläuferprotein kommen kann. An der Ausbildung eines funktionellen Translokations-Initiations-Komplexes, der für eine Sec-abhängige Proteintranslokation essentiell ist, sind SecA, SecY und das Vorläuferprotein als gleichwertige Partner beteiligt (Tippe, 2001). Eine Proteintranslokation

bleibt bereits aus, wenn die Wechselwirkungen zwischen zwei dieser Partner gestört sind. Für das *S. aureus* SecA2 ist es folglich möglich, dass es zwar mit den Komponenten der klassischen Sec1-Translokase funktionelle Wechselwirkungen eingehen kann, die Translokation der *S. hyicus* Lipase bzw. eine Komplementation des Wachstumsdefekts bei 42°C aber daran scheitert, dass das *S. aureus* SecA2 nicht mit klassischen Sec-Substraten wechselwirken kann. Dies ist vorstellbar, da das *S. aureus* SecA2 an die Erkennung eines spezifischen SecA2/SecY2-Substrats mit einem außergewöhnlichen Signalpeptid angepasst und daher möglicherweise nicht mehr in der Lage ist, klassische Sec-Substrate zu erkennen. Es ist ebenfalls möglich, dass die Wechselwirkungen des *S. aureus* SecA2-Proteins mit den Komponenten der *B. subtilis* Sec1-Translokase gestört sind, oder das SecA2 sowohl mit klassischen Sec-Substraten wie auch den Sec1-Komponenten keine funktionellen Wechselwirkungen mehr eingehen kann.

Eine Ausbildung von Heterodimeren mit dem *B. subtilis* SecA, in welchen das *B. subtilis* SecA stabilisiert wird und wie sie für das *S. aureus* SecA1 vorstellbar ist, könnte für das *S. aureus* SecA2 einfach daran scheitern, dass das weniger homologe *S. aureus* SecA2 keine Heterodimere mit dem *B. subtilis* SecA ausbilden kann.

IV.2.2 Das *S. aureus* SecA2 kann mit Komponenten der *B. subtilis* Sec1-Translokase und einem Protein mit einem SecA2/SecY2-Signalpeptid keine funktionellen Wechselwirkungen eingehen.

Das *S. aureus* SecA2 kann die Translokation der *S. hyicus* Lipase in *B. subtilis* nicht gewährleisten, weil es entweder das klassische Sec-Substrat nicht erkennen kann, keine funktionellen Wechselwirkungen mit den Komponenten der Sec1-Translokase möglich sind oder beides zutrifft (siehe IV.2.1) Um zwischen diesen Möglichkeiten differenzieren zu können, wurde anstelle der *S. hyicus* Lipase die Translokation des SrrSPProLip-Proteins untersucht. Hierbei zeigte sich, dass bei Co-Expression von *S. aureus* SecA2 und SrrSPProLip-Protein in *B. subtilis* NIG1152 bei 30°C keine Sekretion der Hybrid-Lipase in den Überstand zu beobachten ist (Abbildung 26). Bei dem SrrSPProLip-Protein ist das authentische Signalpeptid der *S. hyicus* Lipase gegen das des SecA2/SecY2-Substrats von *S. aureus* ausgetauscht worden. Dies führt dazu, dass in *B. subtilis* keine Translokation dieses Proteins stattfindet, möglicherweise weil keine Wechselwirkungen zwischen dem SecA2/SecY2-Signalpeptid und der *B. subtilis* Sec1-Translokase erfolgen (siehe IV.1.2). Eine solche Interaktion zwischen Signalpeptid und Sec-Translokase findet neben dem SecY vor allem mit dem SecA-Protein statt (Wang *et al.*, 2000; Baud *et al.*, 2002; Papanikou *et al.*, 2005). Das *S. aureus* SecA2 sollte im Gegensatz zum *B. subtilis* SecA jedoch in der Lage sein, mit dem SecA2/SecY2-Signalpeptid produktive Wechselwirkungen einzugehen. Dies

kann jedoch nur dann zu einer Translokation des SrrSPPProLip-Proteins führen, wenn das *S. aureus* SecA2 mit den restlichen Komponenten der Sec1-Translokase von *B. subtilis* funktionell zusammenarbeiten kann. Für das Ausbleiben einer Sekretion des SrrSPPProLip-Proteins auch bei Co-Expression des *S. aureus* SecA2 ist eine mögliche Erklärung, dass das *S. aureus* SecA2 nicht in der Lage ist, die nötigen Wechselwirkungen mit der *B. subtilis* Sec1-Translokase einzugehen. Es ist jedoch ebenfalls möglich, dass das *S. aureus* SecA2 sowohl mit der *B. subtilis* Sec1-Translokase, wie auch dem SrrSPPProLip-Protein funktionelle Wechselwirkungen eingehen kann, aber die Translokation dennoch scheitert, da das SrrSPPProLip-Protein mit dem klassischen SecY-Protein nicht interagieren kann.

Es ist ebenfalls zu beachten, dass die Sekretion des SrrSPPProLip-Proteins in NIG1152 in diesem Fall bei 30°C, der permissiven Temperatur für das mutierte *B. subtilis* SecA, untersucht worden ist. Dies bedeutet, dass das *B. subtilis* SecA, das eine Translokation des SrrSPPProLip-Proteins nicht gewährleisten kann (siehe IV.1.2), neben dem *S. aureus* SecA2 ebenfalls in der Zelle vorliegt. Selbst wenn das *S. aureus* SecA2 Wechselwirkungen mit den Komponenten der klassischen Sec-Translokase eingehen könnte ist es möglich, dass das *B. subtilis* SecA eine bedeutend höhere Affinität zu diesen Komponenten besitzt und das *S. aureus* SecA2 von der Sec1-Translokase in der Membran verdrängen könnte. Zusammengefasst ist die Unfähigkeit des *S. aureus* SecA2-Proteins die Translokation sowohl eines klassischen Sec-Substrats, wie auch eines Proteins mit einem SecA2/SecY2-Signalpeptid zu vermitteln ein deutliches Indiz dafür, dass das *S. aureus* SecA2 nicht in der Lage ist, funktionelle Wechselwirkungen mit Komponenten der klassischen Sec-Translokase einzugehen. Dies ist sinnvoll, da in *S. aureus* eine Hybrid-Translokase aus dem SecA2-Protein, das wahrscheinlich nur SecA2/SecY2-Substrate erkennt, und den klassischen Sec-Komponenten, die die Translokation eines solchen Substrats nicht gewährleisten können, keine Funktion besitzen würde. Die Ausbildung einer solchen Hybrid-Translokase würde nur die Ausbildung funktioneller klassischer oder akzessorischer Sec-Translokasen aufgrund einer Konkurrenz um die benötigten Translokase-Komponenten behindern.

IV.3 Bedeutung der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in nicht-pathogenen Bakterien.

Ein großer Teil der beim Menschen vorkommenden Krankheiten wird durch bakterielle Krankheitserreger hervorgerufen. Für die Entwicklung von Therapie- und Präventionsverfahren im Kampf gegen diese bakteriellen Krankheitserreger ist es von essentieller Bedeutung herauszufinden, welche Eigenschaften dieser Bakterien dazu führen, dass sie pathogen sind. Eine Möglichkeit zur Entdeckung dieser Eigenschaften stellt der

Vergleich von pathogenen Bakterien mit nahen, aber nicht-pathogenen Verwandten dar. Der Zusammenhang zwischen Proteinexport und Pathogenität ist wohl bekannt. Die von pathogenen Bakterien exportierten Proteine spielen unter anderem eine Rolle bei der Adhäsion an Wirtszellen, der Invasion in die Wirtszelle und beim Schutz vor Verteidigungsmechanismen des Wirts (Lee und Schneewind, 2001; Coombes *et al.*, 2004; Pizarro-Cerda und Cossart, 2006).

In Gram-negativen Bakterien gibt es für einige bakterielle Pathogenitätsfaktoren spezialisierte Sekretionswege, die eine gleichzeitige Überquerung beider Biomembranen des Bakteriums und teilweise sogar noch die der Wirtsmembran ermöglichen. Diese als Typ I-V bezeichneten Sekretionswege sind für die Pathogenität der jeweiligen Gram-negativen Bakterien von großer Bedeutung (Delepelaire, 2004; Henderson *et al.*, 2004; Cianciotto 2005; Backert und Meyer, 2006; Schlumberger und Hardt, 2006). Diese spezialisierten Sekretionswege existieren in Gram-positiven Bakterien nicht.

Der kürzlich entdeckte Sec2-Exportweg Gram-positiver Bakterien ist hauptsächlich in pathogenen Vertretern gefunden worden und zeigte in diesen eine Beteiligung an der Pathogenität (Bensing und Sullam, 2002; Braunstein *et al.*, 2003, Lenz *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004). Daher ist spekuliert worden, dass es sich bei diesem Sekretionsweg um das Gram-positive Pendant zu den Typ I-V Sekretionswegen von Gram-negativen Bakterien handelt (Lenz *et al.*, 2003). Obwohl der Sec2-Exportweg präferentiell in pathogenen Bakterien vorkommt, ist er jedoch nicht exklusiv auf diese beschränkt. Aufgrund der Beteiligung des Sec2-Exportwegs an der Pathogenität vieler Bakterien war es unklar, ob er in nicht-pathogenen Bakterien überhaupt eine Funktion besitzt. Dies zu untersuchen war ein Ziel dieser Dissertation.

Vorherige Untersuchungen hatten gezeigt, dass es Unterschiede in der Sec2-Proteintranslokation zwischen Bakterien mit nur einem SecA2-Protein und solchen mit einem SecA2/SecY2-System gibt. Daher wurde die Bedeutung der Sec2-Proteintranslokation in nicht-pathogenen Bakterien in Vertretern beider Gruppen untersucht.

IV.3.1 Untersuchung der SecA2/SecY2-abhängigen Proteintranslokation in *S. carnosus*.

Die Komponenten für ein SecA2/SecY2-Translokationssystem sind in Streptokokken und Staphylokokken weit verbreitet. In den Genomen von *S. gordonii*, *S. parasanguinis*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* und *S. aureus* ist ein *secA2/secY2*-Operon vorhanden. Bei allen diesen Bakterien handelt es sich um pathogene Bakterien und in *S. gordonii* und *S. parasanguinis* ist eine Beteiligung des SecA2/SecY2-Translokationssystems an der Pathogenität gezeigt worden (Bensing und Sullam, 2002; Chen *et al.*, 2004). In *S. agalactiae* und *S. aureus* ist für das in den *secA2/secY2*-Operons kodierte

Srr-Protein ebenfalls eine Rolle in der Pathogenität nachgewiesen worden (Siboo *et al.*, 2005; Seifert *et al.*, 2006). Da es sich bei diesem Protein um das jeweilige SecA2/SecY2-Substrat handelt, ist höchstwahrscheinlich auch in diesen Bakterien der SecA2/SecY2-Weg an der Pathogenität beteiligt.

Bei *S. carnosus* handelt es sich um einen nahen, aber nicht-pathogenen Verwandten von *S. aureus*, der schon seit langem in der Lebensmittelindustrie als Starterkultur eingesetzt wird (Liepe, 1982). In *S. carnosus* sind in dieser Dissertation als erstem nicht-pathogenen Bakterium die Gene für ein SecA2/SecY2-Translokationssystem entdeckt und die Funktion des akzessorischen Exportwegs untersucht worden.

IV.3.1.1 Das SecA2/SecY2-System von *S. carnosus* ist nicht funktionell.

Die Identifikation des *secA2/secY2*-Operons des nicht-pathogenen Bakterium *S. carnosus* war aufgrund des bekannten Zusammenhangs zwischen SecA2/SecY2-Translokation und Pathogenität überraschend. Das *S. carnosus secA2/secY2*-Operon ist dem aus *S. aureus*, aber auch denen aus anderen Staphylokokken und Streptokokken sehr ähnlich und beinhaltet Gene, die für ein SecA2, ein SecY2, die Proteine Asp1-3, ein großes Serin-reiches Protein (Srr) und zumindest ein Protein des Srr-Glykosylierungssystem (GtfA) kodieren (Abbildung 28). Dass auch das Gen für das zweite Protein dieses Glykosylierungssystems, *gtfB*, in *S. carnosus* vorliegt, ist aufgrund der hohen Ähnlichkeit zum *secA2/secY2*-Operon von *S. aureus* wahrscheinlich. Da die „gefischten“ und sequenzierten Bereiche jedoch den Bereich des *S. carnosus* Genoms, auf dem dieses Gen liegen sollte, nicht umfassten, konnte dies nicht eindeutig geklärt werden.

Die Sequenzierung des *secA2/secY2*-Operons von *S. carnosus* ergab jedoch, dass sich in allen Genen des Operons mit Ausnahme des *asp1*-Gens Stop-Codons befinden. Diese große Anzahl von Stop-Codons zeigt deutlich, dass das SecA2/SecY2-System von *S. carnosus* nicht aktiv sein kann. Dies erklärt auch, warum in einer *S. carnosus secA2*-Disruptionsmutante im Vergleich zum Wildtyp kein Unterschied in der Proteintranslokation vorhanden ist (Abbildung 31 und 32). Bei der Suche nach einem *S. carnosus* Srr-Protein hätte theoretisch das durch ein Stop-Codon auf 242 Aminosäuren verkürzte Srr-Protein gefunden werden können. Es ist jedoch gut möglich, dass das verkürzte Protein proteolytisch abgebaut wird und daher nicht detektiert werden kann. Darüber hinaus ist für die Srr-Proteine von *S. gordonii*, *S. agalactiae* und *S. parasanguinis* bekannt, dass sie sich nicht mit herkömmlichen Färbemethoden wie Coomassie- oder Silberfärbung sondern nur mit spezifischen Antikörpern nachweisen lassen (Bensing und Sullam, 2002; Chen *et al.*, 2004; Seifert *et al.*, 2006). Der zu diesem Zweck in *S. carnosus* eingesetzte Antikörper, der gegen ein Fusionsprotein aus *S. aureus* Srr und *S. hyicus* Lipase gerichtet ist, zeigte jedoch bei den Experimenten zur Translokation des ScSrrTag Proteins (siehe IV.1.3) keine Reaktion mit dem *S. carnosus* Srr-

Protein. Dies erklärt, warum das verkürzte *S. carnosus* Srr-Protein selbst für den Fall dass es nicht proteolytisch abgebaut wird, nicht detektiert werden konnte.

Bei den Untersuchungen der Aktivität des Promotors des *secA2/secY2*-Operons von *S. carnosus* über eine LacZ-Fusion zeigte sich in *S. carnosus* eine im Vergleich zum *secA1*-Promotor geringe, aber dennoch nachweisbare Aktivität (Abbildung 35). Da das *S. carnosus* SecA2/SecY2-System nicht funktionell ist, erscheint eine Aktivität des Promotors des *secA2/secY2*-Operons sinnlos. Es ist jedoch zu beachten, dass die Untersuchungen der Promotoraktivität zwar in *S. carnosus* durchgeführt wurden, allerdings die Promotor-lacZ-Fusionen auf einem Plasmid und nicht in Form einer chromosomalen Kopie vorlagen. Daher ist es möglich, dass in *S. carnosus* ein Transkriptionsregulator vorliegt, der die Transkription des chromosomalen Promotors des *secA2/secY2*-Operons reprimieren kann, aber nicht in der Lage ist, die Aktivität der hohen Anzahl an *secA2/secY2*-Promotoren, die bei der plasmidkodierten lacZ-Fusion vorliegen, abzuschalten. Hierbei würde der Repressor einfach stöchiometrisch austitriert. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der chromosomal vorliegende *secA2/secY2*-Promotor über eine Strukturveränderung der chromosomalen DNA nicht mehr für die DNA abhängige RNA-Polymerase zugänglich ist und daher keine Expression stattfindet. Bei einer solchen Strukturveränderung, die eine Regulation der Genexpression erlaubt, kann es sich z.B. um eine Verdichtung der DNA durch Histon-ähnliche Proteine (z.B. H-NS) handeln (Laurent-Winter *et al.*, 1997; Dorman und Deighan, 2003).

Da das SecA2/SecY2-System von *S. carnosus* nicht funktionell ist wirft dies die Frage auf, wieso in *S. carnosus* überhaupt noch ein *secA2/secY2*-Operon vorliegt. Ein solches Vorliegen von „Pseudogenen“, die keine funktionellen Genprodukte mehr kodieren, ist in prokaryotischen Genomen zwar nicht so häufig wie in eukaryotischen, aber dennoch auch keine Seltenheit (Liu *et al.*, 2004). So existieren z.B. in vielen *E. coli* Stämmen die Gene für ein zweites Typ III-Sekretionssystem, diese kodieren jedoch meistens nur verkürzte oder inaktivierte Proteine (Ren *et al.*, 2004). Eine Erklärung warum in *S. carnosus* das *secA2/secY2*-Operon noch vorliegt, obwohl es nur ein nicht-funktionelles System kodiert wäre, dass der Bereich des *S. carnosus* Chromosoms auf dem das Operon liegt für die Gesamtstruktur des Chromosoms nicht verzichtbar ist. Daher ist möglicherweise ein Abschalten des Promotors (über einen Regulator oder über eine Modifikation der DNA), oder sogar das Tolerieren der Synthese einiger verkürzter, nicht funktioneller Proteine, für *S. carnosus* eher möglich, als auf diesen gesamten Bereich zu verzichten. Da das *secA2/secY2*-Operon eine Länge von über 20 Kilobasen besitzt, und das *S. carnosus* Chromosom, sofern man das *S. aureus* Chromosom als Bezug nimmt, eine Größe von etwa 2,8 Megabasen besitzt, entspricht es immerhin über 0,7 Prozent des gesamten Chromosoms. Daher ist es zumindest vorstellbar, dass dieser Bereich für die Stabilität des Chromosoms eine Bedeutung besitzt. Allerdings ist für bakterielle Chromosomen bekannt, dass sie einen hohen Grad an Veränderungen, wie Excissionen und Transpositionen großer genetischer Elemente tolerieren können, ohne dass die Stabilität beeinträchtigt wird (Niermann *et al.*, 2004;

Robinson und Enright, 2004). Es wurde z.B. für *C. glutamicum* kürzlich gezeigt, dass eine Deletion von 11 Bereichen des Chromosoms mit einer Länge von insgesamt 250 kB möglich war, ohne dass es zu einer signifikanten Beeinträchtigung des Zellwachstums kommt (Suzuki *et al.*, 2005).

Weiterhin ist es ebenfalls möglich, dass ein „Stilllegen“ des *secA2/secY2*-Operons über Stop-Codons auch evolutionär gesehen Vorteile gegenüber einer Excision eines signifikanten Teils des Chromosoms bietet. Stop-Codons stellen eine verhältnismäßig leicht reversible Veränderung dar. Sollte das *SecA2/SecY2*-System in *S. carnosus* wieder benötigt werden, z.B. bei Veränderungen des natürlichen Habitats, so ist es vorstellbar, dass es leichter ist die Stop-Codons zu entfernen als das gesamte Translokationssystem neu zu akquirieren.

Die hohe Ähnlichkeit der *secA2/secY2*-Operons aus unterschiedlichen Staphylokokken und Streptokokken zeigt, dass dieser Bereich hoch konserviert ist und für verschiedene Bakterien eine bedeutende, sehr ähnliche Funktion besitzt. Nach den bislang publizierten Ergebnissen handelt es sich bei dieser Funktion um eine Adhäsion der Bakterien an Wirtszellen (Bensing und Sullam, 2002; Chen *et al.*, 2004; Siboo *et al.*, 2005). Das *SecA2/SecY2*-System ist wahrscheinlich dafür zuständig, dass das jeweilige Srr-Protein in einer aktiven, glykosylierten Form exportiert und aufgrund des Zellwandankers an der Zelloberfläche des jeweiligen Bakteriums befestigt wird. Das Srr-Protein fungiert dann als ein Adhäsion, das an Rezeptoren auf den Oberflächen von Wirtszellen bindet, und diese Funktion ist für die Srr-Proteine von *S. gordonii*, *S. agalactiae*, *S. parasanguinis* und auch *S. aureus* gezeigt worden (Bensing und Sullam, 2002; Chen *et al.*, 2004; Siboo *et al.*, 2005; Takamatsu *et al.*, 2006). Hierbei stellt die nicht-repetitive Region wahrscheinlich den Kontakt her, während die Serin-reiche Region als eine Art Stängel fungiert, der diese exponiert und über den LPXTG-Zellwandanker mit der Oberfläche des Bakteriums verbindet. Das Srr-Protein von *S. aureus*, das auch als SraP bezeichnet wird, ist an der Bindung von *S. aureus* an menschliche Blutplättchen beteiligt und stellt somit die erste Stufe in der Kolonisierung von menschlichen Herzklappen dar, die letztlich in bakterieller Endokarditis, einer lebensbedrohlichen Herzerkrankung, endet (Siboo *et al.*, 2005). Bei dieser Besiedlung sind die Bakterien in sogenannten makroskopischen Vegetationen von einer Schicht aus Blutplättchen und Fibrin umgeben, die sie vor einer Anlagerung von spezifischen Antikörpern und somit einer Immunantwort des Wirts schützt (McCormick *et al.*, 2002). Die Adhäsion an Wirtszellen und die Ausbildung der Vegetationen bietet den Bakterien somit einen bedeutenden Selektionsvorteil.

Da das *SecA2/SecY2*-System von *S. carnosus* nicht funktionell ist, ist im natürlichen Habitat von *S. carnosus* die durch das Srr-Protein vermittelte Adhäsion offensichtlich nicht mehr erforderlich. Was genau das natürliche Habitat von *S. carnosus* ist, ist nicht bekannt (Kloos und Schleifer, 1986), aber da es sich bei *S. carnosus* um einen GRAS („generally regarded as safe“)-Organismus handelt, der schon seit langen in Starterkulturen in der Wurstfermentation eingesetzt wird (Liepe, 1982), ist eine schädliche Besiedlung menschlichen Gewebes auszuschließen. Die Adhäsion an Blutplättchen und die Ausbildung makroskopischer

Vegetationen zum Schutz vor einer Immunantwort ist im natürlichen Habitat von *S. carnosus* daher nicht erforderlich, weshalb das *secA2/secY2*-Operon durch Stop-Codons „stillgelegt“ wurde. Ein solches „Abschalten“ von Genen in Form von Pseudogenen, wenn diese für das Überleben in einem bestimmten Habitat nicht mehr benötigt werden, ist auch für zahlreiche andere Gene in Prokaryoten bekannt. Für verschiedene Serotypen von *Salmonella enterica* oder unterschiedliche *Brucella*-Spezies ist zum Beispiel entdeckt worden, dass je nach Lebensraum und den damit verbundenen unterschiedlichen Bedingungen, unterschiedliche Gene in Form von Pseudogenen abgeschaltet werden, aber nicht verloren gehen (Anjum *et al.*, 2005; Chain *et al.*, 2005). In *S. thermophilus*, einem nicht-pathogenen Verwandten von *S. gordonii* und *S. pneumoniae*, der in der Milchprodukt-Herstellung Anwendung findet, konnte sogar gezeigt werden, dass einige Pathogenitätsfaktoren in dem nicht-pathogenen Bakterium nur noch in Form von Pseudogenen vorliegen (Bolotin *et al.*, 2004). Dies entspricht genau dem Abschalten des *secA2/secY2*-Operons, das in einem gemeinsamen Vorfahren von *S. aureus* und *S. carnosus* offensichtlich vorlag, in dem nicht-pathogenen Bakterium jedoch still gelegt wurde, da es für die Besiedlung eines anderen Habitats nicht mehr erforderlich war.

IV.3.2 Untersuchung der SecA2-abhängigen Proteintranslokation in *C. glutamicum*.

C. glutamicum ist ein Bakterium der Gruppe der *Corynebacteriaceae*, keulenförmiger Gram-positiver Bakterien, zu denen unter anderem auch die Mycobakterien gehören. Eine Analyse der Genome von *C. glutamicum*, *C. diphtheriae*, *C. jeikeium*, *M. leprae*, *M. smegmatis*, *M. tuberculosis*, *M. avium* und *M. bovis* zeigt in allen Fällen, dass dort zwei *secA*-Gene vorhanden sind. Mit der Ausnahme von *C. glutamicum* handelt es sich bei allen diesen Vertretern der *Corynebacteriaceae* um pathogene Bakterien, wobei *M. smegmatis* erst kürzlich in die Risikogruppe 2 heraufgestuft wurde. Für *M. tuberculosis*, den Erreger der Tuberkulose an der fast drei Millionen Menschen pro Jahr sterben und mit dem nach Schätzungen der WHO etwa zwei Milliarden Menschen infiziert sind, konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen SecA2-abhängiger Proteintranslokation und Pathogenität besteht. Dieser nachgewiesene Zusammenhang und die Tatsache, dass zwei *secA*-Gene präferentiell in pathogenen Gram-positiven Bakterien vorhanden sind, wirft auch hier die Frage auf, welche Funktion der SecA2-Translokationsweg in nicht-pathogenen Bakterien besitzt. Um dies zu untersuchen, wurde *C. glutamicum* ausgewählt, ein nicht-pathogenes Bakterium, das schon seit langem in der industriellen Aminosäureproduktion eingesetzt wird.

IV.3.2.1 Aminosäuresequenz-Analyse der *C. glutamicum* SecA-Proteine.

Die Zuordnung, welches SecA-Protein von *C. glutamicum* das SecA1 und welches das SecA2 darstellt, erfolgte über eine vergleichende Analyse der Aminosäuresequenz der beiden Proteine mit den SecA-Proteinen aus anderen Bakterien (Tabelle 4, Abbildung 36). Das von NCgl1384 kodierte SecA-Protein wurde hierbei als das SecA2-Protein, das von NCgl0726 kodierte Protein als das SecA1 identifiziert. Dies war möglich, da das NCgl1384 zu allen untersuchten klassischen SecA- oder SecA1-Proteinen eine deutliche geringere Homologie aufwies als NCgl0726. Diese geringe Homologie zu klassischen SecA-Proteinen, sogar denen aus nahe Verwandten Bakterien, ist eine Gemeinsamkeit der bekannten SecA2-Proteine (Lenz und Portnoy, 2002; Caspers, 2002). Darüber hinaus zeigte NCgl1384 eine hohe Homologie zu den SecA2-Proteinen aus *M. tuberculosis* und *M. smegmatis*. Durch die ClustalW-Analyse, bei der gezeigt wurde, dass in NCgl1384 und den mycobakteriellen SecA2-Proteinen exakt die gleichen Regionen in der Aminosäuresequenz im Vergleich zu den SecA1-Proteinen fehlen, wurde dies bekräftigt (Abbildung 36). Es gibt jedoch auch einige Bereiche, die in beiden *C. glutamicum* SecA-Proteinen und allen analysierten SecA-Proteinen konserviert sind. So sind z.B. die essentiellen Walker-Motive der NBD in allen untersuchten SecA-Proteinen vorhanden (Walker *et al.*, 1982; Hunt *et al.*, 2002). Da die an der Hydrolyse von ATP beteiligten Aminosäurereste im *C. glutamicum* SecA1 und SecA2 konserviert sind, lässt es sich vermuten, dass sowohl SecA1 wie auch SecA2 als Translokations-ATPase funktionieren können.

Von den drei in den SecA2-Proteinen fehlenden Bereichen sind die ersten beiden in SecA- und SecA1-Proteinen wenig konserviert (Caspers, 2002). Diese Bereiche sind daher wahrscheinlich für die Funktionalität eines SecA-Proteins von geringerer Bedeutung.

Bei dem dritten Bereich, der in den SecA2-Proteinen der Mycobakterien und von *C. glutamicum* jedoch auch in denen aus Listerien, Staphylokokken und Streptokokken (Caspers, 2002) fehlt, handelt es sich um die in prokaryotischen SecA- und SecA1-Proteinen hochkonservierte carboxyterminale Domäne (CTD). Auffälligerweise fehlt dieser Bereich im SecA1-Protein von *C. glutamicum* ebenfalls. Die Funktion dieses Bereichs ist in *E. coli* die Wechselwirkung mit Phospholipiden und SecB, und in *E. coli* ist er essentiell für die SecA-Funktion und somit für das Überleben der Zelle (Breukink *et al.*, 1995). In *B. subtilis*, wie in allen anderen bisher untersuchten Gram-positiven Bakterien, konnte kein SecB-Homolog gefunden werden. Die CTD kann in *B. subtilis* deletiert werden, ohne dass ein Effekt auf Überleben und Proteinsekretion auftritt (van Wely *et al.*, 2000). Da SecA2-Proteine bisher nur in Gram-positiven Bakterien gefunden wurden und in diesen kein SecB-Homolog existiert, ist es wahrscheinlich, dass ein Fehlen der hochkonservierten, carboxyterminalen Domäne keinen Einfluss auf die Funktion der SecA2-Proteine in der Proteintranslokation hat (Caspers, 2002). Das Fehlen des C-Terminus grenzt das SecA1-Protein von *C. glutamicum* jedoch von allen anderen bekannten SecA- oder SecA1-Proteinen ab, in denen diese Region hoch konserviert

ist und hierauf wird unter IV.3.2.2 noch besonders eingegangen.

IV.3.2.2 *C. glutamicum* besitzt als bislang einziges Bakterium zwei essentielle SecA-Proteine.

Die Versuche zur Herstellung von Deletionsmutanten des *secA1*- und des *secA2*-Gens von *C. glutamicum*, die nur bei *in trans* Expression des entsprechenden *C. glutamicum* SecA-Proteins erfolgreich waren (Abbildung 43 und 40), zeigten gemeinsam mit den angeschlossenen „plasmid-curing“ Experimenten (Abbildung 44 und 41) eindeutig, dass in *C. glutamicum* zwei essentielle *secA*-Gene vorliegen. In kürzlich publizierten Experimenten ist über Transposonmutagenese untersucht worden, für welche Gene von *C. glutamicum* Insertionsmutanten erhalten werden können, und für welche dies unmöglich ist (Suzuki *et al.*, 2006). Hier konnte für die beiden *secA*-Gene ebenfalls keine Insertionsmutante erhalten werden. Auch wenn diese Transposonmutagenese-Versuche nicht ausreichend sind um Gene wirklich eindeutig als essentiell zu klassifizieren, bestätigen sie die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse. Das Vorhandensein von zwei essentiellen *secA*-Genen ist ein völlig einzigartiger Befund, denn in den allen Bakterien, in denen ein zweites *secA*-Gen vorliegt und die daraufhin untersucht worden sind, ist das zusätzliche *secA2*-Gen stets nicht-essentiell (Braunstein *et al.*, 2001; Lenz und Portnoy, 2002; Bensing und Sullam, 2002, Chen *et al.*, 2004). Eine Erklärung für das Vorliegen eines zweiten essentiellen SecA-Proteins ist, dass in *C. glutamicum* die Translokation mindestens eines essentiellen Vorläuferproteins durch das SecA2-Protein vermittelt wird, weil das klassische SecA1-Protein dieses nicht oder nur unzureichend gewährleisten kann. Bei der Suche nach SecA2-abhängig exportierten Proteinen in *C. glutamicum* ist die Katalase als ein solches identifiziert worden. Das die Katalase kodierende Gen ist in Mycobakterien nicht-essentiell (Goto *et al.*, 1995) und bei einer Hoch-Durchsatz-Transposonmutagenese in *C. glutamicum* war eine Insertion in das Katalase-Gen möglich, was ein Beweis dafür ist, dass die Katalase in *C. glutamicum* ebenfalls nicht-essentiell ist (Suzuki *et al.*, 2006). Bei der Katalase handelt es sich also nicht um das putative SecA2-Substrat, dessen Translokation essentiell für das Überleben der Zelle ist. Ein weiteres essentielles SecA2-Substrat ist in den durchgeführten Experimenten nicht identifiziert worden. Dass ein solches essentielles Substrat existiert, aber nicht identifiziert werden konnte, ist vor allem daher wahrscheinlich, da bei der Suche nach SecA2-Substraten die Promotoraustauschmutante ohne einen Vektor zur Lac-Repressor Überproduktion eingesetzt wurde und bei diesem Stamm das Wachstum auch in Abwesenheit von IPTG mit dem des Wildtyps identisch war (Abbildung 47). Das heißt, dass unter diesen Bedingungen die SecA2-Expression nicht so stark reduziert ist, um die Translokation eines hypothetischen essentiellen SecA2-Substrats zu beeinträchtigen.

Es ist jedoch ebenfalls möglich, dass die Essentialität des SecA2-Proteins nicht darin

begründet liegt, dass es die Translokation eines essentiellen Vorläuferproteins gewährleistet. Eine Möglichkeit hierfür beruht darauf, dass das SecA1 von *C. glutamicum* im Vergleich zu anderen SecA- oder SecA1-Proteinen eine einzigartige Besonderheit aufweist. Auf Ebene der Aminosäuresequenz ist auffällig, dass der hoch konservierte C-Terminus, der in allen anderen SecA- oder SecA1-Proteinen vorhanden ist, im *C. glutamicum* SecA1 fehlt. Der C-Terminus kann jedoch im SecA von *B. subtilis* deletiert werden, ohne dass Auswirkungen auf die Proteinsekretion beobachtet werden (van Wely *et al.*, 2000). Dies macht es unwahrscheinlich, dass das Fehlen dieses Bereichs im *C. glutamicum* SecA1-Protein dazu führt, dass ein oder mehrere essentielle Vorläuferproteine nicht mehr über das klassische SecA1 transloziert werden können. Das Fehlen des C-Terminus im SecA1 könnte jedoch auf anderer Ebene dazu führen, dass das SecA2-Protein essentiell ist. Denn auch wenn die Deletion dieses Bereichs im SecA von *B. subtilis* keinen Effekt auf die Proteinsekretion besitzt, so zeigt eine solche Mutante dennoch einige Auffälligkeiten (van Wely *et al.*, 2000). Bei Deletion des SecA C-Terminus kommt es zu einer erhöhten Expression von Genen, deren Expression auch bei oxidativem Stress induziert ist. Hierbei handelt es sich um das so genannte Peroxid-Regulon, welches die Gene umfasst, die für AhpC, AhpF, MrgA und die Katalase KatA kodieren (van Wely *et al.*, 2000). AhpC und AhpF sind für die enzymatische Reduktion verschiedener Alkyl-Hydroperoxide zuständig, während KatA hauptsächlich Wasserstoffperoxid abbaut (Bsar *et al.*, 1996). MrgA schützt die DNA vor oxidativem Stress. Darüber hinaus ist für das MrgA-Protein gezeigt worden, dass es direkt an den C-Terminus des *B. subtilis* SecA-Proteins bindet (van Wely *et al.*, 2000). Wie genau und warum es zu einer Induktion des Peroxid-Regulons bei Deletion des C-Terminus des *B. subtilis* SecA kommt ist unklar.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem SecA C-Terminus und der Induktion der oxidativen Stressantwort ist in Abbildung 52 beispielhaft für die Katalase-Expression dargestellt und im Folgenden beschrieben.

MrgA ist ein Dps („DNA-binding proteins from starved cells“)-Protein. Dps-Proteine besitzen nicht nur die Aufgabe, die DNA über eine Verdichtung der Chromatin-Struktur vor oxidativem Stress zu schützen, sondern sind darüber hinaus durch die Bindung von Eisen an der Eisen-Homeostasis direkt beteiligt (Pulliainen *et al.*, 2005; Olsen *et al.*, 2005). Dps-Proteine sind sehr stringent regulierte Proteine, deren Expression nicht nur auf Ebene der Transkription sondern auch durch einen effizienten Abbau über das Clp-Protease-System gesteuert wird (Stephani *et al.*, 2003; Abbildung 52). Unter normalen Wachstumsbedingungen ist die Dps-Expression reprimiert und das dennoch gebildete Protein wird sehr schnell proteolytisch abgebaut. Möglicherweise ist dieser Abbau selbst geringer Mengen an Dps-Protein nötig, da die durch Dps vermittelte Kondensation des bakteriellen Chromosoms die Transkription von Genen stark behindert und daher unter normalen Wachstumsbedingungen unterbunden werden muss.

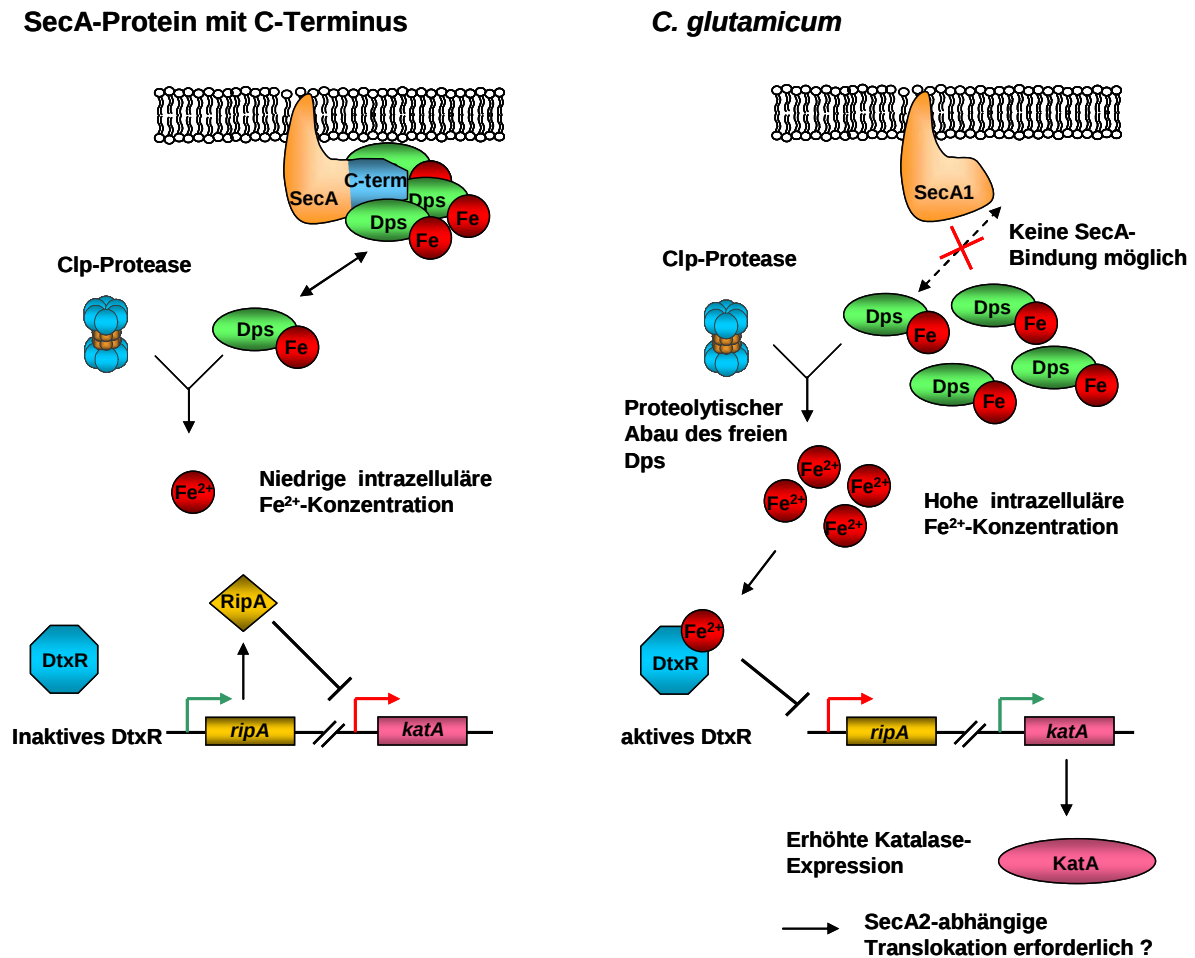


Abbildung 52: Potentieller Zusammenhang zwischen SecA C-Terminus und Induktion der oxidativen Stressantwort. Auf der linken Seite ist die Situation für ein Bakterium dargestellt, dessen SecA-Protein einen C-terminus besitzt, auf der rechten Seite die Situation in *C. glutamicum*, wo das SecA1-Protein keinen C-Terminus besitzt. Ist ein SecA C-Terminus vorhanden (links), so liegt ein großer Teil des Dps-Proteins in einer SecA gebundenen, Protease-resistenten Form vor. Nur ein geringer Teil des Dps-Proteins wird über die Clp-Protease abgebaut und die geringe Menge an freigesetztem Fe^{2+} ist nicht ausreichend um für den DtxR-Transkriptionsregulator als Co-Faktor zu fungieren. Expression des RipA-Transkriptionsfaktors findet statt und dieser reprimiert die Expression des Katalase-Gens *katA*. Dem *C. glutamicum* SecA1 (rechts) fehlt der C-Terminus und folglich ist keine Dps-Bindung möglich. Somit wird das Dps-Protein nicht vor dem proteolytischen Abbau durch die Clp-Protease geschützt und beim Abbau des Dps wird eine große Menge an Fe^{2+} frei. Diese Menge ist ausreichend um als Co-Faktor für DtxR zu fungieren und aktiver DtxR führt zu einer Repression der *ripA*-Expression. In Abwesenheit des Repressors RipA findet eine Expression von *katA* statt und es kommt zu einer Expression der Katalase. Eine hohe intrazelluläre Katalase-Aktivität besitzt möglicherweise einen schädlichen Effekt (s.u.), was eine SecA2-abhängige Translokation der Katalase erforderlich machen könnte.

Es ist nun vorstellbar, dass das Dps-Protein von *B. subtilis* (MrgA) durch Bindung an den C-Terminus von SecA vor diesem proteolytischen Abbau geschützt ist (Abbildung 52 links). Diese SecA-gebundene, geschützte Form steht in einem Gleichgewicht mit der cytosolischen Form, die durch die Clp-Proteasen abgebaut wird. Solange Dps an SecA gebunden ist, ist es höchstwahrscheinlich nicht in der Lage, die unter normalen Bedingungen negative DNA-Kondensation zu vermitteln. Eine Bindung von Eisen ist jedoch auch für die SecA-assoziierte

Form des Dps denkbar. Die SecA-Bindung hätte somit möglicherweise die Funktion, einen Teil des Dps-Proteins in der Zelle vor der Proteolyse zu schützen, ohne dass es in der DNA-Kondensation aktiv ist. Diese könnte den Sinn haben, dass sobald das Clp-Protease-System als Folge auf eine oxidative Stressantwort das freie Dps-Protein nicht mehr abbaut, das SecA-gebundene Protein, das in einem Gleichgewicht mit der cytosolischen Form steht, direkt für den Schutz der DNA zur Verfügung steht. Da es bei einem oxidativen Stress schnell zu irreparablen Schädigungen der DNA kommen kann, könnte dieser Mechanismus entwickelt worden sein, um eine bestimmte Menge des Dps-Proteins in der Zelle in einer schnell verfügbaren aber ungefährlichen Art zu konservieren. Wenn das SecA-Protein tatsächlich einen Teil des Dps-Proteins durch Bindung vor dem proteolytischen Abbau schützt, so könnte dies auch erklären, warum bei Deletion des C-Terminus des SecA-Proteins eine oxidative Stressantwort ausgelöst wird. Wie erwähnt würde die SecA-gebundene Form des Dps-Proteins noch mit Eisen assoziiert vorliegen und somit einen Teil des ansonsten frei in der Zelle vorliegenden Eisens binden. Frei in der Zelle vorliegendes Eisen ist ein Signal für oxidativen Stress, da dieses Eisen die Bildung toxischer Hydroxyl-Radikale über die Fenton-Reaktion katalysiert (Miller und Britigan, 1997; Green and Paget 2004). Bei einer Deletion des SecA C-Terminus ist das Dps-Protein nicht mehr vor proteolytischem Abbau geschützt und als Konsequenz wird weniger Eisen in der Zelle gebunden. Die erhöhte Menge an freiem Eisen könnte die oxidative Stressantwort induzieren.

Ein Dps-Protein und Homologe der restlichen Gene des *B. subtilis* Peroxid-Regulons sind auch in *C. glutamicum* vorhanden. Der Zusammenhang zwischen dem hoch konservierten C-Terminus des SecA-Proteins, der im *C. glutamicum* SecA1-Protein fehlt, und der Induktion der oxidativen Stressantwort ist besonders interessant. Bei einem zu *B. subtilis* ähnlichem Mechanismus würde man erwarten, dass durch das Fehlen des SecA1 C-Terminus die *C. glutamicum* Zelle aufgrund des oben beschriebenen Mechanismus über eine erhöhte Menge intrazellulären Eisens verfügt, daher wie unter oxidativem Stress reagiert und die Expression des Peroxid-Regulons induziert wäre (Abbildung 52, rechts). Dies würde somit unter anderem auch zu einer erhöhten Expression der Katalase, KatA, führen. Für die Expression der Katalase ist in *C. glutamicum* tatsächlich eine Abhängigkeit von der intrazellulären Eisen-Konzentration gezeigt worden (Wennerhold *et al.*, 2005). So fungiert bei Eisenüberschuss das Eisen als Co-Faktor für den Transkriptionsregulator DtxR. DtxR reguliert unter anderem die Expression eines weiteren Transkriptionsfaktors, RipA, der wiederum die Katalase-Expression reprimiert. Bei Eisenüberschuss kommt es folglich über eine Kaskade von zwei negativen Transkriptionsregulatoren, DtxR und RipA, zu einer Induktion der Katalase-Expression (Wennerhold *et al.*, 2005 und Abbildung 52).

Die Aktivität der Katalase ist nötig, um Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff umzuwandeln, bevor das Wasserstoffperoxid in einer Fenton-Reaktion hochtoxische Hydroxylradikale bildet, die zu DNA-Schädigungen führen können (Green und Paget, 2004). Es wäre jedoch dennoch vorstellbar, dass eine zu hohe intrazelluläre Katalase-Aktivität für die

Zelle einen negativen Effekt besitzt. So stellt z.B. die Aktivität von der Katalase KatG gerade in dem zu *C. glutamicum* nahe verwandtem *M. tuberculosis* eine Gefahr dar und wurde von Master *et al.* (2001) daher als ein zweischneidiges Schwert („double-edged sword“) bezeichnet. Neben seiner Katalase-Funktion kann KatG als eine Peroxidase Isonikotinsäure-Hydrazid (INH) in eine für Mycobakterien toxische Form, höchstwahrscheinlich Isonikotinsäure, umwandeln (Slayden und Barry, 2000). Bei INH handelt es sich um das wirkungsvollste anti-mycobakterielle Mittel, und Resistenz gegenüber INH wird in Mycobakterien durch eine Inaktivierung der KatG-Peroxidasefunktion vermittelt (Slayden und Barry, 2000). Die enorme Toxizität von INH wird vor allem dadurch vermittelt, dass INH als ein neutrales Molekül über passive Diffusion in die Zellen gelangt, dort dann aber aufgrund der KatG vermittelten Umwandlung in Isonikotinsäure in einer geladenen Form in der Zelle „festgehalten“ wird (Bardou *et al.*, 1998). Somit kann es zu einer enormen Anreicherung an Isonikotinsäure in der Zelle kommen, wo diese dann einen toxischen Effekt auf das Zellwachstum besitzt. Es kann folglich nur die intrazelluläre Aktivität von KatG zu diesem toxischen Anreicherungseffekt führen. Extrazellulär vorliegendes KatG wäre für die Zelle harmlos und könnte bestenfalls durch eine extrazelluläre Umwandlung von INH in die geladene Isonikotinsäure, die nicht in die Zelle diffundieren kann, sogar noch eine Schutzfunktion ausüben. Der toxische Effekt von INH geht in *M. tuberculosis* höchstwahrscheinlich auf eine Inhibition der Mykolsäure-Synthese zurück (Vilcheze *et al.*, 2006) und da die Zellwand von *C. glutamicum* ebenfalls über Mykolsäuren verfügt ist es denkbar, und für *Corynebacterium lepus* gezeigt (Gerson *et al.*, 1980), dass INH den gleichen Effekt auch hier ausübt. Ob *M. tuberculosis* und *C. glutamicum* auch unter normalen Wachstumsbedingungen INH ausgesetzt sind ist unklar, die Anwesenheit von Efflux-Systemen, die in Mycobakterien INH aus der Zelle transportieren können, macht es jedoch wahrscheinlich, dass intrazelluläres INH auch unter normalen Wachstumsbedingungen ein Problem für *M. tuberculosis* darstellen kann (Colangeli *et al.*, 2005). Selbst wenn *M. tuberculosis* und *C. glutamicum* unter normalen Bedingungen nicht mit INH in Kontakt treten würden, wäre es dennoch vorstellbar, dass eine zu hohe intrazelluläre Katalase-Aktivität auf bislang unbekannte Art und Weise einen schädlichen Effekt auf die Zelle besitzt.

Letztendlich würde dies bedeuten, dass das Fehlen des C-Terminus des SecA1-Proteins von *C. glutamicum* eine Induktion der Katalase-Expression bewirkt, deren intrazelluläre Aktivität toxisch sein kann und das durch eine Sekretion der Katalase in den Überstand dieser Effekt ausgeglichen werden könnte.

In *M. tuberculosis* wurde gezeigt, dass das SecA2-Protein an der Sekretion der Katalase beteiligt ist (Braunstein *et al.*, 2003), und auch in *C. glutamicum* wurde die Katalase in dieser Doktorarbeit als ein Protein identifiziert, dessen Lokalisierung abhängig von der SecA2-Expression ist. Es ist möglich, dass über SecA2-vermittelten Export die Menge an intrazellulärer Katalase reduziert werden kann, um somit dem toxischen Effekt zu hoher

intrazellulärer Katalase-Aktivität entgegen zu wirken. Somit könnte das einzigartige Fehlen des C-Terminus des *C. glutamicum* SecA1-Proteins letztlich der Grund dafür sein, dass das SecA2-Protein von *C. glutamicum* als bislang einziges SecA2-Protein essentiell ist. Da die Katalase in *C. glutamicum* ein nicht-essentiell Protein ist, würde dies auch erklären, warum der Export eines eigentlich nicht-essentiellen Proteins dennoch essentiell sein kann.

Es ist natürlich ebenfalls möglich, dass eine einfachere Erklärung, wie die SecA2-abhängige Translokation eines bislang nicht entdeckten, essentiellen Vorläuferproteins die Essentialität des SecA2-Proteins in *C. glutamicum* bedingt. Die über die oxidative Stressantwort geknüpfte Verbindung zwischen dem fehlenden C-Terminus des SecA1-Proteins und der Essentialität des SecA2-Proteins, zwei für *C. glutamicum* einzigartige Beobachtungen, stellt jedoch eine interessante und zusammenhängende Erklärung für diese beiden Befunde dar.

IV.3.2.3 Die SecA2-abhängige Proteintranslokation ist in *C. glutamicum* wie in *M. tuberculosis* am Schutz vor oxidativem Stress beteiligt.

Das Ergebnis, dass das SecA2-Protein von *C. glutamicum* essentiell ist, zeigt eindeutig, dass die SecA2-abhängige Proteintranslokation in einem nicht-pathogenen Bakterium wie *C. glutamicum* eine bedeutende Rolle spielt. Dies war unklar, da in pathogenen Bakterien mit einem SecA2-System wie *L. monocytogenes* und *M. tuberculosis* gezeigt wurde, dass die SecA2-abhängige Proteintranslokation an der Pathogenität beteiligt ist. Für die SecA2/SecY2-Translokation konnte im Verlaufe dieser Arbeit sogar gezeigt werden, dass in einem nicht-pathogenen Bakterium das akzessorische Translokationssystem inaktiviert ist, da es dort offensichtlich nicht mehr benötigt wird (siehe IV.3.1.1). Für die SecA2-abhängige Translokation in *C. glutamicum* ist dies ganz offensichtlich nicht der Fall. Hier kommt der akzessorischen Translokation sogar allerhöchstens noch eine größere Bedeutung zu als in pathogenen Bakterien mit diesem System. Bei der Suche nach SecA2-abhängig exportierten Proteinen von *C. glutamicum* wurde die Katalase identifiziert. Interessanterweise stellt die Katalase in *M. tuberculosis* ebenfalls eins der beiden SecA2-Substrate dar (Braunstein *et al.*, 2003). Das zweite SecA2-Substrat von *M. tuberculosis*, die Superoxid-Dismutase SodA, von der ein homologes Protein auch im *C. glutamicum* Genom kodiert ist, wurde bei den Untersuchungen in *C. glutamicum* nicht entdeckt. In der Promotoraustauschmutante, die in diesen Experimenten eingesetzt wurde, fand jedoch nur eine unvollständige Repression der *secA2*-Promotoraktivität statt, wie ein effizientes Wachstum auch bei Repression der Expression des essentiellen *secA2*-Gens zeigt. Daher wird offensichtlich noch eine ausreichende Menge an SecA2-Protein gebildet und es ist vorstellbar, dass daher die Translokation der Superoxid-Dismutase unter diesen Bedingungen nicht beeinträchtigt war. Weiterhin ist es möglich, dass die unvollständige Repression des *secA2*-Promotors die Identifikation anderer SecA2-Substrate in *C. glutamicum* ebenfalls verhindert hat. Unabhängig davon, ob möglicherweise noch weitere SecA2-Substrate in *C. glutamicum*

vorliegen, deutet die Identifikation der Katalase als SecA2-Substrat in *C. glutamicum* und *M. tuberculosis* auf eine ähnliche Funktion der SecA2-Proteintranslokation in beiden Bakterien hin. Für *M. tuberculosis* wird vermutet, dass Superoxid-Dismutase und Katalase die Zelle vor reaktiven Sauerstoff-Zwischenstufen (ROI: „reactive oxygen intermediates“) schützen. ROI-Freisetzung stellt einen bedeutenden antimikrobiellen Mechanismus in Macrophagen des Wirts dar und eine extrazelluläre Lokalisierung von Superoxid-Dismutase und Katalase kann für diesen Schutzmechanismus vorteilhaft sein (Daffe und Etienne, 1999; Raynaud *et al.*, 1998). Als Konsequenz ist eine *secA2*-Mutante, bei der deutlich weniger Superoxid-Dismutase und Katalase extrazellulär vorliegen, der ROI-Freisetzung gegenüber weniger resistent und daher weniger pathogen (Braunstein *et al.*, 2003). Bei *C. glutamicum* handelt es sich um ein nicht-pathogenes Bakterium, welches folglich einer ROI-Freisetzung durch Makrophagen eines Wirts nicht begegnet. ROIs werden jedoch auch während des Wachstums von allen lebenden Zellen gebildet und da bakterielle Membranen für Wasserstoffperoxid permeabel sind, stellt auch die Umgebung eine Quelle für ROIs dar (Storz und Imlay, 1999; Green und Paget, 2004; Panek und O'Brian, 2004). ROIs sind somit eine Gefahr, der auch ein nicht-pathogenes Bakterium wie *C. glutamicum* ausgesetzt ist. Folglich ist es gut vorstellbar, dass eine extrazelluläre Lokalisierung der Katalase für *C. glutamicum* wie auch für *M. tuberculosis* einen verbesserten Schutz vor oxidativem Stress darstellt und daher die SecA2-abhängige Translokation für den Export der Katalase (und eventuell anderer Proteine) entwickelt wurde. Die Entwicklung eines spezialisierten Translokationssystem war möglicherweise nötig, da die Katalase auch eine wichtige intrazelluläre Funktion beim Schutz vor ROIs besitzt und daher nicht vollständig in den Überstand transloziert werden darf. Dies könnte auch der Grund sein, warum die Katalase kein Sec-Signalpeptid besitzt, da ansonsten eine Faltung in eine aktive Form innerhalb der Zelle verhindert und eine effektive Translokation in den Überstand über den klassischen Sec-Weg eingeleitet werden würde. Darüber hinaus könnte ein Export der Katalase, wie unter IV.3.2.2 diskutiert, die Zelle auch vor einer schädlichen intrazellulären Reaktion des Enzyms schützen. Die SecA2-Translokation könnte somit an der Einstellung eines Gleichgewichts der intra- und extrazellulär vorliegenden Katalase beteiligt sein und somit gewährleisten, dass ausreichende aber nicht zu große Mengen innerhalb der Zelle vorliegen.

Da die Katalase in *C. glutamicum* wie auch in *M. tuberculosis* über kein erkennbares Signalpeptid verfügt, ist es unklar, wie für dieses Protein ein „targeting“ an die SecA2-Translokase erfolgt. Gleichzeitig wurde in *M. smegmatis* gezeigt, dass in einer *secA2*-Mutante die Translokation mancher Fusionsproteine mit einem klassischen Signalpeptid reduziert ist, was darauf hindeutet, dass das SecA2 Vorläuferproteine mit Signalpeptiden erkennen kann (Braunstein *et al.*, 2001). Daher wäre es alternativ vorstellbar, dass ein oder mehrere bislang unbekannte Proteine, die über klassische Signalpeptide verfügen, SecA2-abhängig exportiert werden und dass diese an der Translokation der Katalase in einem Sec-unabhängigen Mechanismus beteiligt sind. Das SecA2-Protein wäre somit nicht direkt sondern nur indirekt

für die Translokation der Katalase von Bedeutung.

Auch wenn die SecA2-Translokation in einem Bakterium wie *M. tuberculosis* für die Pathogenität dieses Stammes von Bedeutung ist, so zeigt die ähnliche Funktion der SecA2-Translokation in einem nicht-pathogenen Bakterium wie *C. glutamicum*, dass die SecA2-Translokation *per se* nicht für die Pathogenität eines Bakteriums verantwortlich sein muss. Vielmehr scheint die SecA2-Translokation sowohl in *C. glutamicum* wie auch in *M. tuberculosis* Vorteile bei der Bekämpfung von oxidativem Stress zu liefern, der während des Wachstums in dem jeweiligen Habitat anfällt. Für *M. tuberculosis* führt dies zwar zu einem verbesserten Schutz gegenüber einer Immunantwort des Wirts, die SecA2-Translokation als ein Charakteristikum für pathogene Bakterien zu bezeichnen ist aufgrund der in *C. glutamicum* gewonnen Ergebnisse jedoch nicht korrekt.

V. Zusammenfassung

In einigen Gram-positiven Bakterien existiert neben dem essentiellen klassischen Sec-Weg der Proteintranslokation (Sec1) ein weiterer, nicht-essentieller Sec-Translokationsweg (Sec2). Der Sec2-Weg wurde hauptsächlich in pathogenen Bakterien gefunden und ist in diesen an der Pathogenität beteiligt. Bakterien mit einem Sec2-Exportsystem lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen: solche nur mit einem zweiten SecA-Protein (SecA2-System) und solche mit einem zweiten SecA, zweiten SecY und weiteren an der Sec2-Translokation beteiligten Komponenten (SecA2/SecY2-System). Über den Sec2-Weg werden nur wenige spezifische Exportsubstrate transloziert, die über den klassischen Sec-Weg nicht (SecA2/SecY2-Substrate) oder nur ineffizient (SecA2-Substrate) exportiert werden können.

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie die SecA2/SecY2-Substrate von einer Translokation über den klassischen Sec-Weg ausgeschlossen werden. Hierzu wurde die Translokation von Fusionsproteinen aus dem SecA2/SecY2-Substrat von *S. aureus* und einem Sec1-Substrat und von verkürzten SecA2/SecY2-Substraten über den klassischen Sec-Weg von *E. coli*, *B. subtilis* und *S. carnosus* analysiert. Es zeigte sich bei Untersuchungen in *E. coli* und *S. carnosus*, dass weder das Signalpeptid noch die Translokations-Initiations-Domäne des SecA2/SecY2-Substrats, zwei Bereiche die in Sec1-Substraten an Wechselwirkungen mit der Translokase beteiligt sind, ein „targeting“ an und eine Translokation über den klassischen Sec-Weg verhindern. Weitere Untersuchungen zeigten, dass SecA2/SecY2-Substrate prinzipiell über den klassischen Sec-Weg exportiert werden können, wahrscheinlich jedoch eine Modifikation der Proteine durch ein spezielles Glykosylierungssystem dies unmöglich macht. Diese Modifikation vor der Translokation ist für die Funktion der SecA2/SecY2-Substrate offensichtlich jedoch so bedeutend, dass ein spezieller Translokationsweg für diese Proteine entwickelt wurde.

Für das SecA2/SecY2-System wurde bislang nur vermutet, dass es als eine eigenständige Translokase funktioniert und keine Wechselwirkungen mit der klassischen Sec-Translokase eingeht. In der vorliegenden Arbeit wurde für das SecA2-Protein von *S. aureus*, einem Bakterium mit einem SecA2/SecY2-System, in einer konditionalen *secA*-Mutante von *B. subtilis* gezeigt, dass es mit der klassischen Sec-Translokase von *B. subtilis* weder die Translokation eines Sec1-Substrats noch die eines Proteins mit einem SecA2/SecY2-Signalpeptid ermöglichen kann. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass das SecA2/SecY2-System eine eigene, unabhängige Translokase ausbildet.

Da ein Zusammenhang zwischen Sec2-Translokation und Pathogenität besteht, wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Bedeutung der Sec2-Translokation in nicht-pathogenen Bakterien zukommt. Hierbei ergaben sich für das SecA2 und das SecA2/SecY2-System unterschiedliche Ergebnisse. In *S. carnosus*, bei dem in dieser Arbeit als erstem nicht-pathogenen Bakterium die Gene für ein SecA2/SecY2-System entdeckt wurden zeigte sich, dass das SecA2/SecY2-System durch eine Vielzahl von Stop-Codons abgeschaltet wurde. Dies ist höchstwahrscheinlich geschehen, da die durch das System in pathogenen Bakterien wie *S. aureus* vermittelte Adhäsion an Zelloberflächen eines Wirts im Habitat des nicht-pathogenen *S. carnosus* nicht mehr erforderlich ist. Für das SecA2-System von *C. glutamicum*, einem ebenfalls nicht-pathogenen Bakterium, ergab sich, dass dieses nicht nur funktionell ist, sondern dass interessanterweise das *C. glutamicum* SecA2 im Gegensatz zu allen anderen bekannten SecA2-Proteinen sogar essentiell für das Überleben der Zelle ist. Für *C. glutamicum* wurde die Katalase als ein SecA2-abhängig exportiertes Protein identifiziert. Da die Katalase in *M. tuberculosis* ebenfalls ein SecA2-Substrat darstellt, besitzt der SecA2-Weg in einem nicht-pathogenen und einem pathogenen Bakterium offensichtlich eine ähnliche Funktion. Bei dieser handelt es sich wahrscheinlich um einen Schutz vor oxidativem Stress. Die extrazelluläre Lokalisierung der Katalase scheint für *C. glutamicum* sogar essentiell für das Überleben der Zelle zu sein, entweder zum Schutz vor oxidativem Stress, oder weil eine zu hohe intrazelluläre Katalase-Aktivität einen toxischen Effekt besitzt.

VI. Literatur

Akimaru J, Matsuyama S, Tokuda H, Mizushima S (1991): Reconstitution of a protein translocation system containing purified SecY, SecE, and SecA from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(15):6545-9

Akita M, Sasaki S, Matsuyama S, 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

Akita M, Shinkai A, Matsuyama S, Mizushima S (1991): SecA, an essential component of the secretory machinery of *Escherichia coli*, exists as homodimer. *Biochem Biophys Res Commun* 174(1):211-6

Akiyama Y, Ito K (1987): Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 1987 Nov;6(11):3465-70

Andersson H, von Heijne G (1991): A 30-residue-long "export initiation domain" adjacent to the signal sequence is critical for protein translocation across the inner membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Nov 1; 88(21):9751-4.

Angelini S, Deitermann S, Koch HG (2005): FtsY, the bacterial signal-recognition particle receptor, interacts functionally and physically with the SecYEG translocon. *EMBO Rep.* 2005 May;6(5):476-81

Anjum MF, Marooney C, Fookes M, Baker S, Dougan G, Ivens A, Woodward MJ (2005): Identification of core and variable components of the *Salmonella enterica* subspecies I genome by microarray. *Infect Immun.* 2005 Dec;73(12):7894-905.

Backert S, Meyer TF (2006): Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Apr; 9(2):207-17

Bardou F, Raynaud C, Ramos C, Laneelle MA, Laneelle G (1998): Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* 1998 Sep;144 (Pt 9):2539-44.

Barkocy-Gallagher GA, Bassford PJ Jr. (1992): Synthesis of precursor maltose-binding protein with proline in the +1 position of the cleavage site interferes with the activity of *Escherichia coli* signal peptidase I in vivo. *J Biol Chem.* 1992 Jan 15;267(2):1231-8.

- Baud C**, Karamanou S, Sianidis G, Vrontou E, Politou AS, Economou A (2002): Allosteric communication between signal peptides and the SecA protein DEAD motor ATPase domain. *J Biol Chem.* 2002 Apr 19;277(16):13724-31.
- Benach J**, Chou YT, Fak JJ, Itkin A, Nicolae DD, Smith PC, Wittrock G, Floyd DL, Golsaz CM, Gierasch LM, Hunt JF (2003): Phospholipid-induced monomerization and signal-peptide-induced oligomerization of SecA. *J. Biol. Chem.* 278 (6), 3628-38
- Bensing BA**, Sullam PM (2002): An accessory sec locus of *Streptococcus gordonii* is required for export of the surface protein GspB and for normal levels of binding to human platelets. *Mol Microbiol* 44(4):1081-94
- Bensing BA**, Gibson BW, Sullam PM (2004a): The *Streptococcus gordonii* platelet binding protein GspB undergoes glycosylation independently of export. *J Bacteriol.* 2004 Feb; 186(3):638-45.
- Bensing BA**, Lopez JA, Sullam PM (2004b): The *Streptococcus gordonii* surface proteins GspB and Hsa mediate binding to sialylated carbohydrate epitopes on the platelet membrane glycoprotein Ibalpha. *Infect Immun.* 2004 Nov;72(11):6528-37.
- Bensing BA**, Takamatsu D, Sullam PM (2005): Determinants of the streptococcal surface glycoprotein GspB that facilitate export by the accessory Sec system. *Mol Microbiol.* 2005 Dec;58(5):1468-81.
- Bessonneau P**, Besson V, Collinson I, Duong F (2002): The SecYEG preprotein translocation channel is a conformationally dynamic and dimeric structure. *EMBO J* 21(5):995-1003
- Birnboim HC**, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Blanco J**, Coque JJ, Martin JF (1996): Characterization of the secA gene of *Streptomyces lividans* encoding a protein translocase which complements and *Escherichia coli* mutant defective in the ATPase activity of SecA. *Gene.* 1996 Oct 17;176(1-2):61-5.
- Bolhuis A**, Broekhuizen CP, Sorokin A, van Roosmalen ML, Venema G, Bron S, Quax WJ, van Dijl JM. (1998): SecDF of *Bacillus subtilis*, a molecular Siamese twin required for the efficient secretion of proteins. *J Biol Chem* 273(33):21217-24

- Bolotin A**, Quinquis B, Renault P, Sorokin A, Ehrlich SD, Kulakauskas S, Lapidus A, Goltsman E, Mazur M, Pusch GD, Fonstein M, Overbeek R, Kyprides N, Purnelle B, Prozzi D, Ngui K, Masuy D, Hancy F, Burtreau S, Boutry M, Delcour J, Goffeau A, Hols P (2004): Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol.* 2004 Dec;22(12):1554-8. Epub 2004 Nov 14.
- Bostina M**, Mohsin B, Kuhlbrandt W, Collinson I (2005): Atomic model of the *E. coli* membrane-bound protein translocation complex SecYEG. *J Mol Biol.* 2005 Oct 7;352(5):1035-43
- Bradford MM** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Braunstein M**, Brown AM, Kurtz S, Jacobs WR Jr (2001): Two nonredundant SecA homologues function in mycobacteria. *J Bacteriol* 183(24):6979-90
- Braunstein M**, Espinosa BJ, Chan J, Belisle JT, Jacobs WR Jr (2003): SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 2003 Apr;48(2):453-64.
- Breukink E**, Nouwen N, van Raalte A, Mizushima S, Tommassen J, de Kruijff B (1995): The C terminus of SecA is involved in both lipid binding and SecB binding. *J Biol Chem* 270(14):7902-7
- Breyton C**, Haase W, Rapoport TA, Kuhlbrandt W, Collinson I (2002): Three dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* 418 (6898), 662-5
- Brundage L**, Hendrick JP, Schiebel E, Driessen AJ, Wickner W (1990): The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* 62(4):649-57
- Bsat N**, Chen L, Helmann JD (1996): Mutation of the *Bacillus subtilis* alkyl hydroperoxide reductase (ahpCF) operon reveals compensatory interactions among hydrogen peroxide stress genes. *J Bacteriol.* 1996 Nov;178(22):6579-86.
- Cannon KS**, Or E, Clemons WM Jr, Shibata Y, Rapoport TA (2005): Disulfide bridge formation between SecY and a translocating polypeptide localizes the translocation pore to the center of SecY. *J Cell Biol.* 2005 Apr 25; 169(2):219-25
- Casadaban MJ** (1976): Regulation of the regulatory gene for the arabinose pathway, *araC*. *J Mol Biol* 104(3):557-66

- Caspers M** (2002): Funktionelle Charakterisierung von Sec-Proteinen aus pathogenen Gram-positiven Bakterien. Diplomarbeit, Forschungszentrum Jülich GmbH
- Chain PS**, Commerci DJ, Tolmasky ME, Larimer FW, Malfatti SA, Vergez LM, Agüero F, Land ML, Ugalde RA, Garcia E (2005): Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. *Infect Immun*. 2005 Dec;73(12):8353-61.
- Chen Q**, Wu H, Fives-Taylor PM (2004): Investigating the role of secA2 in secretion and glycosylation of a fimbrial adhesin in *Streptococcus parasanguis* FW213. *Mol Microbiol*. 2004 Aug;53(3):843-56.
- Chou, MM** und Kendall, DA (1990): Polymeric sequences reveal a functional interrelationship between hydrophobicity and length of signal peptides. *J. Biol. Chem*. 265:2873-2880.
- Cianciotto NP** (2005): Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol*. 2005 Dec;13(12):581-8.
- Clauser KR**, Baker P, Burlingame AL (1999): Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal Chem* 71, 2871-2882.
- Colangeli R**, Helb D, Sridharan S, Sun J, Varma-Basil M, Hazbon MH, Harbacheuski R, Megjugorac NJ, Jacobs WR Jr, Holzenburg A, Sacchettini JC, Alland D (2005): The *Mycobacterium tuberculosis* iniA gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol. *Mol Microbiol*. 2005 Mar;55(6):1829-40.
- Coombes BK**, Valdez Y, Finlay BB (2004): Evasive maneuvers by secreted bacterial proteins to avoid innate immune responses. *Curr Biol*. 2004 Oct 5;14(19):R856-67.
- Cunningham K**, Wickner W (1989): Specific recognition of the leader region of precursor proteins is required for the activation of translocation ATPase of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(22):8630-4
- Daffe M**, Etienne G (1999): The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuber Lung Dis*. 1999;79(3):153-69.
- Dalbey RE** (1990) Positively charged residues are important determinants of membrane protein topology. *Trends Biochem Sci*. 1990 Jul;15(7):253-7.
- Delepelaire P** (2004): Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov 11;1694(1-3):149-61.

- Demleitner G**, Gotz F (1994): Evidence for importance of the *Staphylococcus hyicus* lipase pro-peptide in lipase secretion, stability and activity. *FEMS Microbiol Lett.* 1994 Aug 15;121(2):189-97.
- de Gier JW**, Scotti PA, Saaf A, Valent QA, Kuhn A, Luirink J, von Heijne G (1998): Differential use of the signal recognition particle translocase targeting pathway for inner membrane protein assembly in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(25):14646-51.
- den Blaauwen T**, Fekkes P, de Wit JG, Kuiper W, Driessen AJ (1996): Domain interactions of the peripheral preprotein Translocase subunit SecA. *Biochemistry* 35(37):11994-2004
- de Vrije GJ**, Batenburg AM, Killian JA, de Kruijff B (1990): Lipid involvement in protein translocation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 4(1):143-50
- Dilks K**, Gimenez MI, Pohlschroder M (2005): Genetic and biochemical analysis of the twin-arginine translocation pathway in halophilic archaea. *J Bacteriol.* 187(23):8104-13
- Dolan KM**, Oliver DB (1991): Characterization of *Escherichia coli* SecA protein binding to a site on its mRNA involved in autoregulation. *J Biol Chem* 266(34):23329-33
- Dorman CJ**, Deighan P (2003): Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr Opin Genet Dev.* 2003 Apr;13(2):179-84.
- Doyle SM**, Braswell EH, Teschke CM (2000): SecA folds via a dimeric intermediate. *Biochemistry* 39(38):11667-76
- Driessen AJ** (1993): SecA, the peripheral subunit of the *Escherichia coli* precursor protein translocase, is functional as a dimer. *Biochemistry* 32(48):13190-7
- Duong F**, Wickner W (1997a): Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO J* 16(10):2756-68
- Duong F**, Wickner W (1997b): The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J* 16(16):4871-9
- Economou A**, Wickner W (1994): SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* 78(5):835-43
- Economou A**, Pogliano JA, Beckwith J, Oliver DB, 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* 1995 83(7):1171-81

- Eichler J**, 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 U S A* 94(11):5574-81.
- Facey SJ**, Kuhn A (2004): Membrane integration of E. coli model membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov 11;1694(1-3):55-66.
- Fekkes P**, van der Does C, und Driessen AJM (1997): The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J*. 16:6105-6113
- Fikes JD**, Bassford PJ Jr. (1987): Export of unprocessed precursor maltose-binding protein to the periplasm of Escherichia coli cells. *J Bacteriol*. 1987 Jun;169(6):2352-9.
- Fountoulakis M**, Langen H (1997): Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, non-volatile buffer and simplified peptide recovery. *Anal Biochem* 250, 153-156.
- Gerson DF**, Cooper DG, Ramsay B, Zajic JE (1980): The effect of substrate on inhibition of Corynebacterium lepus by isonicotinic acid hydrazide (Isoniazid). *Can J Microbiol*. 1980 Dec;26(12):1498-500.
- Goto M**, Oka S, Tachikawa N, Kitada K, Wada M, Abe C, Shimada K, Kimura S (1995): KatG sequence deletion is not the major cause of isoniazid resistance in Japanese and Yemeni Mycobacterium tuberculosis isolates. *Mol Cell Probes*. 1995 Dec;9(6):433-9.
- Götz F**, Popp F, Korn E, Schleifer KH (1985): Complete nucleotide sequence of the lipase gene from Staphylococcus hyicus cloned in Staphylococcus carnosus. *Nucleic Acids Res*. 1985 Aug 26; 13(16):5895-906.
- Götz F**, Schumacher B (1987): Improvements of protoplast transformation in Staphylococcus carnosus. *FEMS Microbiol Lett* 40, 285-288.
- Green J**, Paget MS (2004): Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Dec;2(12):954-66.
- Hanahan D** (1983): Studies on the transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Hardy KG** (1985) Bacillus cloning methods. In : DNA cloning Vol. II (Glover, DM ed.), IRL Press, Oxford, Washington DC S. 1-17

- Hartl FU**, Lecker S, Schiebel E, Hendrick JP, Wickner W (1990): The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell* 63(2):269-79
- Herbort M**, Klein M, Manting EH, Driessen AJ, Freudl R (1999): Temporal expression of the *Bacillus subtilis* *secA* gene, encoding a central component of the preprotein translocase. *J Bacteriol* 181(2):493-500
- Henderson IR**, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D (2004) : Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004 Dec; 68(4):692-744.
- Honda K**, Nakamura K, Nishiguchi M, Yamane K (1993) : Cloning and characterization of a *Bacillus subtilis* gene encoding a homolog of the 54-kilodalton subunit of mammalian signal recognition particle and *Escherichia coli* Ffh. *J Bacteriol* 175(15):4885-94
- Hunt JF**, Weinkauff S, Henry L, Fak JJ, McNicholas P, Oliver DB, Deisenhofer J (2002): Nucleotide control of interdomain interactions in the conformational reaction cycle of SecA. *Science* 297(5589):2018-26
- Ito K** (1990): Structure, function, and biogenesis of SecY, an integral membrane protein involved in protein export. *J Bioenerg Biomembr* 22(3):353-67
- Izard JW**, Kendall DA (1994): Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol Microbiol* 13(5):765-73
- Jilaveanu LB**, Zito CR, Oliver D (2005): Dimeric SecA is essential for protein translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 May 24;102(21):7511-6
- Joly JC**, Leonard MR, Wickner WT (1994): Subunit dynamics in *Escherichia coli* preprotein translocase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(11):4703-4707
- Karamyshev AL**, Johnson AE (2005): Selective SecA association with signal sequences in ribosome-bound nascent chains: a potential role for SecA in ribosome targeting to the bacterial membrane. *J Biol Chem* ;280(45):37930-40
- Karamanou S**, Vrontou E, Sianidis G, Baud C, Roos T, Kuhn A, Politou AS, Economou A (1999): A molecular switch in SecA protein couples ATP hydrolysis to protein translocation. *Mol Microbiol* 34(5):1133-1145

- Kawamura F**, Doi RH (1984): Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. : *J Bacteriol* 160(1):442-4
- Keilhauer C**, Eggeling L, Sahm H (1993): Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J Bacteriol* 175, 5595-5603.
- Khatib K**, Belin D (2002): A novel class of *secA* alleles that exert a signal-sequence-dependent effect on protein export in *Escherichia coli*. *Genetics*. 2002 Nov;162(3):1031-43.
- Kim L**, Mogk A, Schumann W (1996): A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application. *Gene* 181 (1996) 71-76
- Kimura E**, Akita M, Matsuyama S, Mizushima S (1991): Determination of a region in *SecA* that interacts with presecretory proteins in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1991 266(10):6600-6
- Kinoshita S**, Udaka S, Shimono M (1957): Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol*. 3:193-205
- Klein M**, Meens J, Frendl R (1995): Functional characterization of the *Staphylococcus carnosus* *SecA* protein in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* *secA* mutant strains. *FEMS Microbiol Lett* 131(3):271-7
- Klein, M** (1995): Isolierung und funktionelle Charakterisierung des *secA* Gens aus *Staphylococcus carnosus* und eines azidresistenten *secA* Allels von *Bacillus subtilis*. Dissertation, Forschungszentrum Jülich GmbH
- Klose M**, Schimz KL, van der Wolk J, Driessen AJ, Frendl R (1993): Lysine 106 of the putative catalytic ATP-binding site of the *Bacillus subtilis* *SecA* protein is required for functional complementation of *Escherichia coli* *secA* mutants in vivo. *J Biol Chem* 268(6):4504-10
- Kloos WE**, Schleifer KH (1986): Genus IV. *Staphylococcus* in Holt JG, Sneath PHA, Mair NS, Scarps MS (eds.) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. William and Wilkins Baltimore 2. Auflage: 1013-1035
- Laemmli, UK** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

- Laurent-Winter C**, Ngo S, Danchin A, Bertin P (1997): Role of *Escherichia coli* histone-like nucleoid-structuring protein in bacterial metabolism and stress response--identification of targets by two-dimensional electrophoresis. *Eur J Biochem.* 1997 Mar 15;244(3):767-73
- Lee HC**, Bernstein HD (2001): The targeting pathway of *Escherichia coli* presecretory and integral membrane proteins is specified by the hydrophobicity of the targeting signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (6): 3471-6.
- Lee VT**, Schneewind O (2001): Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev.* 2001 Jul 15;15(14):1725-52.
- Lenz LL**, Portnoy DA (2002): Identification of a second *Listeria secA* gene associated with protein secretion and the rough phenotype. *Mol Microbiol* 45(4):1043-56
- Lenz LL**, Mohammadi S, Geissler A, Portnoy DA (2003): SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Oct 14;100(21):12432-7.
- Liepe, HU (1982)**: Starter cultures and dry suasage. *Focus Mikrobiologie* 5, 10-15.
- Li P**, Beckwith J, Inouye H (1988): Alteration of the amino terminus of the mature sequence of a periplasmic protein can severely affect protein export in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Oct;85(20):7685-9.
- Lill R**, Dowhan W, Wickner W (1990): The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell* 60(2):271-80
- Liu, G**, Topping, TB, Randall, LL (1989): Physiological role during export for the retardation of folding by the leader peptidase of maltose binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 9213-9217
- Liu Y**, Harrison PM, Kunin V, Gerstein M (2004): Comprehensive analysis of pseudogenes in prokaryotes: widespread gene decay and failure of putative horizontally transferred genes. *Genome Biol.* 2004;5(9):R64.
- Luirink J**, Dobberstein B (1994): Mammalian and *Escherichia coli* signal recognition particles. *Mol Microbiol* 11(1):9-13
- Machata S**, Hain T, Rohde M, Chakraborty T (2005): Simultaneous deficiency of both MurA and p60 proteins generates a rough phenotype in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol.* 2005 Dec;187(24):8385-94.

Madsen SM, Beck, HC, Ravn, P, Vrang, A, Hansen, AM & Israelsen, H (2002): Cloning and inactivation of a branched-chain-amino-acid aminotransferase gene from *Staphylococcus carnosus* and characterization of the enzyme. *Appl Environ Microbiol* 68, 4007-4014.

Manting EH, van der Does C, Driessen AJ. (1997): In vivo cross-linking of the SecA and SecY subunits of the *Escherichia coli* preprotein translocase. *J Bacteriol* 179(18):5699-704

Manting EH, Kaufmann A, van der Does C, Driessen AJ (1999): A single amino acid substitution in SecY stabilizes the interaction with SecA. *J Biol Chem* 274(34):23868-74

Manting EH, van Der Does C, Remigy H, Engel A, Driessen AJ (2000): SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *EMBO J* 19(5):852-61

Master S, Zahrt TC, Song J, Deretic V (2001): Mapping of *Mycobacterium tuberculosis* katG promoters and their differential expression in infected macrophages. *J Bacteriol.* 2001 Jul;183(13):4033-9.

Matsuyama S, Fujita Y, Mizushima S (1993): SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J* 12(1):265-70

McCormick JK, Tripp TJ, Dunny GM, Schlievert PM (2002): Formation of vegetations during infective endocarditis excludes binding of bacterial-specific host antibodies to *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis.* 2002 Apr 1;185(7):994-7.

Meens J, Frings E, Klose M, Freudl R (1993): An outer membrane protein (OmpA) of *Escherichia coli* can be translocated across the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 9(4):847-55

Meens J, 1994: Untersuchungen zur Signalsequenzfunktion und zur Funktion SecE homologer Proteine in Gram-positiven Bakterien. Dissertation, Forschungszentrum Jülich GmbH

Miyakawa Y, Komano T (1981): Study of the cell cycle of *Bacillus subtilis* using temperature- sensitive mutants. I. Isolation and genetic analysis of the mutants defective in septum formation. *Mol Gen Genet* 181 : 207-214.

Miller JH (1972): Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.*

Miller RA, Britigan BE (1997): Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev.* 1997 Jan;10(1):1-18.

Monk IR, Cook GM, Monk BC, Bremer PJ (2004): Morphotypic conversion in *Listeria monocytogenes* biofilm formation: biological significance of rough colony isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Nov;70(11):6686-94.

Murphy CK, Beckwith J (1994): Residues essential 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 U S A* 91(7):2557-2561

Nakamura K, Imai Y, Nakamura A, Yamane K (1992): Small cytoplasmic RNA of *Bacillus subtilis*: functional relationship with human signal recognition particle 7S RNA and *Escherichia coli* 4.5S RNA. *J Bacteriol* 174(7):2185-92

Nakamura K, Nishiguchi M, Honda K, Yamane K (1994): The *Bacillus subtilis* SRP54 homologue, Ffh, has an intrinsic GTPase activity and forms a ribonucleoprotein complex with small cytoplasmic RNA in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 199(3):1394-9

Nakamura K, Yahagi S, Yamazaki T, Yamane K (1999): *Bacillus subtilis* histone-like protein, HBSu, is an integral component of a SRP-like particle that can bind the Alu domain of small cytoplasmic RNA. *J Biol Chem* 274(19):13569-76

Nakatogawa H, Mori H, Ito K (2000): Two independent mechanisms down-regulate the intrinsic SecA ATPase activity. *J Biol Chem* 275(43):33209-12

Navarre WW, Daefler S, Schneewind O (1996): Cell wall sorting of lipoproteins in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 178, 441-446.

Nierman WC, DeShazer D, Kim HS, Tettelin H, Nelson KE, Feldblyum T, Ulrich RL, Ronning CM, Brinkac LM, Daugherty SC, Davidsen TD, Deboy RT, Dimitrov G, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn ML, Haft DH, Khouri H, Kolonay JF, Madupu R, Mohammoud Y, Nelson WC, Radune D, Romero CM, Sarria S, Selengut J, Shamblin C, Sullivan SA, White O, Yu Y, Zafar N, Zhou L, Fraser CM (2004): Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Sep 28;101(39):14246-51.

Nilsson I, Whitley P, von Heijne G (1994): The COOH-terminal ends of internal signal and signal-anchor sequences are positioned differently in the ER translocase. *J Cell Biol.* 1994 Sep;126(5):1127-32.

Nishiyama K, Mizushima S, Tokuda H (1992): The carboxyl-terminal region of SecE interacts with SecY and is functional in the reconstitution of protein translocation activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1992 Apr 5;267(10):7170-6

- Nishiyama K**, Suzuki T, Tokuda H. (1996): Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell* 85(1):71-81
- Nouwen N**, Driessen AJ (2002): SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC. *Mol Microbiol* 44(5):1397-405
- Olsen KN**, Larsen MH, Gahan CG, Kallipolitis B, Wolf XA, Rea R, Hill C, Ingmer H (2005): The Dps-like protein Fri of *Listeria monocytogenes* promotes stress tolerance and intracellular multiplication in macrophage-like cells. *Microbiology*. 2005 Mar;151(Pt 3):925-33.
- Or E**, Navon A, Rapoport T. (2002): Dissociation of the dimeric SecA ATPase during protein translocation across the bacterial membrane. *EMBO J* 21(17):4470-9
- Or E**, Boyd D, Gon S, Beckwith J, Rapoport T (2005): The bacterial ATPase SecA functions as a monomer in protein translocation. *J Biol Chem*. 2005 Mar 11; 280(10):9097-105
- Paetzel M**, Dalbey RE, Strynadka NC (2002): Crystal structure of a bacterial signal peptidase apoenzyme: implications for signal peptide binding and the Ser-Lys dyad mechanism. *J Biol Chem*. 2002 Mar 15;277(11):9512-9.
- Panek HR**, O'Brian MR (2004): KatG is the primary detoxifier of hydrogen peroxide produced by aerobic metabolism in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol*. 2004 Dec;186(23):7874-80.
- Papanikou E**, Karamanou S, Baud C, Frank M, Sianidis G, Keramisanou D, Kalodimos CG, Kuhn A, Economou A (2005): Identification of the preprotein binding domain of SecA. *J Biol Chem*. 2005 Dec 30;280(52):43209-17
- Park S**, Liu G, Topping TB, Cover HW, Randall LL (1988): Modulation of the folding pathways of exported proteins by leader sequence. *Science* 239, 1033-1035
- Pizarro-Cerda J**, Cossart P (2006): Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 2006 Feb 24;124(4):715-27.
- Plückthun A**, Knowles JR (1987): The consequences of stepwise deletions from the signal-processing site of beta-lactamase. *J Biol Chem*. 1987 Mar 25;262(9):3951-7.
- Pogliano JA**, Beckwith J (1994): SecD and SecF facilitate protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J* 13(3):554-61

Popp, F (1986): Molekularbiologische Charakterisierung des Lipasegens aus *S. hyicus*, kloniert in *S. carnosus*. Dissertation, TU München

Pulliainen AT, Kauko A, Haataja S, Papageorgiou AC, Finne J (2005): Dps/Dpr ferritin-like protein: insights into the mechanism of iron incorporation and evidence for a central role in cellular iron homeostasis in *Streptococcus suis*. *Mol Microbiol.* 2005 Aug;57(4):1086-100.

Randall LL, Topping, TB, und Hardy, SJ (1990): No specific recognition of leader peptide by SecB, a chaperone involved in protein export. *Science* 248 (4957): 860-863.

Ramamurthy V, Oliver D (1997): Topology of the integral membrane form of *Escherichia coli* SecA protein reveals multiple periplasmically exposed regions and modulation by ATP binding. *J Biol Chem* 272(37):23239-46

Rapoport TA, Jungnickel B, Kutay U (1996): Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem* 65:271-303

Raynaud C, Etienne G, Peyron P, Laneelle MA, Daffe M (1998): Extracellular enzyme activities potentially involved in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* 1998 Feb;144 (Pt 2):577-87.

Ren CP, Chaudhuri RR, Fivian A, Bailey CM, Antonio M, Barnes WM, Pallen MJ (2004): The ETT2 gene cluster, encoding a second type III secretion system from *Escherichia coli*, is present in the majority of strains but has undergone widespread mutational attrition. *J Bacteriol.* 2004 Jun;186(11):3547-60.

Robinson DA, Enright MC (2004): Evolution of *Staphylococcus aureus* by large chromosomal replacements. *J Bacteriol.* 2004 Feb;186(4):1060-4.

Rygus T, Hillen W (1991): Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. *Appl Microbiol Biotechnol* 35(5):594-9

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

Sahm H, Eggeling L, de Graaf AA (2000): Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*. *Biol Chem.* 2000 Sep-Oct;381(9-10):899-910.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839):487-91

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2nd Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.

Samuelson JC, Chen M, Jiang F, Moller I, Wiedmann M, Kuhn A, Phillips GJ, Dalbey RE (2000): YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* 406(6796):637-41

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24:104-8

Schäfer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G, Puhler A (1994): Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*. 1994 Jul 22;145(1):69-73.

Schatz PJ, Bieker KL, Ottemann KM, Silhavy TJ, Beckwith J (1991): One of three transmembrane stretches is sufficient for the functioning of the SecE protein, a membrane component of the *Escherichia coli* secretion machinery. *EMBO J.* 10(7):1749-1757

Schiebel E, Driessen AJ, Hartl FU, Wickner W (1991): Delta mu H⁺ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* 64(5):927-39

Schleifer KH, Fischer U (1982): Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *Int Syst Bacteriol* 32, 153-156.

Schlumberger MC, Hardt WD (2006): Salmonella type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Feb;9(1):46-54.

Scotti PA, Urbanus ML, Brunner J, de Gier JW, von Heijne G, van der Does C, Driessen AJ, Oudega B, Luirink J (2000): YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J* 19(4):542-9

Seifert KN, Adderson EE, Whiting AA, Bohnsack JF, Crowley PJ, Brady LJ (2006): A unique serine-rich repeat protein (Srr-2) and novel surface antigen (epsilon) associated with a virulent lineage of serotype III *Streptococcus agalactiae*. *Microbiology.* 2006 Apr;152(Pt 4):1029-40

Sharma V, Arockiasamy A, Ronning DR, Savva CG, Holzenburg A, Braunstein M, Jacobs WR, Sacchettini JC (2003): Crystal structure of Mycobacterium tuberculosis SecA, a preprotein translocating ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (5), 2243-8

Sianidis G, Karamanou S, Vrontou E, Boulias K, Repanas K, Kyrpides N, Politou AS, Economou A (2001): Cross-talk between catalytic and regulatory elements in a DEAD motor domain is essential for SecA function. *EMBO J* 20(5):961-70

Siboo IR, Chambers HF, Sullam PM (2005): Role of SraP, a Serine-Rich Surface Protein of Staphylococcus aureus, in binding to human platelets. *Infect Immun.* 2005 Apr;73(4):2273-80.

Simic P, Willuhn J, Sahm H, Eggeling L (2002): Identification of glyA (encoding serine hydroxymethyltransferase) and its use together with the exporter ThrE to increase L-threonine accumulation by Corynebacterium glutamicum. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Jul; 68(7):3321-7.

Simonen M, Palva I. (1993): Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol Rev* 57(1):109-37

Slayden RA, Barry CE 3rd (2000): The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in mycobacterium tuberculosis. *Microbes Infect.* 2000 May;2(6):659-69.

Snyders S, Ramamurthy V, Oliver D. (1997): Identification of a region of interaction between *Escherichia coli* SecA and SecY proteins. *J Biol Chem* 272(17):11302-6

Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.

Stephani K, Weichart D, Hengge R (2003): Dynamic control of Dps protein levels by ClpXP and ClpAP proteases in Escherichia coli. *Mol Microbiol.* 2003 Sep;49(6):1605-14.

Storz G, Imlay JA (1999): Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol.* 1999 Apr;2(2):188-94.

Studier FW, **Moffatt BA** (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 189(1):113-30.

Struck JC, Toschka HY, Specht T, Erdmann VA (1988): Common structural features between eukaryotic 7SL RNAs, eubacterial 4.5S RNA and scRNA and archaebacterial 7S RNA. *Nucleic Acids Res* 16(15):7740

- Summers RG**, Harris CR, Knowles JR (1989): A conservative amino acid substitution, arginine for lysine, abolishes export of a hybrid protein in *Escherichia coli*. Implications for the mechanism of protein secretion. *J Biol Chem*. 1989 Nov 25;264(33):20082-8.
- Suzuki N**, Okayama S, Nonaka H, Tsuge Y, Inui M, Yukawa H (2005): Large-scale engineering of the *Corynebacterium glutamicum* genome. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Jun;71(6):3369-72
- Suzuki N**, Okai N, Nonaka H, Tsuge Y, Inui M, Yukawa H (2006): High-throughput transposon mutagenesis of *Corynebacterium glutamicum* and construction of a single-gene disruptant mutant library. *Appl Environ Microbiol*. 2006 May;72(5):3750-5.
- Takahashi Y**, Yajima A, Cisar JO, Konishi K (2004): Functional analysis of the *Streptococcus gordonii* DL1 sialic acid-binding adhesin and its essential role in bacterial binding to platelets. *Infect Immun*. 2004 Jul;72(7):3876-82.
- Takamatsu H**, Fuma S, Nakamura K, Sadaie Y, Shinkai A, Matsuyama S, Mizushima S, Yamane K (1992): In vivo and in vitro characterization of the *secA* gene product of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 174(13):4308-16
- Takamatsu D**, Bensing BA, Sullam PM (2004a): Genes in the accessory *sec* locus of *Streptococcus gordonii* have three functionally distinct effects on the expression of the platelet-binding protein GspB. *Mol Microbiol*. 2004 Apr;52(1):189-203.
- Takamatsu D**, Bensing BA, Sullam PM (2004b): Four proteins encoded in the *gspB*-*secY2A2* operon of *Streptococcus gordonii* mediate the intracellular glycosylation of the platelet-binding protein GspB. *J Bacteriol* 2004 Nov;186(21):7100-11.
- Takamatsu D**, Bensing BA, Sullam PM (2005a): Two additional components of the accessory *sec* system mediating export of the *Streptococcus gordonii* platelet-binding protein GspB. *J Bacteriol*. 2005 Jun;187(11):3878-83.
- Takamatsu D**, Bensing BA, Cheng H, Jarvis GA, Siboo IR, Lopez JA, Griffiss JM, Sullam PM (2005b): Binding of the *Streptococcus gordonii* surface glycoproteins GspB and Hsa to specific carbohydrate structures on platelet membrane glycoprotein Ib α . *Mol Microbiol*. 2005 Oct;58(2):380-92
- Takamatsu D**, Bensing BA, Prakobphol A, Fisher SJ, Sullam PM (2006): Binding of the streptococcal surface glycoproteins GspB and Hsa to human salivary proteins. *Infect Immun*. 2006 Mar;74(3):1933-40.

- Tam PC**, Maillard AP, Chan KK, Duong F (2005): Investigating the SecY plug movement at the SecYEG translocation channel. *EMBO J.* 2005 Oct 5;24(19):3380-8.
- Tatusova TA**, Madden TL (1999): BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett.* 1999 May 15;174(2):247-50.
- Tauch A**, Kirchner O, Löffler B, Gotker S, Puhler A, Kalinowski J (2002): Efficient electrotransformation of corynebacterium diphtheriae with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Curr Microbiol* 45, 362-367.
- Taura T**, Baba T, Akiyama Y, Ito K (1993): Determinants of the quantity of the stable SecY complex in the *Escherichia coli* cell. *J Bacteriol.* 1993 Dec;175(24):7771-5
- Thomas JR**, Bolhuis A (2006): The tatC gene cluster is essential for viability in halophilic archaea. *FEMS Microbiol Lett.* 2006 Mar;256(1):44-9
- Thompson JD**, Higgins DG, Gibson TJ (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994 Nov 11;22(22):4673-80.
- Tippe, D** (2001): Untersuchungen von *in vivo* Wechselwirkungen zwischen Sekretorischen Vorläuferproteinen und Komponenten des Proteinexportapparates Gram- positiver Bakterien. Dissertation, Forschungszentrum Jülich GmbH
- Valent QA**, Scotti PA, High S, de Gier JW, 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 den Berg B**, Clemons WM Jr, Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, Rapoport TA (2004): X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*; 2004 Jan 1;427(6969):36-44.
- van Dijk JM**, de Jong A, Smith H, Bron S, Venema G (1991): Non functional expression of *Escherichia coli* signal peptidase I in *Bacillus subtilis* . *J Gen Microbiol*, 137: 2073-2083.
- van Wely KH**, Swaving J, Klein M, Freudl R, Driessen AJ (2000): The carboxyl terminus of the *Bacillus subtilis* SecA is dispensable for protein secretion and viability. *Microbiology* 146 (Pt 10):2573-81
- Vieira J**, Messing J (1982): The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19 : 259-268.

Vilcheze C, Wang F, Arai M, Hazbon MH, Colangeli R, Kremer L, Weisbrod TR, Alland D, Sacchettini JC, Jacobs WR Jr (2006): Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. *Nat Med*. 2006 Aug 13;

von Heijne G (1985): Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* 184, 99-105

von Heijne G (1986): Net N-C charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria. *J Mol Biol*. 1986 Nov 20;192(2):287-90.

von Heijne G, Abrahmsen L. (1989): Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett*. 244(2):439-46

Vrontou E, Economou A (2004): Structure and function of SecA, the preprotein translocase nanomotor. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov 11;1694(1-3):67-80

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982): Distantly related sequences in the α - and β - subunits of ATP- synthase. Myosin kinases and other ATP requiring enzymes have a common nucleotide binding fold. *EMBO* 1, 945-951

Walter P, Blobel G (1982): Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature*, 1982 Oct 21;299(5885):691-8

Wang L, Miller A, Kendall D A (2000): Signal peptide determinants of SecA binding and stimulation of ATPase activity. *J. Biol. Chem*. 275, 10154-10159

Wang L, Miller A, Rusch SL, Kendall DA (2004): Demonstration of a specific *Escherichia coli* SecY-signal peptide interaction. *Biochemistry*. 2004 Oct 19;43(41):13185-92.

Wennerhold J, Krug A, Bott M (2005): The AraC-type regulator RipA represses aconitase and other iron proteins from *Corynebacterium* under iron limitation and is itself repressed by DtxR. *J Biol Chem*. 2005 Dec 9;280(49):40500-8.

Wolfe PB, Wickner W, Goodman JM (1983): Sequence of the leader peptidase gene of *Escherichia coli* and the orientation of leader peptidase in the bacterial envelope. *J Biol Chem*. 1983 Oct 10;258(19):12073-80.

World Health Organization (2002): The world health report 2002 - Reducing Risks, Promoting Healthy Life.

Yahr TL, Wickner WT (2000): Evaluating the oligomeric state of SecYEG in preprotein translocase. *EMBO J* 19(16):4393-401

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

Yoshihisa T, Ito K (1996): Pro-OmpA derivatives with a His6 tag in their N-terminal "translocation initiation domains" are arrested by Ni²⁺ at an early post-targeting stage of translocation. *J Biol Chem.* 1996 Apr 19;271(16):9429-36.

Zanen G, Houben EN, Meima R, Tjalsma H, Jongbloed JD, Westers H, Oudega B, Luirink J, van Dijl JM, Quax WJ (2005): Signal peptide hydrophobicity is critical for early stages in protein export by *Bacillus subtilis*. *FEBS J.* 2005 Sep;272(18):4617-3

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie I des Forschungszentrums Jülich GmbH angefertigt.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Roland Freudl für die Überlassung des spannenden Themas, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen Ratschläge, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

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

Herrn Prof. Dr. Sahm danke ich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Institut für Biotechnologie I.

Bei den gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Proteinsekretion“ Astrid Bida, Gabi Decker, Henrike Brundiek, Maren Hintz, Anna Rumpf, Anna-Lena Weiss, Oliver Köberling, Peter Kreutzenbeck, Frank Lausberg, Carsten Kröger und Dr. Karl-Ludwig Schimz möchte ich mich für das sehr gute Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft bedanken. Besonderer Dank gilt Astrid Bida für Ihre tatkräftige Unterstützung und Daniel Meißner, der mir jahrelang ein sympathischer Laborkollege war.

Der AG Eggeling danke ich nicht nur für wertvolle Ratschläge bei den Arbeiten mit *C. glutamicum*, sondern auch für das angenehme Arbeitsklima im Altbau des IBT. Besonders bedanken möchte ich mich bei Eva Radmacher, Roland Gande und Nadine Tietze, mit denen ich zahlreiche anregende und unterhaltsame Flur- und Labordiskussionen geführt habe.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie I danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und für die außergewöhnlich gute Arbeitsatmosphäre im gesamten Haus.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Oma, die mich während des gesamten Studiums und besonders während der Doktorarbeit unterstützt haben.

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig ausgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Jülich, im September 2006

1. **Toxizitätsprüfungen in Zellkulturen für eine Vorhersage der akuten Toxizität (LD50) zur Einsparung von Tierversuchen**
von W. Halle (1998), 92 Seiten
ISBN: 978-3-89336-221-9
2. **Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung**
von D. Weuster-Botz (1999), II, 320 Seiten
ISBN: 978-3-89336-245-5
3. **Cell Culture Models as Alternatives to Animal Experimentation for the Testing of Neuroprotective Compounds in Stroke Research**
Practical Handbook of Methods
edited by A. J. Carter, H. Kettenmann (1999), 144 pages
ISBN: 978-3-89336-250-9
4. **Action and Visuo-Spatial Attention**
Neurobiological Bases and Disorders
Book of Abstracts
collected by P. H. Weiss (2000), XIV, 56 pages
ISBN: 978-3-89336-272-1
5. **Genomweite Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips zur Charakterisierung des Glucose-Überflussmetabolismus von *Escherichia coli***
von T. Polen (2003), 100 Seiten
ISBN: 978-3-89336-337-7
6. **Auslegung des Detektorsystems für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen mit hoher Sensitivität**
von U. Heinrichs (2003), IV, 238 Seiten
ISBN: 978-3-89336-340-7
7. **Biological Principles Applied to Technical Asymmetric Catalysis**
by A. Liese (2003), VI, 206 pages
ISBN: 978-3-89336-344-5
8. **Designstudie eines μ CT-Zusatzes für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen: Beispiel für ein multimodales bildgebendes System**
von M. Khodaverdi (2004), III, 162 Seiten
ISBN: 978-3-89336-360-5
9. **Bioprocess Development for the Generation of Monocyte-Derived Dendritic Cells: Applicability in Breast Cancer Immunotherapy**
by H.R. Bohnenkamp (2004), XLII, 128 pages
ISBN: 978-3-89336-364-3

10. **Regulation der *clp*-Genexpression durch ClgR und Definition des ClgR-Regulons aus *Corynebacterium glutamicum***
von S. Engels (2004), V, 125 Seiten
ISBN: 978-3-89336-379-7
11. **Metabolomanalyse zur Untersuchung der Dynamik im Aromatenbiosyntheseweg in L-Phenylalanin Produzenten von *Escherichia coli***
von M. Oldiges (2005), XVI, 181 Seiten
ISBN: 978-3-89336-380-3
12. **Identifizierung und Charakterisierung eines Transkriptionsregulators der Aconitase von *Corynebacterium glutamicum***
von A. Krug (2005), VI, 122 Seiten
ISBN: 978-3-89336-382-7
13. **Prozessentwicklung der elektroenzymatischen Sulfoxidation mit Chloroperoxidase**
von S. Lütz (2005), XIV, 178 Seiten
ISBN: 978-3-89336-387-2
14. **Export von Proteinen mit Zwillingsarginin-Signalsequenzen über den Tat-Weg in *Escherichia coli***
von P. J. Kreutzenbeck (2005), 118 Seiten
ISBN: 978-3-89336-388-9
15. **Untersuchungen zur Fettsäure- und Zellwandsynthese sowie zur Glutamatbildung mit *Corynebacterium glutamicum***
von E. Radmacher (2005), 130 Seiten
ISBN: 978-3-89336-389-6
16. **Monomodale und multimodale Registrierung von autoradiographischen und histologischen Bilddaten**
von A. Vieten (2005), 116 Seiten
ISBN: 978-3-89336-390-2
17. **Biosynthese von Phosphonaten: Charakterisierung des rekombinanten Enzyms Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494**
von S. Johnen (2005), 128 Seiten
ISBN: 978-3-89336-400-8
18. **Ex-vivo Generierung von neutrophilen Zellen zur Prävention und Therapie der Sepsis**
von R. Herbold (2005), 202 Seiten
ISBN: 978-3-89336-407-7

19. **Entwicklung eines Donor/Akzeptor-Konzeptes für die asymmetrische Synthese unsymmetrischer Benzoiner mit Hilfe ThDP-abhängiger Enzyme**
von P. Dünkemann (2005), 222 Seiten
ISBN: 978-3-89336-408-4

20. **Analyse der Bindungsspezifität der humanen Lck-SH3-Domäne anhand artifizierender und physiologischer Peptid-Liganden und strukturelle Charakterisierung dieser Peptide im Komplex mit SH3-Domänen**
von T. T. Tran (2005), 155 Seiten
ISBN: 978-3-89336-412-1

21. **Modeling Based Process Development of Fed-Batch Bioprocesses: L-Valine Production by *Corynebacterium glutamicum***
by M. Brik Ternbach (2005), 202 pages
ISBN: 978-3-89336-413-8

22. **Charakterisierung der Ausscheidung von L-Glutamat bei *Corynebacterium glutamicum***
von K. C. Stansen (2005), 151 Seiten
ISBN: 978-3-89336-416-9

23. **Metabolic and Bioprocess Engineering – a Fruitful Symbiosis**
by R. Takors (2005), 399 pages
ISBN: 978-3-89336-420-6

24. **Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymatischen *de novo* Synthese von GDP- β -L-Fucose und der *in situ* Fucosylierung von Oligosacchariden**
von C. Hoh (2005), 240 Seiten
ISBN: 978-3-89336-423-7

25. **Humane Primärzellen als Feederzellen für die Kokultur mit hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut**
von A. S. Magin (2006), 206 Seiten
ISBN: 978-3-89336-424-4

26. **Vergleichende Analyse der Sec- und Tat-abhängigen sekretorischen Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien als Wirtsorganismen**
von D. Meißner (2006), 140 Seiten
ISBN: 978-3-89336-427-5

27. **Energie- und Redoxstoffwechsel von *Corynebacterium glutamicum***
von A. Kabus (2006), VI, 115 Seiten
ISBN: 978-3-89336-439-8

28. **NMR-Lösungsstruktur der humanen Hck SH3-Domäne im Komplex mit einem artifizierender, hochaffinen Peptid-Liganden**
von H. Schmidt (2006), XII, 115 Seiten
ISBN: 978-3-89336-441-1

29. **Entwicklung und Untersuchung eines Verfahrens zur integrierten Aufreinigung von Plasmid DNA mittels wässriger Zweiphasenextraktion**
von A. Frerix (2006), VII, 127 Seiten
ISBN: 978-3-89336-442-8
30. **Advanced Methods in Multiplexing Multi-Pinhole Imaging**
Design and Implementation of a High-Resolution and High-Sensitivity Small-Animal SPECT Imaging System
by C. Lackas (2006), XX, 176 pages
ISBN: 978-3-89336-451-0
31. **Enantioselektive C-C Knüpfung mit Enzymen**
Charakterisierung und reaktionstechnische Bearbeitung der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I
von T. Stillger (2006), XIV, 146 Seiten
ISBN: 978-3-89336-457-2
32. **Echtzeitsystem für Phasenrücksetzanalysen und Neuro-Rückkopplungen am MEG**
von H. Rongen (2006), 176 Seiten
ISBN: 978-3-89336-461-9
33. **Analyse des Mechanismus der Phosphatregulation in *Corynebacterium glutamicum***
von U. Sorger-Herrmann (2006), 117 Seiten
ISBN: 978-3-89336-466-4
34. **Enantioselective Reduction of Hydrophobic Keto Compounds in Multiphase Bioreactor**
by M. Villela Filho (2007), XVI, 196 pages
ISBN: 978-3-89336-470-1
35. **Untersuchung der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in nicht-pathogenen Gram-positiven Bakterien**
by M. Caspers (2007), 164 Seiten
ISBN: 978-3-89336-488-6

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Band / Volume 35
ISBN 978-3-89336-488-6

Lebenswissenschaften
Life Sciences