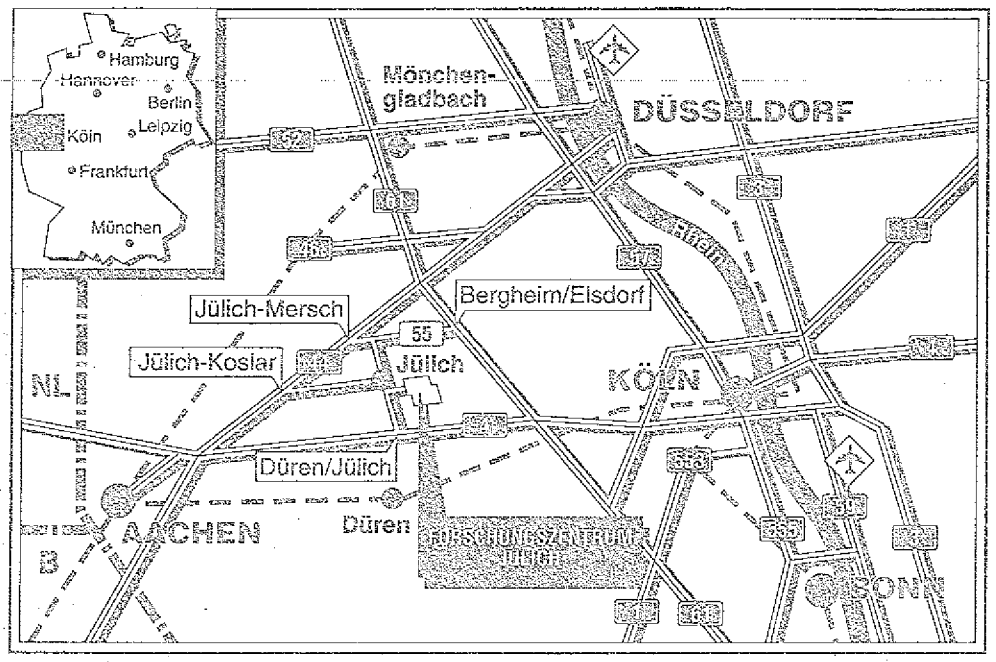
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH KFA

Institut für Biotechnologie

Isolierung zweier Komponenten des Proteintranslokations-Apparates von *Bacillus* und *Staphylococcus*

Barbara Overhoff



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2494
ISSN 0366-0885
Institut für Biotechnologie Jül-2494
D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
Postfach 1913 · D-5170 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

Isolierung zweier Komponenten des Proteintranslokations-Apparates von *Bacillus* und *Staphylococcus*

Barbara Overhoff

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1.1. Proteintransport in Gram-negativen Bakterien

Im Vergleich zu eukaryontischen Zellen, die durch ihren komplexen Aufbau über zahlreiche Kompartimente verfügen, liegt Bakterienzellen ein einfaches Bauprinzip zugrunde. Gram negative Bakterien haben zwei Membranen, die das *Cytoplasma* von seiner Umgebung abgrenzen; die *innere* und *äußere Membran* sind durch den *periplasmatischen* Raum voneinander getrennt.
Während das Cytoplasma den Ort zentraler Reaktionen wie Replikation der DNA, Proteinbiosynthese und katalytisches Zentrum anaboler und kataboler Stoffwechselreaktionen darstellt, wird durch die Zellhülle die biologische Kommunikation mit der Umgebung gewährleistet. Sie wirkt als Permeabilitätsschranke, die die Molekül- und Ionenzusammensetzung der Zelle reguliert, sowie die Information äußerer Reize in das Zellinnere weiterleiten kann. An diesen Reaktionen sind zahlreiche Proteine beteiligt, die im Cytoplasma synthetisiert und zu ihrem Wirkort, der inneren oder äußeren Membran, dem Periplasma oder dem umgebenden Medium transportiert werden müssen. Die dabei zu überwindeden hydrophoben Barrieren deuten auf einen komplexen Mechanismus der Translokation hin.
Proteine, die an das Außenmedium abgegeben werden, verfügen häufig über ein für das jeweilige Protein spezifisches Exportsystem (*Haemolysin*, Mackman et al.,1986; *Pullulanase*, Reyss und Pugsley,1990) oder tragen die für den Export notwendigen Komponenten in Form einer C-terminalen Helferdomäne im Protein selber (*IgA Protease*, Pohlner et al.,1987).
Die meisten Proteine der inneren und äußeren Membran, sowie periplasmatische Proteine werden über einen gemeinsamen, sogenannten *sec*-abhängigen Weg transportiert. Dieser Mechanismus wurde bei dem Gram negativen Bakterium *Escherichia coli* gut untersucht (Bieker et al.,1990).
Sekretorische Proteine zeichnen sich durch das Vorhandensein einer Signalsequenz aus. Obwohl bei der Vielzahl bekannter Signalsequenzen keine Homologien in der Primärstruktur festgestellt werden konnten, liegt ihnen doch ein gemeinsames Bauprinzip zugrunde: ein bis mehrere positiv geladene Aminosäuren am N-Terminus werden von einem bis zu 12 Aminosäuren langen Bereich mit hydrophoben Eigenschaften gefolgt, der eine membrandurchspannende Region darstellt (von Heijne und Abrahmsen,1989). Im Laufe des Transports periplasmatischer und äußerer Membranproteine durch die Cytoplasmamembran wird diese Signalsequenz durch die *Signalpeptidase* abgespalten; diese erkennt den Bereich zwischen dem hydrophoben Teil und dem N-Terminus des reifen Proteins, der sich in der Regel durch die Aminosäure-

sequenz Ala-X-Ala auszeichnet (von Heijne,1986).

1.2. Experimentelle Ansätze zur Identifizierung der Exportkomponenten

Die am Export beteiligten zellulären Komponenten wurden hauptsächlich über zwei Versuchsansätze identifiziert (Bieker et al.,1990):

1. Durch Expression eines Fusionsproteins konnten konditional lethale Mutanten isoliert werden, die einen pleiotropen Defekt im Proteinexport aufwiesen. Das Fusionsprotein, das sich aus dem N-Terminus eines exportierbaren Proteins (wie *LamB*, *MalE*) und einem cytoplasmatisch lokalisierten Protein (β-*Galaktosidase*) zusammensetzt, kann unter den gewählten Bedingungen nicht exportiert werden. Der in der Literatur als 'jamming' bezeichnete Effekt beschreibt die durch die starke Expression der Fusion hervorgerufene Blockierung der Exportstellen in der Membran, die für die Zellen lethal ist. Klone, die unter diesen Selektionsbedingungen überleben können, tragen eine Mutation in einer der an der Wechselwirkung mit dem Fusionsprotein beteiligten Komponenten. Die über diesen Ansatz identifizierten Gene werden mit *sec* für 'secretion' abgekürzt. Der pleiotrope Defekt im Proteinexport verdeutlicht sich durch die Akkumulation verschiedener Exportproteine (Bieker et al.,1990).

2. Die Translokation sekretorischer Proteine kann durch Mutationen in der Signalsequenz verhindert werden. Hierbei handelt es sich um Veränderungen im hydrophoben Bereich des Signalsequenz, auch kann der Austausch einer positiv geladenen gegen eine negativ geladene Aminosäure am N-Terminus den Exportdefekt verursachen. Zu diesen Mutationen wurden Suppressormutanten isoliert, die ein Protein mit einer veränderten Signalsequenz wieder exportieren können. Über den beschriebenen Ansatz konnten Komponenten identifiziert werden, die während der Translokation eines sekretorischen Proteins eine Wechselwirkung mit der Signalsequenz eingehen. Diese dominanten Suppressoren von Signalsequenz-mutationen werden mit *prl* für '*pr*otein *l*ocalization' gekennzeichnet (Bieker et al,1990).

Weitere Komponenten konnten als Mutationen mit regulatorischem Effekt auf die Expression von *secA* isoliert, sowie biochemisch als stimulierende Komponenten auf den Proteintransport in vitro charakterisierte werden (Oliver et al.,1990).

1.3. Komponenten des Proteinexport-Apparates von *E.coli*

Zahlreiche Faktoren des Proteinexport-Apparates sind genetisch und biochemisch gut untersucht:

secA (prID): Mutationen im *secA* Gen wurden mit Hilfe einer *MalE-LacZ* Fusion von Oliver und Beckwith (1981), sowie als Suppressoren von *MalE*-Signalsequenzmutationen isoliert (Fikes und Bassford,1989).

Das *SecA* Protein ist ein 102 kDa großes, membranassoziiertes Protein mit *ATPase* Aktivität. Diese auch als *Translokations ATPase* bezeichnete Aktivität wird durch Inkubation mit Vesikeln der inneren Membran, sowie durch ein translokationskompetentes Exportprotein stimuliert (Lill et al.,1989). Biochemisch konnte gezeigt werden, daß das *SecA* Protein hierbei mit dem *SecY* Protein der Plasmamembran, dem *SecB* Protein (einem cytoplasmatischen Chaperon), sowie mit der Signalsequenz und dem reifen Teil des zu exportierenden Proteins wechselwirkt (Cunningham und Wickner,1989; Lill et al.,1990; Hartl et al.,1990).

Als einziges der bisher identifizierten Gene des Proteinexport-Apparates ist die Expression des *secA* Gens reguliert, sie reagiert auf die Änderung der Exportfähigkeit einer Zelle. Die *SecA* Synthese ist abhängig von der Translation des im *secA* Operon stromaufwärts lokalisierten *Gens X* (Schmidt et al.,1988) und wird durch Defekte im Proteinexport erhöht. So führen Inkubation eines *secA* (ts) Stamms bei der nicht-permissiven Temperatur, Mutationen in den Genen *secD*, *secE*, *secY* oder Expression von lethalen Fusionsproteinen zu einer ca. 10fach erhöhten *SecA* Konzentration (Gardel et al.,1987; Rollo und Oliver,1988; Bieker et al.,1990). Schmidt und Oliver (1989) konnten einen autoregulatorischen Mechanismus der *SecA* Expression auf der Ebene der Translation nachweisen, das *SecA* Protein reprimiert seine eigene Synthese.

secY (prIA): Die Isolierung von Suppressormutanten zu Mutationen in der Signalsequenz des *LamB* Proteins deuteten auf eine Wechselwirkung des *SecY* Proteins mit der Signalsequenz von Exportproteinen hin (Emr et al.,1981). Eine entsprechende konditional-lethale Mutante im gleichen Gen wurde durch lokalisierte Mutagenese der chromosomalen Region um das *prIA* Gen erhalten (Ito et al., 1983).

SecY ist zusammen mit Genen ribosomaler Proteine im sogenannten *spc* Operon organisiert und kodiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 49000 (Cerretti et al.,1983). Als integrales Membranprotein mit 10 membranspannenden Segmenten (Akiyama und Ito, 1987) stellt das *SecY* im Komplex mit dem *SecE* Protein und einem bisher nicht identifizierten "*Bande I*" Protein

den membranlokalisierten Anteil des sogenannten *Translokators* dar (Brundage et al.,1990).
Durch Sequenzierung zweier sehr effektiver Signalsequenz-Suppressoren (*prlA4* und *prlA410*) konnten die Mutationen in den Transmembransegmenten 7 und 10 lokalisiert werde. Dies könnte bedeuten, daß die Signalsequenz erst nach der Insertion in die Membran von *SecY* erkannt wird (Bieker et al,1990).

secB: Im Gegensatz zu allen anderen *sec* Mutanten führt die Inaktivierung des *secB* Gens durch Transposonmutagenese nicht zum Verlust der Zellebensfähigkeit (Kumamoto und Beckwith,1985). *SecB* ist nur für den Export bestimmter Proteine notwendig, auch kann die Abhängigkeit von *SecB* durch Inkubation bei einer höheren Temperatur abgeschwächt werden. Möglicherweise übernehmen unter diesen Bedingungen die Hitzeschockproteine *GroEL* und *DnaK* die Funktion von *SecB* (Altman et al.,1991).
Das ca. 460Bp große *secB* Gen kodiert für ein Protein von 16kDa, welches als Tetramer im Cytoplasma vorkommt (Kumamoto und Nault,1989; Watanabe und Blobel, 1989). *SecB* wirkt im Proteinexport als Chaperon, das durch Bindung das Vorläuferprotein in einer exportkompetenten Konformation hält, hierbei werden neben dem reifen Teil des Proteins auch Strukturen in der Signalsequenz erkannt (Collier et al.,1988; Gannon et al.,1989, Altman et al., 1990). Die *SecB* Assoziation verhindert so die Aggregation der Vorläuferproteine, sowie deren unspezifische Bindung an exportinaktive Stellen der Cytoplasmamembran. Die hohe Affinität des *SecB* Proteins zum *SecA*, der peripheren Komponente des *Translokators*, läßt auf eine weitere Funktion schließen. *SecB* vermittelt die spezifische Bindung des Vorläuferproteins an die Exportstellen der Cytoplasmamembran (Hartl et al.,1990).
Genetisch und biochemisch konnte bisher neben der *SecB*-Abhängigkeit für den cotranslationalen Transport des *Maltose Bindeproteins* eine Bindungsaffinität zu den Vorläufermolekülen *praeLamB*, *praeOmpA*, *praeOmpF*, *praePhoE* gezeigt werden (Kumamoto und Beckwith,1985; Kumamoto und Gannon,1988; Kumamoto,1989; Kusters et al.,1989). Bindung von *SecB* an die prozessierte Form der Proteine, sowie das cytoplasmatische Enzym β-*Galaktosidase* konnte nicht dargestellt werden (Kumamoto, 1989). Auch konnte eine Abhängigkeit des *Ribose-Bindeprotein* und des β-*Laktamase* Transports von *SecB* nicht nachgewiesen werden (Collier et al.,1990; Laminet et al.,1991).

secE (prlG): Das *secE* Gen ist zusammen mit dem *nusG* Gen in einem Operon organisiert und kodiert für ein ca 14kDa großes Membranprotein mit drei

membrandurchspannenden Segmenten (Schatz et al.,1989; Downing et al.,1990). Kältesensitive Mutanten im *secE* Gen wurden durch Selektion auf erhöhte Expression einer *SecA*-β-*Galaktosidase* Fusion identifiziert (Riggs et al.,1988). Die Isolierung eines Signalsequenzsuppressors (*prlG*) zu Mutationen im *LamB* und *MalE* Protein deutet auf eine Wechselwirkung des *SecE* Proteins mit dem Vorläuferprotein während des Exports hin (Stader et al.,1989).
SecE liegt im Komplex mit dem *SecY* und *Bande 1* Protein als Membranbestandteil des *Translokators* vor. Genetische Untersuchungen von Bieker und Silhavy (1990) deuten auf eine sequentielle Wirkungsweise der Komponenten hin, *bei der SecE* vor dem *SecY* Protein mit der Signalsequenz in Wechselwirkung zu treten scheint.

secD, secF: Durch die Expression lethaler Fusionsproteine konnte die kältesensitive *secD* Mutation isoliert werden, die einen pleiotropen Effekt auf den Proteinexport ausübt. Das Gen *secD* ist zusammen mit dem *secF*, das für einen weiteren essentiellen Faktor des Proteintransports kodiert, in einem Operon von insgesamt 7 Genen organisiert. Beide Proteine sind in der Cytoplasmamembran verankert und tragen eine große periplasmatische Domäne. Diese Beobachtung und die Tatsache, daß die beschriebenen Gene nicht als Signalsequenzsuppressoren isoliert wurden, läßt eine späte Wirkungsweise im Proteintransport vermuten (Gardel et al.,1990).

Signalpeptidase: Durch Überproduktion und Selektion auf erhöhte Prozessierungskinetik des M13 'Coat'-Proteins konnte das *lep* Gen, welches für die *Signalpeptidase* aus *E.coli* kodiert, isoliert werden (Date und Wickner, 1981). Das 37kDa große Protein ist mit zwei membrandurchspannenden Segmenten in der Cytoplasmamembran verankert (Date,1983). Das aktive Zentrum des Enzyms ist ins Periplasma gerichtet, während der Translokation wird hinter der konservierten Erkennungssequenz das Signalpeptid vom reifen Teil eines Proteins abgespalten (Wolfe et al,1983). Die Erkennungssequenz der *Signalpeptidase* kann für zahlreiche Vorläuferproteine mit Ala-X-Ala angegeben werden (von Heijne, 1986).

Die Hitzeschockproteine ***GroEL*** und ***DnaK*** wirken wie das *SecB* Protein als Chaperon, sie binden an Vorläufer exportierbarer Proteine und erhalten diese in einer exportkompetenten Konformation (Lecker et al.,1989; Laminet et al.,1990). Durch Überexpression dieser Hitzeschockproteine kann der durch Mutation eines *sec* Gens oder Expression eines lethalen Fusions-

proteins hervorgerufene Exportdefekt einer Zelle kompensiert werden, so daß ein Überleben bei nicht-permissiver Bedingung ermöglicht wird (van Dyk et al.,1989; Phillips und Silhavy,1990).

Aus *E.coli* wurde ein Protein *P48* (*ffh*) isoliert, welches starke Homologie zu dem eukaryontischen Protein *SRP54* des '*Signal Recognition Particle*' (*SRP*), einer essentiellen Komponente des eukaryontischen Proteinexport-Apparates, zeigt (Römisch et al.,1989; Bernstein et al.,1989). Dieses Protein ist assoziiert mit einer *4,5S RNA* (*ffs*), die ihrerseits wiederum Homologie zur *SRP7S* RNA des *SRP*-Partikels besitzt. Mutanten im *ffs* Gen zeichnen sich durch Akkumulation des Vorläuferproteins *prae-β-Laktamase*, nicht aber des *prae-Maltose Bindeproteins* aus. Diese lethale Mutation kann durch Expression der eukaryontischen *SRP7S* RNA supprimiert werden. Die *4,5S* RNA aus *E.coli* bindet in vitro an das eukaryontische *SRP54*-Protein und kann somit die *SRP7S*-RNA teilweise funktionell ersetzen (Ribes et al.,1990; Poritz et al.,1990). Das Protein *P48* und die *4,5S* RNA von *E.coli* sind Komponenten eines Ribonukleopartikels, welcher möglicherweise *SRP*-ähnliche Funktion im Proteintransport übernimmt.

Von den temperatursensitiven Mutationen im *secA* und *secY* Gen wurden zahlreiche Suppressormutanten isoliert, die ein eingeschränktes Wachstum unter nicht-permissiven Bedingungen ermöglichen (*secC*, Ferro-Novick et al.,1984; *ssa*, Oliver,1985; *ssy*, Shiba et al.,1986a). Hierbei handelt es sich in der Regel um Gene, die im Zusammenhang mit der Proteinbiosynthese stehen. Durch diese Suppressormutationen wird die Biosyntheserate reduziert, so daß die verminderte Akkumulation von Vorläuferproteinen ein langsames Zellwachstum unter nicht-permissiven Bedingungen ermöglicht. Der gleiche Effekt kann auch durch Inkubation in Gegenwart einer sublethalen Dosis des Proteinbiosyntheseinhibitors Chloramphenikol erreicht werden (Lee und Beckwith,1986; Ueguchi und Ito,1990). Obwohl diese Gene wahrscheinlich nicht für essentielle Komponenten des Proteinexport-Apparates kodieren, spiegeln sie doch die enge Kopplung zwischen Translation und Proteintransport wider.

Driessen und Wickner (1990) konnten in vitro ein definiertes ATP-abhängiges Proteintranslokations-System rekonstituieren. Dieses System bestand aus künstlichen Vesikeln, in deren Membran das *SecY* Protein eingebaut war, *SecA* und translokationskompetentem *praeOmpA*. Unter Energieverbrauch wurde das Protein *praeOmpA* in die Vesikel transloziert. Da für diese Reaktion relativ große Mengen von ATP benötigt wurden, ist die Beteiligung weiterer Komponenten, welche die Kinetik des Transports verbessern, wahrscheinlich.

Zahlreiche cytoplasmatische Faktoren, denen neben dem *SecB* Protein

Chaperon-Funktion zugeschrieben wird, könnten in dieser Weise wirksam sein (*GroEL*, *DnaK* oder *Ribonukleopartikel*). Hierbei scheint jedoch das *SecB* eine zentrale Rolle im Proteintransport zu spielen, da nur dieses eine Wechselwirkung mit *SecA* eingeht (Brundage et al.,1990).
Trotz der Vielzahl der isolierten Faktoren könnten weitere, bisher unbekannte Komponenten existieren, die eine zusätzliche Funktion beim Transport von Proteinen übernehmen. Wie schon für Eukaryonten gezeigt wurde (Savitz und Meyer,1990), könnte auch im prokaryontischen System ein Ribosomenrezeptor in der Cytoplasmamembran existieren, der beim cotranslationalen Transport von Proteinen die Bindung der Ribosomen an die Membran vermittelt.

1.4. Modell für den Export des *Maltose Bindeproteins* ins Periplasma

Die bisher erzielten Ergebnisse werden in Abbildung 1 am Beispiel des cotranslationalen Transports des *Maltose Bindeproteins* als sequentielles Modell dargestellt:

Während der Synthese des sekretorischen Proteins am Ribosom bindet das *SecB* Protein an das Vorläufermolekül, um so seine exportkompetente Konformation aufrecht zu erhalten. Hierbei erkennt das Chaperon Strukturen in der Signalsequenz und dem reifen Teil des Vorläuferproteins [1] (Altman et al.,1990; Hartl et al.,1990). Nachdem ca. 80% des Proteins synthetisiert sind, kann das *SecB* auf Grund seiner hohen Affinität zum membranassoziierten *SecA* eine produktive Bindung des Komplexes an den *Proteintranslokator* vermitteln. Das *SecA* Protein, das an das *SecY* gebunden ist, erkennt hierbei neben *SecB* sowohl die Signalsequenz, als auch den reifen Teil des *Maltose Bindeproteins* [2] (Hartl et al.,1990). Daß auch *SecY* und *SecE* an der Erkennung der Signalsequenz beteiligt sind, wurde durch die Isolierung von Signalsequenz-Suppressormutationen in diesen Genen belegt (*prlA* und *prlG*; Bieker et al.,1990). Während die Assoziation des *SecB*-Praeprotein Komplexes an den *Translokator* energieunabhängig geschieht, ist die eigentliche Translokation abhängig von ATP und dem elektrochemisches Potential (Yamane et al.,1987; Swidersky et al.,1990). Die im *SecA* Protein lokalisierte *ATPase*-Aktivität wird durch Bindung eines exportkompetenten Vorläuferproteins, *SecY* und saurer Phosholipide stimuliert [3] (Lill et al.,1990; Brundage et al.,1990). Ob, wie von Geller (1990) vorgeschlagen, die ATP-Hydrolyse für die Insertion der Signalsequenz in die Membran und das elektrochemische Potential für die eigentliche Translokation durch die Membran benötigt werden, ist zur Zeit nicht geklärt.
Während der Translokation erfolgt die Abspaltung der Signalsequenz durch

die *Signalpeptidase*, deren aktives Zentrum im Periplasma lokalisiert ist. Das *Maltose Bindeprotein* nimmt seine endgültige Faltung ein und wird ins Periplasma freigesetzt [4].

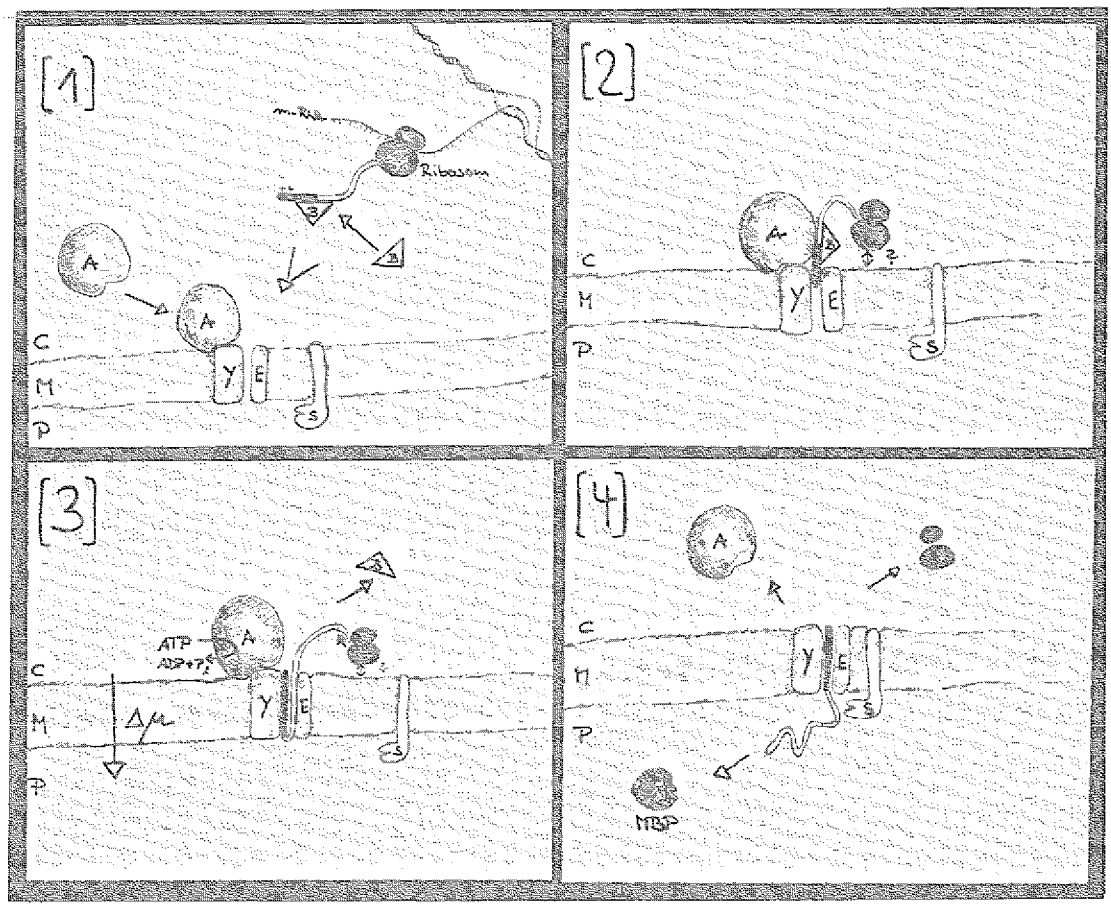


Abb.1 Modell für den cotranslationalen Proteintransport des *Maltose-Bindeproteins* (*MBP*) ins Periplasma von *E.coli*; A *SecA*; B *SecB*; E *SecE*; Y *SecY*; S *Signalpeptidase*; C Cytoplasma; M Cytoplasmamembran; P Periplasma.

1.5. Proteintransport in Gram-positiven Bakterien

Gram-positive Bakterien der Gattung *Bacillus* verfügen über die Fähigkeit Exoproteine in großen Mengen zu bilden und auszuschleusen (bis zu 12 g/l Harwood,1989). Diese Fähigkeit mag im unterschiedlichen Aufbau der Zellwand begründet sein. Während zum Export eines Proteins in das Außenmedium eines Gram-negativen Bakteriums zwei Membranen überwunden werden müssen, stellt in Gram-positiven Bakterien die Cytoplasmamembran die einzige hydrophobe Barriere für die Ausschleusung eines Proteins dar.

Über den Proteintransport in Gram-positiven Bakterien ist nur wenig bekannt. Zahlreiche durch Selektion auf verminderten Proteinexport isolierte Gene regulieren auf Ebene der Transkription und Translation die

Synthese der Exoenzyme (*sac* und *prs* Gene aus *B.subtilis*; Kontinen et al.,1988; Henner et al.,1988; bzw. *agr* und *exp* für *Staphylococcus aureus*; Rescei at al.,1986; Morfeld et al.,1988). Trotz der unterschiedlichen morphologischen Strukturen gibt es jedoch Hinweise auf die Existenz eines vergleichbaren Exportapparates in Gram-positiven und -negativen Bakterien.

Für den Export bestimmte Proteine tragen wie die der Gram-negativen Bakterien eine Signalsequenz, die im Laufe des Transports abgespalten wird. Die in der Regel längere Signalsequenz beginnt an ihrem N-Terminus mit zwei bis fünf positiven Ladungen, gefolgt von einer hydrophoben Region aus 15 und mehr Aminosäuren (von Heijne und Abrahmsen,1989). Wie auch bei *E.coli* befindet sich zwischen der Signalsequenz und dem reifen Teil in der Regel die Aminosäurefolge Ala-X-Ala, die die Konsensussequenz für die *Signalpeptidase* in Gram-negativen Bakterien darstellt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß sekretorische Proteine aus Gram-positiven Bakterien in *E.coli* unter korrekter Prozessierung ins Periplasma ausgeschleust werden (Iino und Sako,1988; Harwood, 1989). In vitro wurde auch für *B.subtilis* eine *Signalpeptidase*-Aktivität nachgewiesen, welche die gleiche Spezifität wie das aus *E.coli* isolierte Enzym aufweist (Wong und Doi,1986).

Sequenzierung des *spc* Operons und Verwendung des *secY* Gens aus *E.coli* als Sonde führten zur Identifizierung eines Gens, das zum *secY* von *E.coli* starke Homologie aufweist (Suh et al.,1990; Nakamura et al.,1990a). Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt 41,3% Homologie zum *SecY* Protein, wobei die Übereinstimmung der Aminosäuren in den cytoplasmatischen Domänen bis zu 80% beträgt. Expression des *SecY*-homologen Proteins aus *B.subtilis* in einer temperatursensitiven *secY* Mutante von *E.coli* führt nicht zur Komplementation des Wachstumsdefekts, vermittelt aber eine deutliche Beschleunigung des Proteinexports (Nakamura et al.,1990b).

1.6. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung einer am Proteinexport beteiligten Komponente aus den Gram-positiven Bakterien *Staphylococcus carnosus* und *Bacillus subtilis*. Dies sollte über zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze erfolgen:

a) über heterologe Komplementation der im Proteinexport defekten Mutante MM52 (*secA* Ts) von *E.coli*;
b) über DNA-DNA Hybridisierung mit dem *secA* Gen aus *E.coli* als Sonde.

Die isolierten Gene sollten charakterisiert und ihre Wirkungsweise in *E.coli* untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 1 und 2 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Zitat
Gram positive Bakterien		
Bacillus subtilis		Kawamura und Doi, 1984
DB104	*his nprR2 nprE18 _aprA3*	
Staphylococcus carnosus		Schleifer und Fischer, 1982
TM300	Wildtyp	
Gram negative Bakterien: Escherichia coli-Stämme		
JM109	*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi _(lac proAB)* F'*[traD36 proAB*$^+$ *lacI*^{q} *lacZ _M15]*	Yanish-Perron, 1985
Sure^{TM}	*recB recJ sbcC201 uvrC umuC::*Tn5 *(kan*^{R}*) mcrA mcrB mrr lac _(hsdRMS) endA1 gyrA96 thi relA1 supE44* F *[proAB lacI*^{q} *Z M15* Tn10]	Greener, 1990
Y1090	*supF araD139 strA proA*$^+$ *_(lon) _lacU169 [trpC22::*Tn*]* (pMC9)	Huynh et al., 1985
ED8654	*supE supF hsdR metB lacY gal trpR*	Murray et al., 1977
MC4100	*araD39 _(argF-lac) U169 relA51 rpsL150 flbB5301 deoC1 ptsF25*	Shultz et al., 1982
MM52	MC4100 *secA51* [Ts]	Oliver und Beckwith, 1981
BA13	MC4100 *secA13*[Am] *supF*[Ts] *trp*[Am] *zch*::Tn10	Cabelli et al., 1988
IQ85	MC4100 *secY24*[Ts] *zhc::*Tn10	Shiba et al.,1984
IT41	W3110 *sup*^{0} *lep9* [Am,Ts] mini Tn10 nahe *lep*	Inada et al., 1989
CK1953	MC4100 *secB*::Tn5	Kumamoto und Beckwith, 1985
MM180 =PR520	MC4100 *secE*[Cs]*E501 arg::*Tn10	Riggs et al., 1988
NP315	K10 *fda-* [Ts]	Schreyer und Böck, 1973
T850	*tonA2? proA44 lacY1 supE44? gal-6 _ hisG1 rpsL9 malA1 (*^{R}*) xyl-7 mtl-2 argH1 thi-1 mop-1 (=groE)*	Takano und Kakefuda, 1972
MF746	*thr-1 dnaK756* (Ts) *tonA21 lacY1 supE44 _ rfbD1*	Yochem et al., 1978

Tabelle 2: Plasmide

Plasmid	genetische Marker	Zitat
pUC18, pUC19	*Amp*^{R} *lacZ'*	Vieira und Messing, 1982
pHC79	*Amp*^{R} *Tet*^{R} *Cos*-Region vom Phagen Lambda	Hohn und Collins, 1980
pKK223-3	*Amp*^{R} *tac*-Promotor *rrn*-Terminator	Brosius und Holy, 1984
pMF8	pBR325 Derivat: *Amp*R *secA*	Schmidt und Oliver, 1989
pOF39	pBR325 Derivat: *Amp*^{R} *groELES*	Fayet et al., 1986

2.2. Medien und Kultivierungsbedingungen

Die Gram-positiven Bakterienstämme *B.subtilis* und *S.carnosus* wurden in Vollmedium (LB) kultiviert, die Anzucht von *E.coli* Stämmen erfolgte je nach Angabe in Vollmedium (LB) oder Minimalmedium (M9).

Vollmedium (nach Miller,1972)

LB-Medium (Angaben pro l): 10g Bacto-Tryptone
5g Hefe Extrakt
5g NaCl

Minimalmedium (variiert nach Miller, 1972)

Minimalmedium M9 (Angaben pro l): 7g KH_2PO_4
3g K_2HPO_4
1g NH_4SO_4
pH Wert von 6.5 einstellen

Nach dem Autoklavieren wurden folgende Lösungen zugesetzt:

1 ml 1M $MgSO_4$
1 ml Thiamin (50mg/ml)
0.4% C-Quelle
1 ml 10x Salz Lösung bestehend aus (Angaben pro l):
60g Na_2HPO_4
30g KH_2PO_4
5g NaCl
10g NH_4Cl
pH Wert 7.3 einstellen

Für die Kultivierung auf Platten wurden den Medien 15g/l Agar zugesetzt. LB-Weich-Agar enthielt eine Konzentration von 7,5g/l.

Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen zugesetzt: Ampizillin 50µg/ml, Tetrazyklin 12,5µg/ml und Kanamyzin 50µg/ml.
Die Gram-positiven Bakterienstämme sowie die Wildtypstämme von *E.coli* wurden bei 37°C kultiviert, während die Anzucht der *E.coli* Stämme mit temperatursensitiven Eigenschaften bei der permissiven Temperatur 30°C erfolgte.

2.3. Allgemeine genetische und rekombinante DNA Techniken wie Spaltung mit Restriktionsenzymen, *Klenow* Reaktion, DNA Fällung, Ligation und Transformation wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

2.4. Präparation von Plasmid DNA
Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte aus 2,5ml Übernacht-Kulturen (Minipräparation) bzw. im größeren Maßstab (Midipräparation) aus 50ml Kulturen von *E.coli*.

Folgende Lösungen wurden benötigt:

Lösung A: 50mM Glukose, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA
Lösung B: 0,2N NaOH, 1% SDS
Lösung C: 3M Kaliumacetat pH 4.8
Phenol-Chloroform: neutralisiertes Phenol und Chloroform im gleichen Verhältnis gemischt
TE-Puffer: 10mM Tris, 1mM EDTA; pH 7.8

'*Mini*'*präparation*: Plasmid-DNA wurde aus 2,5 ml Übernacht-Kultur nach der Methode der alkalischen Lyse (Sambrook et al.,1989) gewonnen.

'*Midipräparation*': Mit einer nach Birnboim und Doly (1979) modifiziert Methode wurde aus einer 50ml Kultur Plasmid DNA wie folgt isoliert:

* Nach Zentrifugation der Kultur wurde der Zellniederschlag in 5ml Lösung A aufgenommen und 10 Minuten auf Eis gegeben;
* nach Zugabe von 10 ml Lösung B erneut 10 Minuten auf Eis inkubieren;
* nach Zugabe von 7,5 ml Lösung C weitere 10 Minuten auf Eis inkubieren;
* der Ansatz wurde 15 Minuten in der Minifuge RF bei 5000rpm zentrifugiert; die DNA wurde aus dem Überstand mit 15 ml Isopropanol gefällt und 15 Minuten zentrifugieren;
* der Niederschlag wurde in 2 ml H_2O gelöst, nach Zugabe von 2ml kaltem 5M $LiCl_2$ (in 50mM Tris-HCl pH 8.0) wurde der Ansatz 15 Minuten auf Eis gestellt und 15 Minuten zentrifugiert;

* die Fällung der DNA aus dem Überstand erfolgte durch Zugabe von 10ml Ethanol und 30 minütiger Inkubation bei -20°C, der Ansatz wurde anschließend 15 Minuten zentrifugiert;
* der DNA Niederschlag wurde in 400µl TE Puffer aufgenommen, und in Gegenwart von 5µl RNase (10mg/ml) 30 Minuten bei 37°C inkubiert;
* die Proteine wurden durch je eine Phenol/Chloroform und Chloroform-Extraktion entfernt;
* durch Zugabe von 1/10 Volumen Lösung C und 2 Volumen Ethanol wurde die Plamid DNA gefällt, der Ansatz zentrifugiert und der DNA Niederschlag mit 70% Ethanol gewaschen;
* die getrocknete Plasmid DNA wurde in 100µl TE Puffer aufgenommen und die Konzentration der DNA wurde über Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

Puffer für Agarosegelelektrophorese:

10x TAE-Puffer (Angaben pro l): 49g Tris, 11.4ml Essigsäure, 20ml 0,5M EDTA pH 8.0
6x DNA-Probenpuffer: 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 15 % Ficoll in H_2O

1µl Plasmid-DNA wurden mit 10µl 1xTAE-Puffer und 2µl 6xDNA-Probenpuffer versetzt, der Ansatz auf ein 0,8% Agarosegel gegeben und die DNA durch Elektrophorese getrennt. Das Gel wurde nach dem Lauf mit Ethidiumbromid angefärbt und die DNA unter UV Licht sichtbar gemacht.

Zur Sequenzierung war Plasmid DNA aus einer Midipräparation geeignet. Plasmid DNA aus einer Minipräparation konnte nach der Vorschrift von Sambrook et al. (1989) durch Lithiumchlorid von RNA gereinigt und so ebenfalls für die Sequenzreaktion eingesetzt werden.

2.5. Erstellung einer Cosmidgenbank von *Staphylococcus carnosus*

Chromosomale DNA von *Staphylococcus carnosus* TM300 wurde nach der Vorschrift von Rescei et al. (1987) präpariert, partiell mit dem Restriktionsenzym *Sau*3A gespalten und mit dem mit *Bam*HI linearisierten Vektor pHC79 ligiert. Die Verpackung in Lambda Phagenköpfe, sowie die Transfektion und Vermehrung im *E.coli* Stamm ED8654 erfolgte nach dem Protokoll zum 'DNA Packaging-Kit' der Firma Boehringer, Mannheim. Die durchschnittliche Größe der inserierten DNA Fragmente lag bei 26 kB, die Cosmide wurden aus 1500 rekombinanten Klonen präpariert. Nach der statistischen Berechnung von Silhavy et al. (1984; unter der Annahme, das Genom von TM300 umfasse

5000kB) ist somit das Genom von *S.carnosus* TM300 zu 99,99% in der Genbank repräsentiert .

2.6. Herstellung von Deletionsklonen zur Sequenzierung

Die zur Sequenzierung benötigten Klone wurden nach dem Protokoll des 'Erase a base'-Kits der Firma Promega (Madison, USA) hergestellt.

Folgende Lösungen wurden nach diesem Protokoll benötigt:

10x ExonukleaseIII Puffer: 660mM Tris-HCl, pH 8.0; 6,6mM $MgCl_2$
7,4xS_1-Puffer: 0,3M KAc, pH4.6; 2,5M NaCl, 10mM $ZnSO_4$, 50 % Glycerin
S_1-Nuklease Mix: 172µl H_2O, 27µl 7,4x S_1 Puffer, 60U *S_1 Nuklease*
S_1 Nuklease Stop Puffer: 0,3M Tris, 0,05M EDTA
Klenow Puffer: 20mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM $MgCl_2$
Klenow Mix: 30µl Klenow Puffer, 3-5U Klenow DNA Polymerase
dNTP: 0,125mM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP
10x Ligase Puffer: 500mM Tris-HCl pH 7.6, 100mM $MgCl_2$, 10mM ATP

Folgendes Protokoll ist für Einführung von Deletionen in ein 6,5 kB DNA Fragment geeignet:

* 5µg Plasmid DNA wurden mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen, die jeweils ein 3' überhängendes Ende und ein 5'-überhängendes oder stumpfes Ende bilden, gespalten. Während das 3'-überhängende Ende vor dem Abbau durch *Exonuclease*III geschützt ist, wird das 5'überhängende bzw. stumpfe Ende durch die 3'-> 5' gerichtete *Exonuklease* Aktivität angegriffen;
* nach Reinigung und Fällung der mit zwei Enzymen restringierten DNA wurde der Niederschlag in 60µl ExoIII-Puffer gelöst und auf die Reaktionstemperatur von 37°C erwärmt;
* nach Zugabe von 250-500 Units *Exonuklease*III wurde in 30 Sekunden Intervallen je 2,5µl Probe entnommen und die Reaktion im *S_1-Nuklease* Mix bei 4°C gestoppt;
* nach erfolgter Probennahme wurden die Eppendorfgefäße 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so daß die *S_1-Nuklease* wirksam werden konnte;
* nach Zugabe von 1µl S_1 Stop Puffer wurden die Enzyme durch 10 minütiges Erwärmen auf 70°C inaktiviert;
* zur Auffüllung der 3'überhängenden Enden wurden jedem Ansatz 1µl *Klenow* Mix sowie 1µl dNTP-Mix zugesetzt und weitere 5 Minuten bei 37°C inkubiert;

* das Ausmaß der Deletion wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft;
* die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C in 1x Ligasepuffer mit 1U *Ligase*;
* die Ligationsansätze wurden in den *E.coli* Stamm JM109 transformiert und die Größe der Deletion nach Präparation der Plasmide durch Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

2.7. DNA Sequenzierung nach Sanger

Die durch *Exonuklease*III gewonnenen Deletionsklone wurden mit Hilfe der Didesoxynukleotid-Terminationsmethode (Sanger et al.,1977) sequenziert. Die Sequenzreaktion setzte sich aus den folgenden Schritten zusammen: alkalische Denaturierung der Plasmid-DNA, Bindung des 'Primers', Markierung mit ^{35}S-ATP, Verlängerung der markierten Ketten und Trennung der DNA-Ketten über Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Folgende Lösungen wurden benötigt:

Denaturierungspuffer: 0,2M NaOH; 0,2mM EDTA
Neutralisierungspuffer: 2M Ammoniumazetat, pH 4,5
10x Reaktionspuffer: 70mM Tris-HCl pH 7.5, 70mM $MgCl_2$, 300mMNaCl,100mM DTT, 1mM EDTA

Nukleotid-Mixe

Stammlösungen		Pipettierschema (Angaben in µl) T-Mix	C-Mix	G-Mix	A-Mix
dTTP	0,5mM	5	100	100	100
dCTP	0,5mM	100	5	100	100
dGTP	0,5mM	100	100	5	100
ddTTP	10mM	15	-	-	-
ddCTP	10mM	-	3	-	-
ddGTP	10mM	-	-	5	-
ddATP	10mM	-	-	-	1,5
Tris-HCl pH 8.0	10mM	200	200	200	100

dNTP Chase Mix enthält dATP, dCTP, dGTP und dTTP in einer Konzentration von 0,125mM.
Formamid Puffer: 10ml Formamid, 10mg Xylencyanol, 10mg Bromphenolblau, 200µl 0,5M EDTA pH 8.0
5x TBE-Puffer (Angaben pro l) 54g Tris, 27,5g Borsäure, 20ml 0,5M EDTA pH 8.0

Zusammensetzung des Sequenzgels (Angaben pro 60ml):
25,2g Harnstoff, 6,0ml 10xTBE Puffer, 27,2ml H_2O, 0,3ml 10% APS, 9ml Acrylamid:Bisacrylamid (19:1), 60µl TEMED

Denaturierung:

* 2µg Plasmid DNA in einem maximalen Volumen von 8µl wurden mit 40µl Denaturierungspuffer 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert;
* nach gleichzeitiger Zugabe von 4µl Neutralisierungspuffer, sowie 100µl eiskaltem Ethanol wurde die DNA 10 Minuten bei -70°C gefällt;
* der Ansatz wurde 10 Minuten zentrifugiert und der Niederschlag mit 1 ml 70% eiskaltem Ethanol gewaschen;
* der DNA Niederschlag wurde maximal 2,5 Minuten in einer temperierbaren Vakuumzentrifuge getrocknet und kalt gestellt.

Primerbindung:

* Der DNA Niederschlag wurde in 3µl ‚Sequenz-' bzw. ‚Reversem Sequenz-Primer' (10ng/µl) gelöst, 1,5 µl 10x Reaktionspuffer und 9,5µl H_2O zugesetzt und 20 Minuten bei 37°C inkubiert.

Markierung der DNA:

* Nach der Bindung des Primers erfolgten die Zugabe von 1µl *Klenow Polymerase* (5U/µl) sowie 2µl [^{35}S]-dATPαS (>600Ci/mmol, Amersham Buchler GmbH, Braunschweig);
* je 3µl dieser Mischung wurden in vorbereitete Eppendorfgefäße mit 2µl der entsprechenden Nukleotidmixe gegeben, die Inkubation erfolgte 20 Minuten bei 37°C.

Verlängerung der Ketten:

* Nach Zugabe von 2µl dNTP 'Chase' Mix wurden die Ansätze weitere 15 Minuten inkubiert;
* die Reaktion wurde durch Zugabe von 4µl Formamidpuffer gestoppt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Das Polyacrylamid-Gel wurde durch einstündige Elektrophorese bei 1500V auf ca 55°C vortemperiert. Vor der Trennung der markierten DNA-Ketten über das Polyacrylamid-Gel wurde der Reaktionsansatz 2,5 Minuten bei 96°C denaturiert und je 2µl aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 1,5 (kurzer Lauf) bzw. 3 Stunden (langer Lauf) in 1xTBE Puffer bei ca. 1500V.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und die markierten DNA Ketten durch Autoradiographie dargestellt.

2.8. DNA-DNA Hybridisierung nach Southern

Die DNA-DNA Hybridisierung wurde nach dem Protokoll des nichtradioaktiven 'DNA labeling and detection'-Kits der Fa. Boehringer, Mannheim, dem die Methode von Southern et al. (1975) zugrunde liegt, durchgeführt. Nach diesem Protokoll wurde die als Sonde eingesetzte DNA mit Digoxygenin-11-dUTP markiert. Die 'Ziel'-DNA wurde über Agarose-Gelelektrophorese getrennt und auf Nylonmembranen übertragen. Die Bedingungen für den Transfer der DNA auf Nylonmembranen (Fa. Schleicher und Schüll, Dassel) sowie die dazu benötigten Lösungen wurden dem Protokoll der Fa. Pharmacia/LKB zur Vakuum-Blot-Apparatut (LKB 2016 VacuGene) entnommen. Die Hybridisierung der DNA-Sonde gegen die auf Nylonmembranen fixierte 'Ziel'-DNA erfolgte je nach Angabe in wäßriger oder formamidhaltiger Lösung.

Folgende Lösungen wurden benötigt (nach Protokollen der Firmen Boehringer und Pharmacia/LKB):

Depurinisierungspuffer: 0,25N HCl
Denaturierungspuffer: 1,5M NaCl, 0,5M NaOH
Neutralisierungspuffer: 1M Tris, 2M NaCl; pH 5.0
20xSSC-Puffer: 3M NaCl, 0,3M Trinatriumcitrat; pH 7.4
Hybridisierungslösung (wäßrig): 5xSSC, 0,1% N-lauroylsarkosinat, 0,02% SDS, 1% Blocking Reagenz (Fa. Boehringer),
Hybrdidisierungslösung (mit Formamid): 5x SSC, 20 bzw. 50% Formamid, 0,1% N-lauroylsarkosinat, 0,02% SDS, 1% Blocking Reagenz
Waschlösung 1: 2x SSC, 0,1% SDS
Waschlösung 2: 0,1x SSC, 0,1% SDS
Puffer 1: 100mM Tris-HCl, 150mM NaCl; pH 7.5
Puffer 2: 0,5% Blocking Reagenz in Puffer 1
Puffer 3: 100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 50mM $MgCl_2$; pH 9.5
Färbelösung: 45µl NBT (4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid) 35µl X-Phosphat-Lösung (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat), 10ml Puffer 3

Markierung der DNA Sonde: Vor der Markierung mit Digoxygenin-11-dUTP (Dig-dUTP) wurde die DNA 10 Minuten bei 96°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Ein Markierungsansatz von 20µl setzte sich wie folgt zusammen:

10ng-3µg denaturierte DNA,
2µl Hexanukleotidmix (enthält Oligonukleotide, Fa.Boehringer),
2µl dNTP 'labeling' Mix (enthält dNTP und Dig-dUTP zur Markierung, Fa. Boehringer),
2 U *Klenow Polymerase*

Die Inkubation erfolgte 20 Stunden bei 37°C. Vor der Hybridisierung wurde der Markierungsansatz mit Hybridisierungs-lösung verdünnt und erneut

hitzedenaturiert.

Denaturierung und Transfer der 'Ziel'-DNA auf Nylonmembran
Nach Trennung der DNA Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese wurde die DNA unter Vakuum wie folgt auf Nylonmembran übertragen:

* Das Agarosegel wurde auf die in die Vakuum Blot Apparatur eingespannt Nylonmembran gelegt;
* sofort nach Einschalten des Vakuums von mindestens 40cm H_2O wurde das Gel mit Depurinisierungslösung überschichtet und 10 Minuten einwirken gelassen;
* die Lösung wurde entfernen und Schritt 1 nacheinander mit Denaturierungs- und Neutralisierungslösung wiederholt;
* der Transfer der DNA erfolgte mit 20x SSC 1 Stunde;
* die DNA wurde durch 3 minütige UV-Bestrahlung auf der trockenen Nylonmembran fixiert.

Praehybridisierung und Hybridisierung: Um unspezifische Bindungen der DNA Sonde an die Nylonmembran zu verhindern wurde in Abwesenheit der Sonde eine Praehybridisierung des Filters bei 68°C in wäßriger Lösung bzw. bei 42°C in 50% formamidhaltiger Lösung für mindestens 2,5 Stunden durchgeführt.
Die Hybridisierung gegen die Dig-dUTP markierte DNA-Sonde, die zuvor hitzedenaturiert wurde, erfolgte über Nacht bei 68°C (hohe Stringenz) bzw. bei 42°C in 20% formamidhaltiger Lösung (niedrige Stringenz).
Zur Beseitigung unspezifisch gebundener DNA wurden die Filter nach der Hybridisierung bei Raumtemperatur 2 mal 5 Minuten in Waschlösung 1, sowie 2 mal 15 Minuten in Waschlösung 2 bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur gewaschen.

Detektion der DNA-DNA Hybride:
Die Detektion der an den Filter gebundenen DNA Sonde erfolgte durch einen anti-Digoxygenin gerichteten, an *alkalische Phosphatase* gekoppelten Antikörper wie folgt:

* die Membran wurde in Puffer 1 gewaschen und 30 Minuten bei Raumtemperatur in Puffer 2 geschwenkt;
* die Membran wurde kurz in Puffer 1 gespült, die Inkubation mit dem Anti-Digoxygenin-Antikörper (Verdünnung 1:5000 in Puffer 1) erfolgte unter vorsichtigem Schwenken 30 Minuten bei Raumtemperatur;
* unspezifisch gebundener Antikörper wurde 2 mal durch 15 minütiges Waschen entfernen;

* die Membran wurde 2 Minuten in Puffer 3 äquilibriert;
* die Inkubation des Filters in Gegenwart der Färbelösung wurde im Dunkeln durchgeführt, nach erfolgter Farbreaktion wurde die Nylonmembran in TE-Puffer fixieren.

2.9. Plaque-Hybridisierung: Southern Hybridisierung gegen Phagen-DNA

Die Hybridisierung einer DNA-Sonde gegen Phagen-DNA erfolgte wie unter 2.8. beschrieben auf Nylonmembranen.
Vor dem Transfer der Phagen DNA auf Nylonmembranen (Fa. Pall Biosupport, Dreieich) wurden die LB Platten, die mit Phagenpartikel enthaltendem Weichagar überschichtet waren, zur Aushärtung 1 Stunde bei 4°C gekühlt. Die Nylonfilter wurden 1 Minute auf die Agaroberfläche gelegt und die an der Membran adsorbierte DNA in den folgenden Schritten denaturiert. Hierzu wurde der Filter mit der Adsorptionsseite nach oben 5 Minuten auf einem Tropfen (0,5ml) Denaturierungslösung inkubiert, sodann der gleiche Vorgang auf Neutralisierungslösung wiederholt. Die Fixierung der Phagen-DNA an die luftgetrockneten Filter erfolgte durch 3 minütiger UV-Bestrahlung. Die Detektion hybridisierter Phagen DNA wurde wie unter *Southern Hybridisierung* (2.8.) beschrieben durchgeführt.

2.10. Herstellung von Gesamtzellextrakten und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteinmuster bestimmter Bakterienstämme zu untersuchen, wurden Gesamtzellextrakte der Stämme *E.coli*, *S.carnosus* und *B.subtilis* hergestellt und die Proteine nach ihrem Molekulargewicht über SDS-PAGE getrennt (Laemmli et al.,1970).

Folgende Lösungen wurden benötigt (variiert nach Laemmli et al.,1970):

10xBlot Puffer:	pro l: 30g Tris, 144g Glyzin
Laufpuffer:	pro l: 100ml 10x Blot Puffer, 10ml 10% SDS
Lämmli-Probenpuffer:	pro 100ml: 12,5ml 0,5M Tris-HCl pH 6.8, 20ml 10% SDS, 10ml Glyzerin, 5ml Mercaptoäthanol, Spatelspitze Bromphenolblau
Färbelösung:	pro l: 1,75g Serva Blau R, 454ml Methanol, 92 ml Essigsäure
Entfärber:	pro l: 300ml Ethanol, 100ml Essigsäure

Zusammensetzung eines 12,5% SDS-Polyacrylamid Gels mit 5% Sammelgel:

Trenngel 30ml:	12,5ml Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8) 7,5ml 1,5M Tris-HCl pH 8.8, 0,3ml 10% SDS 9,4ml 30% Glyzerin, 0,3ml 10%APS, 20µl TEMED
Sammelgel 15ml:	2,5ml Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8) 3,75ml 0,5M Tris-HCl pH 6.8, 0,15ml 10% SDS 8,45ml H_2O, 0,15ml 10% APS, 10µl TEMED

Herstellung von Gesamtzellextrakte von E.coli, S.carnosus und B.subtilis

1 ml einer Übernachtkultur von *E.coli* wurde zentrifugiert und der Niederschlag in 100µl Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Die Zellen wurden durch 10 minütiges Kochen aufgeschlossen.

Die Übernachtkulturen von *B.subtilis* und *S.carnosus* (ca. 10ml) wurden auf ein Volumen von 1 ml konzentriert und durch Ultraschall mit Hilfe einer Mikrotip-Spitze in einem Eppendorfgefäß aufgeschlossen (Sonifier B 15, Fa. Branson Sonic Co., USA). Bei einer Schallstärke von 4 erfolgte der Aufschluß von *B.subtilis* 6 mal 30" pulsierend mit je 30" Pause bei 4°C. *S.carnosus* wurde durch 15 minütige, kontinuierliche Beschallung in der Kälte aufgeschlossen. Die Extrakte wurden mit dem gleichen Volumen 2x Laemmli-Probenpuffer gemischt und vor der Elektrophorese 10 Minuten hitzedenaturiert.

SDS-PAGE: 10-30µl des hitzedenaturierten Zellextrakts in Laemmli-Probenpuffer wurden (wenn nicht anders angegeben) auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen, die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 10mA. Das Gel wurde anschließend 30 Minuten in der Färbelösung geschüttelt und die Proteinbanden nach mehrmaligem Wechsel des Entfärbers sichtbar gemacht.

2.11. Western Blot

Der spezifische Nachweis von Proteinen mit Antikörpern wurde nach der Vorschrift von Towbin et al.(1979) durchgeführt. Die Detektion des spezifisch gebundenen Antikörpers erfolgte über einen zweiten, an *Peroxidase*-gekoppelten Antikörper aus Ziegen, der gegen Immunglobulin G aus Kaninchen gerichtet war (Hawkes et al., 1982).

Folgende Lösungen wurden benötigt (variiert nach Towbin et al.,1979)

10xBlot Puffer	(s. unter 2.10.)
Lösung I:	3% RSA, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 0,9% NaCl
Lösung II:	0,3% RSA, 10mM Tris-HCl pH 7.7, 0,9% NaCl, 0,1% Tween 20
Entwickler:	60mg α-Chloronaphtol, 20 ml Ethanol, 80ml Tris-HCl pH 7.5, 150µl H_2O_2

Western Blot (var. nach Towbin et al.,1979)

* Nach der Trennung der Zellproteine über SDS-PAGE (siehe 2.10.) erfolgte der Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembran 3 Stunden bei 30V in 1xBlot Puffer;
* zur Blockierung freien Bindungsstellen wurde die Membran 1 Stunde bei 37°C in Lösung I geschüttelt;
* in Gegenwart des spezifische α*SecA*-Antikörper (in einer 1:300 Verdünnung in LösungII) wurde der Filter über Nacht bei 4°C vorsichtig geschüttelt;
* die Membran wurde 2 mal 30 Minuten bei 37°C in LösungII gewaschen;
* nach Zugabe des zweiten Antikörpers (*Peroxidase*-gekoppeltes-Anti-Kaninchen Immunglobulin aus Ziegen, Verdünnung 1:2000 in LösungII, Fa. Sigma) erfolgte die Inkubation für 1 Stunde bei 37°C;
* die Membran wurde 2 mal 30 Minuten bei 37°C in LösungII gewaschen;
* nach Zugabe des Entwicklers erfolgt die Reaktion der an den Antikörper gekoppelten *Peroxidase* innerhalb weniger Minuten.

2.12. In Vivo ^{35}S-Methionin Markierung und Immunpräzipitation

Die Markierung von Proteinen mit nachfolgender Fällung durch einen spezifischen Antikörper erfolgte nach den Vorschriften von Gebert et al. (1988), Ito et al. (1981) und Shuman et al. (1980).

Folgende Lösungen wurden benötigt (Gebert et al.,1989)

'*Chase*'-*Lösung*:	100µl Methionin (20mg/ml), 5µl Chloramphenikol (40mg/ml 50% Ethanol)
Lysepuffer I:	2% SDS, 1mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8.0
Lysepuffer II:	2% Triton X-100, 0,15M NaCl, 0,1mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8.0
Waschpuffer 1:	1% Triton X-100, 1M NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8.0,
Waschpuffer 2:	0,1% SDS, 0,5 M LiCl, 50mM Tris-HCl pH 8.0
Waschpuffer 3:	50mM Tris-HCl pH 8.0

Eine bei 30°C gewachsene Übernacht-Kultur von *E.coli* in Minimalmedium (mit je 0,4% Glyzerin und Maltose) wurde im gleichen Medium auf eine OD_{578} von ca. 0.03 verdünnt.

Anzucht und Markierung

* Während der frühen exponentiellen Wachstumsphase wurde die Kultur geteilt und bei 30°C und 42°C weiter kultiviert;

* zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten wurden die Kulturen für die ^{35}S-Methionin Markierung auf eine OD_{578} 0,1 eigestellt;
* 2ml auf 30°C vortemperierte Zellsuspension wurde 2 Minuten in Gegenwart von 4µl 'Methionin Assay Medium' (0,5mg/ml H_2O; Difco) inkubiert;
* durch Zugabe von 35µCi ^{35}S-Methionin (ca.10µCi/µl; Amersham Buchler, Braunschweig) wurden die Zellen markiert (an dieser Stelle wurden 5µl des Markierungsansatzes zur Quantifizierung der eingesetzten Radioaktivität entnommen);
* nach 1 Minute wurden 52µl 'Chase' Lösung zugesetzt, zu den angegebenen 'Chase' Zeiten wurde 0,5ml Probe in 0,15ml eiskaltes 40% TCA pippetiert;
* die Fällung der Proteine erfolgte 20 Minuten auf Eis, nach der Zentrifugation wurde der Proteinniederschlag mit Aceton gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet;

Zellaufschluß und Immunfällung

* der getrocknete Niederschlag wurde mit 30µl Lysepuffer I sorgfältig gelöst, der Ansatz 10 Minuten bei 65°C (gilt nur für nachfolgende Fällung von Membranproteinen) und 2 Minuten bei 96°C inkubiert;
* nach Zugabe von 1ml Lysepuffer II und Zentrifugation wurde aus dem Überstand durch Zugabe des entsprechenden Antikörpers das spezifische Protein über Nacht bei 4°C gefällt (hier 10µl zur Quantifizierung der Radioktivität entnehmen);
* die Präzipitation der Antigen-Antikörper Komplexe erfolgte durch Inkubation mit 100µl fixierten *Staphylococcus aureus* Zellen (Pansorbin, 10% w/v; Calbiochem) 20 Minuten auf Eis (zwischenzeitlich mehrmaliges Schütteln) und nachfolgende Zentrifugation;
* der Niederschlag wurde nachfolgend mit je 0,5ml Waschpuffer 1,2 und 3 gewaschen;
* der Zellniederschlag wurde in 15µl 2x Laemmli-Probenpuffer (siehe 2.10.) resuspendiert und der Antigen/Antikörper-Komplex durch 5 minütige Denaturierung bei 96°C gelöst; nach der Zentrifugation wurde der gesamte Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Flourographie

* nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Gel 1 Stunde in einem Gemisch aus Methanol, H_2O und Essigsäure (45:45:10) fixiert und nachfolgend 30 Minuten in 'Amplifier' (Amersham Buchler GmbH,

Braunschweig) geschüttelt;

* nach Trocknung des Gels unter Vakuum erfolgte die Exposition eines Röntgenfilms (X-Ray, Fuji) bei -70°C.

Der prozentuale Einbau von ^{35}S-Methionin wurde aus dem Quotienten der durch Szintillationsmessung bestimmten radioaktiven Zerfälle im Zellysat (nach Zugabe von LysepufferII) und im Markierungsansatz errechnet.

2.13. In Vitro Transkription/Translation

Mit Hilfe des 'Prokaryotic DNA-Directed Translation'-Kits der Firma Amersham (Amersham Buchler GmbH, Braunschweig) wurden plasmidkodierte Gene exprimiert und ihr Produkt durch nachfolgenede SDS-PAGE und Flourographie dargestellt. Der Transkriptions- und Translationsansatz setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

4µg Plasmid DNA	
7,5µl Lösung 2	(enthält für Transkription und Translation nötigen Komponenten wie Nukleotide, tRNA, Energie-regenerierende Systeme und anorganische Salze)
3µl Lösung 3	(enthält alle Aminosäuren außer Methionin in äquimolarem Verhältnis)
2µl ^{35}S-Methionin	(zur Markierung der Genprodukte)
7,5µl Lösung 5	(Verdünnungspuffer)
5µl Lösung 1	(S-30 Extrakt von einem *RNase*-negativem *E.coli* Stamm mit den essentiellen enzymatischen Komponenten und Ribosomen für die Transkription und Translation

Die Reaktion erfolgte 60 Minuten bei 37°C, nach Zugabe von 5µl Lösung 7 (Methionin 'Chase' Lösung) wurde der Ansatz weitere 5 Minuten inkubiert. Vor SDS-PAGE wurde der Ansatz mit 35µl 2x Lämmli-Probenpuffer (siehe 2.10.) gemischt und 10µl der hitzedenaturierten Probe auf das Gel aufgetragen. Die weitere Behandlung des Gels und Flourographie wurde wie unter 'In Vivo ^{35}S-Methionin Markierung und Immunpräzipitation' beschrieben durchgeführt.

2.14. Präparation von Ribosomen und zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Präparation von *E.coli* Ribosomen, Extraktion ribosomaler Proteine und nachfolgende zweidimensionale Gelelektrophorese erfolgte nach den Vorschriften von Hardy et al.(1969), Isono und Isono (1978), Geyl et al.(1981) und Rheinberger et al.(1988).

Folgende Lösungen wurden benötigt:

$T_{10}M_6N_{30}SH_4$ Puffer: 10mM Tris-HCl pH 7.4 (bei 4°C), 6mM $MgCl_2$, 30mM NH_4Cl, 4mM Merkaptoethanol
Saccharose lösung: 40% in $T_{10}M_6N_{30}SH_4$ Puffer

Gelzusammensetzung der 1. Dimension: (pro 100ml) 4g Acrylamid, 0,1g Bisacrylamid, 1,19g Bis-Tris, 36g Harnstoff, 0,19g EDTA, 1ml 7% APS, 350µl TEMED, pH 5.0 mit Essigsäure einstellen

Gelzusammensetzung der 2. Dimension: (pro l) 372g Harnstoff, 186g Acrylamid, 4,8g Bis-Acrylamid, 54ml Essigsäure, 10ml 5N KOH, 33ml 10% APS, 5,8ml TEMED, der pH der Lösung liegt bei 4.5

Oberer Elektroden Puffer (10fach konzentriert, pro l): 20,9g Bis-Tris, 45ml Essigsäure, pH liegt bei 3.8;
Unterer Elektrodenpuffer (10fach konzentriert, pro l): 175,7g K-Azetat, 49ml Essigsäure, pH liegt bei 5.3;
Probenpuffer: 6M Harnstoff, 10mM DTT, Spatelspitze basisches Fuchsin

Präparation der Ribosomen: Ausgehend von 1 Liter LB Kultur wurden Ribosomen von *E.coli* nach der Vorschrift von Isono und Isono (1978), sowie Rheinberger et al.(1988) isoliert. Bei einer OD_{650} von ca. 2.0 wurden die Zellen geerntet und in ca. 10ml $T_{10}M_6N_{30}SH_4$-Puffer (entspricht ca. 0,5g Feuchtgewicht/ml) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte in der Kälte durch Ultrabeschallung mit einem 1/2" Horn bei maximaler Intensität (6x30''pulsierend mit je 30'' Pause; Sonifier B 15, Fa. Branson Sonic Co., USA). Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 30.000g, 4°C wurde der Zellextrakt einer Ultrazentrifugation unterzogen (105.000g, 4°C, 3 Stunden). Der Niederschlag, der Ribosomen und Zellmembranen enthielt, wurde in ca. 1ml $T_{10}M_6N_{30}SH_4$-Puffer resuspendiert und auf einen kontinuierlichen Saccharosegradient (0 bis 40%) gegeben. Nach 18 Stunden bei 21.000UpM und 4°C wurden die Ribosomen enthaltenden Fraktionen durch Absorptionsmessung bei 260nm bestimmt und vereinigt. Die Ribosomen wurden durch erneute Ultrazentrifugation bei 105.000g sedimentiert und in 0,5ml $T_{10}M_6N_{30}SH_4$-Puffer resuspendiert (entspricht zwischen 300 und 600 A_{260} Einheiten).
Extraktion ribosomaler Proteine: Nach der Vorschrift von Hardy et al.(1969) wurden die ribosomalen Proteine durch zweimalige Extraktion in Gegenwart von 1/10 Volumen 1M $MgCl_2$ und 2 Volumen Eisessig unter ständigem Rühren bei 4°C von der RNA getrennt. Die Überstände der 10 minütigen 20.000g-Zentrifugation wurden vereinigt und über Nacht bei 4°C gegen 2% Essigsäure dialysiert. Nach Lyophilisation wurden die Proteine mit 2% Essigsäure in einer Konzentration von ca. 10mg/ml gelöst.
Elektrophorese (Geyl et al. (1981)): 10µl der Proteinlösung wurden mit

40µl Probenpuffer gemischt und in der 1.Dimension ca. 7 Stunden mit 1mA pro Gel getrennt (Elektrophorese bei 4°C, Laufrichtung vom + zum -Pol; Gelröhrchen mit einem Durchmesser von 2,5mm und ca. 10cm Länge). Die Gele wurde aus den Glasröhrchen gelöst und mit Hilfe einer 0,6% Agaroselösung auf den Gelen für die anschließende 2.Dimension fixiert (Plattengele 14cm x10cm x0,75mm). Die Elektrophorese erfolgte ca. 15 Stunden bei 4°C und 30mA.

Die Gele wurden 30 Minuten vorsichtig in der Färbelösung geschwenkt, durch mehrmaliges Wechseln des Entfärbers konnte das Proteinmuster sichtbar gemacht werden.

3. ERGEBNISSE

3.1 ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES *L13* GENS AUS *STAPHYLOCOCCUS CARNOSUS*, EINES SUPPRESSORS FÜR TEMPERATURSENSITIVE MUTATIONEN IM EXPORTAPPARAT VON *E.COLI*

3.1.1. Isolierung und Kartierung von *secA* (Ts) komplementierenden Cosmiden aus einer Genbank von *S.carnosus* TM300

Mit dem Ziel, eine *SecA* analoge Komponente des Exportapparates von *E.coli* aus *S.carnosus* zu isolieren, wurde eine Cosmidgenbank von *S.carnosus* TM300 in die *E.coli* Mutante MM52 (*secA* Ts) transformiert. Die Selektion erfolgte bei 37°C auf Minimalmedium mit der C-Quelle Maltose und Ampicillinresistenz. Da die sowohl für die Aufnahme von Maltose, als auch für die Ausprägung der Resistenz nötigen Proteine in der Plasmamembran bzw. im Periplasma lokalisiert sind, konnten nur solche Klone wachsen, deren Proteinexportdefekt komplementiert wurde.
Bei der Selektion wurden 4 Cosmide erhalten, die DNA Fragmente zwischen 5,5 und 22 kB trugen (pCos7, 22, 23, 48). Die Restriktionskartierung von pCos7, 23 und 48 ist in Abbildung 2 dargestellt.
Beim Vergleich der Restriktionskarten sind keine gemeinsamen Regionen zu erkennen, die auf die Isolierung identischer Gene schließen lassen könnte. Da bei der Konstruktion der Genbank keine größenfraktionierte DNA von TM300 in den Vektor pHC79 ligiert wurde, bestand die Möglichkeit, daß mehrere kleine, auf dem Chromosom nicht benachbart liegende Fragmente in einem Cosmid nebeneinander inseriert wurden. Demnach wäre bei der Klonierung eines bestimmten Fragments in unterschiedlichen Cosmiden kein einheitliches Restriktionsmuster zu erwarten. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde jedes der oben erwähnten Cosmide in einer Southern Hybridisierung als Sonde gegen die jeweiligen anderen Plasmide eingesetzt. Die Cosmide besaßen zum Teil homologe Bereiche zueinander, die jedoch kein übereinstimmendes Restriktionsmuster aufwiesen, so daß davon ausgegangen werden mußte, daß die Cosmide keine gemeinsamen DNA Fragmente hatten.

Die durch die Cosmide kodierten Proteine wurden in einem Transkriptions-Translations Experiment in vitro synthetisiert und nach Trennung über SDS-PAGE und Flourographie dargestellt (Abb.3).
Neben den durch den Kontrollvektor pHC79 exprimierten Produkten, die der β-*Laktamase* und den Tetrazyklin-Resistenz vermittelnden Proteinen

entsprechen, traten bei den untersuchten Cosmiden zahlreiche weitere Proteinbanden auf, die jedoch im Vergleich zueinander keine offensichtlichen Gemeinsamkeiten zeigten. Bei Cosmid pCos23 (Spur 3) wurde ein Protein von ca. 16kDa in großer Menge gebildet (siehe Pfeil), welches im Weiteren genauer untersucht wurde.

Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß die vier isolierten Cosmide unterschiedliche DNA-Fragmente trugen, die den Protein-Exportdefekt der Mutante MM52 supprimieren konnten.

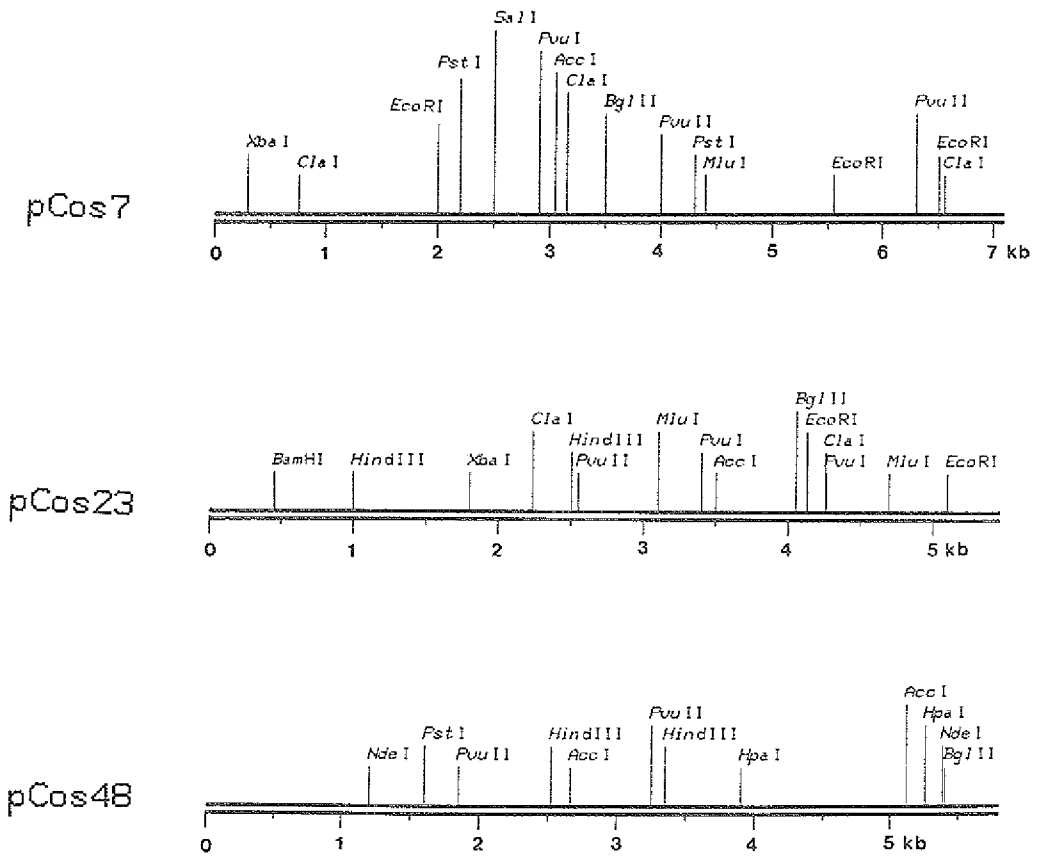


Abb.2 Restriktionskarte der *E.coli secA* Ts (MM52) komplementierenden Cosmide pCos7, pCos23 und pCos48 aus einer Genbank von *S.carnosus* TM300.

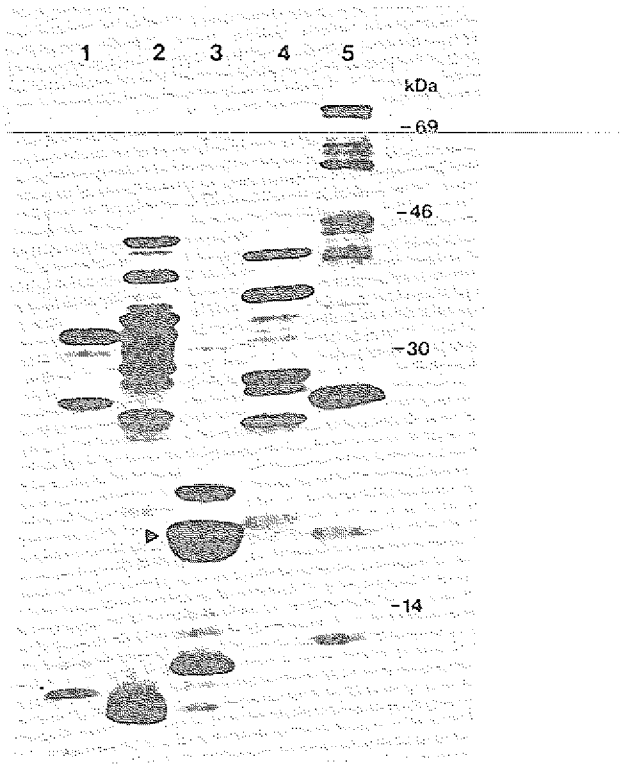


Abb.3 Expression der Cosmide pHC79 (1), pCos22 (2), pCos23 (3) pCos48 (4) und pCos7 (5) in einer 'in vitro' Transkriptions-Translationsreaktion; Pfeil markiert 16kDa Produkt von pCos23.

3.1.2. Komplementationsverhalten der Cosmide in temperatursensitiven Mutanten des Proteinexportapparates von *E.coli*

Das Komplementationsverhalten der im Stamm MM52 selektionierten Cosmide wurde bei unterschiedlichen Temperaturen (Tab.3) untersucht.

Tab.3 Komplementation des *E.coli* Stamms MM52 durch die Cosmide pHC79, pCos7, pCos22, pCos23 und pCos48 bei unterschiedlichen Temperaturen; + = gutes Wachstum, - = kein Wachstum, (+) = eingeschränktes Wachstum

		pHC79	pCos7	pCos22	pCos23	pCos48
MM52	37°C*	-	+	+	+	+
	42°C**	-	(+)	-	+	-

*: Selektion auf Minimalmedium mit Maltose, 2 Tage
**: Selektion auf LB Medium 2 Tage.

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, war nur das Cosmid pCos23 in der Lage, die temperatursensitive Mutation der Mutante MM52 auch bei 42°C eindeutig zu supprimieren.

Um zu untersuchen, ob die Fähigkeit zur funktionellen Komplementation spezifisch für die *secA* (Ts) Mutation ist, wurden die Cosmide in weitere temperatursensitive Mutanten des Export-Apparates transformiert. Diese tragen einen Defekt im *secY* Gen (IQ85) und der *Signalpeptidase* (IT41) (Tab.4).

Tab.4 Wachstumsverhalten der *E.coli* Stämme MM52 (*secA* Ts), IQ85 (*secY* Ts) und IT41 (*lep* Ts) nach Transformation mit den Cosmiden pCos7, 22, 23, 48.

	pHC79	pCos7	pCos22	pCos23	pCos48
MM52 (*secA* Ts)*	-	+	+	+	+
IQ85 (*secY* Ts)**	-	+	+	+	+
IT41 (*lep* Ts)**	-	+	-	+	-

Wachstum nach 2 Tagen auf Minimalmedium mit Maltose bei * 37°C bzw ** 42°C; + = Wachstum, - = kein Wachstum.

Die in Tabelle 4 dargestellten Ergebnisse lassen vermuten, daß die funktionelle Komplementation der *secA*(Ts) Mutante durch die isolierten Cosmide nicht spezifisch ist. Neben dem *secA* Defekt konnten die Cosmide auch den *secY* Defekt der Mutante IQ85, die Cosmide pCos7 und 23 außerdem den Defekt in der *Signalpeptidase* supprimieren. Für die weiteren Untersuchungen wurde das Cosmid pCos23 ausgewählt, da dieses als einziges den drei erwähnten Mutanten das Wachstum auch bei 42°C ermöglichte.

3.1.3. Untersuchungen zur Zellmorphologie von MM52/pCos23

Während unterschiedlicher Kultivierungszeit der Stämme MM52/pHC79 und MM52/pCos23 bei der nicht-permissiven Temperatur (42°C) wurde das Erscheinungsbild der Zellen im Lichtmikroskop untersucht (Abb.4).
Ausgehend vom gleichen Phaenotyp nahm die Länge der Zellen des Stamms MM52/pHC79 im Vergleich zu MM52/pCos23 nach zweistündiger Inkubation bei 42°C zu. Nach weiteren vier Stunden bildete der Stamm MM52/pHC79 bis zu 30µm lange, aneinanderhaftende Filamente, die nicht mehr in der Lage waren, sich zu teilen. Der Phaenotyp von MM52/pCos23 entsprach dem des *secA*-

Wildtyp Stamms (nicht abgebildet). Die Zellen kamen hauptsächlich im Zweierverband vor und neigten nur vereinzelt zur Bildung verlängerter Formen.
Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß das Cosmid pCos23 die Ausbildung der in der Mutante MM52 durch den *secA*(Ts) Defekt verursachten, typischen Filamentierung bei der nicht permissiven Temperatur unterdrückt.

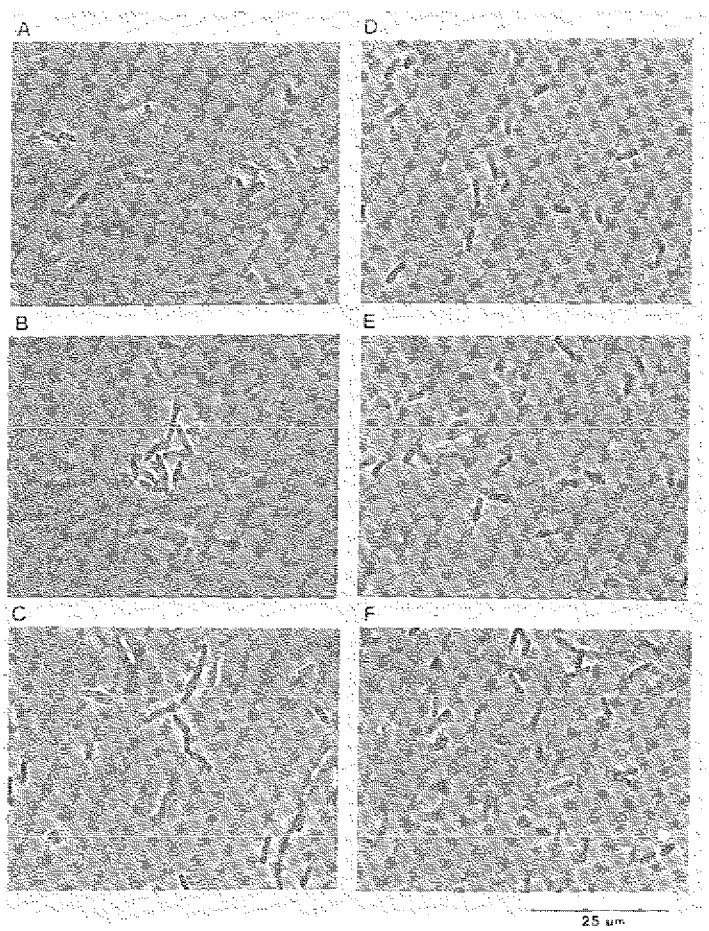


Abb.4 Veränderung der Zellmorphologie der Stämme MM52/pHC79 und MM52/pCos23 nach Kultivierung bei 42°C; A-C MM52/pHC79, D-F MM52/pCos23, A und D 30°C; B und E 2h 42°C; C und F 6h 42°C.

3.1.4. Subklonierung des komplementierenden Fragments aus pCos23

Wie in Abb.5 dargestellt, wurde das 5,5kB große DNA-Insert des Cosmids pCos23 durch partielle Restriktion mit dem Enzym *Sau*3A um 3kB verkleinert und in den mit *Bam*HI linearisierten Vektor pUC18 subkloniert (Abb.5; pUC23). Durch *Exonuclease*III Abbau und gezielte Subklonierung konnte der komplementierende Bereich auf eine Größe von 0,7kB eingeengt werden (Abb.5; p23-1).

Durch die Subklonierung eines *Sau*3A Fragments in einen Vektor mit hoher Kopienzahl konnte im Zellextrakt von JM109/pUC23 eine stark exprimierte Proteinbande nachgewiesen werden (Abb.6). Das Auftereten dieser Bande von ca. 16kDa korrelierte mit der Fähigkeit zur Komplementation von MM52 (Abb.5). Wie in Abbildung 3 dargestellt, wurde in einer in vitro Transkriptions-Translations-Reaktion durch das Cosmid pCos23 ein stark exprimiertes Produkt gleicher Größe gebildet.

Die Ergebnisse zeigen, daß es sich bei der isolierten DNA um ein kleines Gen von ca. 0,7kB handelt, das für ein Protein von etwa 16kDa kodiert.

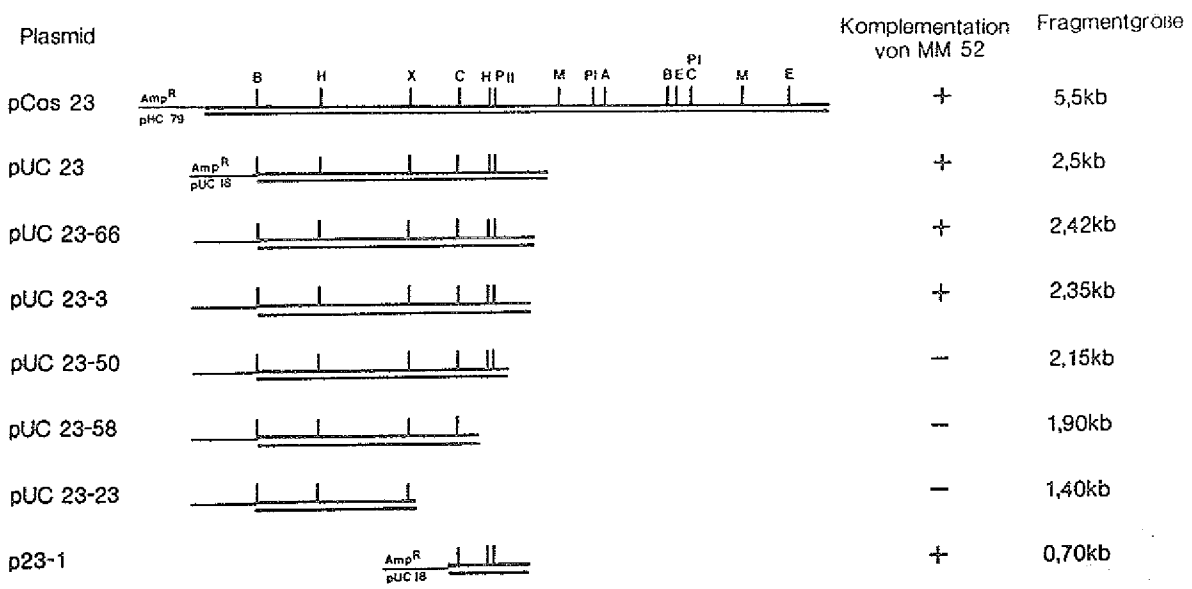


Abb.5 Deletionsanalyse des Cosmids pCos23 und Komplementation der *E.coli* Mutante MM52 durch die Deletionsklone; A *Acc*I, B *Bam*HI, C *Cla*I, E *Eco*RI, H *Hind*III, M *Mlu*I, PI *Pvu*I, PII *Pvu*II, X *Xba*I

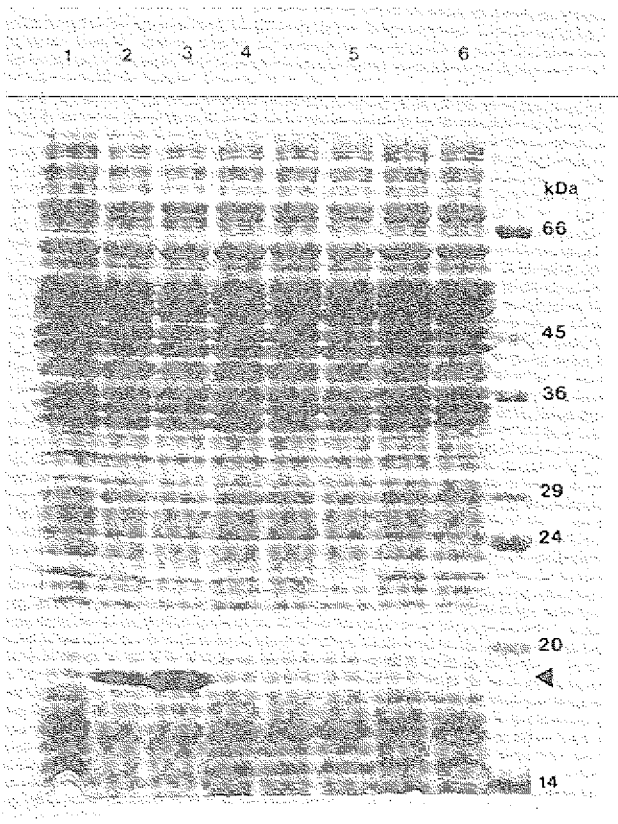


Abb.6 SDS-PAGE von Zellextrakten der plasmidtragenden Stämme (1) JM109/pUC18, (2) pUC23, (3) pUC23-3, (4) pUC23-50, (5) pUC23-58, (6) pUC23-23

3.1.5. Sequenzierung des komplemetierenden Gens

Zur weiteren Charakterisierung des komplementierenden DNA-Fragments aus *S.carnosus* wurde das Gen sequenziert und durch Vergleich mit den in der Swiss-Protein Datenbank (Firma IntelliGenetics, Inc., Mountain View, CA) gespeicherten Informationen identifiziert.

Die zur Sequenzierung eingesetzten Klone wurden durch die Einführung von Deletionen mittels *Exonuclease*III in das Plasmid pUC23 bzw. durch gezielte Subklonierung erhalten.

Es wurde ein 885 Bp großes Fragment sequenziert, das zwei offene Leserahmen trägt (Abb.7a,b). Der erste offene Leserahmen kodiert für ein Protein von 145 Aminosäuren; der zweite, unvollständige Leserahmen ist durch 40 Aminosäurereste repräsentiert. Während das Protein des ersten

offenen Leserahmens mit einem Methionin beginnt, dient im zweiten offenen Leserahmen das Triplett TTG, das in Leucin übersetzt wird, als Startcodon. Die Gene sind durch eine Sequenz von 22 Bp getrennt, dieser geringe Abstand deutet auf eine gemeinsame Organisation in einem Operon hin. Etwa 10 Bp vor dem Translationsstart befindet sich bei beiden Genen eine für *E.coli* typische Ribosomenbindungsstelle (-GAGG-; Lewin,1990). 202 Bp vor dem Startcodon des ersten Gens repräsentiert die Sequenz -TTGACA- eine typische -35 Region, wie sie für *E.coli* Promotoren beschrieben ist. Die 17 Bp stromabwärts lokalisierte Sequenz -TACGAT- könnte als zugehörige -10 Region wirksam sein (Lewin,1990). Das sequenzierte Fragment enthält keine DNA-Abschnitte, die Haarnadelstrukturen ausbilden könnten. Derartige Strukturen würden auf mögliche Regulationsmechanismen auf der Ebene der Transkription oder Translation hinweisen.

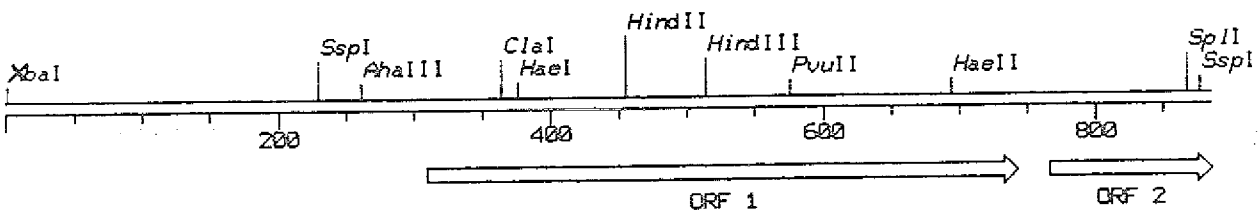


Abb.7 a) Restriktionskarte des sequenzierten Fragmentes von pCos23, das die *E.coli* Mutante MM52 (*secA* Ts) komplementiert; Pfeile markieren den Bereich der offenen Leserahmen (ORF1 und 2).

```
            10        20        30        40        50        60
             |         |         |         |         |         |
  1 TCTAGAAAAAATCTATTTAGCTCCACAAGAATTAATCAATGACTTCGGGCCAGATATTAA

 61 AATACAGCGTAAAAAATCATTGGAAAATGATTGAATCGTATTGACAAATACTTAGATAAA
                                              -35

121 TTATACGATTATATGCGGTATTGTTTTATATCACCACCACGATAAGCCCCGGAAACTTAT
       -10

181 TGTGTTACTAGATATAGAAGCAAAGTCGAATGAAAATCAACTAAATGAATATTATCTGAG
                                                   Ssp I

241 CTTTGAATCGTAACATTGTTTTAAAAAAAGCAACTTGCATAGCAGTTATTATTAGGAGGA
                                                            RBS

301 CAATTATTATGCGTCAAACATTTATGGCTAATGAATCAAACATTGAGCGCAAATGGTATG
    L13 ==>  METArgGlnThrPheMETAlaAsnGluSerAsnIleGluArgLysTrpTyrVal

361 TTATCGATGCAGCAGGCCAAACTTTAGGTCGCTTATCATCAGAAGTAGCATCTATTTTAC
      IleAspAlaAlaGlyGlnThrLeuGlyArgLeuSerSerGluValAlaSerIleLeuArg

421 GCGGAAAACATAAAGCAACTTATACTCCACACGTTGACAGTGGTGACTACGTAATCATCA
      GlyLysHisLysAlaThrTyrThrProHisValAspSerGlyAspTyrValIleIleIle

481 TCAACGCTGGACAAATCGAAATGACAGGTAAAAAAGCTTCAGACAAAGTTTACTACCGTC
      AsnAlaGlyGlnIleGluMETThrGlyLysLysAlaSerAspLysValTyrTyrArgHis

541 ACTCTAACTACCCAGGTGGAATTAAATCAATCACAGCTGGTGAATTAAGAGAGAAAAACC
      SerAsnTyrProGlyGlyIleLysSerIleThrAlaGlyGluLeuArgGluLysAsnPro

601 CAGAACGTTTACTTGAAATTTCAATCAAAGGCATGTTACCAAGCAGCCGTTTAGGTGAAA
      GluArgLeuLeuGluIleSerIleLysGlyMETLeuProSerSerArgLeuGlyGluLys

661 AACAAGGTAAAAAATTATTTGTATATGGTGGCGCTGAACATCCACACGCTGCACAACAAC
      GlnGlyLysLysLeuPheValTyrGlyGlyAlaGluHisProHisAlaAlaGlnGlnPro

721 CAGAAAACTACGAGTTACGTGGTTAATTAGAAGGAGGAAATTACATTGGCACAAGTTGAA
      GluAsnTyrGluLeuArgGly            RBS     S9==> LeuAlaGlnValGlu

781 TATAGAGGCACAGGCCGTCGTAAAAACTCAGTAGCACGTGTACGTTTAGTACCAGGCGAA
    TyrArgGlyThrGlyArgArgLysAsnSerValAlaArgValArgLeuValProGlyGlu

841 GGTAACATCACTGTAAATGGTAAAGACGTACGTGAATATTTACCA
    GlyAsnIleThrValAsnGlyLysAspValArgGluTyrLeuPro
                                       Ssp I
```

Abb.7 b) Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz eines *E.coli secA* (Ts) komplementierenden Fragments aus *S.carnosus* TM300; unterstrichen sind die vermutete -35 und -10 Regionen, sowie die Ribosomenbindungsstellen (RBS)

3.1.6. Homologievergleich der Proteinsequenzen mit den ribosomalen Proteinen *L13* und *S9* von *E.coli*

Beim Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenz der offenen Leserahmen mit den in der Swiss-Protein Datenbank gespeicherten Informationen nach der Methode von Myers und Miller (1988) zeigte sich eine starke Homologie zu den durch die Gene *rplM* und *rpsI* kodierten Proteine aus *E.coli*. Das Protein *L13* (*rplM*), ein Protein der großen ribosomalen Untereinheit, ist mit dem *S9* Protein (*rpsI*), das in der kleinen ribosomalen Untereinheit lokalisiert ist, in einem Operon organisiert (Isono et al.,1985). Der Sequenzvergleich der Proteine ist in Abb.8 dargestellt.

```
SCL13     - MRQTFMANESNIERKWYVIDAAGQTLGRLSSEVASILRGKHKATYTPHVD -50
            :s :: :    s : :::s::s: :::::ss:s:  :::::::: ::::::
ECL13     - MK-TFTAKPETVKRDWYVVDATGKTLGRLATELARRLRGKHKAEYTPHVD -49

SCL13     - SGDYVIIINAGQIEMTGKKASDKVYYRHSNYPGGIKSITAGELREKNPER -100
            s:::s:ss::  s s:: : s::::: :s   ::::  :  :s  s :::
ECL13     - TGDYIIVLNADKVAVTGNKRTDKVYYHHTGHIGGIKQATFEEMIARRPER -99

SCL13     - LLEISIKGMLPSSRLGEKQGKKLFVYGGAEHPHAAQQPENYELRG -145
            ss::ss:::::   ::    s:: :: : :: ::::::    :
ECL13     - VIEIAVKGMLPKGPLGRAMFRKLKVYAGNEHNHAAQQPQ--VLDI -142


SCS9      - LAQVEYRGTGRRKNSVARVRLVPGEGNITVNGKDVREYLP -40
            s:   : :::::: : ::: s :: : : s: s s  :
ECS9      - MAENQYYGTGRRKSSAARVFIKPGNGKIVINQRSLEQYFG -40
```

Abb.8 Aminosäuresequenzvergleich des ribosomalen Proteins *L13* und der N-terminalen Region des Proteins *S9* aus *S.carnosus* (Sc L13, Sc S9) und *E.coli* (Ec L13, Ec S9); ':' markiert identische Aminosäuren, 's' markiert Aminosäuren mit gleichen chemischen Eigenschaften wie A,S,T; D,E; N,Q; R,K; I,L,M,V; F,Y,W.

Die Sequenz des ersten offenen Leserahmens ist mit der Proteinsequenz des *L13* Proteins zu 54,9% identisch, weitere 15,5% der Aminosäuren an gleicher Position sind auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften ähnlich. Beim Vergleich der Sequenz des zweiten Leserahmens mit dem *S9* Protein zeigt sich, daß 18 der 40 Aminosäuren identisch, weitere 5 zu den Aminosäuren des Proteins *S9* in gleicher Position ähnlich sind.

Auf Grund dieser Daten kann geschlossen werden, daß es sich bei der isolierten DNA um das ribosomalen Gene *rplM* und um einen Teil des ribosomalen *rpsI* Gens für die Proteine *L13* und *S9* aus *S.carnosus* handelt. Das Protein *L13* ist für die Komplementation der Mutante MM52 verantwortlich, da die *secA* (Ts) Mutation auch durch das Plasmid pUC23-3 (Abb.5), bei dem die Sequenz von *S9* deletiert wurde, komplementiert wird.

3.1.7. Untersuchungen zur Expression und Komplementation des heterologen *L13*-Proteins in *E.coli*

Das 0,61kB große *Ssp*I Fragment trägt eine 78Bp lange Sequenz, die vor dem Translationsstart des *rplM* Gens liegt, sowie die strukturelle Information des *L13* Proteins und der ersten 37 Aminosäuren des *S9* Proteins. Dieses Fragment wurde in beiden Orientierungen zu den Promotoren *lacZ* (Vektoren pUC18 bzw. pUC19) und *tac* (Expressionsvektor pKK223-3) kloniert, um zu untersuchen, ob das *Ssp*I Fragment eine Promotor wirksame Struktur trägt und ob das *L13* Protein unter der Kontrolle des *lacZ* bzw. *tac* Promotors exprimiert werden kann (Abb.9 und 10). Über SDS-Page wurde die Synthese und Induzierbarkeit des Genproduktes *L13* durch IPTG überprüft (Abb.10), außerdem wurde die Fähigkeit zur funktionellen Komplementation der Mutante MM52 getestet (Abb.9).

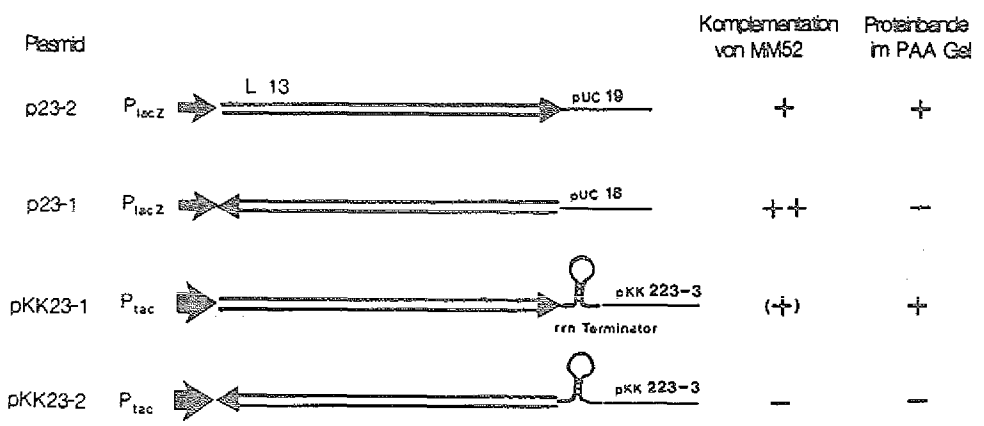


Abb.9 Klonierung des *rplM* tragenden *Ssp*I Fragments in den Vektoren pUC18 und 19 und den Expressionsvektor pKK233-3 in unterschiedlichen Orientierungen; P_{lac} *lacZ* Promotor; P_{tac} *tac Promotor*,; Pfeile geben Richtung der Promotoren und der *rplM* Gens an; Komplementation der Mutante MM52: ++ sehr gutes, + gutes, (+) eingeschränktes, - kein Wachstum; SDS-PAGE: - keine Proteinbande, + Proteinbande sichtbar.

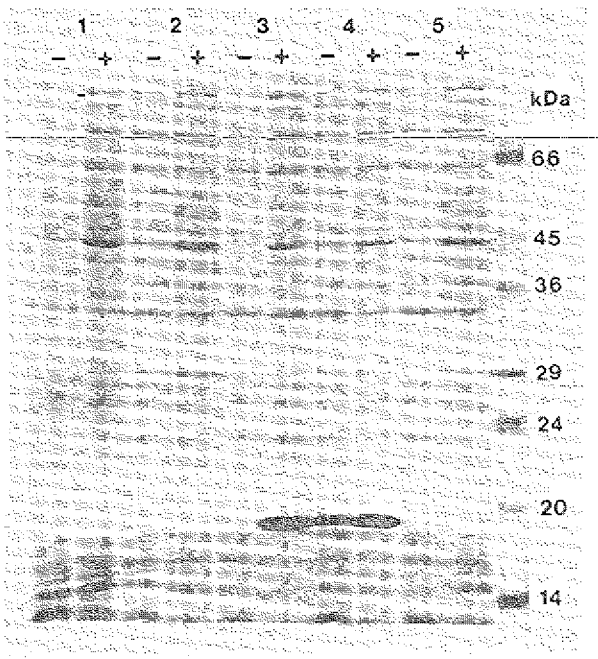


Abb.10 SDS-PAGE von Zellextrakten der *E.coli* Stämme Shure/pUC18 (1), p23-1 (2), p23-2 (3), pKK23-1 (4), pKK23-2 (5) nach Kultivierung unter Glukose reprimierten [-](0,5% Glukose in LB) bzw. IPTG induzierten [+](1mM IPTG in LB, 2h 37°C) Bedingungen.

Wie Abbildung 9 darstellt, waren die Plasmide p23-1 und p23-2 in der Lage, die Mutante MM52 zu komplementieren. Ein besseres Wachstum wurde durch das Plasmid p23-1 erreicht, bei dem das Gen dem *lacZ* Promotor entgegengesetzt kloniert wurde. Im Gegensatz zum Extrakt aus p23-2 konnte eine Proteinbande nicht sichtbar gemacht werden (Abb.10, Spur 2 und 3).
Dieses Ergebnis ließ vermuten, daß auf dem *Ssp*I Fragment ein Promotor lokalisiert ist, und daß das Genprodukt, wenn es in geringer Konzentration exprimiert wird, eine effektivere Komplementation hervorruft.
Im Plasmid p23-2 war die Synthese des *L13* Proteins durch IPTG induzierbar. Dieses Resultat schließt nicht aus, daß das Fragment einen eigenen, schwachen Promotor trägt, dessen Wirkung durch den starken *lacZ* Promotor überlagert werden kann.
Zellextrakte des *E.coli* Wildtypstamms Shure/pKK23-1 wiesen sowohl unter Glukose reprimierten, als auch IPTG induzierten Bedingungen große Mengen des Genproduktes auf (Abb.10, Spur 4), wodurch nur ein reduziertes Wachstum der Mutante MM52 bei der nicht-permissiven Temperatur erreicht werden konnte. Das Plasmid pKK23-2, bei dem wie bei p23-1 das Gen dem Promotor

entgegengesetzt kloniert wurde, konnte weder die Mutante MM52 komplementieren, noch wurde ein Protein in sichtbaren Mengen gebildet.
Im Gegensatz zu der oben erwähnten Schlußfolgerung zeigte dieses Ergebnis, daß auf dem *Ssp*I Fragment kein Promotor lokalisiert ist. Möglicherweise kommt es bei p23-1 durch einen vektorlokalisierten Promotor zur geringen Expression des *L13* Proteins, die für eine funktionelle Komplementation der *E.coli secA* Mutante ausreicht. Der auf dem Vektor lokalisierte Promotor P_3 (Stüber und Bujard, 1981) könnte in dieser Weise wirksam sein.

Die Fähigkeit der Plasmide, die Mutante MM52 zu komplementieren, wurde unter Glukose reprimierten und IPTG induzierten Bedingungen untersucht. Die gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tab.5 Wachstum der *E.coli* Mutante MM52(*secA* Ts) mit den Plasmiden pUC18, p23-1, p23-2, pKK23-1 und pKK23-2 unter Glukose reprimierten und IPTG induzierten Bedingungen; Pfeile zeigen die relative Lage des Promotors zum *rplM* Strukturgen.

Temp.	Medium	pUC18	p23-2 ->-->	p23-1 -><--	pKK23-1 =>-->	pKK23-2 =><--
30°C	LB	+++	+	+++	-	+++
	LB 0,5% Gluk	+++	++	+++	+	+++
37°C	M9 Mal	-	-	+	-	-
	M9 Mal 0,2mM IPTG	-	-	++	(+)	-
	LB 0,5% Gluk	-	(+)	+++	++	-

+++: sehr gutes, ++: gutes, +: mittleres, (+): eingeschränktes Wachstum, -: kein Wachstum nach 1 Tag.

Durch das Plasmid p23-1 wurde das beste Wachstum der Mutante MM52 bei nicht permissiver Temperatur erreicht. Die Plasmide p23-2 und pKK23-1, bei denen das Protein in großer Konzentration exprimiert wurde (Abb.10), konnten nur eine eingeschränkte Komplementation vermitteln, die zum Teil nur unter Glukose reprimierten Bedingungen wirksam war. Bereits bei 30°C war das Wachstum dieser Transformanden im Vergleich zum Kontrollplasmid pUC18 eingeschränkt.
Die Ergebnisse zeigen, daß für die Komplementation der Mutante MM52 bereits geringe, im SDS Polyacrylamidgel nicht sichtbare Mengen des *L13* Proteins ausreichen; hohe Konzentrationen (nach SDS-PAGE deutlich sichtbar, Abb.10) des Proteins führen bereits bei der permissiven Temperatur (30°C) zu einer Wachstumshemmung.

3.1.8. Untersuchungen zur Suppression unterschiedlicher *E.coli* Mutanten durch das ribosomale Protein *L13* aus *S.carnosus*

Die *rplM* tragenden Plasmide pCos23 und p23-1 wurden in unterschiedliche *E.coli* Mutanten transformiert, um zu untersuchen, ob der supprimierende Effekt spezifisch auf Mutationen des Proteinexport-Apparats von *E.coli* wirkt, oder allgemein temperatursensitive Mutationen komplementiert (Tab.6). Für das Plasmid pOF39, das die Gene der Hitzeschockprotein GroELES trägt, wurde bereits von Van Dyk et al.(1989) die Fähigkeit zur unspezifischen Komplementation beschrieben.

Tab.6 Komplementation unterschiedlicher Mutanten von *E.coli* durch die Plasmide pCos23, p23-1 und pOF39

Stamm	relevanter Genotyp	pCos23	p23-1	pOF39
MM52	*secA* (Ts)	+	+	+ [1]
BA13	*secA* (Am)	-	-	n.b. [2]
IQ85	*secY* (Ts)	+	+	+ [3]
IT41	*lep* (Ts)	+	(+)	+ [3]
CK1953	*secB*::Tn5	-	-	n.b. [4]
MM180	*secE* (Cs)	-	-	n.b. [5]
T850	*groEL* (Ts)	-	-	+ [6]
MF746	*dnaK* (Ts)	-	-	- [6]
NP315	*fda* (Ts)	n.b.	-	n.b. [2]

Selektionsbedingungen: [1] bei 37°C auf M9 Medium mit Maltose; [2] 42°C LB; [3] 42°C M9 Maltose; [4] 30°C LB; [5] 20°C LB; [6] 44°C auf LB mit 0,05% NaCl; +: Komplementation, (+): eingeschränkte Komplementation, -: keine Komplementation; n.b.: nicht bestimmt.

Durch die Plasmide pCos23 und p23-1, die das Gen des ribosomalen L13-Proteins tragen, konnten die temperatursensitiven Mutationen in den Komponenten *SecA*, *SecY* und der *Signalpeptidase* supprimiert werden. Die Suppression weiterer temperatursensitiver Mutationen wie die der Hitzeschockproteine *DnaK* und *GroEL*, sowie des Enzyms der Glykolyse *Fruktose-1.6.-diphosphataldolase* wurde nicht erreicht. Auch wurden die durch Inaktivierung der Gene *secA* (BA13, *secA* Am) bzw. *secB* (CK1953, *secB::*Tn5) bedingte Wachstumshemmung, sowie die kältesensitive Mutation im *secE* Gen durch die Wirkung von *L13* nicht aufgehoben. Das Plasmid pOF39, welches die Gene der Hitzeschockproteine *GroEL*, *GroES* trägt, war in der Lage neben den temperatursensitiven Mutationen im *secA*, *secY* und *lep* Gen wie erwartet auch die Mutation im *groEL* Gen zu komplementieren. Diese pleiotrope Wirkung wurde bereits von van Dyk et al.(1989) beschrieben.

3.1.9. Lokalisation des heterologen *L13* Proteins in der *E.coli* Mutante MM52

Zum Verständnis der Wirkungsweise des *L13* Proteins in der *E.coli* Mutante MM52 wurde untersucht, ob ein Einbau des Proteins in die Ribosomen von *E.coli* erfolgt. Hierzu wurden nach der Vorschrift von Rheinberger et al.(1988) die Ribosomen durch Saccharose-Gradientenzentrifugation aus den Stämmen MC4100/pUC18, MM52/pUC18 und MM52/pUC23-3 isoliert und die ribosomalen Proteine nach Extraktion mit Essigsäure über zweidimensionale Gelelektrophorese dargestellt (nach Hardy et al.,1969; Isono und Isono, 1978; Geyl et al.,1981). Abbildung 11 zeigt unter A das ribosomale Proteinmuster des Stamms MC4100/pUC18, die Beschriftung eindeutig identifizierbarer Proteinspots erfolgte nach Geyl et al. (1981). Die unter B und C

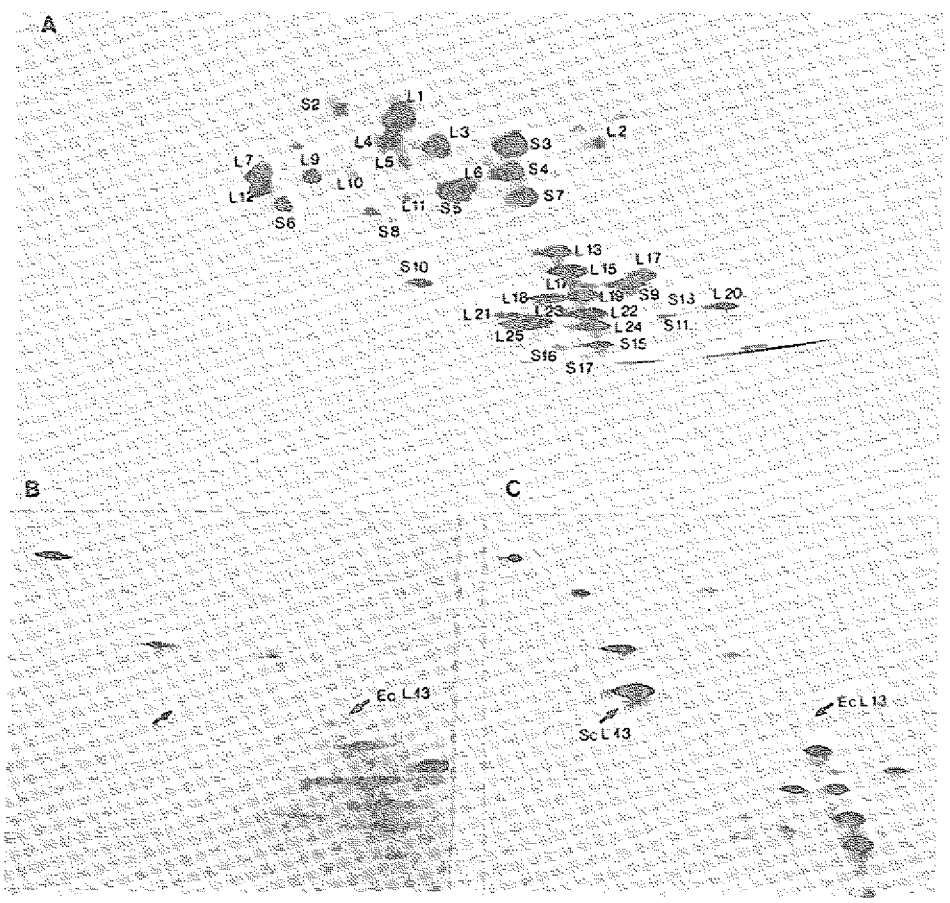


Abb.11 Zweidimensionale Gelelektrophorese der ribosomalen Proteine aus *E.coli* MC4100/pUC18 (A), MM52/pUC18 (B) und MM52/pUC23-3 (C); mit Pfeil markiert ist das *L13* Protein aus *E.coli* (EcL13) bzw. *S.carnosus* (ScL13).

dargestellten Extrakte wurden aus dem Stamm MM52/pUC18 bzw. MM52/pUC23-3 gewonnen, und präsentieren den relevanten Ausschnitt des ribosomalen Proteinmusters.

Erwartungsgemäß zeigte die Mutante MM52/pUC18 im Vergleich zum Wildtyp MC4100/pUC18 keinen Unterschied im ribosomalen Proteinmuster. Zwischen Abb.11 B (MM52/pUC18) und C (MM52/pUC23-3) war jedoch ein deutlicher Unterschied sichtbar; hier erschien (durch den Pfeil Sc L13 markiert) ein zusätzlicher Punkt unterhalb des ribosomalen Proteins *S5*, an der vergleichbaren Stelle in Abb.11 B war kein Proteinspot zu erkennen. Das *L13* Protein von *E.coli* (Pfeil Ec L13) war nur reduziert vorhanden.
Die Ergebnisse zeigen, daß nach Expression des *rplM* Gens aus *S.carnosus* in *E.coli* das heterologe *L13* Protein in die Ribosomen von *E.coli* eingebaut wird, hierbei liegt es in größerer Menge als das homologe *L13* vor.

3.1.10. Untersuchungen zum Wachstum, Proteintransport und zur Proteinsynthese des komplementierten Stamms MM52/pCos23

Zur weiteren Charakterisierung wurde der Einfluß der Expression des heterologen *L13* Proteins auf das Wachstum, die Proteinbiosynthese und die Proteintranslokation in *E.coli* untersucht.
Die Anzucht der Stämme MM52/pHC79 und MM52/pCos23 erfolgte über Nacht bei 30°C in Minimalmedium mit Glyzerin und Maltose. Die Kulturen wurden in dem gleichen Medium auf eine OD_{578nm} von 0,025 verdünnt und nach etwa einstündigem Wachstum in der frühen exponentiellen Phase geteilt. Ein Teil wurde weiterhin bei 30°C kultiviert, während der andere Teil bei der nichtpermissiven Temperatur von 42°C inkubiert wurde. Nach 2- bis 4-stündiger Kultivierung, bei der beide Stämme vergleichbare Wachstumsraten aufwiesen (gemessen an OD Zunahme, siehe Abb.12), wurden die Kulturen auf eine OD_{578} von 0,1 eigestellt und eine Minute bei 30°C bzw.42°C mit ^{35}S-Methionin markiert. Die Probennahme erfolgte zu den in Abbildung 13 angegebenen Zeiten. Als Markerprotein für den Export wurde das Protein der äußeren Membran *OmpA* mit Antikörpern gefällt, nicht-prozessierte und reife Form über SDS-PAGE getrennt und durch Flourographie dargestellt.

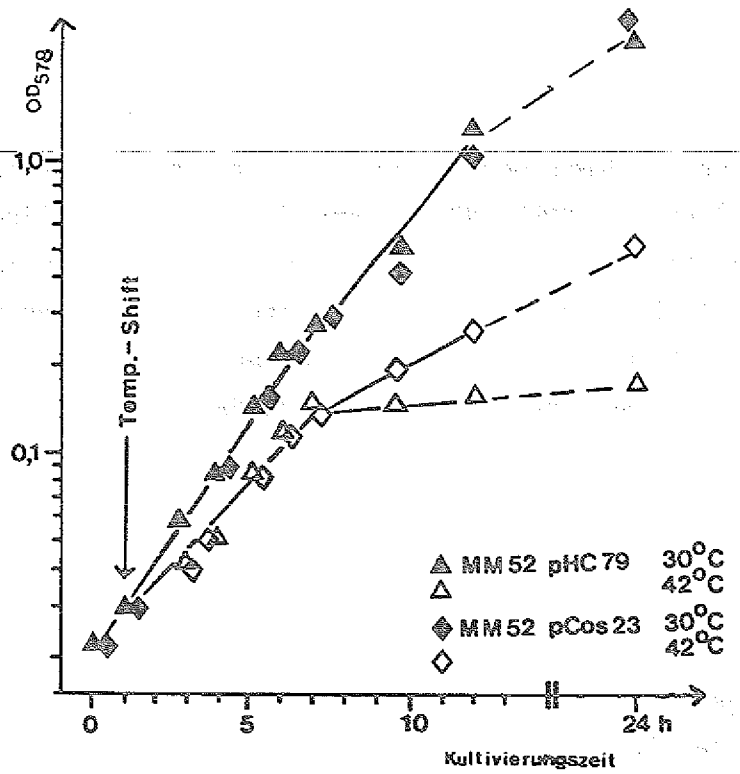


Abb.12 Wachstum der *E.coli* Stämme MM52/pHC79 und MM52/pCos23 bei 30°C und 42°C in Minimalmedium.

Wie Abbildung 12 dargestellt, war das Wachstum der Stämme MM52/pHC79 und MM52/pCos23 nahezu identisch. Während beide Kulturen bei 30°C über den gesamten Meßzeitraum eine vergleichbare OD Zunahme zeigten, wurde nach sechsstündiger Kultivierung bei 42°C der komplementierende Effekt des Cosmids pCos23 deutlich, die OD_{578} erreichte einen Endwert von 0,48. Im Gegensatz dazu wirkte sich der temperatursensitive *secA* Defekt im Stamm MM52/pHC79 nach 6 Stunden vollkommen aus, so daß nur eine geringe Zunahme der OD_{578} auf 0,17 verzeichnet werden konnte.

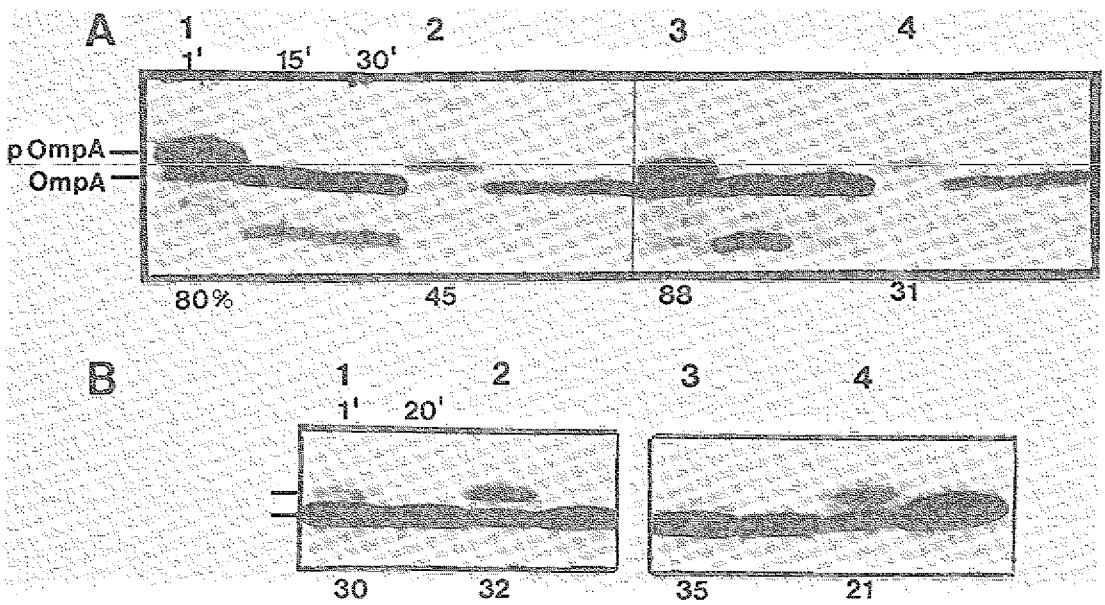


Abb.13 Prozessierung von *pOmpA* in den *E.coli* Stämmen MM52/pHC79 und MM52/pCos23 nach Kultivierung bei 30°C und 42°C; Markierungstemperatur 30°C (A) bzw.42°C (B); MM52/pHC79 30°C (1) und 42°C (2); MM52/pCos23 30°C (3) und 42°C (4); 'Chase'-Zeiten: 1,15,30 bzw. 1, 20 Minuten; Prozentzahlen in der Abbildung geben die ^{35}S-Methioninaufnahme der jeweiligen Stämme an.

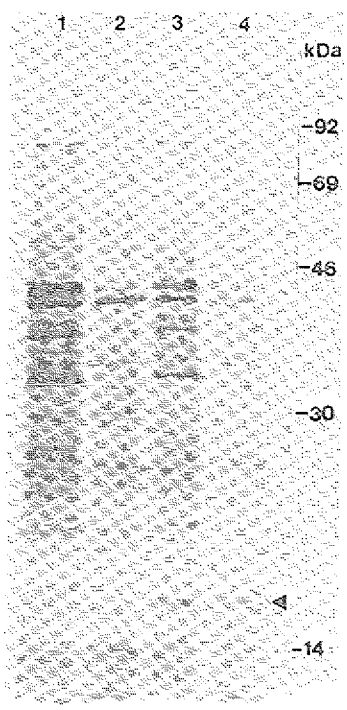


Abb.14 Proteinsynthesemuster der ^{35}S-Methionin markierten *E.coli* Stämme MM52/pHC79 und MM52/pCos23 nach vierstündiger Kultivierung bei 30°C und 42°C; MM52/pHC79 30°C (1) und 42°C (2), MM52/pCos23 30°C (3) und 42°C (4).

Die Auswirkungen der *secA* Mutation auf die Proteinprozessierung verdeutlichten sich in Abbildung 13. Bereits bei 30°C kam es zur Akkumulation des Vorläuferproteins *pOmpA*, nach Kultivierung bei 42°C verstärkte sich dieser Effekt, hier lag kaum reife Form vor (Abb.13 A 1,2). Durch 15 minütige Inkubation konnte die nicht-prozessierte Form in das reife Protein *OmpA* überführt werden. Die Kinetik der Prozessierung wurde durch Inkubation bei 42°C beschleunigt (Abb.13 B 1,2). Hier war das Verhältnis der beiden Formen zu Gunsten des reifen Proteins *OmpA* verschoben.
Auch beim Stamm MM52/pCos23 kam es zur Akkumulation der nicht prozessierten Form (Abb.13 A 3). Bei vergleichbarer ^{35}S-Methionin Aufnahme (88 gegenüber 80%) war diese Akkumulation jedoch bei 30°C im Vergleich zum Stamm MM52/pHC79 vermindert. Deutlicher wurde dies bei der Markierungstemperatur von 42°C, hier konnten nur sehr geringe Mengen des nicht-prozessierten Proteins nachgewiesen werden (Abb. 13 B 3).
Um das Proteinsynthesemuster der Kulturen MM52/pHC79 und MM52/pCos23 zu untersuchen, wurden die Zellextrakte der markierten Kulturen über SDS-PAGE getrennt und das Proteinmuster durch Autoradiographie dargestellt (Abb.14). Das Proteinmuster der bei 30 und 42°C kultivierten Stämme MM52/pHC79 (Abb.14 Spur 1 und 2) und MM52/pCos23 (Abb.14, Spur 3 und 4) war vergleichbar. Die Extrakte der beiden Stämme zeigten bei 42°C ein verändertes Synthesemuster, welches auf die Bildung von Hitzeschockproteinen zurückgeführt werden konnte. Auffallend war die beim Stamm MM52/pCos23 zusätzlich auftretende Proteinbande bei ca. 16kDa (Abb.14, Pfeil). Hierbei handelte es sich um das durch das Cosmid exprimierte *L13* Protein.
Der durch das Cosmid pCos23 komplementierte Stamm MM52 zeigt im Vergleich zur Kontrolle MM52/pHC79 ein verbessertes Wachstum nach längerer Kultivierung bei 42°C. Die bei 30°C gewachsene Kultur MM52/pCos23 weist im Vergleich zu MM52/pHC79 eine verminderte Akkumulation des Vorläuferproteins *pOmpA* auf, dieser Effekt verdeutlicht sich bei der Markierungstemperatur von 42°C. Es konnte zwischen den untersuchten Stämmen keine unterschiedliche ^{35}S-Methioninaufnahme gemessen werden, was auf vergleichbare Proteinsyntheseraten schließen läßt.

3.1.11. Proteintransport in den durch p23-1 supprimierten *E.coli* Mutanten MM52, IQ85 und IT41

Der Einfluß des *L13* Proteins auf die Kinetik des Proteintransports sollte in den *E.coli* Stämmen MM52 (*secA* Ts), IQ85 (*secY* Ts) und IT41 (*lep* Ts) untersucht werden, in denen der Wachstumsdefekt durch das *L13* Protein supprimiert wurde. Die Stämme wurden mit den Plasmiden pUC18 und p23-1 transformiert und für die Markierung in Minimalmedium mit Glycerin und Maltose angezogen. Für die Anzucht der Stämme IQ85 und IT41 wurde dem Medium 0,2mM IPTG zugesetzt (s.u.).

Nach den in Abbildung 16 angegegebenen Kultivierungszeiten bei der nicht-permissiven Temperatur erfolgte die Markierung mit ^{35}S-Methionin für eine Minute (MM52, IQ85) bzw. 10 Sekunden (IT41) bei 30°C.

Zahlreiche Suppressoren zu den temperatursensitiven Mutationen im *secA* und *secY* Gen reduzieren die Proteinbiosynthese (Lee und Beckwith,1986). Um den Effekt dieser Reduktion auf den Proteintransport zu untersuchen, wurde das Antibiotikum Chloramphenikol der Kultur MM52/pUC18 20 Minuten vor Beginn der Markierung in einer Konzentration von 1µg/ml zugesetzt.

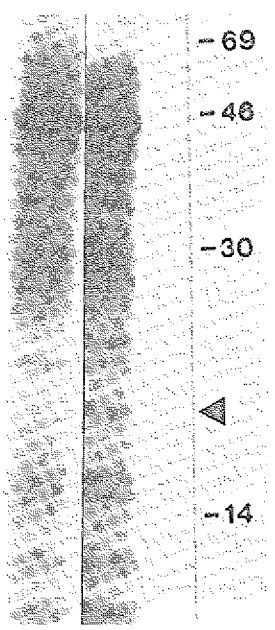


Abb.15 Proteinsynthesemuster der *E.coli* Stämme IQ85/pUC18 und p23-1 nach Kultivierung in Gegenwart von 0,2mM IPTG; Pfeil markiert *L13* Protein.

Hinsichtlich des Wachstums zeigten die vergleichbaren Kulturen bei 30°C und bei 42°C keine Unterschiede. Den Kulturen IQ85 und IT41 wurde IPTG in einer Konzentration von 0,2mM zugesetzt. Hierdurch sollte die Expression des dem *lacZ* Promotor entgegengesetzt klonierten *rplM* Gens auf ein Maß reduziert werden, das für die Suppression ausreichte (Suppression in Gegenwart von 0,2mM IPTG war möglich, für das Wachstum von IT41/p23-1 sogar förderlich). Daß unter diesen Bedingungen *L13* gebildet wurde, zeigt Abbildung 15.

Nach einminütiger Markierung des bei 30°C gewachsenen Stamms MM52/pUC18 zeigte sich eine Akkumulation des Vorläuferproteins *pOmpA* (Abb.16 A 1). Im Vergleich dazu konnte durch das Plasmid p23-1 bei einem leicht verminderten Einbau von ^{35}S-Methionin (29% gegenüber 38%) eine Reduktion der Vorläuferakkumulation erreicht werden (Abb.16 A 2). Dies steht in Übereinstimmung mit dem in Abschnitt 3.1.11 beschriebenen Ergebnis für das Plasmid pCos23. Dreistündiges Wachstum bei 42°C führte zu einer Reduktion der Proteinsynthese (Abb.16 A 3 und 1, MM52/pUC18 42°C, 11% gegenüber 38%), was sich jedoch bei der Kultur MM52/p23-1 nicht in diesem Maße auswirkte (Abb.16 A 4 und 2, 16% gegenüber 29%). Obwohl im Vergleich zum Stamm MM52/pUC18 (42°C) größere Mengen an *pOmpA* vorlagen, konnten diese wie bei MM52/pUC18 (30°C) innerhalb von 4 Minuten prozessiert werden.

Im Stamm IQ85/pUC18 30°C (Abb.16 B) konnte nur nach einminütiger Markierung nicht-prozessiertes Protein nachgewiesen werden. Wie auch für den Stamm MM52 beschrieben verursachte das Plasmid p23-1 bei leicht vermindertem ^{35}S-Methionineinbau (43% gegenüber 59%) eine Reduktion der Vorläuferakkumulation (Abb.16 B 1 und 2). Nach zweistündiger Kultivierung bei 42°C prägte sich der *secY* Defekt deutlich aus, hier kam es zu einer starken Anhäufung von *pOmpA*, die über den Meßzeitraum von 5 Minuten nur leicht vermindert werden konnte (Abb.16 B 3 und 4).

Die für den Stamm IT41 gewählte Markierungszeit von 10 Sekunden, sowie die Probenahmezeiten von maximal einer Minute erwiesen sich als zu kurz (Abb.16 C). Hier wurde innerhalb von einer Minute keine Prozessierung des Vorläufers beobachtet. Es konnte jedoch festgestellt werden, daß die Expression des *L13* Proteins sowohl bei 30°C als auch bei 42°C eine Reduktion der Methioninaufnahme verursachte (bei 30°C 0,4% gegenüber 1,6%; bei 42°C 0,7% gegenüber 6,8%). Durch die verminderte Proteinbiosynthese war die Akkumulation des *OmpA* Vorläufers im Stamm IT41/p23-1 im Vergleich zum Stamm IT41/pUC18 vermindert (Abb.16 C 2 und 1, 4 und 3).

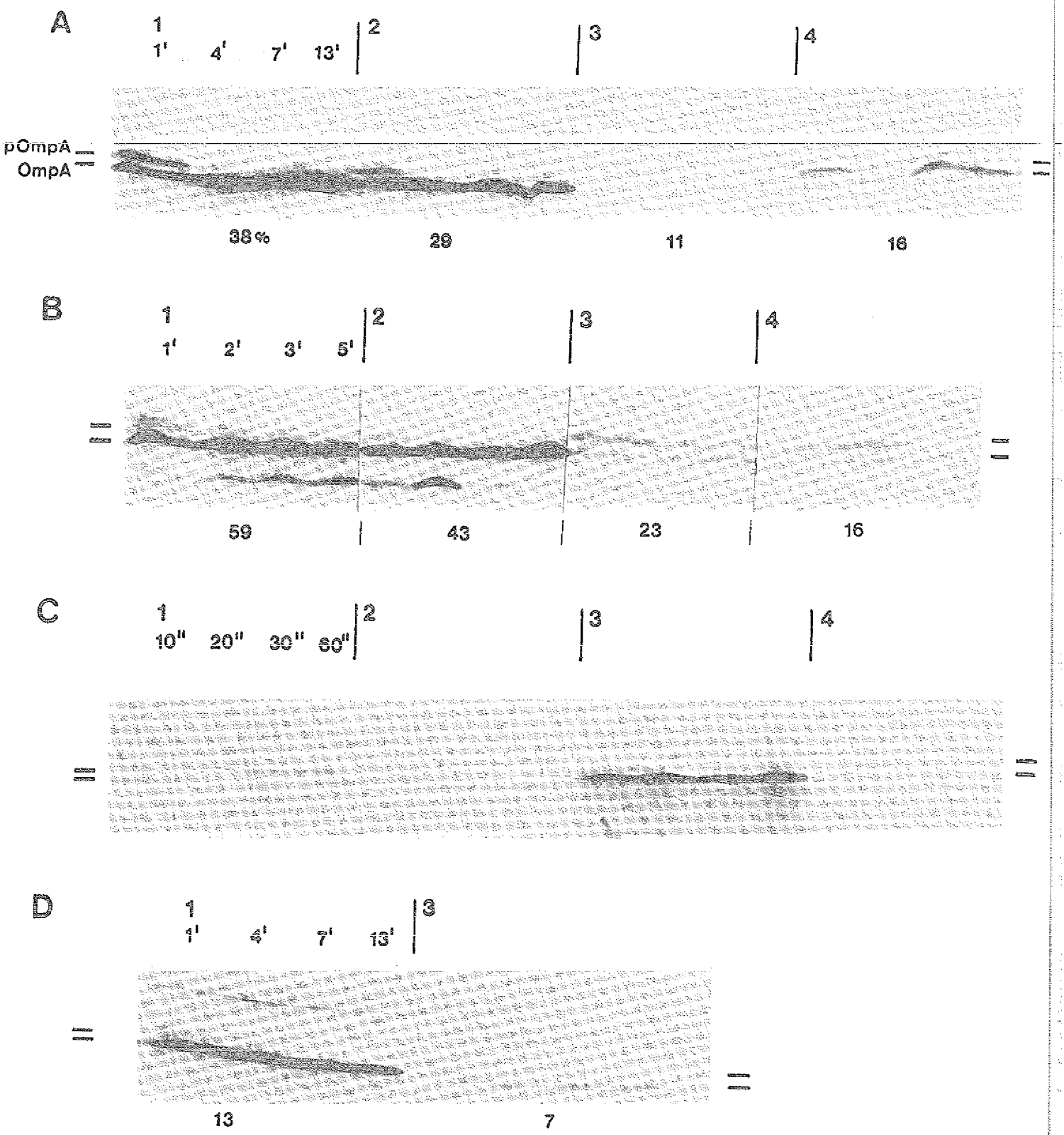


Abb.16 Kinetik der Proteinprozessierung in unterschiedlichen Exportmutanten von *E.coli* mit den Plasmiden pUC18 und p23-1; A: MM52, 3h bei 30 bzw. 42°C, Probennahme 1,4,7,13 Minuten; B: IQ85, 2h bei 30 bzw. 42°C, Probennahme 1,23,5 Minuten; C: IT41, 1h bei 30 bzw.42°C, Probennahme 10, 20,30, 60 Sekunden; D: MM52/pUC18 20 Minuten vor Markierung mit 1µg/ml Chloramphenikol inkubiert, Kultivierung und Probennahme wie unter A; 1 pUC18 30°C, 2 p23-1 30°C, 3 pUC18 42°C, 4 p23-1 42°C; Aufnahme von ^{35}S-Methionin ist als Prozentzahl unter der jeweiligen Abbildung angegeben.

Das in Abbildung 16 D dargestellte Experiment sollte eine Aussage über die Auswirkung reduzierter Proteinbiosyntheserate auf die Prozessierungskinetik von MM52/pUC18 geben. Im Vergleich zur Abbildung 16 A wurde durch 1µg Chloramphenikol/ml Kultur der Einbau von ^{35}S-Methionin bei 30°C von 38% auf 13% gesenkt; da durch Ausprägung der *secA* Mutation bei 42°C ebenfalls die Proteinsynthese reduziert wurde, war kein deutlicher Unterschied zu der bei 42°C in Gegenwart des Antibiotikums gewachsenen Zellen festzustel-len (7% gegenüber 11%). Jedoch wurde durch Zugabe von Chloramphenikol die Akkumulation des Vorläufers deutlich reduziert; während in Abwesenheit des Antibiotikums nach einminütiger Markierung *pOmpA* und *OmpA* in gleichen Mengen vorlagen (Abb.16 A 1), war das Verhältnis in Gegenwart des Inhibitors deutlich zu Gunsten der reifen Form verschoben (Abb.16 D 1). Das Plasmid p23-1 führte in den untersuchten Stämmen zu einer Reduktion der *OmpA*-Vorläufer Akkumulation. Bei unverändertem Wachstum zeigten die Stämme MM52 und IQ85 eine leichte, der Stamm IT41 eine deutlichere Reduktion der ^{35}S-Methionin Aufnahme. Wie aus anderen Experimenten geschlossen werden konnte, war die Bestimmung des Methionineinbaus großen Schwankungen unterworfen, so daß Unterschiede von 15% nicht als signifikant angesehen werden konnten. Durch Reduktion der Proteinsynthese in Gegenwart von 1µg Chloramphenikol/ml wurde ein ähnliches Bild erhalten. Auch hier kam es zu einer verminderten Akkumulation des Vorläufers, jedoch wurde die Aufnahme des radioaktiven Methionins deutlicher gehemmt als durch das Plasmid p23-1.

3.1.12. Proteintransport im *E.coli* Wildtyp JM109 nach Expression unterschiedlicher Mengen des *L13* Proteins aus *S.carnosus*

Dieses Experiment sollte Aussage darüber geben, ob durch starke Expression des ribosomalen Proteins *L13* die Kinetik des Proteintransports im *E.coli* Wildtyp beinflußt wird. Hierzu wurde der Stamm JM109 mit den Plasmiden pUC18, p23-1, p23-2 und pKK23-1 transformiert und bei 25°C in Minimalmedium mit Glukose angezogen (Abb.17). Eine Stunde vor der Markierung wurden die Zellen gewaschen und in Gegenwart von 1mM IPTG weiterhin bei 25°C inkubiert. Die Induktion des *L13* Proteins wurde auf einem SDS-Polyacrylamidgel überprüft, sie konnte in den Extrakten der Stämme JM109/p23-2, sowie pKK23-1, der die größte Konzentration aufwies, dargestellt werden (nicht abgebildet). Die Zellen wurden bei einer OD_{578} von 0,1 für 30 Sekunden bei 25°C mit ^{35}S- Methionin markiert, Proben zu den in Abbildung 17 angegebenen Zeitpunkten entnommen und die Prozessierungskinetik des Membranproteins *OmpA* untersucht.

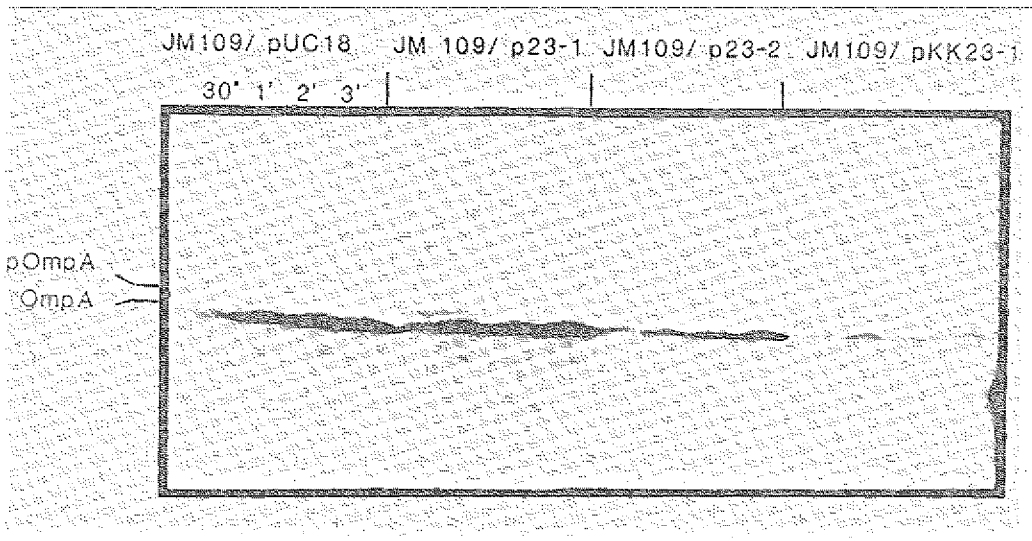


Abb.17 Untersuchungen zum Proteintransport im *E.coli* Wiltyp JM109/pUC18, p23-1, p23-2 und pKK23-1

Abbildung 17 verdeutlicht, daß die Syntheserate des *pOmpA* Proteins mit zunehmender Konzentration des *L13* Proteins abnahm, dies korrelierte mit dem Einbau des ^{35}S-Methionins (pUC18 14%, p23-1 12%, p23-2 7%, pKK23-1 2%). Der Stamm JM109/pKK23-1 mit der geringsten Einbaurate (2%) zeigte schon bei der Anzucht der Zellen ein reduziertes Wachstum, während die Zunahme der OD_{578nm} der übrigen Kulturen identisch war. In allen Markierungsansätzen wurde der Vorläufer des *OmpA* Proteins innerhalb von einer Minute in die reife Form überführt.

Das ribosomale Protein *L13* führt bei starker Expression im *E.coli* Wildtypstamm JM109 zu einer Reduktion der Proteinsyntheserate, wodurch auch das Wachstum der Zellen beeinflußt wird. Die Kinetik der Proteinprozessierung bleibt jedoch unverändert.

3.2. ISOLIERUNG EINES *SECA* HOMOLOGEN DNA-FRAGMENTS AUS *BACILLUS SUBTILIS*

3.2.1. Hybridisierung einer *secA* Sonde aus *Escherichia coli* gegen chromosomale DNA aus Gram-positiven Organismen

Chromosomale DNA aus *S.carnosus* TM300, *B.subtilis* DB104 und *E.coli* MC4100 wurden nach der Vorschrift von Rescei et al. (1987) präpariert. Hierbei wurden die Zellen von *S.carnosus* wie angegeben mit *Lysostaphin* und *Lysozym* aufgeschlossen, während der Aufschluß der *B.subtilis* und *E.coli* Zellen nur mit *Lysozym* erfolgte. Die DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI vollständig gespalten. Nach Trennung der DNA Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese und Transfer auf eine Nylonmembran wurden die Membranen der Länge nach in Streifen geschnitten und unter verschiedenen Bedingungen gegen das *secA* Gen aus *E.coli* als Sonde hybridisiert. Hierbei variierten sowohl die Temperatur, als auch die Formamidkonzentration.
Als DNA Sonde wurde das 2,5kB große *Nco*I Fragment aus dem Plasmid pMF8, welches das *secA* Gen aus *E.coli* trägt, nach Markierung mit Digoxygenin-11-dUTP eingesetzt.

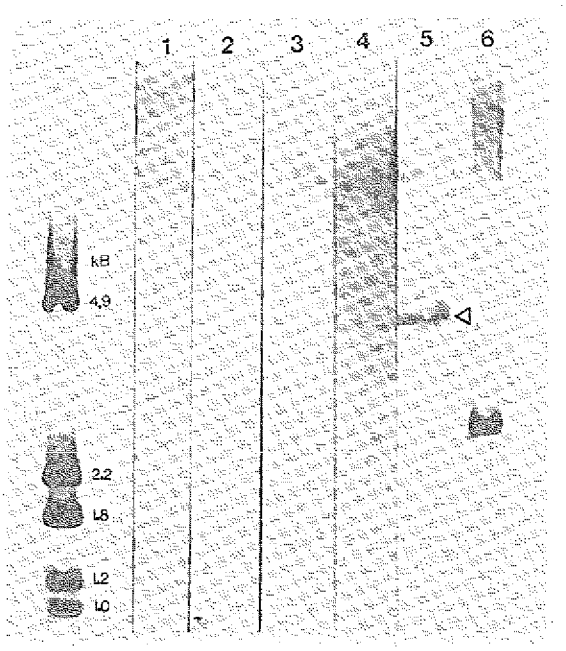


Abb.18 Southern Hybridisierung des *secA* Gens aus *E.coli* gegen chromosomale DNA aus *E.coli* und *S.carnosus* unter unterschiedlichen Bedingungen: Spur 1 bis 5 chromosomale DNA aus TM300, Spur 6 aus MC4100; 1) wäßrige Lösung 42°C, 2) wäßrige Lösung 52°C, 3) wäßrige Lösung 62°C, 4) 20% Formamid 20°C, 5) und 6) 20% Formamid 42°C.

Wie in Abbildung 18 Spur 6 zu ersehen, erhielt man bei 2.5kB das für *E.coli* typische Signal. Die Inkubationsbedingungen in wäßriger Lösung, wie in Spur 1 bis 3 dargestellt, waren für die Hybridisierung gegen chromosomale DNA von *S.carnosus* ungeeignet, hier war kein spezifisches Signal sichtbar. In Gegenwart von 20% Formamid bei 20°C erschienen mehrere Banden, die jedoch auch durch unspezifische Reaktionen zustande kamen. Ein einzelnes spezifisches Signal in der Größe von ca. 4,5 kB war in Spur 5 deutlich zu erkennen. Diese reduzierten Stringenzbedingungen bei 20% Formamid und 42°C waren auch für die Southern Hybridisierung der *E.coli secA*-Sonde gegen chromosomale DNA aus *B.subtilis* DB104 (Daten nicht abgebildet) geeignet. Hier konnte ein *Eco*RI Fragment von ca. 5,5kB dargestellt werden.

3.2.2 Isolierung und Subklonierung eines *secA* homologen DNA Fragments aus *Bacillus subtilis*

Mit dem *secA* Gen aus *E.coli* als DNA Sonde wurde eine *Lambda* gt11 Genbank von *B.subtilis* ATCC 6057 (Fa. Clonetech, Palo Alto, Californien) mit Hilfe der Methode der Plaquehybridisierung durchgemustert. Unter den gewählten reduzierten Stringenzbedingungen wurde ein positiver Klon erhalten. Die Präparation der Phagen DNA erfolgte aus einer 2l Kultur nach Sambrook et al.(1989). Nach Restriktion mit dem Enzym *Eco*RI wurde das inserierte 3,9kB große Fragment in den mit *Eco*RI linearisierten Vektor pUC18 subkloniert. Die resultierenden Plasmide psecA1 und psecA2 sind in Abbildung 19 dargestellt.

Um zu überprüfen, ob dieses isolierte Fragment spezifisch gegen das *secA* Gen aus *E.coli* reagiert, wurde eine Hybridisierung gegen chromosomale DNA aus *B.subtilis* und *E.coli* durchgeführt, wobei als Sonde zum Einen das *Nco*I Fragment aus *E.coli*, zum Anderen das aus der *Bacillus*-Genbank isolierte *Eco*RI Fragment diente (Abb.20).

Die aus *E.coli* und *B.subtilis* eingesetzten DNA Sonden reagierten gegenüber chromosomaler DNA aus *E.coli*, *B.subtilis* und *S.carnosus* TM300 (Abb.20; Spur 1,3,6) gleich; durch beide Sonden wurden Fragmente gleicher Größe markiert. Die Größe der markierten Fragmente betrug bei *E.coli* 2,5kB, bei *B.subtilis* 5,5kB und bei *S.carnosus* 3,9kB.

Dieses Ergebnis zeigt, daß das aus *B.subtilis* isolierte DNA Fragment Homologie zum *secA* Gen aus *E.coli* aufweist.

Die heterologen DNA-Proben verdeutlichten den Nachteil dieser Methode.

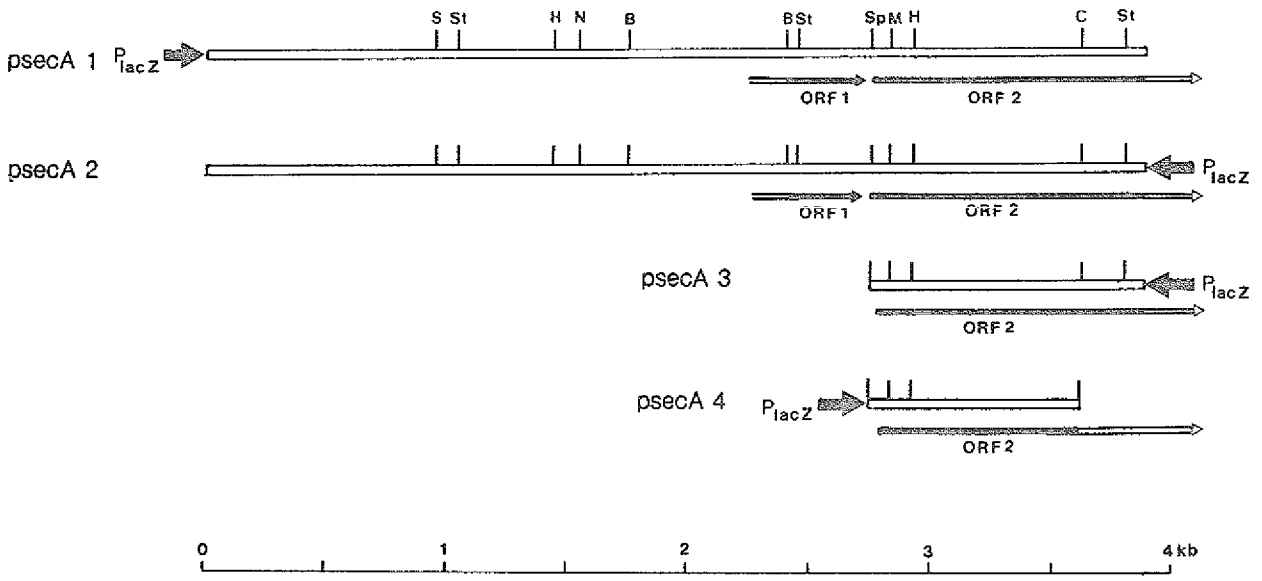


Abb.19 Kartierung der Plasmide psecA1-4, die das *secA* homologe Fragment aus *B.subtilis* tragen; B *Bgl*II, C *Cla*I, H *Hin*dIII, M *Mlu*I, N *Nsi*I, S *Sph*I, Sp *Spe*I, St *Sty*I

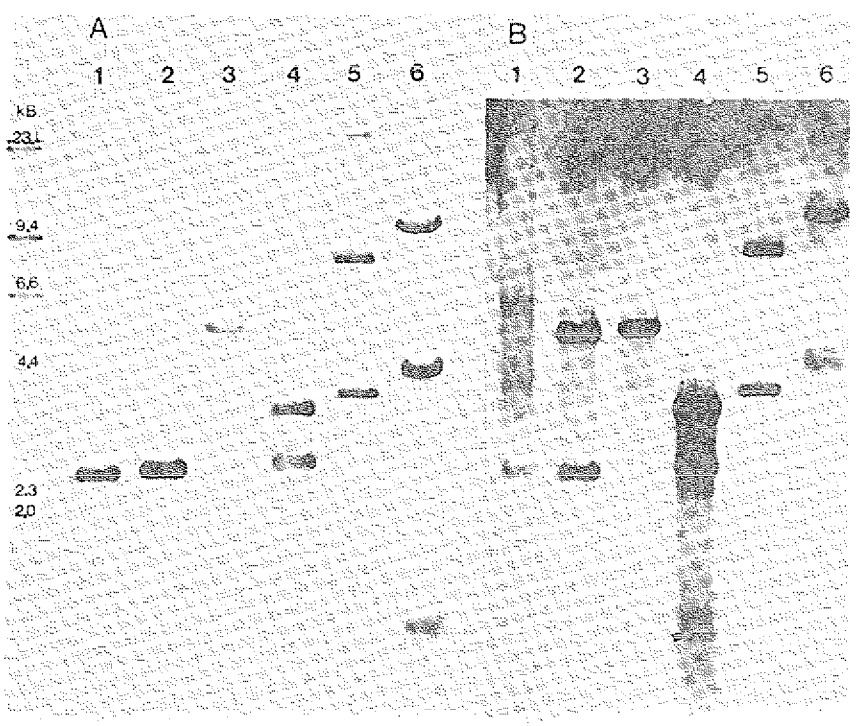


Abb.20 Southern Hybridisierung mit den DNA Sonden *secA* aus *E.coli* und dem *Eco*RI Fragment aus *B.subtilis*; A *Nco*I Fragment aus *E.coli* als Sonde; B *Eco*RI Fragment aus *B.subtilis* als DNA Sonde; (1) chrom.DNA MC4100 x *Eco*RI; (2) pMF8 x *Nco*I; (3) chrom.DNA DB104 x *Eco*RI, (4) psecA1 x *Eco*RI; (5) pOF39; (6) chrom.DNA TM300 x *Eco*RI.

Zwar wurde durch Hybridisierung gegen das jeweils aus dem Organismus isolierte Fragment ein eindeutig positives Signal erhalten (siehe Abb.20 A, Spur 2 hier ist das 2,5kB Fragment stärker markiert als der Vektor; siehe B Spur 4, hier ist das 3,9 kB Fragment stärker markiert als der Vektor), jedoch wurde bei der Hybridisierung gegen das *secA* tragende Plasmid aus dem heterologen Organismus neben dem *secA* Fragment auch der Vektor markiert. Dies wurde auch bei der Hybridisierung gegen das als Negativkontrolle eingesetzte Plasmid pOF39, welches das *groELES* Gen trägt, deutlich. Durch die Hybridisierung unter den hier gewählten, niedrigen Stringenzbedingungen kam es zu unspezifischen Reaktionen. Allgemein galt, daß zunehmende Größe und zunehmende Konzentration der DNA verstärkt zu unspezifischen Signalen führten. Die hier unter niedrigen Stringenzbedingungen angewandte Methode eignet sich somit nur für die Hybridisierung gegenüber chromosomaler DNA.

3.2.3. Sequenzierung und Homologievergleich des *secA*-homologen Fragments aus *B.subtilis*

Das aus *B.subtilis* isolierte *secA* homologe Fragment wurde sequenziert und seine Aminosäuresequenz mit dem *SecA* Protein aus *E.coli* verglichen.
Die für die Sequenzierung verwendeten Klone wurden mittels Subklonierung und Herstellung von Deletionsklonen durch *Exonuklease*III gewonnen und beide DNA Stränge nach der Methode von Sanger et al.(1977) sequenziert. Abbildung 21 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des 1,4 kB Fragments aus psecA1, sowie das Restriktionsmuster des sequenzierten Bereichs.

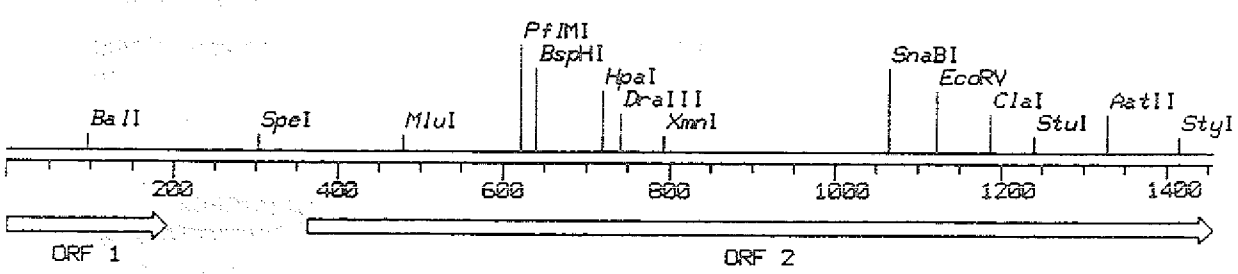


Abb.21 a) Restriktionskartierung des sequenzierten *secA* homologen Fragments aus *B.subtilis*;
Pfeile markieren die offenen Leserahmen (ORF1 und 2).

Abb.21 b) Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des 1,4 kB *secA* homologen Fragmentes aus psecA1; vermutete -35 und -10 Region, sowie die Ribosomenbindungstelle (RBS) sind unterstrichen; Pfeile zeigen palindromische Sequenz an.

```
            10        20        30        40        50        60
             |         |         |         |         |         |
   1 AGAAGAGGAGGAGAGCTTGGACATTGTCCGTCAGAAACGCTTTAATTTAAAGCCGATGGATAGTGA
      GluGluGluGluSerLeuAspIleValArgGlnLysArgPheAsnLeuLysProMETAspSerGlu

  67 AGAAGCGATCTTGCAAATGAATATGCTTGGCCATAATTTCTTTGTTTTCACAAATGCGGAAACAAA
      GluAlaIleLeuGlnMETAsnMETLeuGlyHisAsnPhePheValPheThrAsnAlaGluThrAsn

 133 CCTTACAAATGTCGTGTACCGCAGAAATGACGGGAAATATGGCTTAATTGAACCGACTGAATAATG
      LeuThrAsnValValTyrArgArgAsnAspGlyLysTyrGlyLeuIleGluProThrGlu

 199 AAGAGAAGCCTTCCGTGATGTTCGCGGAAGGTTTTTGTTTTTCTTATTTGCAAATTCTTTGGAAAT
                                                                  -35

 265 AACAAAAGGTATGATATGATAATGAGAGGTATACATGGACTAGTAAATTATTTATACATGCCTTTA
                    -10

 331 AAATAGGCATGTGATGATAGAGGAGCGTTATAAATGCTTGGAATTTTAAATAAAATGTTTGATCCA
                            RBS          METLeuGlyIleLeuAsnLysMETPheAspPro

 397 ACAAAACGTACGCTGAATAGATACGAAAAAATTGCTAACGATATTGATGCGATTCGCGGAGACTAT
     ThrLysArgThrLeuAsnArgTyrGluLysIleAlaAsnAspIleAspAlaIleArgGlyAspTyr

 463 GAAAATCTCTCTGACGACGCGTTGAAACATAAAACAATTGAATTTAAAGAGCGCCTTGAAAAAGGG
     GluAsnLeuSerAspAspAlaLeuLysHisLysThrIleGluPheLysGluArgLeuGluLysGly

 529 GCGACAACGGATGATCTTCTTGTTGAAGCTTTCGCTGTTGTTCGAGAAGCTTCACGCCGCGTAACA
     AlaThrThrAspAspLeuLeuValGluAlaPheAlaValValArgGluAlaSerArgArgValThr

 595 GGCATGTTTCCGTTTAAAGTCCAGCTCATGGGGGGCGTGGCGCTTCATGACGGAAATATCGCGGAA
     GlyMETPheProPheLysValGlnLeuMETGlyGlyValAlaLeuHisAspGlyAsnIleAlaGlu

 661 ATGAAAACAGGGGAAGGGAAAACATTAACGTCTACTCTGCCTGTTTATTTAAATGCGTTAACAGGT
     METLysThrGlyGluGlyLysThrLeuThrSerThrLeuProValTyrLeuAsnAlaLeuThrGly

 727 AAAGGCGTACACATCGTGACTGTCAACGAATACTTGGCAAGCCGTGACGCTGAGCAAATGGGGAAA
     LysGlyValHisIleValThrValAsnGluTyrLeuAlaSerArgAspAlaGluGlnMETGlyLys

 793 ATTTTCGAGTTTCTCGGTTTGACTGTCGGCTTGAATTTAAACTCAATGTCAAAAGACGAAAAACGG
     IlePheGluPheLeuGlyLeuThrValGlyLeuAsnLeuAsnSerMETSerLysAspGluLysArg

 859 GAAGCTTATGCCGCTGATATTACTTACTCCACAAACAACGAGCTTGGCTTCGACTATTTGCGTGAC
     GluAlaTyrAlaAlaAspIleThrTyrSerThrAsnAsnGluLeuGlyPheAspTyrLeuArgAsp

 925 AATATGGTTCTTTATAAAGAGCAGATGGTTCAGCGCCCGCTTCATTTTGCGGTAATTGATGAAGTT
     AsnMETValLeuTyrLysGluGlnMETValGlnArgProLeuHisPheAlaValIleAspGluVal

 991 GACTCTATTTTAATTGATGAAGCGAGAACACCGCTTATCATTTCTGGACAAGCTGCAAAATCCACT
     AspSerIleLeuIleAspGluAlaArgThrProLeuIleIleSerGlyGlnAlaAlaLysSerThr

1057 AAGCTGTACGTACAGGCAAATGCTTTTGTCCGTACGTTAAAAGCGGAGAAGGATTACACGTACGAT
     LysLeuTyrValGlnAlaAsnAlaPheValArgThrLeuLysAlaGluLysAspTyrThrTyrAsp

1123 ATCAAAACAAAAGCTGTACAGCTTACTGAAGAAGGAATGACGAAGGCGGAAAAAGCGTTCGGCATC
     IleLysThrLysAlaValGlnLeuThrGluGluGlyMETThrLysAlaGluLysAlaPheGlyIle

1189 GATAACCTCTTTGATGTGAAGCATGTCGCGCTCAACCACCATATCAACCAGGCCTTAAAAGCTCAC
     AspAsnLeuPheAspValLysHisValAlaLeuAsnHisHisIleAsnGlnAlaLeuLysAlaHis

1255 GTTGCGATGCAAAAGGACGTTGACTATGTAGTGGAAGACGGACAGGTTGTTATTGTTGATTCCTTC
     ValAlaMETGlnLysAspValAspTyrValValGluAspGlyGlnValValIleValAspSerPhe

1321 ACGGGACGTCTGATGAAAGGCCGCCGCTACAGTGAGGGGCTTCACCAAGCGATTGAAGCAAAGGAA
     ThrGlyArgLeuMETLysGlyArgArgTyrSerGluGlyLeuHisGlnAlaIleGluAlaLysGlu

1387 GGGCTTGAGATTCAAAACGAAAGCATGACCTTGGCGACGATTACGTTCCAAAACTACTTCCGAATG
     GlyLeuGluIleGlnAsnGluSerMETThrLeuAlaThrIleThrPheGlnAsnTyrPheArgMET

1453 TACG
     Tyr
```

Das 1456 Basenpaare umfassende Fragment aus *B.subtilis* trägt zwei unvollständige, offene Leserahmen. Während durch den erste Leserahmen 94 Aminosäuren kodiert werden, besteht das Protein des zweiten Leserahmens aus 364 Resten. Zwischen den beiden Genen befindet sich eine nicht translatierte Sequenz von 170 Basenpaaren, die eine für vegetative Promotoren von *B.subtilis* beschriebene Konsensussequenz aufweist (Abb.21b, -35 und -10 Region; Lewin,1990). Zwischen der -10 Region und dem vermuteten Translationsstart des zweiten offenen Leserahmens befindet sich eine gegenläufige, palindromische Sequenz, die eine Haarnadelstruktur aus 8 Basenpaaren mit einer Schleife von 7 Basenpaaren ausbilden kann (siehe Pfeile in Abb.21b). Die Sequenz -GGAG- stellt eine für *B.subtilis* typische Ribosomenbindungsstelle dar (10 Basenpaare vor dem Translationsstart des zweiten Leserahmens; Harwood,1989).

Das *secA* Operon aus *E.coli* setzt sich aus drei Genen zusammen: dem promotorproximal liegenden *GenX*, dem *secA* und dem *mutT* Gen (Oliver et al.,1990). Während beim Sequenzvergleich des ersten offenen Leserahmens mit der Aminosäuresequenz des *GensX* keine Ähnlichkeiten zu erkennen waren, gab es im zweiten Leserahmen im Vergleich zum N-terminalen Bereich des *SecA* Proteins deutliche Übereinstimmungen. Die Sequenzen sind nach der Methode von Myers und Miller (1988) zu 58 Prozent identisch (in Abb.22 mit ':' gekennzeichnet), weiterhin findet man häufig in gleicher Position Aminosäuren mit gleichen chemischen Eigenschaften (in Abb.22 mit '.' gekennzeichnet). Position 100 bis 107 repräsentiert eine von Matsuyama et al. (1990) beschriebenen *ATPase* Konsensussequenz. Sie ist mit dem entsprechenden Bereich aus *E.coli* nahezu identisch, an Position 101 befindet sich bei *B.subtilis* statt eines Arginins ein Lysin (Abb.22, unterstrichene Sequenz). Aus den angeführten Ergebnissen kann geschlossen werden, daß es sich bei dem aus *B.subtilis* isolierten DNA Fragment um den N-terminalen Teil des *secA* Gens handelt. Im Gegensatz zum *secA* Operon aus *E.coli* scheint das *secA* Gen von *B.subtilis* unter der Kontrolle eines eigenen Promotors zu stehen.

```
B - MLGILNKMFDPTK--RTLNRYEKIANDIDAIRGDYENLSDDALKHKTIEF -48
    ::  :      ..  ::: :  :. : : :.  . : :::. :: :: ::
E - MLIKLLTKVFGSRNDRTLRRMRKVVNIINAMEPEMEKLSDEELKGKTAEF -50

B - KERLEKGATTDDLLVEAFAVVREASRRVTGMFPFKVQLMGGVALHDGNIA -98
    . :::::   . :. :::::::::.:: ::  : :::.::. : .  ::
E - RARLEKGEVLENLIPEAFAVVREASKRVFGMRHFDVQLLGGMVLNERCIA -100

B - EMKTGEGKTLTSTLPVYLNALTGKGVHIVTVNEYLASRDAEQMGKIFEFL -148
    ::.:::::::::.::: :::::::::::::.::::.::: ::::.   .::::
E - EMRTGEGKTLTATLPAYLNALTGKGVHVVTVNDYLAQRDAENNRPLFEFL -150

B - GLTVGLNLNSMSKDEKREAYAADITYSTNNELGFDYLRDNMVLYKEQMVQ -198
    :::::.::  :    :::::::::::: :::: :::::::::    :  ::
E - GLTVGINLPGMPAPAKREAYAADITYGTNNEYGFDYLRDNMAFSPEERVQ -200

B - RPLHFAVIDEVDSILIDEARTPLIISGQAAKSTKLYVQANAFVRTLK--- -245
    : ::.:..:::::::::::::::::::: :  :. .:   :  .  :
E - RKLHYALVDEVDSILIDEARTPLIISGPAEDSSEMYKRVNKIIPHLIRQE -250

B - ---------------AEKDYTYDIKTKAVQLTEEGMTKAEKAFGIDNLFD -280
                    ::     .  . . : :: . :       . :.
E - KEDSETFQGEGHFSVDEKSRQVNLTERGLVLIEELLVKEGIMDEGESLYS -300

B - VKHVALNHHINQALKAHVAMQKDVDYVVEDGQVVIVDSFTGRLMKGRRYS -330
        . : ::.  ::.::    .:::::.: :: :.:::  ::: : :::.:
E - PANIMLMHHVTAALRAHALFTRDVDYIVKDGEVIIVDEHTGRTMQGRRWS -350

B - EGLHQAIEAKEGLEIQNESMTLATITFQNYFRMY -364
    .::::::.::::::. ::::  :::.::::::::.:
E - DGLHQAVEAKEGVQIQNENQTLASITFQNYFRLY -384
```

Abb.22 Aminosäuresequenzvergleich zwischen der N-terminalen Region des *SecA* Proteins aus *E.coli* (Aminosäure 1-383, E) und dem durch den zweiten Leserahmen kodierten Protein von *B.subtilis* (B); ':' markiert identische Aminosäuren, '.' markiert ähnliche Aminosären wie A,S,T; D,E; N,Q; R,K; I,L,M,V; F,Y,W; der unterstrichene Bereich zeigt eine *ATPase* Konsensussequenz an.

3.2.4. Western Blot mit Antikörpern gegen das *SecA* Protein aus *E.coli*

Um zu untersuchen, ob Antikörper gegen das *E.coli SecA* Protein mit einem *SecA*-analogen Protein Gram-positiver Organismen reagieren, wurde ein Western Blot durchgeführt. Hierzu wurden Zellextrakte von *S.carnosus* TM300, *B.subtilis* DB104 und *E.coli* MM52 über eine 7,5% SDS-PAGE getrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Inkubation mit dem Anti-*SecA*-Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in Lösung II (Verdünnung des Antikörpers 1:300). Nach Zugabe des zweiten, an *Peroxidase* gekoppelten Antikörpers und Anfärbung mit Chloronaphthol und H_2O_2 ergab sich das in Abbildung 23 dargestellte Bild. Das für das *SecA* Protein aus *E.coli* typische Signal tritt in Spur 5 bis 8 bei einer Größe von 100 kDa auf. Auch

in Spur 1 und 2 (Extrakt von *S.carnosus* TM300 in unterschiedlichen Konzentrationen) ist eine Bande zu erkennen, die etwas kleiner als die *SecA*-Bande aus *E.coli* zu sein scheint. Im Zellextrakt von *B.subtilis* (Spur 3 und 4) konnte keine Kreuzreaktion sichtbar gemacht werden. Die Ursache hierfür könnte einerseits in einer zu geringen Proteinkonzentration liegen, andererseits könnte das *SecA* Protein aus *Bacillus* zu dem aus *E.coli* so unterschiedlich sein, daß es von den Antikörpern nicht erkannt wird.

Durch die Sequenzierung des 1,4kB großen Fragments aus dem Plasmid psecA1 war der vermutete Translationsstart des *secA* Gens aus *B.subtilis* bekannt. Um dieses Gen unter der Kontrolle des *lac* Promotors exprimieren zu können, wurde ein 0,88kB großes *Spe*I-*Cla*I Fragment aus psecA1 nach Auffüllen der Enden mit *Klenow-Polymerase* in den mit *Sma*I linearisierten Vektor pUC18 subkloniert. Im dem daraus resultierenden Plasmid psecA4 (Abb.19) war das Fragment in der korrekten Orientierung hinter dem *lacZ* Promotor eingebaut und konnte so nach Induktion mit IPTG in sichtbaren Mengen exprimiert werden (siehe Abb.24 A Spur e).

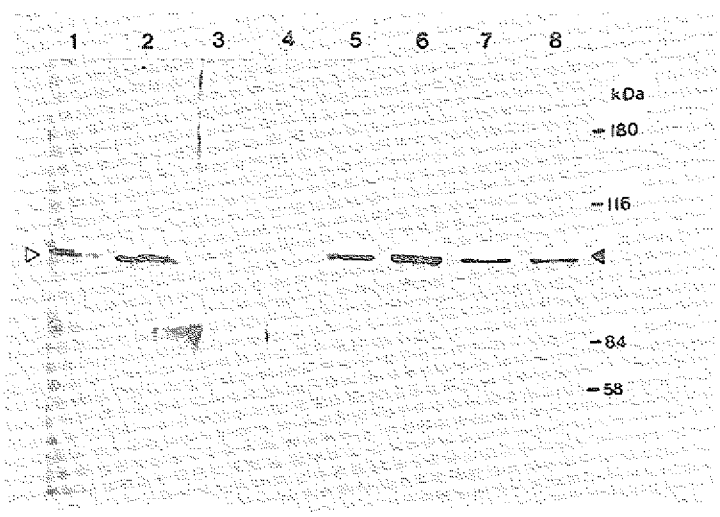


Abb. 23 Western Blot mit anti-*E.coli-SecA* Antikörpern gegen Zellextrakte von *S.carnosus* TM300, *B.subtilis* DB104 und unterschiedlichen Stämmen von *E.coli*; TM300 (1) 10µl (2) 30µl; DB104 (3) 10µl (4) 30µl; MM52 pHC79 (5), pCos7 (6), pCos22 (7), pCos23 (8) je 5µl; geschlossener Pfeil markiert *SecA* aus *E.coli*, offener Pfeil markiert kreuzreaktives Material aus *S.carnosus*.

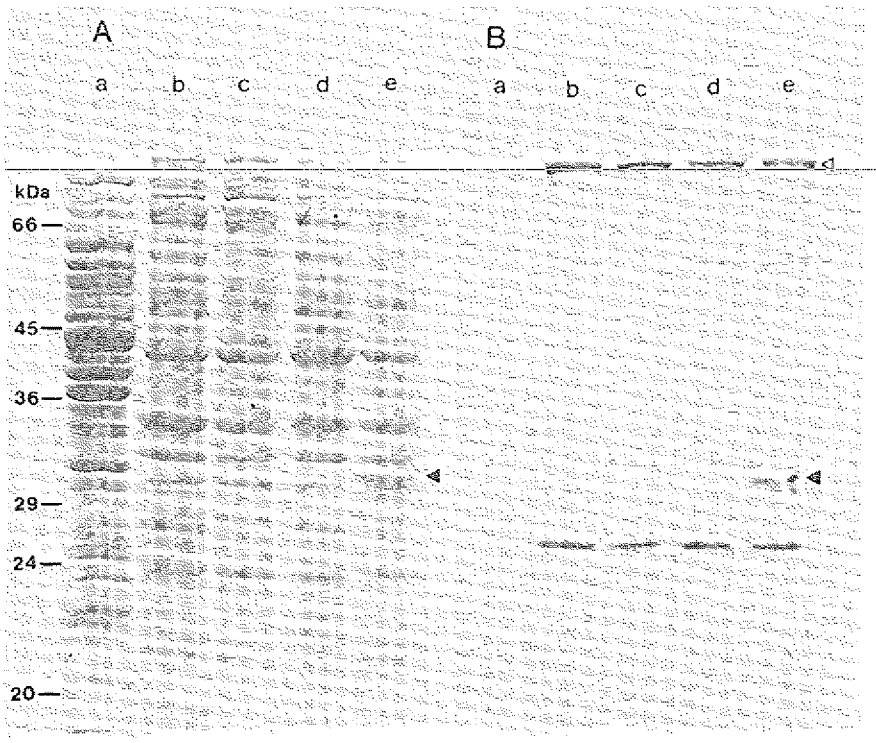


Abb. 24 SDS-PAGE (A) und Western Blot (B) mit anti-*E.coli-SecA* Antikörpern gegen Zellextrakte von DB104 (a) und JM109/pUC18 (b), psecA1 (c), psecA2 (d) und psecA4 (e) nach Induktion mit IPTG (1mM IPTG zwei Stunden 37°C); offener Pfeil markiert *SecA* aus *E.coli*; geschlossener Pfeil markiert *SecA* aus *B.subtilis*.

Wie in Abbildung 24 dargestellt, wurden Extrakte von *B.subtilis* DB104, *E.coli* JM109 mit den Plasmiden pUC18, psecA1, psecA2 und psecA4 nach zweistündiger Induktion mit 1mM IPTG über 12,5% SDS-PAGE getrennt und nach dem Transfer auf Nitrozellulose ein Western Blot mit *anti-SecA* Antikörpern durchgeführt.
In Spur b bis e (B) ist (durch den offenen Pfeil markiert) das durch das *SecA* Protein aus *E.coli* hervorgerufene Signal zu erkennen. Während in Extrakten von JM109 mit den Plasmiden psecA1 und psecA2 (Spur c und d) im Vergleich zum Proteinextrakt aus JM109/pUC18 (Spur b) keine weitere Bande auftrat, konnte eine solche Bande im Zellextrakt des psecA4 enthaltenden Stamms nachgewiesen werden (geschlossener Pfeil, Spur e in Abb.24 A und B). Nach IPTG Induktion wurde im Stamm JM109/psecA4 ein etwa 30kDa großes Protein gebildet, welches mit dem Antikörper gegen das *SecA* Protein aus *E.coli* reagierte. Wie schon in Abbildung 23 dargestellt, trat auch hier keine Reaktion im Gesamtzellextrakt von *B.subtilis* DB104 auf.

Die Ergebnisse zeigen, daß der gegen das *SecA* Protein aus *E.coli* gerichtete Antikörper mit einem *SecA* analogen Protein aus *S.carnosus* TM300 und *B.subtilis* DB104 kreuzreagiert; für *B.subtilis* konnte dies jedoch nur nach starker Expression des Genprodukts ausgehend von Plasmid psecA4 dargestellt werden. Die im Zellextrakt von *B.subtilis* DB104 und durch die Plasmide psecA1 und 2 exprimierte Proteinmenge von *SecA* ist für eine Reaktion mit dem gegen das heterologe *E.coli SecA* Protein gerichteten Antikörper zu gering.

3.2.5. Untersuchungen zur Komplementation des Wachstumsdefekts der *E.coli secA* Mutanten

Die Plasmide psecA 1,2,3 und 4, sowie die Plasmide pUC18 (als Negativkontrolle) und pMF8 (trägt das *secA* Gen aus *E.coli*) wurden in die *E.coli* Mutanten MM52 (*secA* Ts) und BA13 (*secA* Am) transformiert, und die Stämme hinsichtlich des Wachstums bei der nicht-permissiven Temperatur (42°C) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tab.7 Wachstum der Stämme MM52 (*secA* Ts) und BA13 (*secA* Am) bei 42°C nach Transformation mit den Plasmiden psecA1-4, pUC18 und pMF8; + = Wachstum, - = kein Wachstum.

Stamm	pUC18	pMF8	psecA1	psecA2	psecA3	psecA4
MM 52	-	+	-	-	-	+
BA 13	-	+	-	-	-	-

Die Ergebnisse zeigen, daß der Wachstumsdefekt der Mutante MM52 neben dem Plasmid pMF8 auch durch das Plasmid psecA4 komplementiert werden konnte, welches ein 0,88kB Fragment des *secA* Gens aus *B.subtilis* DB104 trägt (Tab.7; Abb.25). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Komplementation von MM52 sowohl in Gegenwart von 0,5% Glukose, als auch von 0,2mM IPTG möglich war (Daten nicht dargestellt). Der Wachstumsdefekt des Stamms BA13, in dem durch eine 'amber'-Mutation im *secA* Operon die Bildung des *SecA* Proteins unterbunden ist, konnte nur durch Transformation mit dem intakten Gen aus *E.coli* (pMF8) aufgehoben werden. Eine Komplementation beider Mutanten durch die Plasmide psecA 1 bis 3 war nicht zu beobachten. Aus den Daten kann geschlossen werden, daß das *SecA* Peptid aus *B.subtilis* in der Mutante MM52 (*secA* Ts) funktionell wirksam ist.

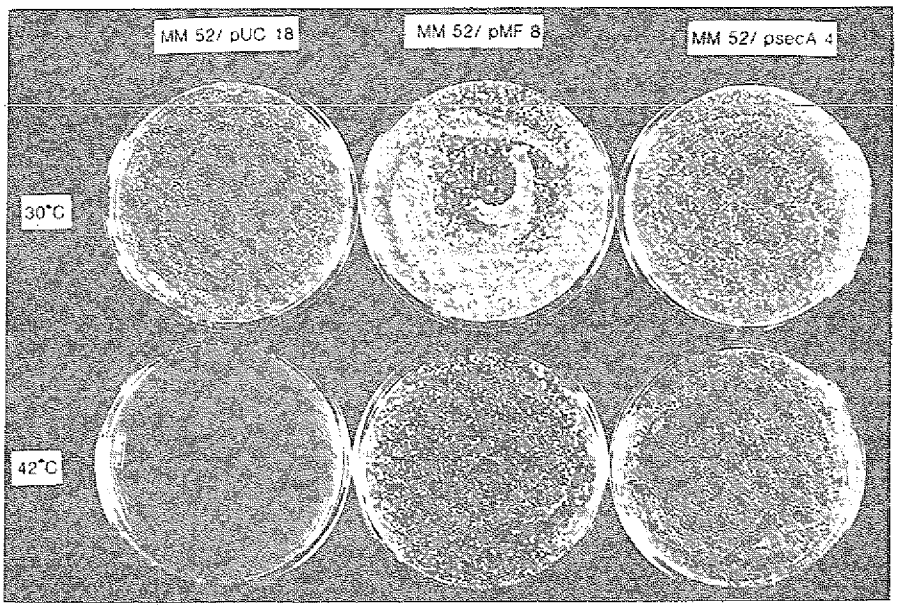


Abb.25 Wachstumsverhalten des *E.coli* Stamms MM52 (*secA* Ts) mit den Plasmiden pUC18, pMF8 und psecA4 auf LB Medium mit 0,2mM IPTG.

3.2.6. Untersuchungen zum Proteintransport im Stamm MM52/psecA4

Um zu untersuchen, ob das *SecA* Fragment aus *B.subtilis* neben der Komplementation des Wachstums der *E.coli* Mutante MM52 auch eine spezifische Wirkung auf den Proteintransport ausübt, wurde ein Pulse-Chase Experiment mit nachfolgender *OmpA*-Antikörperfällung durchgeführt. Die Stämme MM52/pUC18, pMF8 und psecA4 wurden 2,75 Stunden in Minimalmedium mit Glukose bei 42°C kultiviert. Zwanzig Minuten vor Zugabe von ^{35}S-Methionin wurde den Kulturen IPTG in einer Konzentration von 1mM zugesetzt, um die Bildung des *B.subtilis SecA* Peptids zu verstärken (Abb.26). Längerwirkende Induktion bzw. Anzucht der Zellen unter Glukose-Abwesenheit führten zur Zelllyse. Die Kulturen wurden auf eine OD_{578nm} von 0,1 eingestellt, eine Minute mit ^{35}S-Methionin bei 30°C markiert und die Proben nach 1, 3, 6 und 11 Minuten entnommen (Abb.27).

Der Stamms MM52/pMF8, der das *secA* Gen von *E.coli* auf dem Plasmid trägt, verhielt sich nach fast dreistündiger Kultivierung bei der nicht-permissiven Temperatur (42°C) bezüglich der ^{35}S-Methionin-Einbaurate und der Prozessierungsgeschwindigkeit wie der Wildtyp-Stamm MC4100 (nicht abgebildet). Der Vorläufer wurde bereits während des Markierungszeitraums

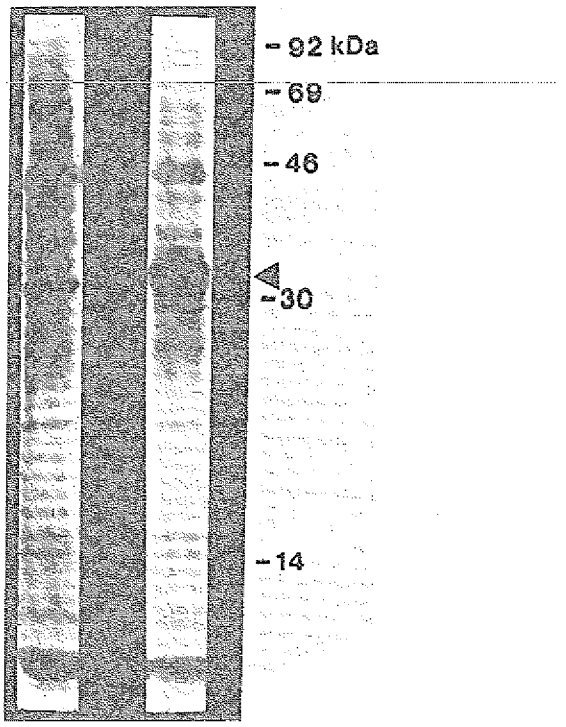


Abb. 26 Expression des *SecA* N-Terminus aus *B.subtilis* in *E.coli* nach Wachstum in Minimalmedium mit Glukose und IPTG (siehe Text); (1) MM52/pUC18, (2) MM52/psecA4; Pfeil markiert das *secA* Peptid.

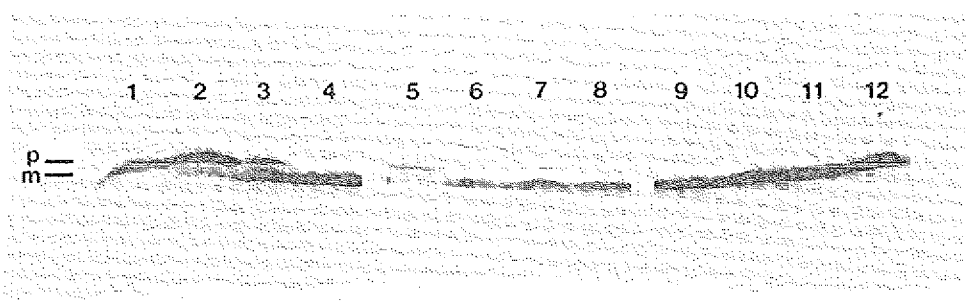


Abb. 27 Kinetik der *pOmpA* Prozessierung in den *E.coli* Stämmen MM52/pUC18 (1-4), psecA4 (5-8) und pMF8 (9-12) nach 1, 3, 6 und 11 Minuten; p= Prae-Form, m= reife Form.

vollständig in das reife *OmpA* Protein überführt. Dagegen zeigten die Stämme MM52/pUC18 und MM52/psecA4 reduzierte ^{35}S-Methionin Aufnahme (21% gegenüber 37% bei MM52/pMF8). Weiterhin war nach einminütiger Markierung eine deutliche Akkumulation von *pOmpA* zu beobachten. Während der *OmpA*-Vorläufer im Stamm MM52/pUC18 über 6 Minuten bestehen blieb, konnte in der Kultur MM52/psecA4 eine deutlich erhöhte Prozessierungs-Geschwindigkeit festgestellt werden; nach 3 Minuten war kein *pOmpA* mehr sichtbar.
Der durch das Plasmid psecA4 kodierte Aminoterminus des *SecA* Proteins aus *B.subtilis* zeigt in der *E.coli* Mutante MM52 eine spezifische, stimulierende Wirkung auf den Proteintransport.
Durch Expression des *SecA* Fragments wird das Protein-Synthesemuster der Kulturen nicht verändert. Hierdurch kann ein indirekte Wirkung über die Induktion der Hitzeschockantwort ausgeschlossen werden.

4. DISKUSSION

4.1. Isolierung, Sequenzierung und physiologische Untersuchungen zur Wirkungsweise des ribosomalen Proteins *L13* aus *S.carnosus*

4.1.1. Isolierung und Sequenzanalyse des *rplM* Gens aus *S.carnosus*

Durch die heterologe Komplementation der *E.coli* Mutante MM52 (*secA* Ts) wurde aus einer Genbank von *S.carnosus* TM300 das Cosmid pCos23 isoliert, welches das Gen *rplM* (*L13*) und einen Teil des *rpsI* (*S9*) Gens trägt. Die Sequenzanalyse des Bereichs ergab, daß die Gene für die ribosomalen Proteine *L13* und *S9* in einem Operon organisiert sind, da der Abstand zwischen den beiden Genen nur 22Bp beträgt (Abb.7b). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den für *E.coli* beschriebenen Daten, auch hier liegen die Gene *rplM* und *rpsI* in einer Trankriptionseinheit, in der das Gen für das *L13* Protein (*rplM*) promotorproximal lokalisiert ist (Isono et al.,1985). Als Startkodon des *L13* Proteins dient das ATG Codon (Nukleotid 309, Abb.7b), das für die Aminosäure Methionin kodiert. Bei dem *rplM* folgenden *rpsI* Gen (S9) könnte das Triplett TTG (Leucin) das Startkodon darstellen (Position 766, Abb.7b). Während die Translation eukaryontischer Proteine immer mit dem Triplett ATG beginnt, können in prokaryontischen Genen neben ATG auch TTG und GTG als Startkodon wirksam sein (Lewin,1990).

Es konnte gezeigt werden, daß die 78 Bp lange Sequenz vor dem vermuteten Translationsstart des *L13* Proteins (Abb.7b, Bp 231 bis 309) keine in *E.coli* wirksame Promotoraktivität aufweist. Eine typische Konsensussequenz für eine -35 Region, die sowohl für *E.coli*, als auch für den vegetativen Sigma-Faktor der *RNA Polymerase* aus *B.subtilis* beschrieben ist, wird durch die Sequenz -TTGACA- repräsen-tiert (Abb.7b, 217 Bp vor ATG-Codon; Lewin,1990). Als zugehörige -10 Region könnte die 17 Bp stromabwärts lokalisierte Sequenz -TACGAT-, die gegenüber der beschriebenen Konsensussequenz $T_{80}A_{95}T_{45}A_{60}A_{50}T_{96}$ an zwei nur zu 45 bzw. 60% konservierten Stellen Austausche zeigt (Lewin,1990), wirksam sein. Über typische Promotorstrukturen der Gattung *Staphylococcus* ist bisher nur wenig bekannt. Das von Götz et al.(1985) sequenzierte *Lipase* Gen aus *S.hyicus*, das in *S.carnosus* exprimiert wurde, trägt wie auch das *rplM* Gen aus *S.carnosus* ca. 70Bp vor dem Translationsstart eine für *E.coli* und *B.subtilis* beschriebene -35 Sequenz. Dies könnte ein Hinweis sein, daß diese Sequenz auch im Organismus *Staphylococcus* als Promotor wirksam ist.

4.1.2. Lokalisierung des heterologen *L13* Proteins in *E.coli*

Wittmann et al.(1974) beschreiben Rekonstitutionsexperimente, in denen ribo-somale Proteine aus *E.coli* und *B.stearothermophilus* zu einer aktiven 30S ribosomalen Untereinheit assemblieren.
Auf Grund der konservierten Primärstruktur des *L13* Proteins aus *E.coli* und *S.carnosus* ist bei Expression des heterologen Proteins in *E.coli* die Bildung von hybriden Ribosomen vorstellbar. Untersuchungen zur Lokalisierung des *L13* Proteins aus *S.carnosus* ergaben, daß dieses in deutlich höherer Konzentration als die homologe Komponente in die Ribosomen eingebaut wird (Abb.11).
Für *E.coli* konnte durch 'Crosslinking' eine Wechselwirkung von *L13* mit den ribosomalen Proteinen *L3*, *L20* und *L21* nachgewiesen werden (Walleczek et al.,1988). Die Proteine *L3* und *L20* sind an der Bindung der Aminoacyl-tRNA bzw. dem Transfer des Peptids während der Elongation beteiligt (Lewin, 1990). Bei einem Einbau des heterologen *L13* an Stelle des homologen Proteins wäre auf Grund sterischer Veränderungen eine verminderte Aktivität der Ribosomen bei der Proteinbiosynthese denkbar. Tatsächlich zeigen die *E.coli* Stämme, in denen das heterologe *L13* in geringen, für die Suppression ausreichenden Konzentrationen exprimiert wird, weder reduziertes Wachstum, noch eine signifikant verminderte ^{35}S-Methionin Aufnahme (Ausnahme *E.coli* Stamm IT41 (*lep* Ts); Abb.13 und 16), die eine grobe Einschätzung der Proteinbiosynthese ermöglicht.

4.1.3. Einfluß der *L13*-Konzentration auf das Wachstum von *E.coli*

Die Expression des *L13* Proteins in der Mutante MM52 ermöglicht ein Überleben unter nicht-permissiven Bedingungen, wobei die für die Mutante typische Ausprägung der Filamentierung nach Wachstum bei der nicht-permissiven Temperatur nahezu unterdrückt wird (Abb.4).

Die für die funktionelle Komplementation ausreichende Menge von *L13* ist dabei so gering, daß das Protein nicht im Coomassie gefärbten Gel, sondern nur nach radioaktiver Markierung der Kultur sichtbar gemacht werden kann (siehe Plasmid p23-1 in Abb.10 und pCos23 in Abb.14). Sowohl im Wildtypstamm, als auch in der *secA* Mutante ist die starke Expression des *L13* Proteins schädlich. Sie verursacht eine Wachstumsverzögerung, bedingt durch eine Reduktion der Proteinbiosynthese (Abb.17; Tab.5).
Die Expression ribosomaler Proteine in *E.coli* ist streng reguliert, auf der Ebene der Translation kann die Synthese der in einem Operon organisierten Proteine durch eines der Genprodukt reprimiert werden (z.B. reguliert *S7* das *str* Operon, *S8* das *spc* Operon, usw.). Durch diesen Mechanismus wird ein

Gleichgewicht der ribosomalen Bausteine und eine schnelle Anpassung an veränderte physiologische Zustände in der Zelle gewährleistet (Watson et al.,1987).
Es wäre daher vorstellbar, daß bei starker Expression des heterologen *L13* Proteins in *E.coli* (wie z.B. durch pKK23-1) das *L13* aus *S.carnosus* die Synthese der homologen Proteine des *rplM-rpsI* Operons in *E.coli* reprimiert. Hierdurch würde neben dem ausreichend vorhandenen *L13* auch die Synthese des *E.coli S9* Proteins reduziert. Als Folge der Limitation des *S9* Proteins wäre somit die Assemblierung der Ribosomen gestört, so daß die übrigen ungebundenen ribosomalen Proteine wiederum ihre eigene Expression reprimierten. Wie für das Plasmid pKK23-1 beschrieben, wäre eine Reduktion der Proteinbiosynthese und des Wachstums die Folge.

4.1.4. Suppressionsverhalten des *L13* Proteins im Vergleich zu den Hitzeschockproteinen *GroEL/ES*

Der funktionell komplementierende Effekt von *L13* scheint im Gegensatz zu Untersuchungen der Suppression durch das Hitzeschockprotein *GroEL* spezifisch zu sein. Van Dyk et al. (1989) konnten zeigen, daß durch Überproduktion von *GroEL/ES* neben den Mutationen in *SecA*, *SecY* und dem Hitzeschockprotein *DnaK* auch der Wachstumsdefekt zahlreicher Mutanten der Aminosäuresynthese von *E.coli* und *S.thyphimurium* aufgehoben werden kann. Die untersuchten Mutationen waren alle temperatursensitiv. *GroEL* sollte hierbei als Chaperon wirken und durch Bindung an die defekten Komponenten eine mehr oder weniger aktive Konformation stabilisieren, die das Wachstum unter nicht-permissiven Bedingungen ermöglicht.
Die durch *L13* erzielte Komplementation ist mit den Ergebnissen der Hitzeschockproteine nicht vergleichbar. Einerseits wird Komplementation nicht durch Überproduktion erreicht, dieser Zustand wirkt auf die Zellen sogar wachstumshemmend. Andererseits können durch *L13* nur die temperatursensitiven Mutationen in Komponenten des Proteintransports (*SecA*, *SecY* und *Signalpeptidase*) supprimiert werden, während andere Defekte wie "Null"-mutationen im *secA* und *secB* Gen, kältesensitive Mutation im *secE*, sowie temperatursensitive Defekte in den Genen *groEL*, *dnaK* und dem Proteintransport-unabhängigen Gen der *Fruktose*-1.6.-*diphosphataldolase* nicht unterdrückt werden (Tab.6).
Dieser Befund könnte auf eine spezifische Funktion von *L13* beim Proteintransport hinweisen. Hierbei ist allerdings die Wirkungsweise von *L13* in der *Signalpeptidase*-Mutante (IT41) schwer verständlich, da sie in einem zu *SecA* und *SecY* unterschiedlichen zellulären Kompartiment, dem Periplasma,

aktiv ist.

4.1.5. Eigenschaften von *secA*(Ts) und *secY*(Ts)-Suppressormutanten

In der Literatur wurde die Isolierung zahlreicher Suppressoren von temperatursensitiven *secA* und *secY*-Mutationen beschrieben, die den Wachstumsdefekt dieser Stämme unterdrücken (*ssa* für *secA* bzw. *ssy* für *secY*). Diese Suppressormutanten betreffen Komponenten des Proteinbiosynthese-Apparates wie *Aminoacyl-tRNA Synthetasen*, *tRNA*-Moleküle, *Translations-Initiationsfaktor*, ribosomale Proteine (*S1*,*S15*) und andere (Oliver,1985; Shiba et al.,1986a und b; Lee und Beckwith,1986). Ihre Wirkungsweise beruht zum Teil auf einer Reduktion der Proteinbiosynthese, wodurch die Akkumulation von zu exportierendem Vorläuferprotein reduziert und so den Mutanten ein Überleben bei der nicht-permissiven Temperatur ermöglicht wird. Daß dieser Effekt auf einer reduzierten Proteinsynthese beruht, wurde durch Zugabe sublethaler Dosen des Inhibitors Chloramphenikol gezeigt, der auch den Wachstumsdefekt supprimieren kann (Lee und Beckwith, 1986).

Die häufig kältesensitiven Suppressoren ermöglichen den *sec* Mutanten in der Regel nur ein Wachstum bei 37°C, nicht bei 42°C (Oliver,1985). Bei einigen Mutanten (*ssyA*, *ssyB*) konnte durch Messung der Kettenverlängerungsgeschwindigkeit des Enzyms β-*Galaktosidase* eine Reduktion der Proteinbiosynthese nachgewiesen werden, während andere Mutationen keine Reduktion verursachen (*ssyE*, *ssyF* [entspricht dem ribosomalen Protein *S1*], *ssyG*; Shiba et al., 1986a und b). Wie auch das in dieser Arbeit beschriebe *L13* Protein aus *S.carnosus* kann die *SsyG* Mutation neben dem temperatur-sensitiven Defekt im *secY*-Gen auch *secA*(Ts) supprimieren (Shiba et al.,1986b).

Die Wirkungsweise dieser Suppression ist bisher nicht verstanden. Während einige Mutationen die Proteinbiosynthese reduzieren und so, wie auch die Proteinbiosyntheseinhibitoren, ein Überleben bei der nicht permissiven Temperatur ermöglichen, scheinen andere Suppressoren nicht über diesen Weg zu wirken.

Lee und Beckwith (1986) diskutieren die Möglichkeit der Reduktion der Kettenverlängerungsgeschwindigkeit exportierbarer Proteine. Hierdurch würde dem sekretorischen Apparat mehr Zeit für die Katalyse der Translokation gegeben. Möglicherweise kann die Zelle auch zwischen sekretorischen und cytoplasmatischen Proteinen unterscheiden und spezifisch die Expression zu exportierender Proteine reduzierender. Dies wurde z.B. in der *E.coli* Mutante BA13 (*secA* Am) beobachtet, durch die Inaktivierung des *secA* Gens wird hier spezifisch die Synthese des *Maltose-Bindeproteins* unterbunden (Oliver und Beckwith,1982). Weitere Hinweise auf einen derartigen Mechanis-

mus lieferte die Isolierung der Mutante *secC*, die einen Defekt im *rpsO* Gen trägt (ribosomales Protein *S15*; Ferro-Novick et al.,1984). Ein Stamm mit dieser Mutation zeigt eine reduzierte Synthese des exportierbaren *Maltose-Bindeproteins*, *Ribose-Bindeproteins* und des äußeren Membranproteins *OmpF*, während die Synthese der cytoplasmatischen Proteine *SecA* und des *Elongationsfaktors G* im Vergleich zum Wildtyp unverändert ist (Ferro-Novick et al.,1984). Diese Interpretationen schließen eine direkte Wechselwirkung einiger Suppressoren mit Komponenten des Exportapparates jedoch nicht aus. Auf Grund der Vielfalt der bisher identifizierten Suppressoren ist die Isolierung unterschiedlicher Cosmide über den in dieser Arbeit vorgestellten Ansatz der heterologen Komplementation verständlich (Abb.2 und 3). Es könnte sich hierbei, wie für *E.coli* beschrieben, um weitere Komponenten der Proteinbiosynthese-Apparates aus *S.carnosus* handeln.

4.1.6. Mögliche Wirkungsweise der Suppression durch das *L13* Protein

Für die mögliche Wirkungsweise des *L13* Proteins, die zur funktionellen Komplementation der temperatursensitiven Mutationen im Exportapparat führt, werden drei Punkte diskutiert:

1. Die Expression des *L13* Proteins löst als eine Art Streßsignal die Hitzeschockantwort in der Zelle aus, wodurch indirekt eine Suppression des Exportdefektes erreicht wird.

Die Hitzeschockantwort kann auch bei niedriger Temperatur durch unterschiedliche Faktoren in der Zelle ausgelöst werden (Parsell und Sauer, 1988). Die Expression des heterologen *L13* Proteins könnte einen Streßfaktor darstellen, der eine verstärkte Synthese von GroEL/ES induzieren würde. Dieser Effekt kann jedoch ausgeschlossen werden, da, wie in Abb.14 gezeigt, das Proteinsynthesemuster durch Expression des *L13* Proteins gegenüber der Kontrolle unverändert ist.

2. Wie die für *E.coli* beschriebenen Suppressoren von *secA*(Ts) und *secY*(Ts) bewirkt die Expression des *L13* Proteins eine Reduktion der Proteinbiosynthese. Hierdurch wäre ein Wachstum der Mutanten unter nicht-permissiven Bedingungen möglich.

Ohne das Wachstum zu beeinflußen führt die Expression des *L13* Proteins im *E.coli* Stamm IT41 (*lep*) zu einer reduzierten Proteinsynthese, während diese in den Stämmen MM52 (*secA* Ts) und IQ85 (*secY* Ts) -gemessen an der ^{35}S-

Methionin-Aufnahme- nicht signifikant verändert ist. Durch sublethale Dosen von Chloramphenikol (1µg/ml) wird die Exportkinetik wie auch durch die Expression des *L13* Proteins beschleunigt, hierbei kommt es aber im Gegensatz zu den supprimierten Stämmen MM52 und IQ85 zu einer deutlichen Reduktion der Proteinsynthese (Abb.13 und 16).
Möglicherweise ist eine bereits geringe Reduktion der Proteinbiosynthese für die Suppression der *sec*(Ts) Mutationen verantwortlich. Vergleichbar mit der Wirkungsweise der Suppressoren *ssyF* bzw.*secC* (mit verändertem *S1* bzw. *S15* Protein) könnte durch Einbau des heterologen *L13* Proteins in die Ribosomen von *E.coli* entweder die Gesamtsyntheserate oder spezifisch die Synthese sekretorischer Proteine reduziert werden.

3. Das ribosomale Protein *L13* stellt eine Komponente des Proteintranslokations-Apparates dar, die möglicherweise eine Wechselwirkung mit *SecA* und/oder *SecY* oder einer bisher nicht identifizierten Komponente in der Membran (z.B. Ribosomenrezeptor) eingeht.

Das homologe *L13* Protein ist peripher in der großen Untereinheit der Ribosomen lokalisiert, eine Funktion ist bisher nicht beschrieben (Walleczek et al.,1988). Auf Grund seiner Lokalisation wäre eine Beteiligung am Proteinexport denkbar, *L13* könnte beim cotranslationalen Transport mit bereits identifizierten (*SecA*, *SecY*, *SecE*) oder noch unbekannten Komponenten (analog dem Ribosomenrezeptor aus Eukaryonten) des Proteinexport-Apparates eine Wechselwirkung eingehen. Durch Expression eines heterologen *L13* Proteins könnte die exportrelevante Ribosomen-aktivität so reduziert werden, daß durch Anpassung an die verminderte Exportfähigkeit der Zellen ein Überleben unter nicht permissiven Bedingungen ermöglicht würde.

4.1.7. Postuliertes Modell für die Suppression der exportdefekten *E.coli* Stämme IT41, IQ85 und MM52 durch das ribosomale Protein *L13* aus *S.carnosus*
Auf Grund der vorliegenden Daten werden folgende Wirkungsweisen des *S.carnosus L13* Proteins bei der Suppression exportdefekter *E.coli* Mutanten vorgeschlagen:

Die temperatursensitive Mutation im Gen der *Signalpeptidase* wird, wie für zahlreiche Suppressoren der Gene *secA* und *secY* beschrieben, durch eine Reduktion der Proteinbiosynthese supprimiert.

Die funktionelle Komplementation der Mutationen *secA*(Ts) und *secY*(Ts) beruht nicht auf Reduktion der gesamten Proteinbiosynthese, sondern wird

vielmehr durch eine Reduktion des Proteinexports erreicht. Dies geschieht entweder durch spezifische Kontrolle der Synthese exportierbarer Proteine (analog dem *secC* Gen, wie unter 4.1.5. beschrieben) oder durch eine Verminderung exportaktiver Komplexe aus Vorläuferprotein-Chaperon-Ribosom. Das heterologe *L13* Protein könnte hierbei auf Grund seiner reduzierten Affinität zu einem postulierten Ribosomenrezeptor die Assoziation des Komplexes an die Exportstellen der Membran verhindern. Nur Ribosomen, die das homologe *E.coli* Protein enthalten, könnten durch Bindung an die Membran eine Translokation der sekretorischen Proteine ermöglichen.

Um diese Hypothese zu untersuchen, ist die Beantwortung der folgende Fragen wichtig: Kann eine Bindung der Ribosomen an die Membran nachgewiesen werden? Erfolgt diese Bindung über einen spezifischen Rezeptor oder gehen die Ribosomen hierbei Wechselwirkung mit bereits identifizierten Komponenten des Exportapparates (*SecA*, *SecY*, *SecE*) ein? Wird die Bindungsaffinität beeinflußt durch den Einbau des heterologen *L13* Proteins aus *S.carnosus*? Ist im Vergleich zu unterschiedlichen cytoplasmatischen Enzymen die Biosynthese sekretorischer Proteine reduziert, und ist dies abhängig von der Art der Translokation (co- bzw. posttranslational)?
Antworten auf diese Fragen könnten Hinweise auf den Mechanismus der Kopplung zwischen der Translation und dem Export sekretorischer Proteine liefern und so die Wirkungsweise des heterologen *L13* Proteins in *E.coli* erklären.

4.2. Isolierung, Sequenzierung und Charakterisierung eines *secA* homologen DNA-Fragments aus *Bacillus subtilis*

4.2.1. Sequenzanalyse des *secA* Gens aus *B.subtilis*

Mit Hilfe des *secA* Gens aus *E.coli* konnte durch die Methode der DNA-DNA Hybridisierung das aminoterminale Fragment des *secA* Gens von *B.subtilis* isoliert werden. Es liegt auf einem 1,4kB großen Fragment (Abb.21b), das für zwei offene, unvollständige Leserahmen kodiert.
Das *secA* Gen aus *E.coli* ist als mittleres in einem Operon aus drei Genen lokalisiert (Oliver et al.,1990). Die Expression des *SecA* Proteins unterliegt einer komplexen Regulation. 'Amber' Mutationen im promotorproximal liegenden *GenX* haben einen polaren Effekt auf die Translation von *SecA*, Defekte in Komponenten des Proteinexport-Apparates führen zu einer Derepression der *SecA* Synthese, die wiederum autoregulatorisch durch das *SecA* Protein reprimiert werden kann (Schmidt et al.,1988; Schmidt und Oliver, 1989).
Im Unterschied zu dieser in *E.coli* vorliegenden Organisation scheint das *secA* Gen von *B.subtilis* unter der Kontrolle eines eigenen Promotors zu stehen. Hierfür sprechen zwei Punkte: die durch den ersten offenen Leserahmen kodierte Aminosäuresequenz zeigt keine Homologie zu der Sequenz des *GensX* aus *E.coli*. Beide offenen Leserahmen sind durch einen Bereich von 170Bp (gegenüber 64Bp in *E.coli*) getrennt, der eine Sequenz beinhaltet, die nahezu mit der durch den vegetativen Sigma Faktor von *B.subtilis* erkannten Konsensussequenz übereinstimmt (Abb.21b; Position 257-284:-TTGGAA-16Bp-TATGAT; Moran et al.,1982).

Oliver et al.(1990) konnten im *E.coli secA*-Operon durch Deletion des Bereiches zwischen dem Stopcodon des *GensX* und der Ribosomenbindungsstelle des *secA* Gens eine konstitutive Expression des *SecA* Proteins erreichen. Dies weist auf eine wichtige Funktion dieser Sequenz in der Regulation hin. In *B.subtilis* befindet sich zwischen der vermuteten -10 Region und der Ribosomenbindungsstelle des *secA* Gens eine entgegengesetzte, palindromische Sequenz, die eine Haarnadelstruktur von 8Bp mit einer Schleife von 7Bp ausbilden könnte (Abb.21b, Position 320-343). Diese Sequenz könnte -analog einer Terminationsstruktur bei den durch Attenuation regulierten Aminosäurebiosynthesegenen (Lewin 1990)- eine wichtige Rolle in der Regulation der *secA* Expression in *B.subtilis* spielen.

4.2.2. Aminosäuresequenzvergleich der aminoterminalen Fragmente aus *B.subtilis* und *E.coli*

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des N-terminalen *SecA*-Fragments aus *B.subtilis* weist zu den ersten 384 Aminosäuren des *E.coli SecA* Proteins eine starke Homologie auf (Abb.24). Auf Grund dieser konservierten Struktur zeigen die gegen das *E.coli SecA* gerichteten Antikörper Kreuzreaktivität zum *SecA* Peptid aus *B.subtilis* (Abb.25).

Für das *SecA* Protein von *E.coli* wurden experimentell drei ATP-Bindungsstellen nachgewiesen, von denen nur eine an der induzierbaren *Translokations ATPase* Aktivät beteiligt ist (Lill et al.,1989). Oliver et al.(1990) schlagen für das *SecA* Protein vier ATP-Bindungsstellen vor, die zu den untersuchten Konsensussequenzen vom Typ *A* und *B* Homologie aufweisen (Position 160-167, 341-348, 503-511 Typ *A*, 266-283 Typ *B*; Nomenklatur nach Walker et al. 1982, Gay und Walker 1983).

Matsuyama et al.(1990) konnten durch Mischung unterschiedlicher aminoterminaler und carboxyterminaler *SecA*-Fragmente mit überlappenden Regionen in vitro ein Hybrid rekonstituieren, welches ATP binden konnte. Dieser Bereich konnte auf die ersten 241 Aminosäuren eingegrenzt werden, und es wurde eine zu den von Oliver et al.(1990) vorgeschlagenen Regionen unterschiedliche ATP-Bindungsstellen postuliert (Position 102-109).

Vergleicht man die Aminosäuresequenz des *SecA* Proteins aus *B.subtilis* mit den ersten 241 Aminosäuren des *E.coli* Proteins, läßt sich folgendes feststellen: die Sequenz des *B.subtilis SecA* Proteins ist an Position 100-107 nahezu identisch mit der von Matzuyama postulierten ATP-Bindungsstelle; als ein konservierter Austausch kann die Aminosäure Lysin an Stelle des Arginins betrachtet werden. Die von Oliver et al.(1990) vorgeschlagene Bindungsstelle (Position 160-167) stimmt nur in 3 von 7 Aminosäuren mit der entsprechenden Sequenz aus *B.subtilis* überein.

Die Konsensussequenzen einer ATP-Bindungsstelle wurden von Walker et al. (1982) und Gay und Walker (1983) ermittelt. Sie sind charkterisiert durch die Sequenz -GX_4GKTX_6(I/V)- für den Typ *A* bzw. (R/K)$X_{2-3}GX_3L\phi_4$(D/E) für den Typ *B* [ϕ steht für hydrophobe Aminosäuren wie I,V,L,M,Y,W,F].

In *B.subtilis* ist die oben erwähnte Aminosäurefolge, die mit der von Matsuyama vorgeschlagenen ATP-Bindungsstelle von *E.coli* übereinstimmt, nahezu identisch zu der von Walker postulierten Konsensussequenz des Typs *A*, im Unterschied ist an Position 1 statt eines Glycins ein Alanin lokalisiert (Aminosäure 98-114, Abb.21). Ein weiterer Bereich, der dem Typ *B* entsprechen würde, wird durch die Abfolge an Position 270-283 vertreten (KAFGIDNLFDKED), im Gegensatz zu der Konsensussequenz stehen hier anstelle

der hydrophoben geladene Aminosäuren (nicht unterstrichen).

Auf Grund dieser Ergebnisse wird die Aminosäurefolge 98-114 des *SecA* Proteins aus *B.subtilis* als ATP-Bindungsstelle des Typs *A* vorgeschlagen. Da der Bereich mit der von Matsuyama et al.(1990) postulierten Sequenz nahezu identisch ist, könnte dies als Hinweis gewertet werden, daß es sich bei der Sequenz um die für die Translokation von Proteinen relevante ATP-Bindungsstelle am *SecA* Protein handelt.

4.2.3. Einfluß der Expression des *SecA* Fragments aus *B.subtilis* in den *E.coli secA* Mutanten MM52 und BA13

Durch Expression des aminoterminalen *SecA* Peptids aus *B.subtilis* konnten sowohl der Wachstums-, als auch der Prozessierungsdefekt der *E.coli* Mutante MM52 (*secA* Ts) komplementiert werden (Abb.25,27). Eine Komplementation der Mutante BA13 (*secA* Am) durch das Plasmid psecA4 wurde nicht beobachtet. Während in der *E.coli* Mutante MM52 auch nach Wachstum bei der nicht-permissiven Temperatur ein zwar enzymatisch inaktives *SecA* Protein gebildet wird, ist bei 42°C die Expression dieses Proteins in der Mutante BA13 auf Grund einer polaren Mutation im *GenX* vollständig unterbunden (Schmidt et al., 1988). Die durch das Plasmid psecA4 hervorgerufene Komplementation von MM52 ist also abhängig von der Anwesenheit inaktiven *SecA* Proteins.

Matsuyama et al.(1990) konnten in Rekonstitutionsexperimenten zeigen, daß aminoterminale und carboxyterminale *SecA* Fragmente mit überlappenden Bereichen in vitro zu einem ATP-bindungsfähigen Protein assemblieren können. Hierbei lokalisierten sie die für die Translokation relevante ATP-Bindungsstelle im N-terminalen Teil, während sie dem C-Terminus die Funktion der Stabilisierung einer aktiven Konformation zuschrieben.

Das N-terminale Fragment aus *B.subtilis* könnte in einer vergleichbaren Weise die Komplementation der Mutante MM52 bewirken. Wie für die α-Komplementation der β-*Galaktosidase* beschrieben, bei der sich das α- und β-Peptid zu einem enzymatisch aktiven Enzym zusammenfügen, könnte das aminoterminale *SecA* Peptid mit dem *SecA* Protein aus *E.coli* zu einer aktiven Form des Enzyms assemblieren. Hierbei könnte der carboxyterminale Bereich des *E.coli* Proteins den Komplex stabilisieren, während das N-terminale Peptid aus *B.subtilis* die enzymatische Aktivität gewährleistete.

4.2.4. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Isolierung des aminoterminalen Fragments des *secA* Gens aus *B.subtilis* vorgestellt, das dem *secA* Gen aus *E.coli* homolog ist. Es komplementiert den *secA*(Ts) bedingten Translokations- und

Wachstumsdefekt der *E.coli* Mutante MM52.

Neben der Identifizierung eines *secY*-homologen Gens in *B.subtilis* liefert der Nachweis eines *secA*-homologen Gens einen weiteren Hinweis auf die Existenz eines konservierten *sec*-homologen Proteintranslokations-Apparates in Gram-positiven Bakterien.

Um eine Aussage darüber machen zu können, ob das *SecA* Protein von *B.subtilis* die entsprechende Komponente in *E.coli* vollständig funktionell ersetzten kann, ist die Klonierung des gesamten *secA* Gens, sowie dessen Expression in der *E.coli* Mutante BA13 [*secA* Am] erforderlich.

Nach Abschluß dieser Arbeit wurde von Sadaie et al.(1991) eine Sequenz aus *B.subtilis* publiziert (*div*), die zum *secA* aus *E.coli* Homologie aufweist. Das von dieser Arbeitsgruppe isolierte *div* Gen ist identisch mit dem in dieser Arbeit vorgestellten aminoterminalen *secA* Fragment aus *B.subtilis*. Die DNA Sequenzen unterscheiden sich in 18 von insgesamt 1456Bp, wobei der Austausch des Nukleotids A zu G an Postition 739 (Abb.21b) einen Aminosäureaustausch (Ile zu Val) zur Folge hat. Dieser Befund kann möglicherweise auf Variationen im Stamm *B.subtilis* DB104 zurückgeführt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Während zahlreiche Komponenten des Proteinexport-Apparates des Gram negativen Bakteriums *Escherichia coli* identifiziert und charakterisiert wurden, ist über den Mechanismus der Proteintranslokation Gram positiver Bakterien nur wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe unterschiedlicher experimenteller Ansätze versucht, Komponenten des Poteintranslokations-Apparates der Gram positiven Organismen *Bacillus* und *Staphylococcus* zu isolieren.

Über den Ansatz der heterologen Komplementation der *E.coli* Mutante MM52, die einen temperatursensitiven Defekt im *SecA*, einer essentiellen Komponente des Proteinexport-Apparates, trägt, wurde das Gen *rplM* aus dem Organismus *Staphylococcus carnosus* isoliert. Das 0,6kB umfassende Gen kodiert für das ribosomale Protein *L13*, das wie bei *E.coli* zusammen mit dem Gen *rpsI* (ribosomales Protein *S9*) in einem Operon organisiert ist. Das *S.carnosus L13* weist gegenüber dem *L13* Protein aus *E.coli* starke Homologie auf; auf Grund dieser konservierten Struktur wird das heterologe Protein in die Ribosomen von *E.coli* eingebaut. Im Bezug auf das Komplementationsverhalten unterschiedlicher Sekretionsmutanten von *E.coli* zeigt *L13* eine pleiotrope Wirkung; durch geringe Expression des heterologen Proteins kann neben dem *secA* (Ts) Defekt der *E.coli* Mutante MM52 auch der temperatursensitive Wachstumsdefekt der Stämme IQ85 (*secY* Ts) und IT41 (*lep* Ts) supprimiert werden. Während die Expression von *L13* in der Mutante IT41 (*lep*) eine Reduktion der Proteinbiosynthese verursacht und somit ein Überleben unter nicht-permissiven Bedingungen ermöglicht, konnte dieser Effekt in den Stämmen MM52 (*secA* Ts) und IQ85 (*secY* Ts) nicht beobachtet werden. Diese Stämme zeigen unter permissiven Bedingungen eine leicht verminderte Akkumulation des *OmpA* Vorläuferproteins.

Über die Methode der Southern Hybridisierung konnte mit Hilfe des *secA* Gens aus *E.coli* als Sonde das aminoterminale *secA* Fragment aus *Bacillus subtilis* isoliert werden. Es kodiert für ein Protein, das zu den ersten 364 Aminosäureresten des *SecA* aus *E.coli* starke Homologie aufweist und mit den gegen das *E.coli SecA* gerichteten Antikörpern kreuzreagiert. Im Gegensatz zum *E.coli secA*, das als mittleres von drei Genen in einem Operon organisiert ist, scheint das *secA* von *B.subtilis* unter der Kontrolle des eigenen Promotors zu stehen. Durch ein 275 Aminosäure großes *B.subtilis secA* Peptid, welches die Konsensussequenz einer ATP-Bindungsstelle aufweist, kann sowohl der Wachstums-, als auch der Protein-Prozessierungsdefekt der *E.coli* Mutante MM52 (*secA* Ts) komplementiert werden.

6. LITERATUR

Akiyama Y, Ito K (1987) Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in Escherichia coli. EMBO J 6: 3465-3470

Altman E, Emr SD, Kumamoto CA (1990) The presence of both the signal sequence and the region of mature LamB protein is required for the interaction of LamB with the exportfactor SecB. J Biol Chem 265: 18154-18160

Altman E, Kumamoto CA, Emr SD (1991) Heat shock proteins can substitute for SecB function during protein export in Escherichia coli. EMBO J 10: 239-245

Bernstein HD, Poritz MA, Strub K, Hoben PJ, Brenner S, Walter P (1989) Model for signal sequence recognition from amino-acid sequence of 54K subunit of signal recognition particle. Nature 340:482-486

Bieker KL, Silhavy TJ (1990) PrlA (SecY) and PrlG (SecE) interact directly and function sequentially during protein translocation in E.coli. Cell 61: 833-842

Bieker KL, Phillips GJ, Silhavy TJ (1990) The sec and prl genes of Escherichia coli. J Bioenerget Biomembranes 22: 291-310

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. Nucl Acid Res 7: 1513-1523

Brosius J, Holy A (1984) Regulation of ribosomal RNA promoters with a synthetic lac operator. Proc Natl Acad Sci 81: 6929-6933

Brundage L, Hendrick JP, Schiebel E, Driessen JM, Wickner W (1990) The purified E.coli integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. Cell 62: 649-657

Cabelli RJ, Chen L, Tai PC, Oliver DB (1988) SecA protein required for secretory protein translocation into E.coli membrane vesicles. Cell 55: 683-692

Cerretti DP, Dean D, Davis GR, Bedwell DM, Nomura M (1983) The spc ribosomal protein operon of Escherichia coli: sequence and cotranscription of the ribosomal protein genes and a proteinexport gene. Nucl Acid Res 11: 2599-2616

Collier DN, Bankaitis VA, Weiss JB, Bassford PJ (1988) The antifolding activity of SecB promotes the export of the E.coli Maltose-binding protein. Cell 53: 273-283

Collier DN, Strobel SM, Bassford PJ (1990) SecB-independent export of Escherichia coli Ribose-binding protein (RBS): Some comparisons with export of Maltose-binding protein (MBP) and studies with RBP-MBP hybrid proteins. J Bacteriol 172: 6875-6884

Cunningham K, Wickner W (1989) Specific recognition of the leader region of precursor proteins is required for activation of translocation ATPase of Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci 86: 8630-8634

Date T, Wickner W (1981) Isolation of the Escherichia coli leader peptidase gene and effects of leader peptidase overproduction in vivo. Proc Natl Acad Sci 78: 6106-6110

Date T (1983) Demonstration by a novel genetic technique that leader peptidase is an essential enzyme of Escherichia coli. J Bacteriol 154: 76-83

Downing WL, Sullivan SL, Gottesman ME, Dennis PP (1990) Sequence and transcriptional pattern of essential Escherichia coli secE-nusG operon. J Bacteriol 172: 1621-1627

Driessen AJ, Wickner W (1990) Solubilization and functional reconstitution of the proteintranslocation enzymes of Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci 87: 3107-3111

Emr SD, Hanley-Way S, Silhavy TJ (1981) Suppressor mutations that restore export of a protein with a defective signal sequence. Cell 23: 79-88

Fayet O, Louarn JM, Georgopoulos C (1986) Suppression of the Escherichia coli *dnaA*46 mutation by amplification of the *groES* and *groEL* genes. Mol Gen Genet 202: 435-445

Ferro-Novick S, Honman M, Beckwith J (1984) The product of gene secC is involved in the synthesis of exported proteins in E.coli. Cell 38: 211-217

Fikes JD, Bassford PJ (1989) Novel secA alleles improve export of Maltose-binding protein synthesized with a defective signal peptide. J Bacteriol 171: 402-409

Gannon PM, Li P, Kumamoto CA (1989) The mature portion of Escherichia coli Maltose-binding protein (MBP) determines the dependence of MBP on SecB for export. J Bacteriol 171: 813-818

Gardel C, Benson S, Hunt J, Michaelis S, Beckwith J (1987) SecD, a new gene involved in protein export in Escherichia coli. J Bacteriol 169: 1286-1290

Gardel C, Johnson K, Jacq A, Beckwith J (1990) The secD locus of E.coli codes for two membrane proteins required for protein export. EMBO J 9:3209-3216

Gay NJ, Walker FE (1983) Homology between human bladder carcinoma oncogene product and mitochondrial ATP-synthase. Nature 301: 262-264

Gebert JF, Overhoff B, Manson MD, Boos W (1988) The tsr chemosensory transducer of Escherichia coli assembles into the cytoplasmic membrane via a SecA-dependent process. J Biol Chem 263: 16652-16660

Geller BL (1990) Elektrochemical potential releases a membrane-bound secretion intermediate of Maltose-binding protein in Escherichia coli. J Bacteriol 172: 4870-4876

Geyl D, Böck A, Isono K (1981) An improved Method for two-dimensional gel-electrophoresis: Analysis of mutationally altered ribosomal proteins of Escherichia coli. Mol Gen Genet 181: 309-312

Götz F, Popp F, Schleifer KH (1985) Complete nucleotide sequence of the lipase gene from Staphylococcus hyicus cloned in Staphylococcus carnosus. Nucl Ac Res 13: 5895-5906

Greener A (1990) E.coli Shure™ strain: clone "unclonable" DNA. Strategies (der Firma Stratagene) 3: 5-6

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: 269-279

Hardy SJS, Kurland CG, Voynow P, Mora G (1969) The ribosomal proteins of Escherichia coli. I. Purification of the 30S ribosomal proteins. Biochem 8: 2897-2905

Harwood CR (1989) Bacillus. Biotechnological Handbook 2; Plenum Press, New York.

Hawkes R, Niday E, Gordon J (1982) A Dot-Immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Anal Biochem 119: 142-147

Henner DJ, Ferrari E, Perego M, Hoch JA (1988) Location of the targets of the hpr-97, sacU(Hy), and sacQ36(Hy) mutations in upstream regions of the subtilisin promoter. J Bacteriol 170: 296-300

Hohn B, Collins J (1980) A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. Gene 11: 291-298

Huynh TV, Young RA, Davis RW (1985) in DNA Cloning, Volume 1, Editor Glover DM, IRL Press Limited: Oxford, England, 56-110

Inada T, Court DL, Ito K, Nakamura Y (1989) Conditionally lethal amber mutations in the leader peptidase gene of Escherichia coli. J Bacteriol 171: 585-587

Isono S, Isono I (1978) Mutations affecting the structural genes and the genes coding for modifying enzymes for ribosomal proteins in Escherichia coli. Mol Gen Genet 165: 15-20

Isono S, Thamm S, Kitakawa M, Isono K (1985) Cloning and nucleotide sequencing of the genes for ribosomal proteins S9 (*rpsI*) and L13 (*rplM*) of Escherichia coli. Mol Gen Genet 198: 279-282

Ito K, Bassford PJ, Beckwith J (1981) Protein localization in E.coli: Is there a common step in the secretion of periplasmic and Outer-membrane proteins? Cell 24: 707-717

Ito K, Wittekind M, Nomura M, Shiba K, Yura T, Miura A, Nashimoto H (1983) A temperature sensitive mutant of E.coli exhibiting slow processing of exported proteins. Cell 32: 789-797

Kawamura F, Doi RH (1984) Construction of a Bacillus subtilis double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. J Bacteriol 160: 442-444

Kontinen VP, Sarvas M (1988) Mutants of Bacillus subtilis defective in protein export. J Gen Microbiol 134: 2333-2344

Kumamoto CA, Beckwith J (1985) Evidence for specificity at an early step in protein export in Escherichia coli. J Bacteriol 163: 267-274

Kumamoto CA, Gannon PM (1988) Effects of Escherichia coli secB mutations on pre-Maltose binding protein conformation and export kinetics. J Biol Chem 263: 11554-11558

Kumamoto CA, Nault AK (1989) Characterization of the Escherichia coli protein-export gene secB. Gene 75: 167-175

Kumamoto CA (1989) Escherichia coli SecB protein associates with exported Protein precursor in vivo. Proc Natl Acad Sci 86: 5320-5324

Kusters R, de Vrije T, Breukink E, de Kruijff B (1989) SecB protein stabilizes a translocation-competent state of purified prePhoE protein. J Biol Chem 264: 20827-20830

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685

Laminet AA, Ziegelhoffer T, Georgopoulos C, Plückthun A (1990) The Escherichia coli heat shock proteins GroEL and GroES modulate the folding of the β-lactamase precursor. EMBO J 9: 2315-2319

Laminet AA, Kumamoto C, Plückthun A (1991) Folding in vitro and transport in vivo of pre-β-lactamase are SecB independent. Molec Microbiol 5: 117-122

Lecker S, Lill R, Ziegelhoffer T, Georgopoulos C, Bassford PJ, Kumamoto CA, Wickner W (1989) Three pure chaperone proteins of Escherichia coli -SecB, trigger factor, and GroEL- form soluble complexes with precursor proteins in vitro. EMBO J 8: 2703-2709

Lee CA, Beckwith J (1986) Suppression of growth and protein secretion defects in Escherichia coli secA mutants by decreasing protein synthesis. J Bacteriol 166: 878-883

Lewin B (1990) Genes IV, Oxford University Press, Oxford.

Lill R, Cunningham K, Brundage LA, Ito K, Oliver DB, Wickner W (1989) SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of Escherichia coli. EMBO J 8: 961-966

Lill R, Dowhan W, Wickner W (1990) The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and leader and mature domains of precursor protein. Cell 60: 271-280

Mackman N, Nicaud JM, Gray L, Holland IB (1986) Secretion of haemolysin by Escherichia coli. Curr Top Microbiol Immunol 125: 159-181

Matsuyama S, Kimura E, Mizushima S (1990) Complementation of two overlapping fragments of SecA, a protein translocation ATPase of Escherichia coli, allows ATP binding to its amino-terminal region. J Biol Chem 265: 8760-8765

Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Moran CP, Lang N, LeGrice SFJ, Lee G, Stephens M, Sonensheim AL, Pero J, Losick R (1982) Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in Bacillus subtilis. Mol Gen Genet **186**: 339-346

Morfeldt E, Janzon L, Arvidson S, Löfdahl S (1988) Cloning of chromosomal locus (exp) which regulates the expression of several exoprotein genes in Staphylococcus aureus. Mol Gen Genet **211**: 435-440

Murray NE, Brammar WJ, Murray K (1977) Lambdoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinats. Mol Gen Genet **150**: 53-61

Myers EW, Miller W (1988) Optimal alignments in linear space. CABIOS **4**: 11-17

Nakamura K, Nakamura A, Takamatsu H, Yoshikawa H, Yamane K (1990a) Cloning and characterization of a Bacillus subtilis gene homologous to E.coli secY. J Biochem **107**: 603-607

Nakamura K, Takamatsu H, Akiyama Y, Ito K, Yamane K (1990b) Complementation of the protein transport defect of an Escherichia coli secY mutant (secY24) by Bacillus subtilis secY homologue. FEBS Lett **273**: 75-78

Oliver DB, Beckwith J (1981) *E.coli* mutant pleiotropically defective in the export of secreted proteins. Cell **25**: 765-772

Oliver DB (1985) Identification of five new essential genes involved in the synthesis of a secreted protein in Escherichia coli. J Bacteriol **161**: 285-291

Oliver DB, Cabelli RJ, Jarosik GP (1990) SecA protein: Autoregulation initiator of secretory precursor protein translocation across the E.coli plasma membrane. J Bioenerget Biomembranes **22**: 311-336

Parsell D, Sauer RT (1988) Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in Escherichia coli: dependence on protein level not protein degradation. Genes Develop **3**: 1226-1232

Phillips GJ, Silhavy TJ (1990) Heat shock proteins DnaK and GroEL facilitate export of LacZ hybrid proteins in E.coli. Nature **344**: 882-884

Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer TF (1987) Gene structure and extracellular secretion of Neisseria gonorrhoeae IgA protease. Nature **325**: 458-462

Poritz MA, Bernstein HD, Strub K, Zopf D, Wilhelm H, Walter P (1990) An E.coli ribonucleoprotein containing 4.5S RNA resembles mammalian Signal Recognition Particle. Science **260**: 1113-1117

Rescei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A, Novick RP (1986) Regulation of exoprotein gene expression in Staphylococcus aureus by agr. Mol Gen Genet **202**: 58-61

Rescei PA, Gruss AD, Novick RP (1987) Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from Staphylococcus simulans. Proc Natl Acad Sci **84**: 1127-1131

Reyss I, Pugsley AP (1990) Five additional genes in the pulC-O operon of the gram-negative bacterium Klebsiella oxytoca UNF5023 which are required for pullulanase secretion. Mol Gen Genet **222**: 176-184

Rheinberger HJ, Geigenmüller U, Wedde M, Nierhaus KH (1988) Parameters for the preparation of Escherichia coli ribosomes and ribosomal subunits active in tRNA binding. Methods Enzymol, Academic Press, New York **164**: 658-670

Ribes V, Römisch K, Giner A, Dobberstein B, Tollervey D (1990) E.coli 4.5S RNA is part of a ribonucleoprotein particle that has properties related to Signal Recognition Particle. Cell **63**: 591-600

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

Rollo EE, Oliver DB (1988) Regulation of the Escherichia coli secA gene by protein secretion defects: Analysis of secA, secB, secD and secY mutants. J Bacteriol **170**: 3281-3282

Römisch K, Webb J, Herz J, Prehn S, Frank R, Vingron M, Dobberstein B (1989) Homology of 54K protein of signal recognition particle, docking protein and two E.coli proteins with putative GTP-binding domains. Nature **340**: 478-482

Sadaie Y, Takamatsu H, Nakamura K, Yamane K (1991) Sequence similarity of the wild-type div$^+$ gene of Bacillus subtilis to the Escherichia coli secA gene. Gene **98**: 101-105

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci **74**: 5463-5467

Savitz AJ, Meyer DI (1990) Identification of a ribosome receptor in the rough endoplasmic reticulum. Nature **346**: 540-544

Schatz PJ, Riggs PD, Jacq A, Fath MJ, Beckwith J (1989) The secE gene encodes an integral membrane protein required for protein export in Escherichia coli. Genes Develop **3**: 1035-1044

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

Schmidt MG, Rollo EE, Grodberg J, Oliver DB (1988) Nucleotide sequence of the secA gene and secA (Ts) mutations preventing protein export in Escherichia coli. J Bacteriol **170**: 3404-3414

Schmidt MG, Oliver DB (1989) SecA protein autogenously represses its own translation during normal protein secretion in Escherichia coli. J Bacteriol **171**: 643-649

Schreyer R, Böck A (1973) Phenotypic suppression of a fructose-1,6-diphosphate aldolase mutation in Escherichia coli. J Bacteriol **115**: 268-276

Shiba K, Ito K, Yura T, Cerretti DP (1984) A defined mutation in the protein export gene within the spc ribosomal protein operon of Escherichia coli: Isolation and characterization of a new temperature-sensitive secY mutant. EMBO J 3: 631-635

Shiba K, Ito K, Yura T (1986a) Suppressors of the secY24 mutation: Identification and characterization of additional ssy genes in Escherichia coli. J Bacteriol 166: 849-856

Shiba K, Ito K, Nakamura Y Dondon J, Grunberg-Manago M (1986b) Altered translation initiation factor 2 in the cold-sensitive ssyG mutant affects protein export in Escherichia coli. EMBO J 5: 3001-3006

Shultz J, Silhavy TJ, Berman ML, Fiil N, Emr SD (1982) A previously unidentified gene in the *spc* operon of *E.coli* K12 specifies a component of a proteinexport machinery. Cell 31:227-235

Shuman HA, Silhavy TJ, Beckwith J (1980) Labelling of proteins with β-galactosidase by gene fusions. J Biol Chem 255: 168-174

Silhavy TJ, Berman M Enquist L (1984) Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor, New York.

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98: 503-518

Stader J, Gansheroff LJ, Silhavy TJ (1989) New suppressors of signal-sequence mutations, prlG, are linked tightly to the secE gene of Escherichia coli. Genes Develop 3: 1045-1052

Stüber D, Bujard H (1981) Organization of transcriptional signals in plasmids pBR322 and pACY184. Proc Natl Acad Sci 78: 167-171

Suh JW, Boylan SA, Thomas SM, Dolan KM, Oliver DB, Price CW (1990) Isolation of a secY homologue from Bacillus subtilis: evidence for a common protein export pathway in eubacteria. Mol Microbiol 4: 305-314

Swidersky UE, Hoffschulte HK, Müller M (1990) Determinants of membrane-targeting and transmembrane translocation during bacterial protein export. EMBO J 9: 1777-1785

Takano T, Kakefuda T (1972) Involvement of bacterial factor in morphogenesis of bacteriophage capsid. Nature New Biol 239: 34-37

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci 67: 4350-4354

Ueguchi C, Ito K (1990) Escherichia coli sec mutants accumulate a processed immature form of Maltose binding protein (MBP), a late phase intermediate in MBP Export. J Bacteriol 172: 5643-5649

Van Dyk TK, Gatenby AA, LaRossa RA (1989) Demonstration by genetic suppression of interaction of GroE products with many proteins. Nature 342: 451-453

von Heijne G (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. Nucl Ac Res 14: 4683-4690

von Heijne G, Abrahamsen L (1989) Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. FEBS Lett 244: 439-446

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

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

Walleczek J, Schüler D, Stöffler-Meilicke M, Brimacombe R, Stöffler G (1988) A model for the spatial arrangement of the proteins in the large subunit of the Escherichia coli ribosome. EMBO J 7: 3571-3576

Watanabe M, Blobel G (1989) SecB functions as a cytosolic signal recognition factor for protein export in E.coli. Cell 58: 695-705

Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM (1987) Molecular biology of the gene. Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, Californien.

Wittmann HG, Wittmann-Liebold B (1974) Chemical structure of bacterial ribosomal proteins. Ribosomes; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

Wolfe PB, Wickner W, Goodman JM (1983) Sequence of leader peptidase gene of Escherichia coli and the orientation of leader peptidase in the bacterial envelope. J Biol Chem 258: 12073-12080

Wong SL, Doi RH (1986) Determination of the signal sequence cleavage site in the preprosubtilisin of Bacillus subtilis. J Biol Chem 261: 10176-19181

Yamane K, Ichihara S, Mizushima S (1987) In vitro translocation of protein across Escherichia coli membrane vesicles requires both the proton motive force and ATP. J Biol Chem 262: 2358-2362

Yanish-Perron CJ (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains. Gene 33: 103

Yochem J, Uchida H, Sunshine M, Saito H, Georgopoulos CP, Feiss M (1978) Genetic analysis of two genes, dnaJ and dnaK, necessary for Escherichia coli and bacteriophage Lambda DNA replication. Mol Gen Genet 164: 9-14

ANHANG

ABKÜRZUNGEN

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BisTris	Bis[2-hydroxyethyl]imino-tris[hydroxymethyl]methan
dNTP	Desoxy-Nukleosid-triphosphate (*N* steht für die Basen: *A* für Adenosin, *C* für Cytidin, *G* für Guanosin, *T* für Thymidin
ddNTP	Didesoxy-Nukleosid-triphosphate
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylen-diamino-tetraacetic acid
g	Erdbeschleunigung
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
kB	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria broth
OD	Optische Dichte
RSA	Rinderserumalbumin
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SRP	Signal Recognition Particle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	NNNN-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	
U	Units (Einheit der enzymat.Aktivität)
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

Ein- und Drei-Buchstaben Code der Aminosäuren

Alanine	Ala	A	Leucine	Leu	L
Arginine	Arg	R	Lysine	Lys	K
Asparagine	Asn	N	Methionine	Met	M
Aspartic acid	Asp	D	Phenylalanine	Phe	F
Cysteine	Cys	C	Proline	Pro	P
Glutamic acid	Glu	E	Serine	Ser	S
Glutamine	Gln	Q	Threonine	Thr	T
Glycine	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidine	His	H	Tyrosine	Tyr	Y
Isoleucine	Ile	I	Valine	Val	V

(Tabelle entnommen aus `Biochemicals for molecular biology', Fa.Boehringer, Mannheim)

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

Herrn Professor H.Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Professor C.Hollenberg danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Der Dechema, Frankfurt, gilt mein besonderer Dank für die großzügige, finanzielle Unterstützung im Rahmen des Biotechnologie-Stipendiums.

B.Bachmann, J.Beckwith, C.Georgopoulos, F.Götz, C.Kumamoto, Y.Nakamura, D.B.Oliver und H.Schwarz danke ich für die freundliche Überlassung verschiedener Stämme, Plasmide und Antikörper.

Herrn S.Peters danke ich für die Ausführung der fotographischen Arbeiten.

Bei Herrn Dr.R.Freudl möchte ich mich für seine Diskussionsbereitschaft und seine Ratschläge im Verlauf dieser Arbeit bedanken .

Sabine Freundlieb, Johannes Gebert, Herrn Prof.W.Boos und seiner Arbeitsgruppe danke ich für den schönen, zweimonatigen Aufenthalt in ihrem Konstanzer Labor. Diese Zeit hat mir die Motivation für die Promotion gegeben. Ferner danke ich Dr.B.Bukau für ein für meine Arbeit sehr aufschlußreiches Telefongespräch.

Bei Marion Spies und Michael Klein möchte ich mich für die motivierte, tatkräftige Unterstützung dieser Arbeit bedanken.
Herrn Dr.K.L.Schimz danke ich ganz herzlich für die mühselige Arbeit des Korrekturlesens.

Allen Institutsmitarbeitern danke ich für das nette Arbeitsklima, das über manche Durststrecke hinweghalf.

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

JÜL-2494
Juli 1991
ISSN 0366-0885