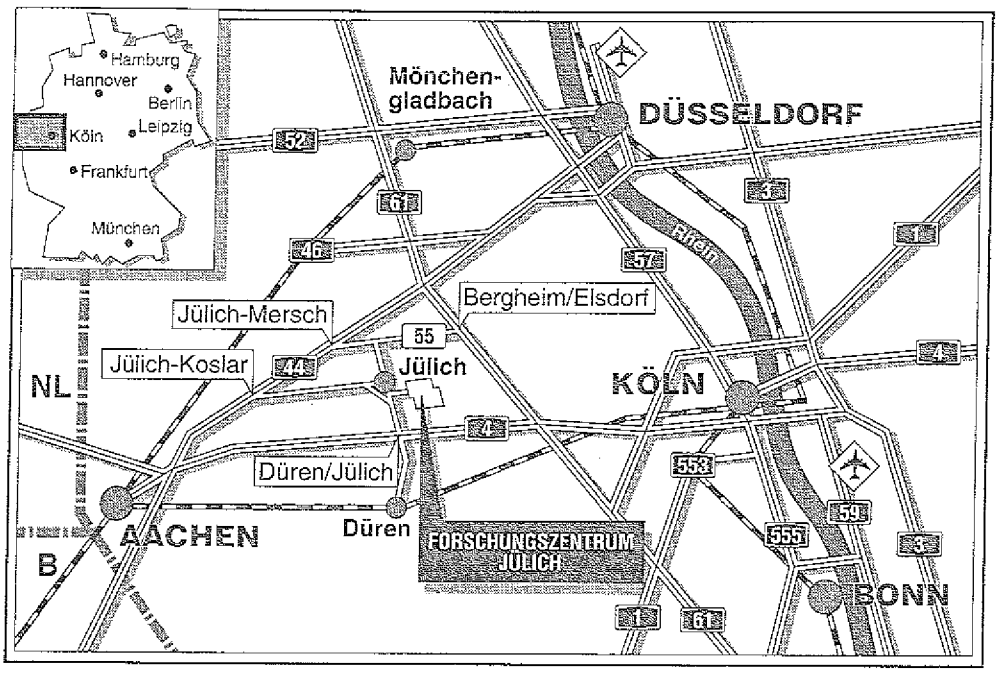
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

Institut für Biotechnologie

Isolierung und Charakterisierung der *secY*-Gene aus *Bacillus licheniformis* und *Staphylococcus carnosus*

Silvia Tschauder



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2779
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-2779
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 und Charakterisierung der *secY*-Gene aus *Bacillus licheniformis* und *Staphylococcus carnosus*

Silvia Tschauder

ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bla, Amp	ß-Lactamasegen
bp	Basenpaare
cat, Cm	Chloramphenicol-Acetyl-Transferasegen
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-diamino-tetraacetic acid
EMS	Ethylmethansulfonat
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-ß-D-Thiogalaktopyrnosid
Kan	Kanamycinresistenzgen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
m.o.i.	multiplicity of infection
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid
NMG	N-Methyl-N'-NItro-N-Nitrosoguanidin
OD	Optische Dichte
ONPF	Ortho-Nitrophenyl-ß-D-Fukosid
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	NNNN- Tetramethylethylendiamin
tet	Tetracyclinresistenzgen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit, Enzymeinheit
Upm	Umdrehungen pro min
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
X-Phosphat	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-Phosphat

Ein- und Drei- Buchstaben Code der Aminosäuren:

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

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

Prokaryotische und eukaryotische Zellen sind in unterschiedlichem Maße kompartimentiert, wobei diese Kompartimente durch Membranen voneinander abgegrenzt werden. Während eukaryotische Zellen über einen komplexen Aufbau durch eine Vielzahl von Kompartimenten wie u.a. Zellkern, Endoplasmatisches Retikulum (ER), Mitochondrien verfügen, liegt den Bakterienzellen ein einfaches Bauprinzip zugrunde. Sie besitzen eine (Gram-positive Bakterien) oder zwei Membranen (Gram-negative Bakterien), die das Cytoplasma von der Umgebung abgrenzen und einen Informationsfluß zwischen den Zellen und ihrer Umgebung kontrollieren. Die Membranen stellen als Lipiddoppelschichten Schranken für die Passage polarer Moleküle dar und bestehen aus Phospholipiden, in die Proteine ein- und aufgelagert sind, die als Pumpen, Kanäle, Rezeptoren und Enzyme dienen.

In Gram-negativen Bakterien sind die innere und äußere Membran durch das Periplasma räumlich voneinander getrennt. Der als Periplasma bezeichnete Raum besteht aus einem stark hydratisierten Peptidoglykangerüst, das über Lipoproteine mit der äußeren Membran vernetzt ist (Schlegel, 1985). Bei Gram-positiven Bakterien schließt die Zellwand mit einer mehrschichtigen Peptidoglykanschicht ab, die auf der Cytoplasmamembran aufgelagert ist (Mèzes & Lampen, 1985).

Alle Proteine einer Bakterienzelle werden im Cytoplasma synthetisiert und müssen zu ihrem Bestimmungsort transportiert werden, der in der inneren und äußeren Membran, im Periplasma oder im umgebenden Medium liegen kann. Der dazu erforderliche Transport von Proteinen durch die Cytoplasmamembran, die sogenannte Translokation, wurde vor allem an dem Gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* intensiv untersucht (Wickner et al., 1991).

In *E.coli* wurden verschiedene Faktoren eines Proteinexport-Apparates identifiziert und genetisch sowie biochemisch untersucht. Es gab zwei verschiedene experimentelle Ansätze zur Isolierung von Exportkomponenten:

1. Durch Expression eines Fusionsproteins, das sich aus dem N-Terminus eines exportierbaren Proteins (LamB, MalE) und aus einem cytoplasmatischen Protein (ß-Galaktosidase) zusammensetzte, konnten konditional-letale Mutanten isoliert werden, die einen pleiotropen Defekt im Proteinexport aufwiesen (*secA, secB, secD/secF;* sec für 'secretion'). Die Selektion beruhte darauf, daß die Fusionsproteine unter Überproduktionsbedingungen nicht exportiert werden können und durch die Blockierung von Exportstellen in der Cytoplasmamembran Letalität bewirken. Zellen, die unter diesen Selektionsbedingungen überleben, besitzen eine Mutation in einer am Export des Fusionsproteins beteiligten Komponenten. (Bieker et al., 1990)

2. Durch die Isolierung von Suppressormutanten, die ein Protein mit einer veränderten Signalsequenz (MalE oder LamB; Veränderung der Ladung, Deletionen) wieder exportieren konnten. Diese Selektion beruht darauf, daß diese Vorläuferproteine mit dem defekten Signalpeptid nicht exportiert werden können und somit nicht auf Maltose wachsen können. Zellen, die auf Maltose wieder wachsen können, tragen Mutationen in Komponenten, die während der Translokation eines sekretorischen Proteins eine Wechselwirkung mit der Signalsequenz eingehen. Diese dominanten Suppressoren wurden mit *prlA, prlD* und *prlG* bezeichnet (prl für 'protein localization') (Bieker et al., 1990).

Aus in vivo und in vitro Charakterisierung der Sec-/Prl-Komponenten wurde folgendes Modell für den Transport eines Proteins über die Cytoplasmamembran aufgestellt (Abbildung 1).

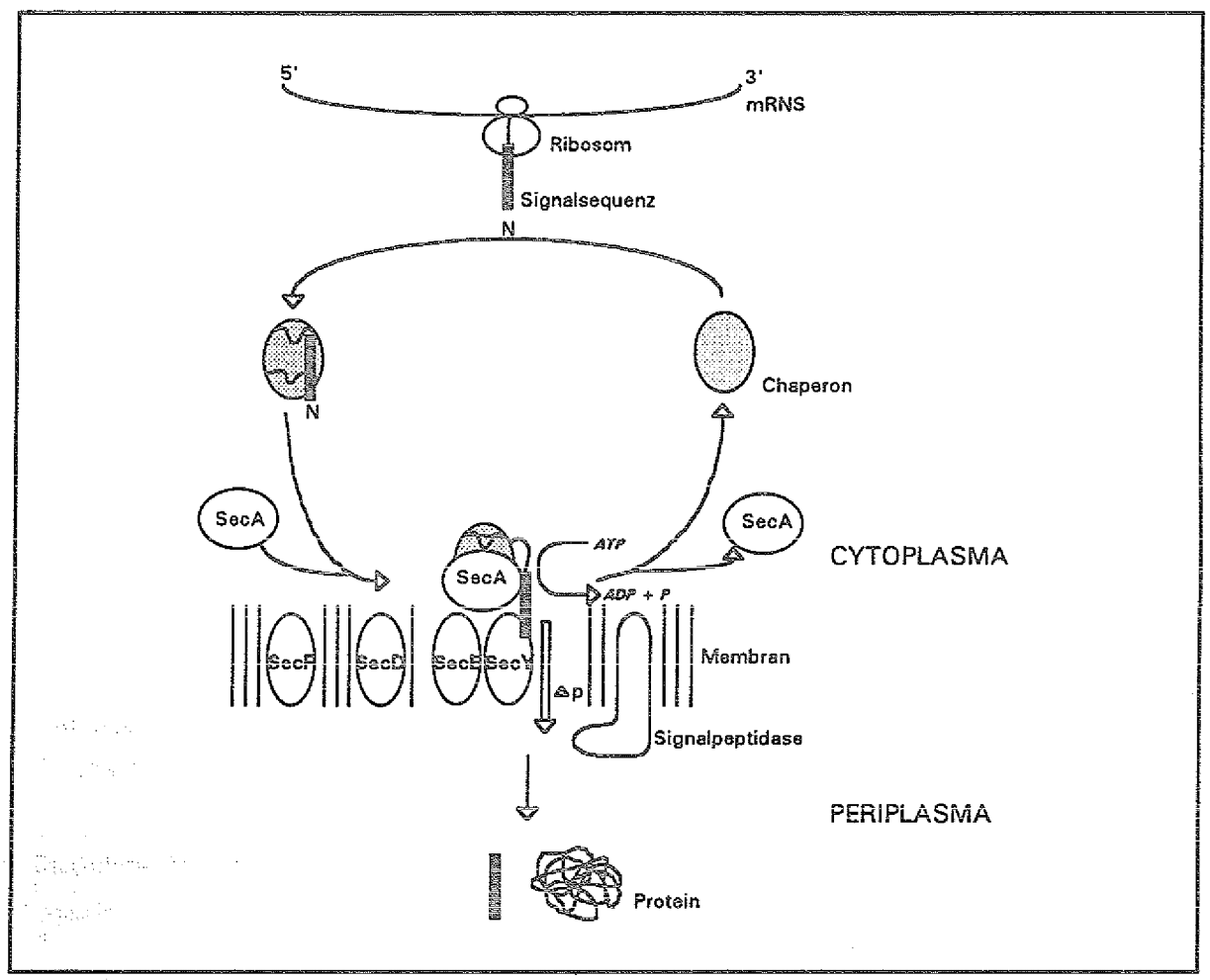


Abb. 1: Modell für den Transport eines Proteins ins Periplasma von *E.coli*. Proteine mit aminoterminaler Signalsequenz werden durch Chaperone gebunden. Mit beginnender Translokation, an der die Proteine SecA, SecE und SecY beteiligt sind, werden die Chaperone freigesetzt. Die Abspaltung der Signalsequenz erfolgt durch die Signalpeptidase. An der Freisetzung der Proteine von der Membran sind die Proteine SecD und wahrscheinlich SecF beteiligt. Die Translokation ist abhängig von ATP und dem Protonenpotential (Δp).

Die Proteine, die durch die Cytoplasmamembran transportiert werden müssen, werden in den allermeisten Fällen als Vorläuferproteine mit einer aminoterminalen Sequenz von 15-30 Aminosäuren, dem sogenannten Signalpeptid, synthetisiert. Obwohl auf der Ebene der Aminosäuresequenzen bei den Signalpeptiden keine Homologien vorhanden sind (von Heijne, 1985), läßt sich ein gemeinsames Bauprinzip feststellen: mindestens 1 oder mehrere positiv geladene Aminosäuren am N-Terminus (n-Region), gefolgt von einem zentralen hydrophoben Bereich (h-Region), bestehend aus 8-11 Aminosäuren, und einer mindestens aus 5-6 polaren Aminosäuren bestehenden c-Region (von Heijne, 1985, 1986). Die Ladungsverteilung der Signalpeptide ist von entscheidender Bedeutung für die elektrostatische Wechselwirkung mit der Cytoplasmamembran und damit möglicherweise für die Initiation der Translokation (de Vrije et al., 1990; Galluser & Kuhn, 1990; Boyd & Beckwith, 1990).

Eine Gruppe von Proteinen, die 'molekularen Chaperone' (Hemmingsen et al., 1988; Abb.1), z.B. GroEL, DnaK oder SecB (Bochkareva et al., 1988; Lecker et al., 1989; Laminet et al. 1990; Bardwell & Craig, 1984; Kumamoto & Beckwith, 1983), binden an verschiedene Proteinvorläufer, um deren exportkompetente Konformation aufrecht zu erhalten bzw. Aggregation und Falschfaltung zu verhindern (Lecker et al., 1990). Abwesenheit des SecB führt nicht zum Verlust der Lebensfähigkeit, wenn die Zellen mit reduzierter Geschwindigkeit wachsen. Möglicherweise übernehmen die Hitzeschockproteine GroEL und DnaK unter diesen Bedingungen die Funktion von SecB (Altman et al., 1991). SecB bindet an Strukturen in der Signalsequenz und dem reifen Teil des Vorläuferproteins (Collier et al., 1988; Gannon et al., 1989). Eine Bindung von SecB an prozessierte, korrekt gefaltete Proteine, sowie an ein cytoplasmatisches Protein, die ß-Galaktosidase, konnte nicht nachgewiesen werden (Kumamoto, 1989). Das SecB-Protein besitzt ein Molekulargewicht von ca. 16000 (Kumamoto & Nault, 1989) und liegt als Homotetramer von 64kD löslich im Cytoplasma vor (Watanabe & Blobel, 1989). Der SecB-Vorläuferprotein-Komplex zeigt eine hohe Affinität zu SecA, einem peripheren Protein der Cytoplasmamembran (Hartl et al., 1990) und Bestandteil des Translokators. Damit vermittelt SecB die spezifische Bindung des Vorläuferproteins an die Exportstellen in der Membran (Hartl et al., 1990).

Das SecA ist ein 102kD großes, membranassoziiertes Protein mit ATPase-Aktivität (Lill et al., 1989; Abb.1). Diese wird auch als Translokations-ATPase bezeichnet und wird durch die Wechselwirkung mit sauren Phospholipiden der Membran, dem Signalpeptid und reifem Teil eines Vorläuferproteins und dem membranständigen SecY aktiviert (Lill et al., 1990; Cunnigham & Wickner, 1989). Die Bindung von ATP initiiert die Translokation von ca. 20 Aminosäuren des Vorläuferproteins, so daß die Signalsequenz von der Signalpeptidase auf der periplasmatischen Seite abgeschnitten werden kann. Das Protein wird durch ATP-Hydrolyse vom SecA freigesetzt und die weitere Translokation wird durch das elektrochemische Potential getrieben (Schiebel et

al., 1991; Driessen, 1992). Die Expression des *secA*-Gens (*prlD*) ist abhängig von der Translation des im *secA* Operon davor lokalisierten *Gens X* (Schmidt et al., 1988) und ist auf Ebene der Translation autoreguliert (Schmidt & Oliver, 1989, Schmidt et al., 1991). Die in der Zelle vorhanden SecA-Menge wird durch Defekte im Proteinexport erhöht (Gardel et al., 1987; Rollo & Oliver, 1988).

Weitere Komponenten des Translokationsapparates sind SecE (Schatz et al., 1989; Abb.1) und SecY (Ito, 1984; Abb.1), die in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind. Das *secE*-Gen kodiert für ein 13,6kD großes Protein mit drei membrandurchspannenden Domänen, von denen jedoch wahrscheinlich nur die dritte essentiell ist (Downing et al., 1990; Schatz et al., 1991). Kältesensitive Mutationen führen zu einer erniedrigten Expressionsrate des SecE-Proteins und damit zu einem Defekt im Proteinexport. Die Isolierung als Suppressor von Signalsequenzmutanten (*prlG*) deutet auf eine Wechselwirkung des SecE-Proteins mit der Signalsequenz von Vorläuferproteinen hin (Stader et al., 1989). SecE und SecY sind als Bestandteile des Translokators in der Membran integriert, der mit dem Vorläuferprotein wechselwirkt (Brundage et al., 1990, 1992). Genetische Untersuchungen zeigen einen sequentiellen Wirkungsmechanismus, bei dem SecE vor und unabhängig von SecY mit der Signalsequenz in Wechselwirkung zu treten scheint (Bieker & Silhavy, 1990; Bieker-Brady & Silhavy, 1992).
SecY konnte durch die Isolation einer konditional-letalen Mutante identifiziert werden, die aus einer lokalisierten Mutagenese im Bereich von Operons ribosomaler Proteingene hervorging (Ito et al. 1983). Das *secY*-Gen liegt zusammen mit elf Genen für ribosomale Proteine im *spc*-Operon und kodiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 49000, das translationsgekoppelt mit dem vorgelagerten L15-Protein exprimiert wird (Cerretti et al., 1983; Ito et al., 1984) und zehn Transmembransegmente (Akiyama & Ito, 1987) besitzt. Die Wechselwirkung von SecY mit der Signalsequenz von Exportproteinen konnte durch die Isolierung von Suppressormutanten (*prlA*) von Signalsequenzmutanten des LamB-Proteins gezeigt werden (Emr et al., 1981). Weitere Hinweise für die Signalsequenzerkennung durch *prlA*-Mutanten (*prlA4-1*, *prlA401*) ergaben die Arbeiten von Iino & Sako (1988) und Sako (1991), die die Translokationsfähigkeit der Staphylokinase in *prlA*-Mutanten durch Veränderung ihrer Signalsequenz wiederherstellten. Weiterhin weisen auch Arbeiten von Puziss et al. (1992) über die Suppression (*prlA666*) des starken Translokationsdefekts eines Maltosebindeproteins, das negative Ladungen neben der h-Region der Signalsequenz trägt und positive Ladungen am Beginn des reifen Proteins enthält, auf die Bedeutung des Transmembransegments 7 für die Signalsequenzerkennung sowie eine Wechselwirkung des SecY (PrlA) mit einer Translokations-Inititiations-Domäne am Beginn des reifen Proteins hin (Ito, 1992). Durch lichtinduzierte Quervernetzungs- ("Photocross-linking") Experimente konnten Joly & Wickner (1993) zeigen, daß SecY und SecA in unmittelbarer Umgebung des Vorläuferproteins während der Passage durch die Membran liegen.

SecD und SecF sind ebenfalls integrale Proteine der Cytoplasmamembran (Abb.1). Kältesensitive Mutanten von *secD* und *secF* haben bei der nicht-permissiven Temperatur pleiotrope Defekte im Proteinexport. Die beiden Gene sind in einem Operon von sieben Genen organisiert, werden kotranskribiert und kodieren für Proteine mit einem Molekulargewicht von 67000 (SecD) bzw. 35000 (SecF), die große periplasmatische Domänen besitzen (Gardel et al., 1990; Matsuyama et al., 1992). Es gibt verschiedene Hinweise darauf, daß SecD und SecF an einem späten Schritt der Translokation beteiligt sind: beide Proteine besitzen große periplasmatische Domänen, es konnten keine Signalsequenz- (*prl-*) Mutationen von ihnen isoliert werden und Bieker-Brady & Silhavy (1992) konnten zeigen, daß die Funktion von SecD und SecF nach der von SecY im Exportweg liegt. Für SecD wurde die Beteiligung an der Freisetzung translozierter Proteine von der Cytoplasmamembran direkt bewiesen (Matsuyama et al., 1993).

Beim Durchtritt des Vorläuferproteins durch die Cytoplasmamembran wird die Signalsequenz von der Signalpeptidase I oder II (Lipoprotein-Signalpeptidase) auf der periplasmatischen Seite abgespalten (Abb.1). Die Signalpeptidase I erkennt die Spaltstelle an den kleinen, apolaren Aminosäuren (>50% Ala) in den Positionen -1 und -3 (-1/-3-Regel; Zahlen geben Positionen der Aminosäuren an, berechnet von erster Aminosäure des reifen Proteins als +1; von Heijne, 1986; Dalbey & Wickner, 1985; Schiebel et al., 1991), wohingegen die Signalpeptidase II Proteine spaltet, die einen Cystein-Rest an Position +1 besitzen, der durch Glyzerid-Fettsäuren modifiziert sein muß. Durch Überproduktion und Selektion auf erhöhte Prozessierungskinetik des M13-'Procoat'-Proteins wurde das Gen für die Signalpeptidase I, *lep*, isoliert (Mandel & Wickner, 1979), das für ein 36kD großes Protein mit zwei Transmembranbereichen und einem großen periplasmatischen C-Terminus kodiert (Date, 1983) . Das Gen der Signalpeptidase II, *lsp*, kodiert für ein 18kD-Protein, das mit vier Segmenten in der Membran verankert ist (Dev & Ray, 1984; Innis et al., 1984). Nach dem Transport durch die Cytoplasmamembran nimmt das exportierte Protein seine endgültige Faltung ein und wird entweder ins Periplasma freigesetzt oder in die äußere Membran bzw. ins Medium weitergeleitet.
Proteine, die in das Außenmedium sezerniert werden, verfügen über ein für das jeweilige Protein spezifisches Exportsystem, wie z.B. α-Hämolysin aus *E.coli* (Mackman et al., 1986) oder Pullulanase aus *Klebsiella oxytoca* (Reyss & Pugsley, 1990). Andere besitzen die notwendigen Exportkomponenten im Protein selbst, wie z.B. die C-terminale Helferdomäne der IgA-Protease von *Neisseria gonorrhoeae* (Pohlner et al., 1987), die eine Pore in der äußeren Membran bildet.

Neben diesem beschriebenen Mechanismus der Translokation über die Sec-Proteine, dem sogenannten *sec*-abhängigen Weg, gibt es auch Proteine, wie z.B. das M13-'Procoat'-Protein, die über einen *sec*-Protein-unabhängigen Weg exportiert werden (Wolfe et al., 1985). Neben dem Sec-Protein-vermittelten Exportmechanismus könnte es zusätzlich jedoch auch noch alternative Exportwege geben. Hinweise darauf ergeben sich aus dem Nachweis von *E.coli* Proteinen, die

Ähnlichkeiten mit den Bestandteilen des eukaryotischen Signalerkennungspartikels (SRP) aufweisen. SRP ist ein multifunktioneller Protein-RNS-Komplex aus sechs Proteinen und einer 7SRNS, der an die Signalsequenzen von sekretorischen Proteinen bindet, sobald diese aus dem Ribosom herausragen. Daraufhin wird die Translation der Vorläuferprotein-mRNS gestoppt, bis der Komplex an einen Rezeptor ('Docking Protein') am Endoplasmatischen Retikulum (ER) bindet. Dort wird dann die Translation wiederaufgenommen und die Translokation beginnt. In *E.coli* wurden die Proteine P48 (=Ffh), welches starke Homologie zu dem 54kD-Protein des eukaryotischen SRP besitzt und FtsY, das starke Sequenzhomologie zum eukaryotischen 'Docking-Protein' besitzt, nachgewiesen (Poritz et al., 1988; Römisch et al., 1989; Bernstein et al., 1989). Das Ffh-Protein ist mit einer 4,5S RNS (Ffs) assoziiert, die ihrerseits homolog zur eukaryotischen 7S RNS des SRP-Partikels ist. Das Protein P48 und die 4,5S RNS von *E.coli* sind Komponenten eines Ribonukleopartikels, welches möglicherweise SRP-ähnliche Funktionen im Proteintransport übernimmt.

Obwohl Gram-positive Bakterien große Mengen an Proteinen exportieren und in der industriellen Produktion extrazellulärer Enzyme (u.a. Proteasen, Lipasen, Amylasen und andere hydrolytische Enzyme) eine große Rolle spielen (Priest, 1977; Debabov, 1982), ist wenig über den Mechanismus der Proteinsekretion dieser Organismen bekannt. Trotz des unterschiedlichen Zellwandaufbaus gibt es jedoch Hinweise auf die Existenz eines vergleichbaren Exportapparats in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien.

So zeigen auch die Exportproteine von Gram-positiven Bakterien den typischen Aufbau eines Vorläuferproteins mit Signalsequenz und reifem Teil des Proteins. Das in der Regel längere Signalpeptid besteht häufig aus mehr als 30 Aminosäureresten und trägt am N-Terminus mehr positive Ladungen als die entsprechenden Gram-negativen Signalpeptide (von Heijne & Abrahmsén, 1989). Wie auch bei *E.coli* befindet sich am Ende des Signalpeptids die Aminosäuresequenz Ala-X-Ala (-3, -1-Regel), die Erkennungssequenz für die Signalpeptidase. Diese Sequenz wird auch bei den Gram-positiven Bakterien durch Signalpeptidasen erkannt, wie die Isolierung und Charakterisierung des Gens für die Signalpeptidase I aus *B.subtilis* zeigte. Die Signalpeptidase I ist ein Protein von 21kD, welches einen Membrananker besitzt (van Dijl et al., 1992). Ferner ist auch die Signalpeptidase II aus *B.licheniformis, B.cereus* und *S.aureus* untersucht worden, die wie die Signalpeptidase II aus Gram-negativen Bakterien aus vier Transmembranbereichen besteht (Zhao & Wu, 1992). Zudem werden die Exportproteine oft als Prä-pro-proteine synthetisiert, die zweimal prozessiert werden, d.h. nach der Signalsequenz wird das Propeptid abgespalten und das reife Protein entsteht. Die Abspaltung des Propeptids ist für die Freisetzung der Proteine von der Zellwand notwendig (Power et al., 1986; Pugsley, 1989).

Die Sequenzierung des *spc*-Operons bei *B.subtilis* und die Verwendung des *secY*-Gens aus *E.coli* als Sonde führte zur Identifizierung eines Gens, das starke Homologie zum *secY*-Gen von *E.coli* aufweist (Suh et al., 1990; Nakamura et al., 1990a). Expression des SecY-homologen Proteins aus *B.subtilis* in einer temperatursensitiven *secY24*-Mutante von *E.coli* führte nicht zur Komplementation des Wachstumsdefekts, vermittelte aber unter bestimmten Bedingungen eine Verbesserung des Proteinexports (Nakamura et al., 1990b).

Auch für das SecA-Protein konnte eine homologe Komponente in *B.subtilis* nachgewiesen werden. Das *div*-Gen von *B.subtilis* wurde durch die Komplementation einer temperatursensitiven *B.subtilis*-Mutante identifiziert, die neben einem pleiotropen Defekt in der Zellteilung, Entwicklung von Kompetenz und Sporulation eine verminderte Sekretion von extrazellulären Enzymen bei der nicht-permissiven Temperatur aufweist (Sadaie & Kada, 1985). Das *div*-Gen kodiert ein Protein, dessen Aminosäuresequenz 50% Identität mit der SecA-Sequenz von *E.coli* besitzt (Sadaie et al., 1991). Zudem ist das *secA*-Gen aus *B.subtilis* mit Hilfe des *secA*-Gens aus *E.coli* als Sonde identifiziert worden (Overhoff et al., 1991). Die Expression eines 275 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Fragments komplementiert den Wachstumsdefekt einer temperatursensitiven *secA*-Mutante von *E.coli* (Overhoff et al., 1991).

Diese Befunde machen es sehr wahrscheinlich, daß die ersten Schritte des Proteintransports durch homologe Komponenten der Sec-Proteine von *E.coli* vermittelt werden. Die folgenden Schritte könnten jedoch unterschiedlich ablaufen. Hierfür spricht, daß Proteine identifiziert wurden, die bei der Reifung der α-Amylase von *B.subtilis* und einer Protease von *Lactococcus lactis* beteiligt sind. Dies sind die extrazellulären Lipoproteine PrsA von *B.subtilis* (Kontinen et al., 1991) und PrtM von *L.lactis* (Haandrikman et al., 1991), die wahrscheinlich für die korrekte Faltung der Proteine nach der Translokation sowie deren Freisetzung von der Membran verantwortlich sind. Da es bislang nicht gelungen ist, SecD- und SecF-homologe Proteine zu isolieren, ist es sehr wahrscheinlich, daß deren Funktionen in den späten Schritten der Translokation von Proteinen durch PrsA bzw. PrtM erfüllt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung der *secY*-Gene von *Bacillus licheniformis* und *Staphylococcus carnosus* sowie die funktionelle Charakterisierung der entsprechenden SecY-Proteine in *Escherichia coli secY*-Mutanten. Dazu sollte zuerst ein Nachweis der Expression der Gram-positiven SecY-Proteine in der Gram-negativen *E.coli*-Zelle erbracht werden. Anschließend sollte das Wachstums- und Translokationsverhalten der *E.coli*-SecY-Mutanten in Anwesenheit der Gram-positiven *secY*-Gene untersucht werden.
Zudem sollten mit Hilfe einer Oligomutagenese verschiedene Aminosäuren des *E.coli*-SecY-Proteins ausgetauscht und somit ihre Rolle für die Struktur und Funktion des Proteins bzw. beim Protonenantiport, der mit der Translokation verbunden ist, analysiert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Bakterienstämme, Phagen und Plasmide

2.1.1. Bakterienstämme

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

Tabelle 1: Verwendete Gram-positive Bakterienstämme: B.subtilis, B.licheniformis, S.carnosus

STAMM	RELEVANTER GENOTYP	REFERENZ
Bacillus subtilis		
DB104	*his nprR2 nprE18 ΔaprA3*	Kawamura & Doi, 1984
Bacillus licheniformis		
DSM13	Wildtyp	Smith et al., 1964
P300	Subtilisin-Überproduzent	Henkel KGaA
Staphylococcus carnosus		
TM300	Wildtyp	Schleifer & Fischer, 1982

Tabelle 2: Verwendete Gram-negative Bakteriensäme: Escherichia coli

STAMM	RELEVANTER GENOTYP	REFERENZ
BHB2688	*N205 recA⁻* (λ *imm434 clts b2 red3 Eam4 Sam7)/λ*	Hohn, 1979
BHB2690	*N205 recA⁻* (λ *imm434 clts b2 red3 Dam15 Sam7)/λ*	Hohn, 1979
BL21	F' *ompT* r^-_B m^-_B	Grodberg & Dunn, 1988
BNN97	BNN93 (λgt11) *hsdR⁻ hsdM⁺ supE thr leu thi lacY1 tonA21*	Young & Davis, 1983
BW313	*dut ung thi1 relA spoT'*/F' *lysA*	Kunkel, 1985

Fortsetzung von Tabelle 2: E.coli

STAMM	RELEVANTER GENOTYP	REFERENZ
CA8000	*thi⁻ lac*$^{+}$	Brickman et al., 1973
CC118	*Δ(ara leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA20 galE galK thi argE(am) araD139 rpoB recA1 rpsE*	Manoil & Beckwith, 1985
CC202	CC118/F42 *lacI3 zzf-2*::TnPhoA	Llyod & Kadner, 1990
IQ85	MC4100 *secY24*^{ts} *araD139 Δ(argF-lac)U169 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR zhc*::Tn10 *thi*	Shiba et al., 1984
JM105	*supE endA sbcB15 hsdR4 rpsL thi Δ(lac-proAB)* F'[*traD36 proAB*$^{+}$ *lacI*^{q} *lacZΔ M15*]	Yanish-Perron, 1985
JM105/ 3-1	JM105 (*secY24*^{ts}, Tn10)	diese Arbeit
JM109	*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB)* F'[*traD36 proAB*$^{+}$ *lacI*^{q} *lacZΔM15*]	Yanish-Perron, 1985
MC1061	*araD139 Δ(ara,leu)7697 Δ(lacIPOZY)X74 galU⁻ galK⁻ hsr⁻ hsm*$^{+}$ *strA*	Casadaban et al., 1980
Y1089	*araD139 strA proA*$^{+}$ *Δ(lon) Δ(lacU169) hflA150* [chr::Tn10] (pMC9)	Young & Davis, 1983

2.1.2. Phagen

Die verwendeten Phagen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Phagen

PHAGE	RELVANTER GENOTYP	REFERENZ
M13	*lacZα*	Messing et al., 1981
λgt11	*lac5 nin5 cI857 S100*	Young & Davis, 1983

2.1.3. Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Verwendete und neu konstruierte Plasmide

PLASMID	RELEVANTE EIGENSCHAFT	REFERENZ
pBGS18 /19	*kan lacZα*	Spratt et al., 1986
pEKEX2	*kan lacI^q*	Eikmanns et al., 1991
pHSG576	*cat lacZα*	Takeshita et al., 1987
pKK223-3	*bla tacp rrnB*	Brosius & Holy, 1984
pKY3	*bla* (pBR322::*secY*)	Ito et al., 1983
pMC1871	*tet 'lacZ*	Shapira et al. 1983
pST120	*bla* (pKK223-3::*secY*)	Suh et al.,1990
pUC18/19	*bla lacZα*	Vieira & Messing, 1982
pDY1	*cat secY*	diese Arbeit
pDY3	*kan secY*	diese Arbeit
pPY1	*cat secY*	diese Arbeit
pTY1	*bla secY*	diese Arbeit
pTY3	*kan secY*	diese Arbeit
pSY1	*kan secY*	diese Arbeit
pEY2	*kan secY*	diese Arbeit
pKYZ1	*bla secY'-'lacZ*	diese Arbeit
pEYZ1	*kan secY'-'lacZ*	diese Arbeit
pKY3R	*bla secY* (E176->R)	diese Arbeit
pKY3N	*bla secY* (E176->N)	diese Arbeit
pKY3A	*bla secY* (F192->A)	diese Arbeit
pKY3F	*bla secY* (Y332->F)	diese Arbeit

Die Konstruktion der wichtigsten Plasmide ist im folgenden kurz dargestellt:

pDY1: 4,1kb EcoRI-Fragment chromosomaler DNS aus *B.licheniformis* DSM13 in EcoRI-Schnittstelle von pHSG576 ligiert, *secY* in korrekter Orientierung hinter *lac*-Promotor
pDY3: 1,5kb PCR-Fragment (sequenzierter Bereich) aus pDY1 in EcoRI-BamHI-geschnittenen pBGS18 ligiert; *secY* unter Kontrolle des *lac*-Promotors
pPY1: 4,1kb EcoRI-Fragment chromosomaler DNS aus *B.licheniformis* P300 in EcoRI-Schnittstelle von pHSG576 ligiert ; *secY* in umgekehrter Orientierung zum *lac*-Promotor
pTY1: 2,9 kb EcoRI-Fragment chromosomaler DNS aus *S.carnosus* TM300 in EcoRI-Schnittstelle von pUC18 kloniert; *secY* in umgekehrter Orientierung zum *lac*-Promotor
pTY3: 2,7kb PstI-EcoRI-Fragment aus pTY1 in PstI-EcoRI-geschnittenen pBGS19 ligiert; *secY* in korrekter Orientierung zum *lac*-Promotor
pSY1: 1,8kb XbaI-HindIII-Fragment aus pST120 in XbaI-HindIII-verdauten pBGS18 kloniert; *secY* in korrekter Orientierung zum *lac*-Promotor
pEY2: 1,5 kb HindIII-Fragment aus pKY3 in HindIII-Schnittstelle von pBGS18 ligiert; *secY* in korrekter Orientierung zum *lac*-Promotor
pKYZ1: 1,3 kb PvuII-Fragment aus pDY3 in SmaI-Schnittstelle von pMC1871 kloniert, so daß *secY-lacZ*-Fusion entstand; als 4,4kb PstI-Fragment *secY-lacZ*-Fusion in PstI-Schnittstelle von pKK223-3 kloniert; *secY-lacZ* in korrekter Orientierung zum *tac*-Promotor
pEYZ1: 4,4kb SalI-Fragment (*secY-lacZ*-Fusion) in SalI-Schnittstelle von pEKEX2 ligiert;*secY-lacZ* in korrekter Orientierung zum *tac*-Promotor
pKY3R, pKY3N, pKY3A, pKY3F: Oligomutanten im *secY*-Gen von *E.coli*

2.2. Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht der Gram-positiven Bakterienstämme *Bacillus subtilis* und *Bacillus licheniformis* erfolgte in Vollmedium (LB) bei 37°C. Die Kultivierung von *Staphylococcus carnosus* wurde bei 37°C in PH-Medium durchgeführt.

Die verschiedenen Stämme von *Escherichia coli* wurden je nach Versuchsanordnung bei 30°, 37° oder 42°C in Vollmedium (LB), 2YT-Medium bzw. Minimalmedium E (ME) kultiviert.

Vollmedium (LB)
Luria-Broth-Medium nach Miller (1972)
Angaben pro Liter: 10g Bacto-Trypton, 5g Hefe-Extrakt, 5g NaCl

2YT-Medium
(Kunkel, 1985)
Angaben pro Liter: 16g Bacto-Trypton, 10g Hefe-Extrakt, 10g NaCl

PH-Medium
Pepton-Hefeextrakt-Medium nach Rescei et al. (1987)
Angaben pro Liter: 10g Bacto-Pepton, 5g Hefe-Extrakt, 5g NaCl, 1g Glukose, 1g K_2HPO_4

ME-Medium
Minimalmedium E nach Vogel & Bonner (1956)
Angaben pro Liter (50x): 10g $MgSO_4 x 7H_2O$, 100g Zitronensäure x $1H_2O$, 500g K_2HPO_4, 175g $NaHNH_4PO_4 x 4H_2O$; bei 45°C in der angegebenen Reihenfolge lösen.

Weitere Zusätze (wenn angegeben): 2µg/ml Thiamin, 500µg/ml Methionin-Assay-Medium (Difco), 0,5% Glukose, 0,5% Glyzerin, 1mM IPTG.

Folgende *Antibiotika*-Konzentrationen wurden verwendet (Endkonzentration): 50µg/ml Ampicillin, 30µg/ml Chloramphenicol, 50µg/ml Kanamycin, 15µg/ml Tetracyclin.

Zur Herstellung von Agarplatten wurden den Medien 15g/l Agar zugegeben. Topagar entstand durch Zusatz von 7,5g/l Agar.

2.3. Allgemeine genetische und rekombinante DNS-Techniken

* Herstellung kompetenter Zellen und Transformation der temperatursensitiven *E.coli*-Stämme erfolgte nach der Methode von Cohen et al. (1972). Die übrigen *E.coli*-Stämme wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode von Hanahan (1985) transformiert.

* Isolierung von Plasmid-DNS erfolgte nach der Methode von Birnboim & Doly (1979).

* Spaltung mit Restriktionsenzymen, Dephosphorylierung, Klenow-Reaktion, Ligation, Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung wurden nach den Standardmethoden von Sambrook et al. (1989) und entsprechend den Angaben der Enzym-Hersteller (Boehringer Mannheim) durchgeführt.

* Herstellung und Verwendung von Agarosegelen mit TAE-Puffer erfolgte entsprechend den Angaben von Sambrook et al. (1989). Die DNS-Elution aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des Geneclean-Kits der Firma Dianova (Hamburg) laut Herstellerangaben durchgeführt.

* Amplifikation von DNS-Fragmenten mit Hilfe der PCR-Technik erfolgte entsprechend den Angaben von Perkin-Elmer Cetus in einem Perkin-Elmer Cetus Gerät unter Benutzung der Taq-Polymerase von Boehringer Mannheim.

2.4. Herstellung von Genbanken

Es wurden partielle λgt11-Genbanken aus chromosomaler DNS verschiedener Bakterienstämme hergestellt. Dazu wurde die chromosomale DNS der Bakterien und die DNS des Phagen isoliert, gespalten, ligiert und in Phagen-Köpfe verpackt. Anschließend erfolgte die Infektion von *Escherichia coli* Y1090.

2.4.1. Isolierung chromosomaler DNS

Chromosomale DNS aus den Stämmen *E. coli* JM109, *B. subtilis* DB104 sowie den beiden *B.licheniformis*-Stämmen DSM13 und P300 wurde gemäß der Vorschrift von Kaiser & Murray (1979) isoliert. Dabei wurden die Zellen einer 500ml Kultur schonend mit Lysozym und Triton-X 100 in Anwesenheit von Pronase (Endkonzentration: 100μg/ml) zur Inaktivierung von Nukleasen

aufgeschlossen. Die DNS wurde nach dreimaliger Phenolextraktion (destilliertes Phenol, neutralisiert mit 0,5M TrisHCl pH8,0) und nach einer Ethanolfällung mit einem Glasstab entnommen. Nach einer RNase-Behandlung wurde die DNS je zweimal mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert. Die DNS wurde in *TE-Puffer* [10mM TrisHCl, 1mM EDTA pH7,6] aufgenommen und im Photometer (260nm und 280nm) sowie auf dem Agarosegel kontrolliert.

Staphylococcus carnosus TM300 - DNS wurde nach der Vorschrift von Rescei et al., 1987 isoliert. 3ml Übernacht-Kultur wurden in 500ml PH-Medium (s. 2.2.) gegeben und bis OD_{578}~0,6 bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von Lysostaphin und Lysoszym in Anwesenheit von Pronase und SDS aufgeschlossen. Nach zweifacher Phenol-Chloroform- und Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion wurde die DNS mit 0,1 Volumenteil 4M LiCl gefällt und in TE-Puffer aufgenommen.

2.4.2. Isolierung von λgt11-DNS

Die Phagen-DNS wurde im präparativen Maßstab aus 1l Kultur des lysogenen *E.coli*-Stamm BNN97 isoliert. Außerdem wurde eine Schnellisolierungsmethode für Phagen-DNS aus 1,5ml Kultur des mit einem Plattenlysat angeimpften *E.coli*-Stamms Y1090 angewendet.

Die Isolierung der DNS im präparativen Maßstab wurde nach der Methode von Sambrook et al., 1989 durchgeführt. 1l LB-Medium (+ 10mM $MgCl_2$) wurde mit 10 ml Übernacht-Kultur von *E.coli* BNN97 angeimpft und bis zu einer OD_{600}~0,6 bei 30°C kultiviert. Anschließend wurde in einem vorgewärmten Wasserbad die Temperatur der Kultur so schnell wie möglich auf 43-44°C eingestellt und 15min bei guter Belüftung inkubiert, um den Prophagen zu induzieren. Nachdem die Temperatur auf 37°C gefallen war, wurde die Kultur 3 Stunden bei guter Belüftung inkubiert und durch Zugabe von 10ml Chloroform lysiert. Freie Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von pankreatischer DNaseI und RNaseI (Endkonzentration: je 1μg/ml) inaktiviert. Die Phagen wurden durch Zugabe von festem NaCl und PEG 8000 über Nacht gefällt und als sichtbare Bande aus einem CsCl-Stufengradienten (1,7g/ml; 1,5g/ml; 1,45g/ml) nach zweistündiger Zentrifugation (22000Upm, 4°C; SW41- oder SW28-Rotor) abgezogen. Aufgefüllt mit einer Lösung aus 1,5g CsCl/ml *SM* [20mM TrisHCl pH7,6; 100mM NaCl; 10mM $MgSO_4$; 0,01% Gelatine] wurde eine weitere Zentrifugation angeschlossen (24h Zentrifugation: 38000Upm (Ti50) oder 35000Upm (SW50,1), 4°C). Nach Entnahme der Phagenbande wurde die Proteinhülle des Phagen durch Pronase (Endkonzentration: 0,5mg/ml) oder Proteinase K (Endkonzentration: 50μg/ml) entfernt. Im Anschluß an eine Phenol-Chlorofom-Extraktion wurde die DNS gegen *TE-Puffer* [10mM

TrisHCl pH7,6, 1mM EDTA] dialysiert und gefällt. Die DNS wurde in TE-Puffer aufgenommen und auf einem 0,5% Agarosegel kontrolliert. Es wurden ca. 400μg λgt11-DNS isoliert.

Zur Isolierung der Phagen-DNS aus 1,5ml Kultur des *E.coli*-Stamms Y1090 wurde zuerst ein Plattenlysat hergestellt (Sambrook et al., 1989), indem 0,1ml des Wirtsstammes Y1090 zusammen mit $5x10^5$-$1x10^7$Phagen in 3ml Topagar (+ 10mM $MgCl_2$) auf eine LB-Platte gegeben wurden. Nach sechsstündiger Inkubation bei 37°C (nicht länger, da sonst phagenresistente Bakterien hochwachsen) wurden die Phagen geerntet: a) durch Überschichten der Platte mit 3-5ml SM-Puffer, Lagerung über Nacht bei 4°C, Abnehmen des Puffers, Zugabe von einem Tropfen Chlorform oder b) durch Zugabe von 3ml SM-Puffer, Abkratzen des Top-Agars mit Glaspipette, Überführen in Zentrifugenröhrchen, Zugabe von 0,5ml Chloroform, gut schütteln, abzentrifugieren, Überstand abnehmen und mit Chloroform versetzen.

Folgende Methode wurde zur Schnellisolierung der Phagen-DNS benutzt (Sambrook et al., 1989). 1,5ml Kultur des Wirtsstamms *E.coli* Y1090 wurde bis zu einer OD_{650}=0,45 in LB + 0,2% Maltose + 10mM $MgCl_2$ wachsen lassen und mit 0,1ml Phagen des Plattenlysats (m.o.i. = 2-5) angeimpft. Nach Lyse und 5min Zentrifugation wurde zu 1,5ml Überstand 2μl DNaseI (1mg/ml) und 2μl RNase (10mg/ml) zugegeben und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phagen wurden mit 600μl PEG/NaCl-Lösung (5ml 40% PEG; 3,5ml 2,5M NaCl) über Nacht gefällt und in 500μl SM-Puffer (s.o.) resuspendiert. Durch Zugabe von 25μl 10% SDS, 40μl 250mM EDTA, pH8 und 5μl Proteinase K (10mg/ml; 1h autolysiert) wurde die Proteinhülle abgedaut. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung wurde die DNS in TE-Puffer aufgenommen und auf einem Agarosegel kontrolliert.

2.4.3. Herstellung von Phagen-Verpackungs-Mixen

Zur Verpackung der rekombinierten Phagen-DNS wurden Verpackungs-Mixe verwendet, die aus Zellextrakten zweier lysogener *E.coli*-Stämmen bestehen. Die entsprechenden Bakteriophagen haben verschiedene Defekte in der Reifung der Phagenpartikel. Einer der Stämme, *E. coli* BHB 2688, trägt eine amber-Mutation im Gen der Kopfkomponente D, so daß er nicht in der Lage ist, DNS zu verpacken und reife Phagen zu produzieren. Der zweite Stamm, BHB 2690, kann aufgrund einer Mutation in der Hauptkopfkomponente E keine reifen Phagenpartikel bilden. Durch Mischung der beiden Lysate kompensieren sich die verschiedenen Defekte und die Inkorporation von DNS in infektiöse Phagenpartikel ist möglich.

Die Verpackungs-Mixe wurden entsprechend der Methode von Hohn (1979) hergestellt. Je 250ml LB-Medium wurden mit Übernachtkultur von BHB 2688 sowie BHB 2690 auf eine

OD_{600}~0,1 eingestellt und bei 30°C bei guter Belüftung bis zu einer OD_{600}~0,3 inkubiert. Nach einer 15minütigen Induktion des Prophagen bei 45°C erfolgte die Phagenproduktion durch dreistündige Inkubation bei 37°C mit starker Belüftung bis zu einer OD_{600}~0,7 (BHB2688) bzw. 1,0 (BHB2690). Die Kulturen wurden im Verhältnis 1:1 (bezogen auf OD) gemischt, sobald nach Zugabe von 10µl Chloroform zu 1ml Kultur innerhalb von 5min vollständige Lyse erfolgte. Ab hier mußte bei 4°C gearbeitet werden, um die Lyse der Zellen zu verhindern. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 1 Volumenteil eiskaltem *M9-Medium* [(Angaben pro l): 100ml 10xSalze [Angaben pro 1l: 60g Na_2HPO_4, 30g KH_2PO_4, 5g NaCl, 10g NH_4Cl; pH 7,3], 1ml 1M $MgSO_4$, 1ml 100mM $CaCl_2$, 40ml 10% Glukose] gewaschen. Das Pellet wurde in 1,5ml *Packaging-Puffer* [40mM TrisHCl pH8,0, 10mM Spermidin x 3 HCl, 10mM Putrescin x 2 HCl, 0,1% ß-Mercaptoethanol, 7% Dimethylsulfoxid] resuspendiert und in ein Glasröhrchen überführt. Der Rest wurde mit weiteren 1,5ml Packaging-Puffer in das Glasröhrchen gegeben und das Gesamtvolumen von 3ml wurde mit 30µl 100mM ATP (neutralisiert) versetzt. 40µl-Aliquots wurden in 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren (Lagerung bei -70°C). Die Effizienz der Verpackungsfähigkeit und Infektion betrug 0,5-5x10^5 Plaques/µg DNS.

2.4.4. In vitro-Verpackung der λ-DNS

Um die DNS in die Phagenköpfe (s.2.4.3.) zu verpacken, wurden die kohäsiven Enden der isolierten λgt11-DNS (s. 2.4.2.) ligiert, nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten, dephosphoryliert und wiederum nach Phenol-Chloroform-Extraktion mit Ethanol präzipitiert. Die aus einem Agarosegel eluierten chromosomalen, mit EcoRI geschnittenen DNS-Fragmente wurden im Verhältnis 1:0,1 (Phagen-DNS : chromosomaler DNS) ligiert, zu einem gefrorenen Verpackungs-Mix gegeben und gemeinsam auf Eis langsam aufgetaut. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde ein weiterer Verpackungs-Mix hinzugegeben, der zusätzlich noch 10mM $MgCl_2$ und 10µg/ml DNaseI enthielt, um nicht eingepackte DNS zu abzubauen. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation bei 37°C wurden 0,5ml SM-Puffer (s.2.4.2.) sowie 5µl Chloroform (um Kontaminationen zu verhindern) zugegeben. Anschließend wurde der λ-sensitive *E.coli*-Stamm Y1090 mit den infektiösen Phagenpartikeln infiziert. Die Selektion auf rekombinante Phagen erfolgte auf LB-Platten, deren Topagar neben 10mM $MgSO_4$ auch 1mM IPTG und 100mM X-gal enthielt. Nach Feststellung der Effizienz wurden die Genbanken mittels Herstellung von Plattenlysaten amplifiziert (s.2.4.2.) und der Phagentiter bestimmt.

2.5. DNS-DNS Hybridisierung nach Southern

2.5.1. DNS-Markierung mit Digoxigenin-dUTP

Zur nicht radioaktiven Markierung von DNS wurde das "Dig-DNA-Labeling and Detection"-Kit der Firma Boehringer Mannheim verwendet.

Vor der Markierung mit Digoxigenin-11-dUTP (Dig-dUTP) wurde die DNS 10min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Die Markierung erfolgte in folgendem Ansatz: 10ng-3μg denaturierte DNS, 2μl Hexanukleotidmix, 2μl dNTP "labeling"-Mix und 2U Klenow-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 20μl. Die Reaktion verlief über Nacht bei 37°C und wurde durch die Zugabe von 2μl 0,2M EDTA pH8 gestoppt. Die markierte DNS wurde mit LiCl gefällt.

2.5.2. Southern-Blotting von chromosomaler DNS

Die mit Restriktionsenzymen verdaute chromosomale DNS wurde in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und mit der Vakuum-Blot-Apparatur (LKB 2016 VacuGene, Fa. Pharmacia/LKB), der die Methode von Southern et al. (1975) zugrunde liegt, auf eine Nylonmembran (Fa. Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Dazu wurde das Gel bei einem Vakuum von 50cm H_2O-Säule zur Denaturierung und Neutralisierung der DNS je 10min überschichtet mit 1.*Depurinisierungslösung* [0,25N HCl], 2. *Denaturierungslösung*: 1,5M NaCl, 0,5M NaOH und 3. *Neutralisierungslösung*: 1M TrisHCl, 2M NaCl, pH5. Der Transfer der DNS erfolgte für 1h mit *20xSSC*: 3M NaCl, 0,3M Trinatriumcitrat, pH7,4. Zum Abschluß wurde die DNS durch eine dreiminütige UV-Bestrahlung auf der Membran fixiert.

2.5.3. Prähybridisierung und Hybridisierung

Um unspezifische Bindung der DNS-Sonde an die Nylonmembran zu verhindern, wurde eine Prähybridisierung durchgeführt. Dazu wurde die Membran mindestens 2-4h bei 42°C unter Schütteln inkubiert mit der *Prähybridisierungslösung* [6x SSC, 20% Formamid, 0,1% N-Lauroylsarkosinat, 0,02% SDS, 1% Blocking-Reagenz (Fa.Boehringer Mannheim)]. Zur Hybridisierung wurde die Membran mit der *Hybridisierungslösung*, bestehend aus der hitzedenaturierten Dig-dUTP-markierten Sonde und frischer Prähybridisierungslösung, unter leichtem Schwenken über Nacht bei 42°C inkubiert. Um unspezifisch gebundene DNS-Sonde zu beseitigen, wurden die Filter nach der Hybridisierung bei Raumtemperatur zweimal 5min in

Waschlösung 1 (2xSSC, 0,1% SDS) und zweimal 15min bei 42°C mit *Waschlösung 2* (0,1xSSC, 0,1%SDS) gewaschen.

2.5.4. Detektion der DNS-DNS Hybride

Die Detektion der an den Filter gebundenen Dig-markierten DNS-Sonde erfolgte durch einen immunologischen Nachweis nach einer Vorschrift der Fa. Boehringer Mannheim. Der erste Schritt der Nachweisreaktion war die Bindung des Antikörper-Konjugats (alkalische Phosphatase) an die hybridisierte Digoxigenin-markierte DNS. Dazu wurde die Membran nach Waschen der Membran 30min bei Raumtemperatur mit dem Anti-Digoxigenin-Antikörper inkubiert. Die Farbreaktion wurde bei alkalischem pH durch Zugabe des farblosen X-Phosphats (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat; 50mg/ml in Dimethylformamid) und NBT (4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid; 75mg/ml in Dimethylformamid, 70% (v/v)) gestartet und durch Baden in TE-Puffer fixiert.

2.5.5. Plaque-Hybridisierung

Zur Hybridisierung der Genbanken, d.h. der rekombinanten Phagen-DNS, wurden pro Genbank (s. 2.4.) je 10 LB-Agarplatten mit ca. 1000 Plaques/Platte 6h bei 37°C inkubiert. Zur Härtung des Agars wurden die Platten anschließend mindestens 1h bei 4°C gekühlt. Anschließend erfolgte der Transfer der Phagen-DNS auf Nylonmembranen (Fa. Pall Biosupport, Dreieich), indem die Nylonfilter 1min auf die Agaroberfläche gelegt wurden. Die Membranen wurden mit der Adsorptionsseite nach oben 5min in 500µl Denaturierungslösung (s. 2.5.2.) und anschließend in Neutralisierungslösung (s. 2.5.2.) inkubiert. Die Fixierung der DNS erfolgte durch 3minütige UV-Bestrahlung. Die Hybridisierung und Detektion hybridisierender Phagen-DNS wurde wie unter 2.5.3. und 2.5.4. beschrieben, durchgeführt.

2.6. DNS-Sequenzierung nach Sanger

Die DNS-Sequenzierung einzel- (M13) und doppelsträngiger (Plasmid) DNS erfolgte nach der Methode von Sanger et al. (1977), die sich aus folgenden Schritten zusammensetzt: alkalische Denaturierung doppelsträngiger DNS, Bindung des Primers, Markierung mit ^{35}S-ATP und Trennung der DNS-Ketten über Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Alle Standardprimer, Reaktionspuffer, Nukleotidgemische, Stoppuffer und die Sequenase®-Version 2.0 wurden aus dem Sequenase-Kit von USB, Cleveland (Ohio) verwendet. Neben den Standardprimern wurden weitere synthetische Oligonukleotide verwendet, die nach der Synthese noch aufgearbeitet wurden (s.2.8.2.).

2.6.1. Denaturierung der doppelsträngigen DNS

2µg Plasmid-DNS in einem maximalen Volumen von 8µl wurden 30min bei 37°C nach Zugabe von 40µl *Denaturierungspuffer* [0,2M NaOH, 0,2mM EDTA] denaturiert. Durch Zugabe von 4µl *Neutralisierungspuffer* [2M Ammoniumazetat pH4,5] und 100µl eiskaltem Ethanol sowie zehnminütiger Inkubation bei -70°C wurde die DNS gefällt und in vorgeheizter Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.6.2. Primerbindung

7µl einzelsträngige DNS (1µg) wurde zusammen mit 2ng Primer (2ng/µl) und 2µl *5xReaktionspuffer* (USB; 200mM TriHCl pH7,5;100mM $MgCl_2$; 250mM NaCl) für 2min auf 65°-70°C erwärmt. Anschließend wurde die Temperatur in einem mit 65°C warmen Wasser gefüllten Behälter langsam auf unter 30°C fallen gelassen.
Doppelsträngige denaturierte DNS (s. 2.6.1.) wurde mit 2ng Primer (2ng/µl) und 2µl 5xReaktionspuffer (USB) und 7µl H_2O für 30min bei 37°C inkubiert.
Beide Ansätze wurden gleichartig weiter verarbeitet.

2.6.3. Markierung der DNS

Die Markierung der DNS erfolgte nach Anlagerung des Primers durch die Zugabe von 1µl 0,1M DDT, 2µl *Nukleotid-Gemisch* (USB; 5x konz: je 7,5µM dGTP, dCTP, dTTP), 0,5µl ^{35}S-ATP (ca. 10µCi/µl; Amersham Buchler, Braunschweig) und 2µl Sequenase® Version 2.0 (1:8 verdünnt in *Enzym-Verdünnungs-Puffer* (USB; 10mM TrisHCl pH7,5,5mM DTT, 0,5mg/ml BSA). Nach einer vierminütigen Inkubation bei Raumtemperatur schloß sich daran die Kettenabbruchreaktion an. Diese erfolgte nach der Verteilung von je 3,5µl des Reaktionsansatzes auf die vier *Terminationsmixe* (je 2,5µl ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP-Mix// pro Mix: 80µM aller 4 dNTPs, 8µM des ddNTPs, 50mM NaCl) während einer weiteren vierminütigen Inkubation bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4µl *Stoppuffer* (USB; 95% Formamid, 20mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylen Cyanol FF) gestoppt.

2.6.4. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach 1min Denaturierung der Reaktionsansätze bei 95°C wurden je 3µl auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen, das zuvor durch halbstündige Elektrophorese auf 50°C vortemperiert wurde.
Für die gelelektrophoretischen Auftrennung wurden denaturierende Gele bestehend aus 6% Acrylamid/ 7M Harnstoff hergestellt (Sambrook et al., 1989). Es wurde eine Sequenzgel-elektrophoreseapparatur der Firma Gibco/ BRL GmbH, Eggenstein, verwendet. Die Auftrennung erfolgte für 1,5h (kurzer Lauf) bzw. für 3h (langer Lauf) in 1x TBE-Puffer [10xTBE: 108g Tris, 55g Borsäure, 7,4g EDTA, ad 1l; pH 8,3] bei 2500V, 55mA und 150W. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 15min in 10% Eisessig und anschließend 5min mit Wasser gespült, um den Harnstoff zu entfernen. Das Gel wurde bei 80°C getrocknet und die markierten DNS-Ketten wurden durch Autoradiographie dargestellt.

2.7. TnPhoA-Mutagenese

Zur Fusion der alkalischen Phosphatase an ein bestimmtes Protein, das SecY-Protein von *B.licheniformis*, wurde das Transposon TnPhoA, das im *E.coli*-Stamm CC202 integriert vorliegt, genutzt (Manoil & Beckwith, 1985). Das Transposon Tn5 enthält das Gen *phoA* ohne dessen Promotor, Signalsequenz und die Nukleotide, die für die ersten fünf Aminosäuren kodieren. Setzt sich das Transposon unter Berücksichtigung von Orientierung und Leseraster korrekt in ein Gen, so entsteht eine Genfusion, die für ein Hybridprotein kodiert. Die alkalische Phosphatase kann nur dann aktiv werden, wenn sie im Periplasma lokalisiert ist. Der Nachweis der Aktivität erfolgt durch die Detektion von blauen Kolonien, die auf X-Phosphat-haltigen Platten entstehen.
Dazu wurde das Plasmid mit dem *secY*-Gen, an das *phoA* fusioniert werden sollte, in *E.coli* CC202 transformiert und auf LB-Platten mit 300µg/ml Kanamycin (induziert Transposition von TnPhoA), x µg/ml Antibiotikum (Erhalt des Plasmids), 40µg/ml X-Phosphat (Substrat für alkalische Phosphatase) ausplattiert. Die anschließende Transformation der aus den blauen Kolonien isolierten Plasmid-DNS in *E.coli* CC118 (Δ*phoA20*) und Ausplattierung auf Platten mit 30µg/ml Kanamycin, x µg/ml Antibiotikum und 40µg/ml X-Phosphat diente der Selektion von Plasmid-DNS, in die das Transposon integriert wurde. Eine Plasmid-DNS-Isolierung aus blauen Kolonien wurde durchgeführt und die Lage des Transposons durch Restriktionskartierung untersucht.

2.8. Oligo-Mutagenese

Um eine ortsspezifische Mutagenese durchzuführen, wurde die zu mutagenisierende DNS in den M13-Phagen eingebaut und im *E.coli*-Stamm BW313 amplifiziert. Dieser Stamm ist in der Lage, statt Thymin Uridin in die DNS einzubauen. Die aus diesem Stamm isolierte Uracil-haltige DNS wurde als Vorlage für die in vitro-Mutagenese mit synthetischen Oligonukleotiden genutzt. Zur in vitro-Synthese des Mutation-enthaltenden DNS-Stranges wurden nur Thyminnukleotide verwendet, d.h. der neu synthetisierte, die Mutation enthaltende Strang besitzt kein Uracil. Somit konnte dieser Strang nach Transformation in *E.coli* JM109 durch die Uracil-DNS-Glykosylase nicht mehr erkannt und, im Gegensatz zu dem Uracil-haltigen Ausgangsstrang, nicht abgebaut werden (Kunkel, 1985). Die entstehenden Phagen enthielten entsprechend die Mutation tragende DNS, die isoliert und in einen entsprechenden Vektor kloniert wurde.

2.8.1. M13-DNS-Präparation

Die Isolierung der M13-RF-Form erfolgte analog der Präparation von Plasmid-DNS nach der Methode von Birnboim & Doly, 1979.
Die einzelsträngige Form wurde nach sechsstündiger Inkubation aus 5ml 2YT-Medium isoliert, die mit einem Einzelplaque und 100μl Übernacht-Kultur des verwendeten *E.coli*-Stammes angeimpft (BW313: + 125μl Uridin (2,5mg/ml)) wurden. Aus dem Überstand von 1ml Kultur wurden durch Zugabe von 200μl 2,5M NaCl/ 20% PEG die Phagen gefällt. Nach Zentrifugation wurde die Proteinhülle durch eine Phenolextraktion und die Zugabe von 40μl 5M $NaClO_4$ und 100μl Isopropanol zu 150μl der wäßrigen Phase entfernt. Die Nukleinsäuren wurden nach Ethanolfällung in TE-Puffer aufgenommen und auf einem Agarosegel kontrolliert.

2.8.2. Aufarbeitung von Oligonukleotiden

Die Synthese von Oligonukleotiden erfolgte nach der Phosphoramidit-Methode mit dem 391-DNA Syntheziser PCR-Mate von Applied Biosystems auf einer Säule, von der die Oligonukleotide anschließend abgelöst wurden. Anschließend wurden die chemischen Schutzgruppen der Nukleotide entfernt, indem die Säule mit 1ml Ammoniak (25%) eluiert wurde. Das Eluat wurde über Nacht bei 60°C im Wasserbad inkubiert und der Ammoniak in der Vakuumzentrifuge bis auf ein Restvolumen von 20μl abgedampft. Nach einer Ethanolfällung mit 0,3M Natriumazetat (pH5,2) wurde das Nukleinsäurepellet in 100μl TE-Puffer aufgegnommen und auf einem 2% Agarosegel (+ 5μl Ethidiumbromid [10mg/ml] auf 100ml) kontrolliert bzw. die Konzentration im

Photometer bei 260nm ($OD_{260}=1$ entspricht 30mg/ml einzelsträngiger Nukleinsäure) bestimmt. Die Ausbeuten variierten zwischen 0,5 und 1mg Nukleinsäure / Oligonukleotid.

2.8.3. Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Zur Phosphorylierung der 5'-Enden der Oligonukleotide wurde folgende Methode verwendet. 200-400pmol Oligonukleotid (1,34µg 24er Oligomer = 200pmol) wurden mit 3µl *10xKinase-puffer* [500mM TrisHCl pH7,5, 50mM DTT, 100mM $MgCl_2$], 3µl 10mM ATP und 5 U T_4-Polynukleotidkinase in einem Gesamtvolumen von 30µl 60min bei 37°C inkubiert. Nach dem Stop der Reaktion durch zweiminütiges Erhitzen auf 90°C konnte die Phosphorylierung auf einem 2%igen Agarosegel (+ 5µl Ethidiumbromid [10mg/ml]) kontrolliert werden, da phosphorylierte Oligonukleotide eine schnellere Laufgeschwindigkeit haben als nicht-phosphorylierte.

2.8.4. In vitro Synthese-Ligations-Reaktion

Die Anlagerung der Oligonukleotide an den Einzelstrang und die Synthese-Ligations-Reaktion des neuen, die Mutation tragenden Stranges wurde in einem PCR-Gerät der Firma Perkin Elmer Cetus durchgeführt.

Die Anlagerung des Oligonukleotids erfolgte durch fünfminütiges Erhitzen von 0,2-0,4 pmol Uracil-haltige Einzelstrang, 10-20 pmol phosphoryliertem Oligonukleotid und 1 µl *10xAnnealing-Puffer* [200mM TrisHCl pH7,5, 20mM $MgCl_2$, 500mM NaCl] in einem Gesamtvolumen von 10µl auf 80°C und dann Abkühlen auf 30°C über einen Zeitraum von 50min.
Die Synthese-Ligations-Reaktion schloß sich durch die Zugabe von 1,4µl *10xdNTP,ATP-Mix* [je 5mM dGTP, dATP, dTTP, dCTP, 10mM ATP], 1 µl *10xSL-Puffer* [100mM TrisHCl pH7,9, 50mM $MgCl_2$, 20mM DTT], 3 µl T_4-DNS-Polymerase (1U/µl) und 1 µl T_4-DNS-Ligase (1U/µl) und zweistündige Inkubation bei 37°C an. Die Reaktion wurde mit 84µl *Stoppuffer* [10mM TrisHCl pH8,0, 10mM EDTA] gestoppt.

Ein Aliquot wurde in *E.coli* JM109 transformiert, um aus den entstehenden Plaques die Mutation-tragende Phagen-DNS zu isolieren.

2.9. Pulse-Chase-Experiment

Zur Untersuchung der Translokationsaktivität von *E.coli*-Mutanten wurde die in vivo-Prozessierungskinetik eines sekretorischen Proteins von *E.coli*, des 'Outer membrane proteins A = OmpA', in Pulse-Chase-Experimenten untersucht. Nach der radioaktiven Markierung, dem Zellaufschluß und der spezifischen Fällung des Proteins mittels eines Antikörpers wurde eine SDS-PAGE und anschließend eine Fluorographie durchgeführt.

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

Die radioaktive Markierung von Proteinen und nachfolgende Fällung mittels eines spezifischen Antikörpers (gegen OmpA) erfolgte in Anlehnung an die Vorschriften von Gebert et al. (1988), Ito et al. (1981) und Nakamura et al. (1990).
10ml ME-Medium [(s.2.2.); Thiamin, Glukose, Methionin-Assay-Medium] wurden mit 100µl LB-Übernacht-Kultur angeimpft (entspricht OD_{600}=0,03) und bei 30°C inkubiert. Bei einer OD_{600}=0,05-0,1 (je nach Versuchsanordung) wurde die Kultur geteilt und getrennt bei 30°C und 42°C weiter kultiviert; gegebenenfalls wurde abzentrifugiert und statt Glukose Glyzerin und IPTG zugesetzt. Nach 2h weiterer Inkubation wurden die Kulturen je nach Versuchsanordnung sofort markiert oder abzentrifugiert, mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen (10-1000µM) und unterschiedlich lange (0,5 - 120 min) induziert sowie anschließend mit ^{35}S-Methionin markiert (nach Einstellung von gleicher OD_{600}): 2ml auf 25°C eingestellte Zellsuspension wurde durch Zugabe von 35µCi ^{35}S-Methionin (10µCi/µl; Amersham Buchler, Braunschweig) markiert. Nach 30sec oder 1min (je nach Versuchsanordnung) wurden 52µl *Chase-Lösung* [100µl Methionin (20mg/ml), 5µl Chloramphenicol (50mg/ml 70%Ethanol)] (t=0min Chase) zugegeben. Je nach Versuchsanordnung wurden zu verschiedenen 'Chase'-Zeiten 0,5ml Proben in 0,15ml eiskaltes 50% TCA pipettiert. Die Fällung der Proteine erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach Zentrifugation und Waschen des Pellets mit Aceton (Aceton abdampfen lassen!), wurden die Zellen lysiert. Zuerst wurde der Niederschlag mit 30µl *Lysepuffer 1* [2% SDS, 1mM EDTA, 50mM TrisHCl pH8,0] sorgfältig gelöst und anschließend 10min bei 65°C und 2min bei 95°C inkubiert. Nach Zugabe von 1ml *Lysepuffer 2* [2% Triton X-100, 0,15M NaCl, 0,1mM EDTA, 50 mM TrisHCl pH8,0] wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert. Die Bindung des spezifischen Proteins (OmpA) an den Antikörper erfolgte durch Zugabe von 10µl spezifischen Antikörpers während einer einstündigen Inkubation bei 30°C. Die Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte durch Inkubation mit 100µl fixierten *Staphylococcus aureus* Zellen (Pansorbin, 10%w/v; Calbiochem) für 1h bei 30°C (zwischenzeitlich mehrmaliges Schütteln) und nachfolgende Zentrifugation. Der Niederschlag wurde nachfolgend mit je 0,5ml *Waschpuffer 1* [1% Triton X-100, 1M NaCl, 50mM TrisHCl pH8,0], *Waschpuffer 2* [0,1% SDS, 0,5M LiCl, 50mM TrisHCl

pH8,0] und *Waschpuffer 3* [50mM TrisHCl pH8.0] gewaschen. Der Antigen/Antikörperkomplex wurde in 15µl SDS-PAGE-Probenpuffer (s.2.9.2) aufgenommen und durch eine 5minütige Inkubation bei 95°C gelöst sowie das Protein denaturiert. Nach Zentrifugation wurde der gesamte Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) aufgetragen.

2.9.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden entsprechend ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch nach der Methode von Laemmli (1970) über SDS-PAGE aufgetrennt.

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

	Trenngel (30ml)	Sammelgel (15ml)
Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)	12,5ml	2,5 ml
1,5M TrisHCl pH8,8	7,5ml	-
0,5M TrisHCl pH6,8	-	3,75ml
30% Glyzerin	9,4ml	-
H_2O	-	8,45ml
10%SDS	0,3ml	0,15ml
10%APS	0,3ml	0,15ml
TEMED	20µl	10µl

Laufpuffer: 50mM Tris, 192mM Glyzin, 0,1% SDS

SDS-PAGE-Probenpuffer: 500µl Lösung 1: 0,2M Tris, 0,02M EDTA
400µl Lösung 2: 8,3% SDS, 83,3mM Tris, 29,2% Glyzerin, 0,03% Bromphenolblau
100µl 1M DTT

Die Elektrophorese erfolgte über Nacht mit konstanter Stromstärke von 10mA.

2.9.3. Fluorographie

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Gel 1h in einem Gemisch aus Methanol, H_2O und Essigsäure (45:45:10) fixiert und anschließend 30min in 'Amplify' (Amersham Buchler GmbH, Braunschweig) inkubiert. Nach Trocknung des Gels unter Vakuum erfolgte die Exposition eines Röntgenfilms (X-Ray, Fuji) bei -70°C.

2.10. Spezifische Detektion von Proteinen durch Western Blotting

Der Transfer von Proteinen aus dem SDS-Polyacrylamidgel (s.2.7.2.) auf Nitrocellulose-Membran wurde mit Hilfe des elektrophoretischen Blottings mit horizontalen Graphitplatten (Semi-Dry-Blotting) nach der Vorschrift von Kyhse-Andersen (1984) durchgeführt. Daran schloß sich der spezifische Nachweis von Proteinen mit Antikörpern gemäß der Methode von Towbin et al. (1979) an. Die Detektion des spezifisch gebundenen primären Antikörpers erfolgte über einen zweiten, an Peroxidase-gekoppelten Antikörper aus Ziegen, der gegen Immunglobulin G aus Kaninchen gerichtet war (Hawkes et al., 1982).

Das **Western Blotting** wurde mit einer Semi-Dry-Blotting-Apparatur von Pharmacia LKB, Freiburg, durchgeführt, indem folgender Aufbau verwendet wurde: Auf der Anode (+-Graphit-Elektrode) wurden 6 Filterpapiere, getränkt in *Anodenlösung I*: 0,3M Tris, 20% Methanol gelegt, auf denen bis zu 6 Transfer-Einheiten plaziert werden konnten, die jeweils 3 Filterpapiere, getränkt in *Anodenlösung II*: 0,025M Tris, 20% Methanol, sowie die Nitrocellulose-Membran und das SDS-Polyacrylamidgel und anschließend 3 Filterpapiere, getränkt in *Kathodenlösung* [0,04M 6-Aminohexansäure, 20% Methanol] umfassten. Den Abschluß bildeten 6 Filterpapiere, getränkt in Kathodenlösung. Der Transfer erfolgte 1h bei 0,8mA pro cm^2 Membran.
Der **immunologischer Nachweis** wurde nach der Blockierung der freien Bindungsstellen während einer einstündigen Inkubation in *Lösung 1* [3% Rinderserumalbumin (RSA); 10mM TrisHCl pH7,5; 0,9% NaCl] durch die Bindung des αlacZ-Antikörpers (in einer 1:1000 Verdünnung in *Lösung 2* [0,3% RSA, 10mM TrisHCl pH7,5; 0,9% NaCl; 0,1% Tween 20] über Nacht bei 4°C oder während einer Stunde bei 37°C durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen in Lösung 2 bei 37°C, um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Filter 1h bei 37°C in Lösung 2 mit 1:2000 verdünntem Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen Immunglobulin aus Ziegen (Sigma Chem.) inkubiert. Die Bindung der Antikörper wurde nach zweimaligem Waschen in Lösung 2 bei 37°C durch eine Farbentwicklung einige Minuten nach Zugabe von *Lösung 3* [60mg -α Chloronaphtol mit 20ml Ethanol lösen, dann 80ml TrisHCl pH7,5 und 150μl Perhydrol (30%) hinzugeben] nachgewiesen. Die Reaktion wurde durch Waschen der Membran in Wasser gestoppt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Isolierung der *secY*-Gene aus *Bacillus licheniformis* und *Staphylococcus carnosus*

Das Ziel war die Isolierung der *secY*-Gene aus den Gram-positiven Bakterien *Bacillus licheniformis* DSM13 und P300 sowie *Staphylococcus carnosus* TM300 mit Hilfe des *Bacillus subtilis secY*-Gens als Gensonde. Der *B.licheniformis* P300 ist ein Industriestamm, der die alkalische Protease Subtilisin überproduziert. Eine mögliche Ursache der erhöhten Produktivität könnte eine Mutation im SecY-Protein sein. Deshalb wurden die *secY*-Gene der beiden *B.licheniformis*-Stämme DSM13 (Wildtyp) und P300 isoliert, um miteinander verglichen zu werden.

3.1.1. Hybridisierung einer *secY* Sonde aus *Bacillus subtilis* gegen chromosomale DNS aus *B.licheniformis* und *S.carnosus*

Das Ziel war die Identifizierung der chromosomalen DNS-Fragmente aus den Gram-positiven Bakterien *Bacillus licheniformis* DSM13 und P300 sowie *Staphylococcus carnosus* TM300, die mit dem *secY*-Gen von *B.subtilis* hybridisierten. Somit wurde chromosomale DNS von *B.subtilis* DB104, den beiden *B.licheniformis*-Stämmen sowie *S.carnosus* TM300 isoliert und mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Nach der Trennung der DNS-Fragmente durch eine Agarose-Gelelektrophorese und Transfer auf eine Nylonmembran wurde die fixierte DNS gegen das *secY*-Gen aus *Bacillus subtilis* hybridisiert. Als DNS-Sonde wurde das Digoxygenin-11-dUTP-markierte 1,01kb große EcoRV-SmaI-Fragment aus dem Plasmid pST120 (s. 2.1.3., Tab. 4), welches das *B.subtilis secY*-Gen trägt, eingesetzt.
Folgende DNS-Fragmente hybridisierten mit dem *B.subtilis secY:*

Tabelle 5: Chromosomale DNS-Fragmente, die mit der B.subtilis secY Gensonde hybridisieren

	B.subtilis DB104	*B.licheniformis* DSM13	*B.licheniformis* P300	*S.carnosus* TM300
EcoRI	7,0kb	4,1kb	4,1kb	2,9kb
EcoRV	3,3kb	2,9kb	2,9kb	-
HindIII	3,0kb	6,2kb	6,2kb	-
XmnI	2,1kb	7,1kb	7,1kb	-

(-: nicht bestimmt)

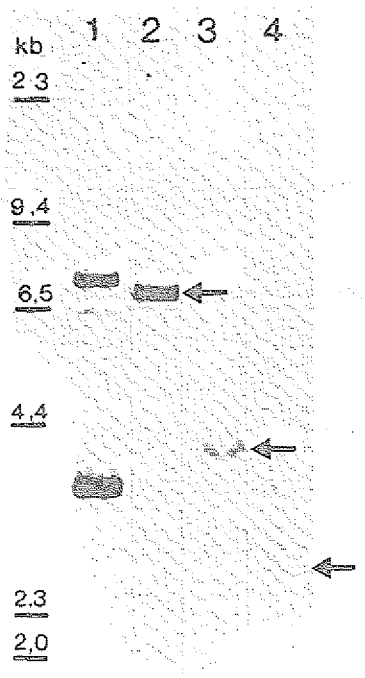


Abb. 2:
Southern Hybridisierung des *secY*-Gens aus *B.subtilis* mit EcoRI verdauter chromosomaler DNS aus *B.subtilis* DB104 (Spur 2), *B.licheniformis* DSM13 (Spur 3), *S.carnosus* TM300 (Spur 4). Als Kontrolle in Spur 1: Plasmid pST120; Molekulargewichtsstandard (λ-HindIII) links markiert. Pfeile markieren hybridisierende Fragmente.

Wie aus Abbildung 2, Spur 2 und Tabelle 5 zu ersehen, erhielt man bei 7,0kb das für *B.subtilis* typische Signal (Suh et al., 1990). Die übrigen erhaltenen und in der Tabelle 5 aufgeführten, mit dem *secY* -Gen hybridisierenden Fragmentgrößen der *B.subtilis*-DNS stimmten ebenfalls mit der bekannten chromosomalen Organisation des *spc*-Operons überein, in dem das *secY*-Gen lokalisiert ist (Suh et al., 1990). Ein einziges spezifisches Signal in der Größe von ca. 4,1kb war in Spur 3 für die chromosomale DNS von *B.licheniformis* DSM13 (Daten für P300 nicht gezeigt) zu erkennen. Die in Spur 4 aufgetragene chromosomale DNS von *S.carnosus* TM300 ergab ein recht schwaches, jedoch reproduzierbares spezifisches Signal bei ca. 2,9kb. Da die Fragmente der *B.subtilis*-DNS die erwarteten Signale lieferten und weil jeweils nur eine spezifische Bande zu erkennen war, wurde daraus geschlossen, daß die hybridisierenden Fragmente vermutlich die gesuchten *secY*-Gene enthalten und so durch Hybridisierung des *B.subtilis secY* Gens mit entsprechenden Genbanken isoliert werden können.

3.1.2. Klonierung der *secY*-Gene von *Bacillus licheniformis* und *Staphylococcus carnosus*

Zur Klonierung der hybridisierenden DNS-Fragmente aus dem *B.licheniformis* und dem *S.carnosus* Chromosom wurden λgt11-Genbanken mit Hilfe der Methode der Plaquehybridisierung durchsucht. Dazu wurden entsprechend den Ergebnissen der Hybridisierung mit den chromosomalen DNS-Fragmenten von *B.licheniformis* EcoRI gespaltene chromosomale DNS-

Fragmente von 3-5kb, sowie von *S.carnosus* EcoRI geschnittene DNS-Fragmente von 2-4kb isoliert und in die EcoRI gespaltene λgt11-DNS einkloniert. Von den erhaltenen Genbanken, die eine durchschnittliche Anzahl von $1x10^5$ rekombinanten Phagen aufwiesen, wurden je 10 000 Phagen ausplattiert. Diese Phagenplaques wurden mit dem Digoxygenin-markierten *B.subtilis secY*-Gen als Sonde hybridisiert. 59 Plaques der *B.licheniformis* DSM13-Genbank, 16 Plaques der *B.licheniformis* P300-Genbank und 116 Plaques der *S.carnosus*-Genbank zeigten ein positives Signal. Einzelne Plaques, die positive Signale zeigten, wurden isoliert und nochmals zur Hybridisierung ausplattiert. Von Plaques, die wiederholt eine positive Reaktion aufwiesen, wurde dann die Phagen-DNS isoliert, mit EcoRI geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und nochmals mit dem *B.subtilis secY*-Gen hybridisiert. Die isolierten Phagen enthielten Inserts von 4,1kb (*B.licheniformis*) und 2,9kb (*S.carnosus*), die mit dem *secY*-Gen von *B.subtilis* ein positives Hybridisierungssignal ergaben. Diese Fragmentgrößen stimmten mit den bei der Hybridisierung gegen chromosomale DNS erhaltenen Signalen überein, so daß daraus geschlossen wurde, daß die isolierten Fragmente mit großer Wahrscheinlichkeit die *secY*-Gene enthielten.

3.1.3. Umklonierung und Kartierung der *secY*-Gene aus *B.licheniformis* und *S.carnosus*

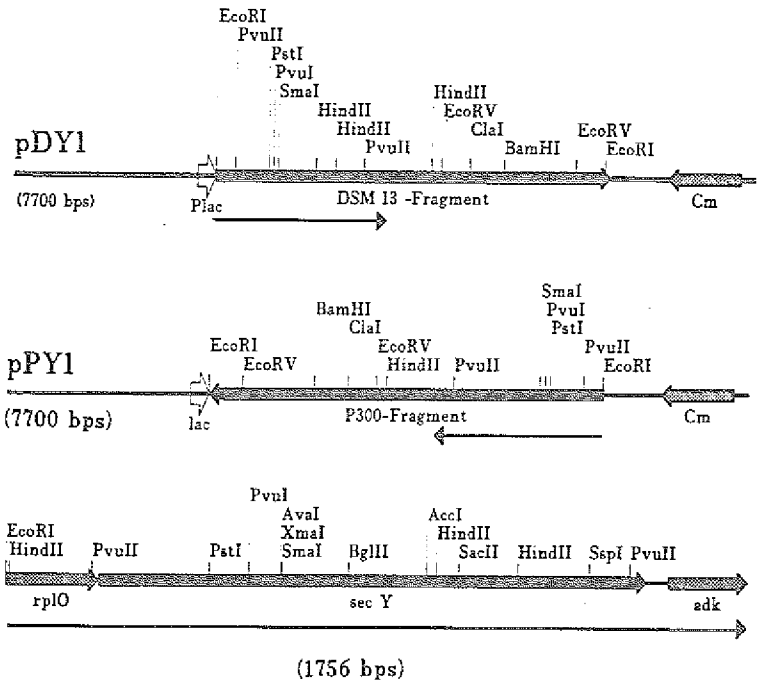
Das *secY*-tragende DNS-Fragment aus den beiden *B.licheniformis*-Stämmen wurde in den mit EcoRI linearisierten low-copy-Vektor pHSG576, das Fragment aus *S.carnosus* in den mit EcoRI geschnittenen Vektor pUC18 einkloniert und durch Restriktionskartierung näher charakterisiert. Die entstandenen Plasmide pDY1, pPY1 und pTY1 sind in Abbildung 3 dargestellt. Das Plasmid pDY1 enthält das 4,1kb-Fragment aus dem *B.licheniformis*-Stamm DSM13 und das Plasmid pPY1 das 4,1kb-Fragment aus dem *B.licheniformis*-Stamm P300. pTY1 wurde das Plasmid mit dem 2,9kb-Fragment aus dem Stamm *S.carnosus* TM300 bezeichnet.

3.2. Sequenzanalyse der *secY*-Gene und Homologievergleich der SecY-Proteine von *B.licheniformis* und *S.carnosus* mit anderen bekannten SecY-Proteinen

3.2.1. Sequenzanalyse der *secY*-Gene von *B.licheniformis* und *S.carnosus*

Die Sequenzierung der *secY*-Gene und der angrenzenden Bereiche wurde doppelsträngig mit der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977) durchgeführt. Hierzu wurde eine Subklonierung in die Vektoren pUC18 und pUC19 vorgenommen und die DNS-Fragmente u.a. mit Hilfe von synthetischen Oligonukleotiden sequenziert.
Die sequenzierten Bereiche der Plasmide pDY1, pPY1 und pTY1 sind in Abbildung 3 dargestellt.

A



B

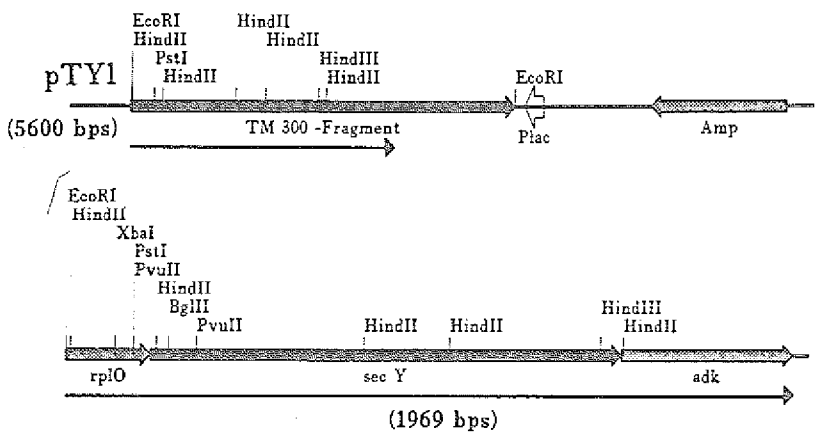


Abb. 3: Restriktionskarten der Plasmide und der sequenzierten Bereiche. A: pDY1 (*B.licheniformis* DSM13) und pPY1 (*B.licheniformis* P300) sowie B: pTY1 (*S.carnosus*). Die dünnen Pfeile unter den Plasmiden markieren die sequenzierten Bereiche, die jeweils im unteren Teil der Abbildung dargestellt sind. Es sind nur die wichtigsten Schnittstellen des klonierten Fragments angegeben. Plac = *lac*-Promotor; Amp, Cm siehe Abkürzungsverzeichnis; *rplO*, *secY* und *adk* siehe Text

```
         10        20        30        40        50        60
          :         :         :         :         :         :
GCTGTGGTCAACCTAGACAAACTCAACAGCTTTGCAGAAGGGACGGAAGTTACTCCTGAA
 A  V  V  N  L  D  K  L  N  S  F  A  E  G  T  E  V  T  P  E
                                ⇓1
CTTCTTTTAGAAACAGGTGTAATCAGCAAGTTGAAATCTGGAGTGAAAATTCTTGGCGAC   120
 L  L  L  E  T  G  V  I  S  K  L  K  S  G  V  K  I  L  G  D

GGTAAATTAGAAAAGAAATTAACTGTTAAAGCCAATAAATTCTCCGCTTCTGCTAAACAA   180
 G  K  L  E  K  K  L  T  V  K  A  N  K  F  S  A  S  A  K  Q

GCAATTGAGGCTGCTGGCGGTACAGCTGAGGTGATCTAACTTGTTTAAGACAATCTCCAA   240
 A  I  E  A  A  G  G  T  A  E  V  I  -  M  F  K  T  I  S  N
                                          SecY ⇒
TTTTATGCGTGTGAAGGATATTCGGAATAAGATTATCTTCACTCTTTTAATGCTTATCGT   300
 F  M  R  V  K  D  I  R  N  K  I  I  F  T  L  L  M  L  I  V

CTTTCGTCTCGGTTCGTTCATTCCTGTGCCGCACGTAAACACAGAAGTTTTAAAGGCACA   360
 F  R  L  G  S  F  I  P  V  P  H  V  N  T  E  V  L  K  A  Q

GGATCAAATGAGCGTATTTGGGATTCTAAACACATTTGGCGGCGGTGCATTGTTCAACTT   420
 D  Q  M  S  V  F  G  I  L  N  T  F  G  G  G  A  L  F  N  F

CTCCATTCTTGCGATGGGAATCATGCCTTACATCACAGCTTCTATCATCATCCAGCTCCT   480
 S  I  L  A  M  G  I  M  P  Y  I  T  A  S  I  I  I  Q  L  L

GCAGATGGATGTTGTGCCGAAGTTTACCGAATGGTCTAAGCAGGGGGAAGTTGGTCGCCG   540
 Q  M  D  V  V  P  K  F  T  E  W  S  K  Q  G  E  V  G  R  R

AAAACTAGCTCAGTTCACAAGGTACTTCACGATCGTTCTTGGATTTATCCAGGCTTTAGG   600
 K  L  A  Q  F  T  R  Y  F  T  I  V  L  G  F  I  Q  A  L  G

TATGTCTTACGGGTTTAACAACATGGCCGGCGGCGCGTTGATTACAGACCCGGGAGTCGG   660
 M  S  Y  G  F  N  N  M  A  G  G  A  L  I  T  D  P  D  V  G

TACTTATTTGCTTATTGCGATTGTACTAACTGCTGGAACTGCTTTTTTAATGTGGCTGGG   720
 T  Y  L  L  I  A  I  V  L  T  A  E  T  A  F  L  M  W  L  G

AGAACAAATTACGTCTCATGGAGTTGGTAACGGAATATCCATTATCATCTTCGCCGGTAT   780
 E  Q  I  T  S  H  G  V  G  N  G  I  S  I  I  I  F  A  G  I

CGTTGCCGGTATTCCGCAGACGATTAATCAGATCTACGCTCAGCAGTTTGTAGATGCTGG   840
 V  A  G  I  P  Q  T  I  N  Q  I  Y  A  V  V  F  V  D  A  G

AGATCAGTTATTCTTGCAAATCATAAAGGTTGTCGTTATATTGGTTGCGATTTTAGCGAT   900
 D  Q  L  F  L  Q  I  I  K  V  V  V  I  L  V  A  I  L  A  I

TGTCGTTGGCGTTATTTTCATCCAACAGGCGGTTAGAAAAATCTCAATTCAATATGCGAA   960
 V  V  G  V  I  F  I  Q  Q  A  V  R  K  I  S  I  Q  Y  A  K

AGGTTCAGGCCGTTCACCGGTTCCTGGCGGCCAGTCTACACACTTGCCGCTGAAGGTTAA  1020
 G  S  G  R  S  P  V  P  G  G  Q  S  T  H  L  P  L  K  V  N

CCCGGCGGGAGTTATTCCGGTTATCTTTGCCGTAGCATTTATCACCACTCCGCGGACCGT  1080
 P  A  G  V  I  P  V  I  F  A  V  A  F  I  T  T  P  R  T  V

GGCAACATTCTTTGGCTCCAATGACGTCACGAATTGGATTCAAAAAACGTTTGATTACAC  1140
 A  T  F  F  G  S  N  D  V  T  N  W  I  Q  K  T  F  D  Y  T

GCATCCGGTCGGAATGGGAGTTTATGCAGCATTGATCATCGCCTTTACCTATTTCTATGC  1200
 H  P  V  G  M  G  V  Y  A  A  L  I  I  A  F  T  Y  F  Y  A
                                                  ⇓2
ATTTGTGCAGGTTAACCCTGAGCAAATGGCCGATAATCTTAAAAAACAAGGTGGCTATAT  1260
 F  V  Q  V  N  P  E  Q  M  A  D  N  L  K  K  Q  G  G  Y  I

TCCGGGAGTTCGTCCAGGAAAAATGACTCAAGATAGAATTACGAGCATTTTGTATCGACT  1320
 P  G  V  R  P  G  K  M  T  Q  D  R  I  T  S  I  L  Y  R  L

TACATTTGTAGGCTCCATATTCTTGGCCGTGATTGCCATTCTTCCTGTCTTGTTCGTTAA  1380
 T  F  V  G  S  I  F  L  A  V  I  A  I  L  P  V  L  F  V  N

TATTGCTGGGCTGCCTTCTTCTGCACAAATTGGTGGAACAAGTTTGCTGATTGTCATCGG  1440
 I  A  G  L  P  S  S  A  Q  I  G  G  T  S  L  L  I  V  I  G

GGTTGCACTTGAAACAATGAAGCAGCTTGAAAGCCAGCTGGTAAAACGAAACTATCGTGG  1500
 V  A  L  E  T  M  K  Q  L  E  S  Q  L  V  K  R  N  Y  R  G

ATTTATGAAGCACTAGAGGAAATGGGGCGCGCCCATTCCCTCTAAAATAGAGAGGACGGG  1560
 F  M  K  H  -

GAATCCGAAATGAACTTAGACTTAATGGGACTGCCTGGAGCCGGTAAAGGGACACAGGCT  1620
          M  N  L  D  T  M  G  L  P  G  A  G  K  G  T  Q  A

GAACGGATTGTTGAAGATTTTGGGATACCTCATATCTCAACAGGAGACATGTTCCGCGCT  1680
 E  R  I  V  E  D  F  G  I  P  H  I  S  T  G  D  M  F  R  A

GCGATGAAAGAAGAAACGGATCTGGGACTCGAAGCCAAATCATACATTGATAAAGGTGAG  1740
 A  M  K  E  E  T  D  L  G  L  E  A  K  S  Y  I  D  K  G  E

CTTGTTCCGGATGAAGTG
 L  V  P  D  E  V
```

Abb. 4: Nukleotidsequenz und abgleitete Aminosäuresequenz des *secY*-Gens und angrenzender Bereiche aus *B.licheniformis* (DSM13; markiert Nukleotidaustausch in P300-Sequenz: ⇓1G = T, ⇓2T = C); vermutete Ribosomenbindungsstelle (RBS) ist unterstrichen

Die Nukleotidsequenz der *secY*-Gene sowie benachbarter Regionen wurde über einen Bereich von 1758bp (*B.licheniformis* DSM13) sowie 1526bp (*B.licheniformis* P300) ermittelt (Abbildung 4). In Abbildung 4 ist nur die Sequenz des *B.licheniformis* DSM13 - Fragments dargestellt, da die Sequenz des entsprechenden Bereichs von *B.licheniformis* P300 bis auf zwei Nukleotide (sind gekennzeichnet) mit der Sequenz von DSM13 übereinstimmte. Diese Nukleotidaustausche hatten im SecY-Protein keinen Aminosäureaustausch zur Folge.

In dem sequenzierten Bereich konnte ein offenes Leseraster von 1293bp identifiziert werden, das an Position 221 mit einem potentiellen Startkodon (TTG) beginnt. Vor diesem Startkodon liegt in entsprechendem Abstand eine mögliche Ribosomenbindungsstelle (RBS: GAGG; Position 208-211), wie von Moran et al. (1982) beschrieben. In Analogie zur Situation in *E.coli* und *B.subtilis* konnten keine potentiellen Promotorstrukturen vor dem *B.licheniformis secY*-Gen identifiziert werden, das für ein Protein von 431 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 47kDa kodiert. Außerdem konnten die zwei unvollständigen, offenen Leserahmen als das Ende des ribosomalen Proteins L15 (*rplO*; Position 1-214) und den Anfang der Adenylatkinase (*adk*; Position 1569-1758) identifiziert werden (Cerretti et al., 1983; Suh et al., 1990).

Diese Reihenfolge von Genen entspricht der Anordnung der Gene im *spc*-Operon von *B.subtilis* (Suh et al., 1990, Nakamura et al., 1990). Das *spc*-Operon umfaßt Gene ribosomaler Proteine und das *secY*-Gen, die von einem einzigen Promotor aus transkribiert werden. In *E.coli* liegt das *secY*-Gen ebenfalls im *spc*-Operon, jedoch liegt dort ein weiteres Gen für ein ribosomales Protein hinter dem *secY*-Gen. In *E.coli* sind die *rplO* und *secY* Gene nur durch 7bp voneinander getrennt (Cerretti et al., 1983).

Da in der Aminosäuresequenz des SecY-Proteins der beiden *B.licheniformis*-Stämme DSM13 und P300 kein Unterschied festgestellt wurde, ist im Weiteren nur mit dem *B.licheniformis*-Wildtyp *secY*-Gen (DSM13) gearbeitet worden.

Die 1969bp umfassende Nukleotidsequenz des *S.carnosus secY*-Gens mit den angrenzenden Regionen ist in Abbildung 5 gezeigt.

```
         10        20        30        40        50        60
          :         :         :         :         :         :
CAGACAGCTTGTTAACTTAGAACAACTAAACAGATTTGAAGAAGGTACAGAAGTTACTCC
 R  Q  L  V  N  L  E  Q  L  N  R  F  E  E  G  T  E  V  T  P

TGAGCTTTTAATCGAAACTGGTGTGGTTAAAAACGCTAAAGCGGGTATCAAAGTATTAGG   120
 E  L  L  I  E  T  G  V  V  K  N  A  K  A  G  I  K  V  L  G

TAATGGTTCTCTAGAGAAAAAATTAACAGTAAAAGCGCATAATTTCTCTGCATCTGCAGC   180
 N  G  S  L  E  K  K  L  T  V  K  A  H  N  F  S  A  S  A  A

TGAAGCAATTGATGCTAAAGGTGGAGCACACGAGGTGATCTAATGTTTGAAACAATTGTT   240
 E  A  I  D  A  K  G  G  A  H  E  V  I  -  M  F  E  T  I  V
                                          SecY ⇒
AACTTCTTTAAAACTAAAGAAGTACGGAACAAGATCTTTTTACGCTCGCAATGCTAGTT   300
 N  F  F  K  T  K  E  V  R  N  K  I  F  F  T  L  A  M  L  V
```

```
ATTTTTAAAATAGGTACTTATATACCTGCGCCTGGAGTCAATCCAGCTGCATTTGATAAC   360
 I  F  K  I  G  T  Y  I  P  A  P  G  V  N  P  A  A  F  D  N

AATCAAGGTTCTCAAGGTGTCACTGATTTATTAAATACTTTTGGTGGCGGAGCCTTGAAG   420
 N  Q  G  S  Q  G  V  T  D  L  L  N  T  F  G  G  G  A  L  K

AACTTTTCCATATTTGCAATGGGTATCATGCCCTACATCACTGCTTCAATCGTAATGCAG   480
 N  F  S  I  F  A  M  G  I  M  P  Y  I  T  A  S  I  V  M  Q

TTATTGCAAATGGATATTGTTCCGAAATTTACAGAATGGGCTAAACAGGGTGATGTTGGA   540
 L  L  Q  M  D  I  V  P  K  F  T  E  W  A  K  Q  G  D  V  G

CGTAAGAAATTAAATAACGTTACACGTTATTTTGCGATTATCTTAGCGTTTATCCAATCC   600
 R  K  K  L  N  N  V  T  R  Y  F  A  I  I  L  A  F  I  Q  S

ATCGGTATGGCATTCCAGTTTAATAACTATTTGAAGGGCGCATTGATTATTGATCCTTCT   660
 I  G  M  A  F  Q  F  N  N  Y  L  K  G  A  L  I  I  D  P  S

CCGATGAGTTATTTGTTAATTGCTATTGTATTAACAACTGGTACTGCATTCTTATTATGG   720
 P  M  S  Y  L  L  I  A  I  V  L  T  T  G  T  A  F  L  L  W

TTAGGTGAACAAATCACTCAGTATGGTGTAGGTAATGGTATTACAACTATTATCTTTGCT   780
 L  G  E  Q  I  T  Q  Y  G  V  G  N  G  I  S  I  E  E  F  A

GGTATTTTGTCAACATTGCCATCATCGCTTATTCAGTTTTATCAACAAGCCTTTGTCGGG   840
 G  I  L  S  T  L  P  S  S  L  I  Q  F  Y  Q  Q  A  F  V  G

CAAAGTGATACATCTATGGCATGGTTGCAAGTTGCTGGTTTAGTTATTGGTTTAGTACTA   900
 Q  S  D  T  S  M  A  W  L  Q  V  A  G  L  V  I  G  L  V  L

TTGACTATGGGTGCTGTTTACGTACTTCAAGCTGTACGTAAAATTCCTATTCAATATGCT   960
 L  T  M  G  A  V  Y  V  L  Q  A  V  R  K  I  P  I  Q  Y  A

AAAAAGCAATCTACTCAGCGTTTAGGATCAAATGCAACGTATTTGCCGTTAAAAGTTAAC  1020
 K  K  Q  S  T  Q  R  L  G  S  N  A  T  Y  L  P  L  K  V  N

TCAGCAGGGGTTATCCCAGTTATCTTCGCAATGGCATTCTTCTTGTTGCCTAGAACATTA  1080
 S  A  G  V  I  P  V  I  F  A  M  A  F  F  L  L  P  R  T  L

ACAATGTTCTTCCCTAAAGCAGATTGGGCTCAGCAAATTGCTAATACAGCCAATCCATCA  1140
 T  M  P  F  P  K  A  D  W  A  Q  Q  I  A  N  T  A  N  P  S

AGTAATATCGGAATGGTAATTTATATTATCTTGATCATTGCATTTACTTACTTCTATGCA  1200
 S  N  I  G  M  V  I  Y  I  I  L  I  I  A  F  T  Y  F  Y  A

TTTGTTCAAGTTAATCCTGAAAAAATGTCTGACAACCTTAAGAAACAAGGCAGTTACGTT  1260
 F  V  Q  V  N  P  E  K  M  S  D  N  L  K  K  Q  G  S  Y  V

CCAGGTATTAGACCTGGTGAACAAACTAAAAAGTATATTACTAAAGTTTTATATCGTTTA  1320
 P  G  I  R  P  G  E  Q  T  K  K  Y  I  T  K  V  L  Y  R  L

ACTTTTGTTGGTTCTATATTCTTGGCAGTTATCGCTATCTTGCCGATACTAGCTACTAAG  1380
 T  F  V  G  S  I  F  L  A  V  I  A  I  L  P  I  L  A  T  K

TTTATGAACTTACCGCAGTCAATCCAAGTCGGCGGTACAAGCTTATTAATCGTTATCGGT  1440
 F  M  N  L  P  Q  S  I  Q  V  G  G  T  S  L  L  I  V  I  G

GTTGCAATCGAAACGATGAAGAGTTTGGAAGCGCAAGTTAACCAAAAAGAATATAAAGGC  1500
 V  A  I  E  T  M  K  S  L  E  A  Q  V  N  Q  K  E  Y  K  G

TTTGGTGGTAGATAAACTGTAGGAGGGCAATATGAATATCATCTTAATGGGTTTACCTGG  1560
 F  G  G  R  -                 M  N  I  I  L  M  G  L  P  G

TGCAGGTAAAGGAACTCAAGCGAGTGAAATAGTTAAGAAATTCCCTATTCCGCATATATC  1620
 A  G  K  G  T  Q  A  S  E  I  V  K  K  F  P  I  P  H  I  S

TACAGGTGATATGTTTATAAAAGCTATCAAAGACAAAACTGAATTAGGTAAAGAAGCTAA  1680
 T  G  D  M  F  I  K  A  E  K  D  Q  T  E  L  G  K  E  A  K

ATCTTATATGGATCGCGGCGAACTTGTACCTGATGAAGTTACTGTGGGTATCGTTAAAGA  1740
 S  Y  M  D  R  G  E  L  V  P  D  E  V  T  V  G  I  V  K  E

AAGACTTTCTGAAGACGATGCGAAAAAAGGATTTTTATTAGATGGTTTCCCACGTACACT  1800
 R  L  S  E  D  D  A  K  K  G  F  L  L  D  G  F  P  R  T  L

TGAACAAGCAGAAGCATTAAGTAAAATCATGAAAGAACTTGACAGAAAGATTGATGCATG  1860
 E  Q  A  E  A  L  S  K  I  M  K  E  L  D  R  K  I  D  A  C

CATCAACATTGAAGTTCCAGAAGAAGAACTTATGAATCGACTCACTGGACGTCGTATTTG  1920
 I  N  I  E  V  P  E  E  E  L  M  N  R  L  T  G  R  R  I  C

CGAAGTTTGCGGAACGACTTATCATCTTGTGTTCAATCCTCCAAAAGTT
 E  V  C  G  T  T  Y  H  L  V  F  N  P  P  K  V
```

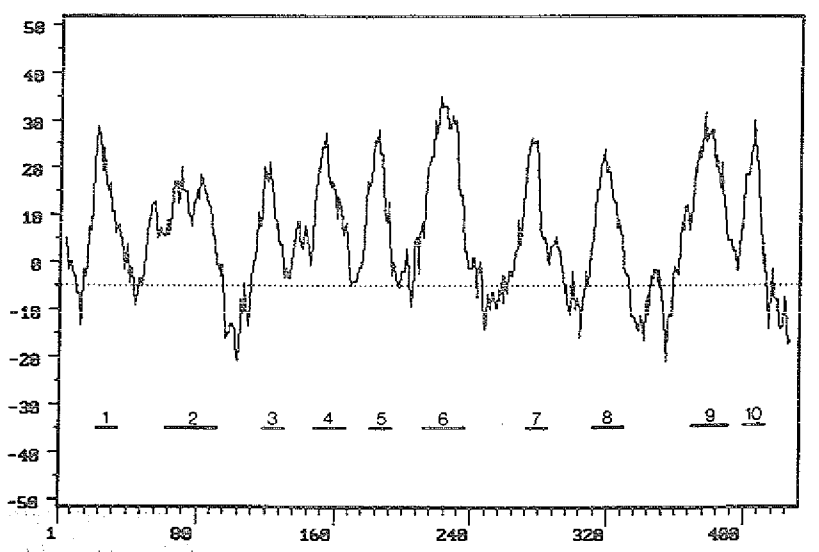
Abb. 5: Nukleotidsequenz des *S.carnosus secY*-Gens und der angrenzenden Bereiche sowie die abgeleitete Aminosäuresequenz der Proteine SecY, L15 und Adk; potentielle Ribosomenbindungsstelle ist unterstrichen

Das *secY*-Gen wurde als offener Leserahmen von 1290bp identifiziert, der mit einem ATG-Startkodon an Position 223 beginnt und dem die potentielle Ribosomenbindungsstelle (RBS) an Position 212-215 vorgelagert ist. Anlog zur Situation in *B.subtilis* und *B.licheniformis* konnten direkt vor dem *S.carnosus secY* keine Promotorsequenzen identifiziert werden, was darauf hinweist, daß auch in diesem Organismus das *secY*-Gen vom *spc*-Promotor transkribiert wird. Vor dem *S.carnosus secY* liegt das Ende des Gens, das für das ribosomale Protein L15 kodiert (Position 1-223) und dessen Stopkodon mit dem Startkodon von SecY überlappt, so daß auch hier eine Translationskopplung möglich wäre (Cerretti et al., 1983; Akiyama & Ito, 1985). Hinter dem *secY* wurde der Anfang des Gens, das für die Adenylatkinase kodiert (Position 1531-1969), identifiziert (Suh et al., 1990; Nakamura et al., 1990).

3.2.2. Hydrophobizitätsplots der SecY-Proteine von *B.licheniformis* und *S.carnosus*

Das SecY-Protein von *E.coli* ist ein integrales Membranprotein und besitzt charakteristische Transmembransegmente, die aus hydrophoben Aminosäuren bestehen (Akiyama & Ito, 1987). Deshalb wurde mit den *B.licheniformis* und *S.carnosus* SecY-Proteinsequenzen eine Hydrophobizitätsanalyse durchgeführt, die auf der Methode von Kyte & Doolittle (1982) basiert. Dabei ist jeder Aminosäure ein bestimmter Hydrophobizitätswert zugeordnet und die Hydrophobizität wird als ein Mittelwert über eine gewisse Anzahl von Aminosäuren (hier: 9 Aminosäuren) geplottet.

A



B

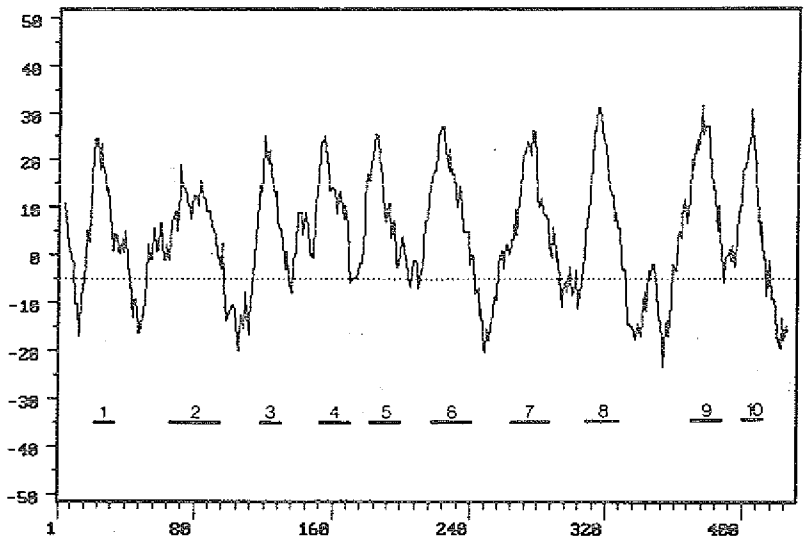


Abb. 6: Hydrophobizitätsplots der SecY-Proteine von *B.licheniformis* (A) und *S.carnosus* (B). Die Balken im unteren Teil der Abbildungen zeigen die Transmembranbereiche an.

In beiden SecY-Proteinen konnten 10 hydrophobe Bereiche als potentielle Transmembransegmente identifiziert werden (Abbildung 6), was mit den Strukturvorhersagen für das *E.coli* (Akiyama & Ito, 1987), das *B.subtilis* SecY (Suh et al., 1990) und weitere, später identifizierte SecY-Proteine übereinstimmt.

3.2.3. Homologievergleich aller bisher bekannten SecY-Proteine

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur zwei SecY-Proteine, d.h. von *E.coli* und *B.subtilis,* bekannt und gut untersucht. Es wurden dann, während diese Arbeit durchgeführt wurde, weitere neun *secY*-Gene isoliert und sequenziert. Ein Vergleich all dieser Proteinsequenzen kann zum Verständnis der strukturellen Organisation und der Identifizierung von funktionellen Domänen beitragen. So wurde mit dem CLUSTAL-Programm von Higgins & Sharp (1988) ein Vergleich der *B.licheniformis* und *S.carnosus* SecY-Proteinsequenzen mit den anderen bekannten SecY-Sequenzen durchgeführt (Abbildung 7).

Der Vergleich aller bislang sequenzierten SecY-Proteine zeigt, daß 11 Aminosäurereste (2%) strikt konserviert sind (in Abbildung 7 mit '*' markiert). 69 (12,5%) Positionen stellen konservierte Austausche dar, d.h. dort befinden sich Aminosäuren mit gleichen chemischen Eigenschaften (in Abbildung 7 mit '•' gekennzeichnet). Ferner ist erkennbar, daß die Transmembransegmente (TMS) 2, 5, 9 und 10 sowie die hydrophilen Segmente, welche die TMS 4 und 5 sowie TMS 8 und 9 miteinander verbinden, die am stärksten konservierten Bereiche sind.

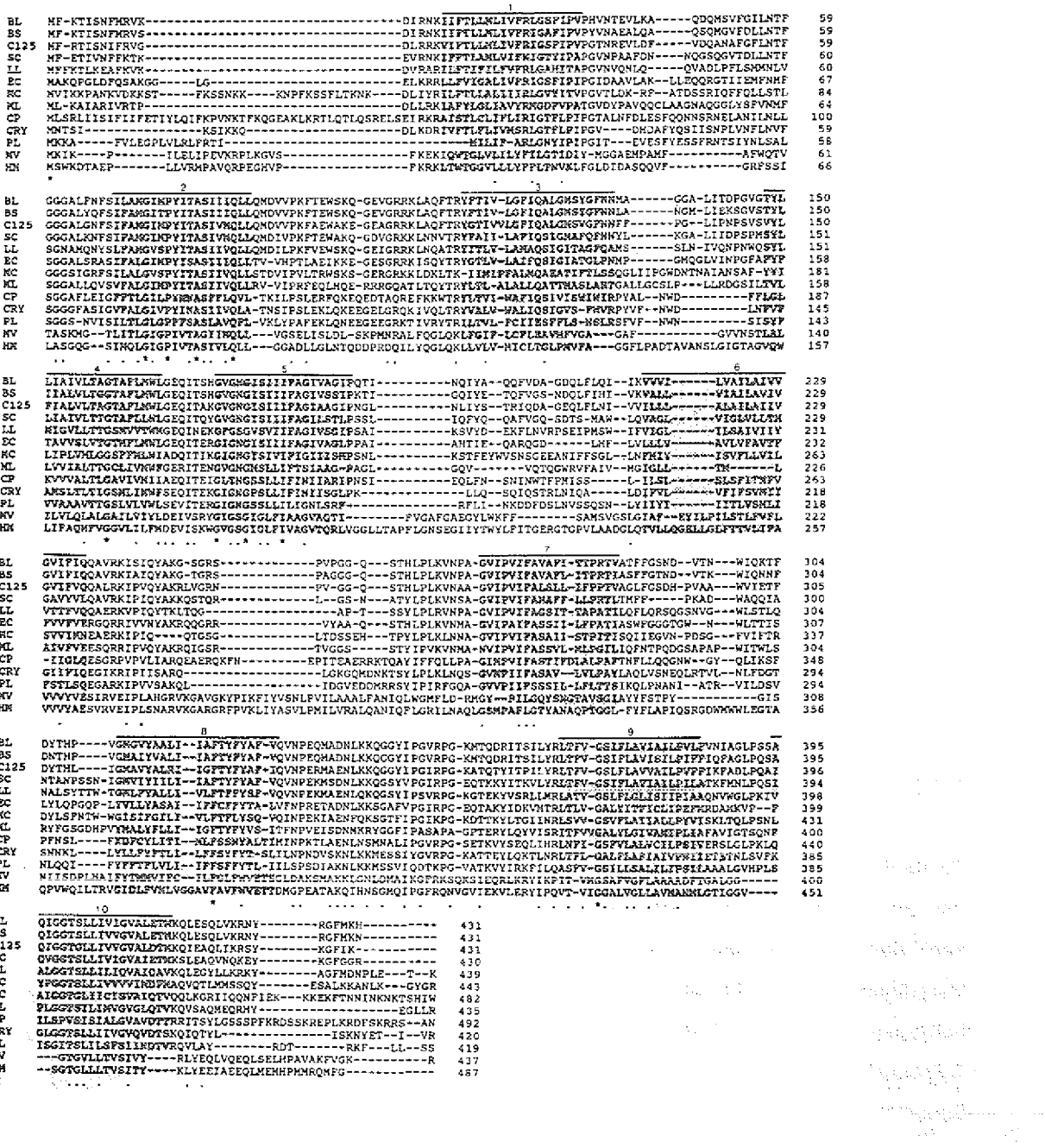


Abb. 7: Vergleich der Proteinsequenzen verschiedener SecY-Proteine: BL *B.licheniformis*; BS *B.subtilis*; C125 *Bacillus* sp. C125; SC *S.carnosus*; LL *Lactococcus lactis*; EC *E.coli*; MC *Mycoplasma capricolum*; ML *Micrococcus luteus*; CP *Cyanophora paradoxa*; CRY *Cryptomonas* ϕ ; PL *Pavlova lutherii*; MV *Methanococcus vannielii*; HM *Haloarcula marismortui*. '*' markiert identische Aminosäuren, '•' markiert Aminosäuren mit gleichen chemischen Eigenschaften wie A - S - T; D - E; N - Q; R - K; I - L - M - V; F - Y - W. Balken zeigen Transmembranbereiche an.

Die Transmembransegmente 2 und 5 weisen darüberhinaus auch zu den Sec61 Proteinen von Hefe und Säugern (Stirling et al., 1989; Görlich et al., 1992) signifikante Homologien auf (Abbildung 8).

```
        TMS 2:                          TMS 5:

BL      FSILAMGIMPYITASIIIQLLQ          HGVGNGISIIIFAGIVAGI
BS      FSIFAMGITPYITASIIIQLLQ          HGVGNGISIIIFAGIVSSI
C125    FSIFAMGIMPYITASIVMQLLQ          KGVGNGISIIIFAGIAAGI
SC      FSIFAMGIMPYITASIVMQLLQ          YGVGNGISIIIFAGILSTL
LL      YSLFAMGVSPYITASIIVQLLQ          KGFGSGVSVIIFAGIVSGI
EC      ASIFALGIMPYISASIIIQLLT          RGIGNGISIIIFAGIVAGL
MC      FSILALGVSPYITASIIVQLLS          KGIGNGISIVIFIGIIISM
ML      VSVFALGIMPYITASIIVQLLR          NGVGNGMSLLIFTSIAAGP
CP      IGFFTLGILPYMNASFFLQVLT          IGLTNGSSLLIFINIIARI
CRY     IGVFALGIVPYINASIIVQLAT          KGIGNGPSLLIFINIISGL
PL      ISILTLGLGPFFSASLAVQFLV          RGIGNGSSLLILIGNLSRF
MV      GTLITLGIGPIVTAGIIMQLLV          YGIGSGIGLFIAAGVAQTI
HM      GSIMQLGIGPIVTASIVLQLLG          WGVGSGIGLFIVAGVTQRL

SCE     GTLLELGVSPIITSSMIFQFLQ          YGLGSGISLFTATNIAEQI
CF      GTLMELGISPIVTSGLIMQLLA          YGLGSGISLFIATNICETI
            .*. *   .   *                 * *
```

Abb. 8: Proteinvergleich der Transmembransegmente 2 und 5 der SecY-Proteine (Abkürzung wie in Abbildung 7) und der entsprechenden Bereiche der Sec61-Proteine aus Saccharomyces cerevisiae (SCE)und Canis familiaris (CF). Identische Aminosäuren sind mit '*' markiert, chemisch verwandte Aminosäuren mit '•'.

Um alle SecY-Proteine einzeln miteinander zu vergleichen, wurden sie einer Analyse im GAP-Programm nach Devereaux et al., 1984 unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt, in der die Prozentsätze an konservierten Aminosäuren, bezogen auf die SecY-Proteine in der oberen Zeile, unterhalb der Diagonalen aufgelistet wurden. Der Prozentsatz aus der Summe aller konservierten und ähnlichen Aminosäuren der SecY-Proteine wurde oberhalb der Diagonalen eingetragen.

Die SecY-Proteine von *B.licheniformis* und *S.carnosus* zeigen einen hohen Grad an Ähnlichkeit zu den SecY-Proteinen von *B.subtilis* (Suh et al., 1990) und *Bacillus* sp. C125 (Kang et al., 1992), dessen Grad dann ständig geringer wird im Vergleich mit *L. lactis* (Koivula et al., 1991), *E.coli* (Cerretti et al., 1983), *M. capricolum* (Ohkubo et al., 1987), *M. luteus* (Ohama et al., 1989), *C. paradoxa* (Michalowski et al., 1990), *Cryptomonas* ϕ (Douglas, 1992), *P. lutherii* (Scaramuzzi et al., 1992) bis zu den Archaebakterien *H. marismortui* (Arndt, 1992) und *M. vanniellii* (Auer et al., 1991).

Tabelle 6: Vergleich der Aminosäuresequenz aller bekannten SecY-Proteine

	BL	BS	C125	SC	LL	EC	MC	ML	CP	CRY	PL	HM	MV
BL	---	91,4	85,5	75,5	69,6	67,6	68,2	66,0	60,0	65,5	57,0	56,4	56,2
BS	84,0	---	82,8	75,3	69,2	65,0	65,6	66,9	61,4	67,2	58,6	56,0	54,8
C125	71,9	67,1	---	75,6	69,8	69,6	65,3	68,0	57,8	65,5	58,3	53,0	54,0
SC	59,4	60,3	55,6	---	67,6	65,6	66,3	66,9	62,1	64,4	58,3	56,8	51,9
LL	47,8	48,0	44,2	45,6	---	64,0	66,6	63,2	59,5	65,0	57,2	55,4	54,0
EC	41,8	41,1	43,3	41,2	38,0	---	61,2	65,2	58,2	64,9	57,7	55,9	50,6
MC	39,7	39,2	34,2	39,8	39,0	33,0	---	60,9	57,4	63,4	55,4	55,4	54,5
ML	37,6	38,3	40,7	38,6	33,7	38,4	25, 9	---	58,3	64,2	57,3	55,4	50,6
CP	29,5	28,8	27,6	30,5	30,3	26,2	26,1	28,7	---	63,0	59,9	48,6	52,4
CRY	33,6	36,4	36,4	34,4	36,0	36,6	30,5	36,1	33,3	---	62,0	55,4	52,3
PL	26,0	26,2	31,7	28,8	27,6	30,9	26,6	27,8	27,0	34,3	---	52,7	50,3
HM	20,4	20,9	19,5	22,8	21,4	23,0	22,2	25,5	18,5	19,1	18,5	---	69,0
MV	19,5	22,3	22,0	21,3	20,0	20,1	20,1	20,7	18,1	18,8	18,8	40,7	---

Werte unterhalb der Diagonalen zeigen den Prozentsatz der identischen Aminosäuren, oberhalb der Diagonalen den Prozentsatz der Summe aus identischen und ähnlichen Aminosäuren; Abkürzungen wie in Abbildung 7.

3.3. Nachweis der Expression des *B.licheniformis* SecY-Proteins in *E.coli*

Um die Funktionalität der Gram-positiven SecY-Proteine durch die Komplementation eines temperatursensitiven *E.coli*-Stammes (secY24^{ts}) nachweisen zu können, wurde zuerst untersucht, ob die SecY-Proteine von den Plasmiden in *E.coli* gebildet werden. Dazu wurden zwei Ansätze zur Bildung von Fusionsproteinen zwischen dem SecY und der alkalischen Phosphatase einerseits sowie dem SecY und der ß-Galaktosidase andererseits ausgewählt. Diese beiden Methoden wurden deshalb gewählt, weil bekannt war, daß das *E.coli* SecY-Protein aufgrund seiner geringen Menge mit Hilfe von SDS-PAGE, Zwei-dimensionaler Gelelektrophorese, Minizell- und Maxizellsystem nicht nachzuweisen ist (Ito, 1984). Exemplarisch für beide SecY-Proteine wurde die Expression des *B.licheniformis* SecY-Proteins in *E.coli* ausgehend von dem Plasmid pDY1 (Abb.3) nachgewiesen.

3.3.1. Fusion der alkalischen Phosphatase an das SecY aus *B.licheniformis*

Die Expression des SecY-Proteins wurde durch den Nachweis der enzymatischen Aktivität der alkalischen Phosphatase gezeigt, die an einen N-terminalen Teil des SecYs fusioniert wurde. Dazu wurde eine TnPhoA-Mutagenese eingesetzt, die auf der Transposition des Transposons Tn5 beruht, welches das *phoA*-Gen (alkalische Phosphatase) ohne seinen Promotor, Signalsequenz und die Kodons für die ersten fünf Aminosäuren enthält. Das TnPhoA zeigt eine niedrige DNS-Spezifität und kann sich somit an vielen Stellen in das *secY*-Gen integrieren, so daß Genfusionen, die für ein Hybridgen *secY'-phoA* kodieren, entstehen können. Der alkalische Phosphatase-Anteil des entsprechenden Hybridproteins kann nur dann aktiv werden, wenn er im Periplasma lokalisiert ist. Entsprechende Klone können auf X-Phosphat-haltigen Indikatorplatten an ihrer Blaufärbung erkannt werden.

Insgesamt wurden nach Transposon-Mutagenese 425 Kolonien erhalten, von denen zwei Kolonien eine dunkle Blaufärbung aufwiesen. Die Retransformation der entsprechenden Plasmid-DNS zeigte, daß eine Insertion des Transposons nur auf einem der beiden Plasmide erfolgt war, was durch die Blaufärbung aller Kolonien dieses Transformationsansatzes bewiesen wurde. Diese Plasmid-DNS wurde isoliert und die Insertionsstelle im Plasmid durch Restriktionskartierung bestimmt. Die Integration des Transposons in das *secY*-Gen auf dem Plasmid pDY1 ist in Abbildung 9 dargestellt.

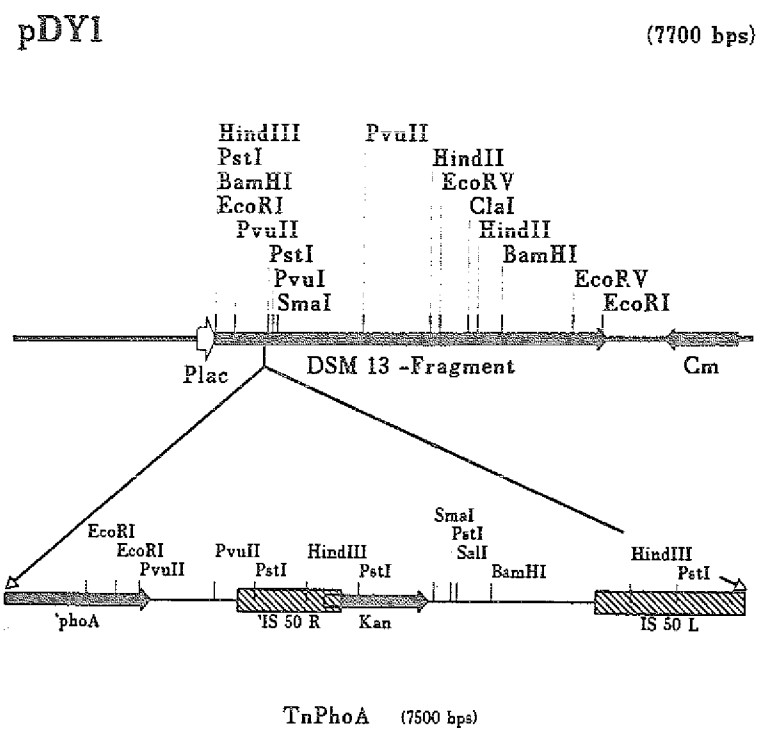


Abb. 9: Integration des Transposons TnPhoA in das *B.licheniformis secY*-Gen im Plasmid pDY1.

Die Insertion und Fusion mit der alkalischen Phosphatase erfolgte nach ca. 200bp im *secY*-Gen und befindet sich damit gemäß dem Topologiemodell des SecY-Proteins von *E.coli* im ersten periplasmatischen Loop (Akiyama & Ito, 1987). Damit wurde gezeigt, daß das *B.licheniformis* SecY vom *lac*-Promotor des Plasmids in *E.coli* exprimiert und vermutlich analog zum *E.coli*-SecY in die Membran integriert wird.

3.3.2. Fusion der ß-Galaktosidase an das SecY von *B.licheniformis*

Ein weiterer Nachweis der Expression von SecY wurde durch ein SecY-ß-Galaktosidase-Fusionsprotein geführt. Dieser wurde einerseits mit Hilfe eines Aktivtätstests auf Indikatorplatten (ß-Galaktosidase-Aktivität) und andererseits durch eine immunologische Detektion eines SecY-ß-Galaktosidase-Fusionsproteins über ß-Galaktosidase-spezifische Antikörper geführt. Der Fusionspunkt lag dabei am extremen C-Terminus des SecY-Proteins. Dazu wurde ein PvuII-PvuII-Fragment aus dem Plasmid pDY1, das die Ribosomenbindungsstelle (RBS), das Startkodon und die kodierende Sequenz für 419 Aminosäuren (12 Aminosäuren fehlen am C-Terminus) des *B.licheniformis -secY* - Gens enthielt, in das *lacZ*-haltige Plasmid pMC1871 kloniert. So entstand ein durchgehender Leserahmen, beginnend mit dem TTG-Startkodon des *secY*s bis ins *lacZ*-Gen, dem die ersten 8 Kodons fehlten (pMYZ1). Da sich auf diesem Vektor vor dem Fusionsgen kein Promotor befand, mußte dieses als PstI-PstI-Fragment (Partialverdau) in den Vektor pKK223-3 hinter den *tac*-Promotor umkloniert werden. Dieses Konstrukt, pKYZ1 (in Abbildung 10 dargestellt), wurde im Startbereich und an der Fusionsstelle sequenziert, um eine Leserasterverschiebung oder einen fehlerhaften Start auszuschließen.

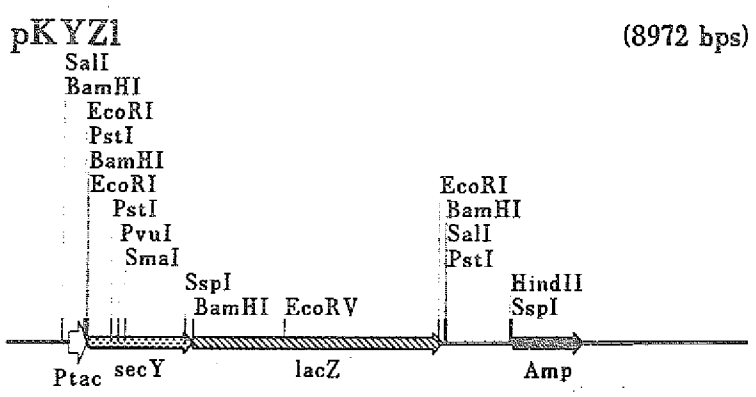


Abb. 10: Restriktionskarte des Plasmids pKYZ1. *secY-lacZ*-Fusionsgen unter Kontrolle des *tac*-Promotors. Es sind nur die wichtigsten Schnittstellen dargestellt. Ptac = *tac*-Promotor; Amp siehe Abkürzungsverzeichnis

Nach Transformation in die *E.coli*-Stämme JM109 (F':*lacZ*ΔM15) und MC1061 (*lacX74*; vollständige Deletion des chromosomalen *lacZ*-Gens) konnte die Aktivität der ß-Galaktosidase durch Blaufärbung der Kolonien auf Indikatorplatten nachgewiesen werden.

Diese Stämme wurden unter induzierenden (2mM IPTG-Zugabe) und reprimierenden (Glukose-Zugabe) Bedingungen bei 37°C kultiviert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben genommen und mit gleichem Volumenteil 15% TCA gefällt. Die gefällten Proben wurden nach Aufnahme in SDS-Probenpuffer mit Proteaseinhibitor (2mM PMSF-Endkonzentration) versetzt und als Gesamtzellextrakte über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde ein Western-Blot mit Antikörpern gegen die ß-Galaktosidase durchgeführt. Im Stamm JM109 erkennt man im induzierten Zustand das vom Chromosom kodierte LacZ'- Polypeptid (*lacZΔM15*), das ein etwas kleineres Molekulargewicht als die vollständige, vom Chromosom kodierte ß-Galaktosidase des Stammes CA8000 bzw. die von Sigma Chemicals gekaufte, aufgereinigte ß-Galaktosidase besitzt. Darüber erkennt man noch eine weitere Form, die auf der Höhe der vollständigen ß-Galaktosidase läuft (116kD). Daß es sich hierbei um die intakte ß-Galaktosidase handelt, wurde durch Zugabe von gereinigter ß-Galaktosidase zu den Proteinproben und dem identischen Laufverhalten der Proteinbanden geschlossen. Im Stamm MC1061 findet man im induzierten Zustand nach 0, 15, 60, 120 Minuten eine Bande, die auf Höhe der vollständigen ß-Galaktosidase läuft (nicht dargestellt) und nach 180 ist auf Höhe des erwarteten Fusionsproteins (ca. 150kD) noch eine weitere, dünne Bande erkennbar (Abbildung 11, A: Bande 6 und 7). Da dieser Stamm keine chromosomale Kopie des intakten oder deletierten *lacZ*-Gens besitzt, ist die Herkunft der unteren Bande nur durch eine Abspaltung des SecY-Anteils vom gebildeten Fusionsproteins zu erklären. Diese Abspaltung an der Fusionsstelle findet in großem Umfang statt, denn es liegen mehr als 95% des gebildeten Proteins in Form der abgespaltenen ß-Galaktosidase vor.

Um den proteolytischen Abbau zu verringern, wurde das Fusionsprotein auf dem Plasmid pEYZ1 im *lon*-Protease-negativen *E.coli*-Stamm Y1089 (nicht dargestellt) und im *ompT*-Protease-negativen und vermutlich auch *lon*-Protease-negativen *E.coli*-Stamm BL21 (Abbildung 11, B) exprimiert. Die Umklonierung des Fusionsgens als SalI-SalI-Fragment aus dem Plasmid pKYZ1 in den Vektor pEKEX2 (*tac*-Promotor, Kanamycin-Resistenzgen) zum Plasmid pEYZ1 war erforderlich, da der Stamm Y1089 ein Ampicillinresistenz vermittelndes Plasmid enthält. Jedoch zeigte sich in beiden Stämmen nach 180 minütiger Expression des Fusionsproteins nur eine unwesentliche Verbesserung des Verhältnisses Fusionsprotein zu ß-Galaktosidase (Abbildung 11 B - Spur 3).

Trotz des stattfindenden proteolytischen Abbaus konnte durch die Identifizierung des Fusionsproteins gezeigt werden, daß das *B.licheniformis secY*-Gen in *E.coli* exprimiert werden kann.

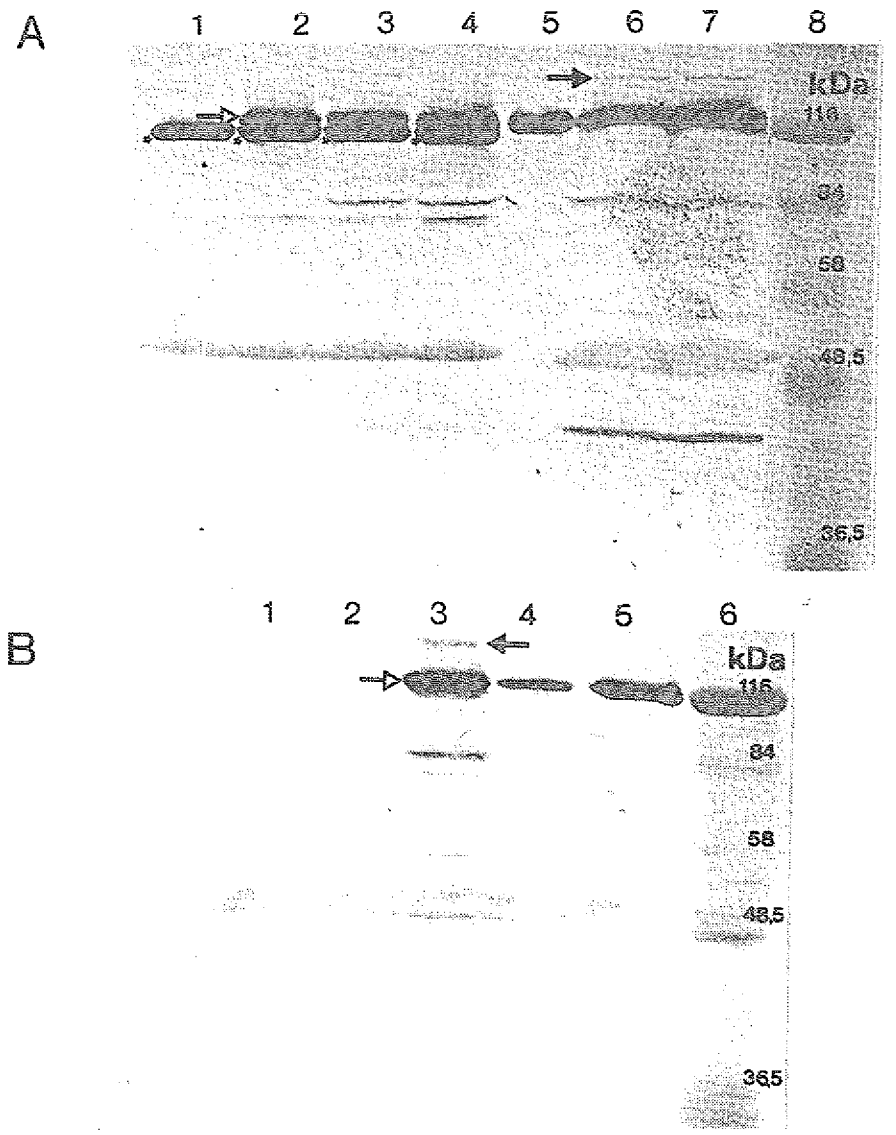


Abb. 11: Western-Blots mit Proteinproben verschiedener *E.coli*-Stämme nach 180 min Induktions-/Repressionszeit. A: induzierte Proben von JM109/pKK223-3 als Negativkontrolle (1), JM109/pKK223-3 mit zugesetzter gereinigter ß-Galaktosidase von Sigma [= +ß-Gal] (2), JM109/pKYZ1 (3), JM109/pKYZ1 + ß-Gal (4), CA8000 (5), MC1061/pKYZ1 (6), MC1061/pKYZ1 + ß-Gal (7), Längenstandard SDS7B (8); B: BL21/pEKEX2 +IPTG als Negativkontrolle (1), BL21/pEKEX2 -IPTG (2), BL21/pEYZ1 +IPTG (3), BL21/pEYZ1 -IPTG (4), ß-Gal (Sigma, 5), Längenstandard SDS7B (6). * = chromosomale *lacZ*ΔM15 kodierte ß-Galaktosidase (116kD), offener Pfeil = ß-Galaktosidase (116kD), geschlossener Pfeil = Fusionsprotein (ca. 150kD)

3.4. Untersuchungen zur Komplementation der Wachstums- und Translokationsdefekte von *E.coli secY*-Mutanten

Um zu testen, ob die SecY-Proteine aus *B.licheniformis* und *S.carnosus* das SecY-Protein aus *E.coli* funktionell ersetzen können, wurden Versuche zur Komplementation von temperaturempfindlichen *E.coli*-Mutanten durchgeführt. Das Komplementationsverhalten wurde in Bezug auf das Wachstum und die Wiederherstellung der Translokationsfähigkeit in der *E.coli*-Mutante bei der nicht-permissiven Temperatur untersucht.

Da der temperaturempfindliche *E.coli*-Stamm IQ85 ($secY^{24}$) keinen *lac*-Repressor, der für die Regulation des *lac*-Promotors und damit der regulierten Expression der davon abhängigen Proteine nötig ist, besitzt, wurde durch P1-Transduktion das $secY^{24}$-Gen in den Stamm JM105 (F' $lacI^{q}$) überführt. Somit stand ein *E.coli*-Stamm zur Verfügung (JM105/3-1), der über das $secY^{24}$-Allel und den *lac*-Repressor verfügte.

3.4.1. Wachstumskomplementationsversuche

Zur Untersuchung der Wachstumskomplementation wurden folgende Plasmide mit den Gram-positiven *secY*-Genen und dem *E.coli-secY*-Gen als Kontrolle in die temperatursensitiven *E.coli*-Mutanten IQ85 und JM105/3-1 transformiert (s. 2.1.3.; Tabelle 4):

- *B.licheniformis secY* in den Plasmiden pDY1 (ca. 2-5 Kopien/Zelle) und pDY3 (ca. 20 Kopien / Zelle). Das *secY*-Gen liegt in beiden Plasmiden unter Kontrolle des *lac*-Promotors.
- *S.carnosus secY* in dem Plasmid pTY3 (ca. 20 Kopien/Zelle). Das *secY*-Gen wird vom *lac*-Promotor exprimiert.
- *B.subtilis secY* in den Plasmiden pST120 (Suh et al., 1990; ca. 20 Kopien/Zelle) und pSY1 (ca. 20 Kopien/Zelle). Das *secY*-Gen liegt im pST120 unter Kontrolle des *tac*-Promotors , in pSY1 unter Kontrolle des *lac*-Promotors.
- *E.coli secY* in den Plasmiden pKY3 (Shiba et al., 1984; ca. 20 Kopien /Zelle) und pEY2 (ca. 20 Kopien/Zelle) als Positivkontrolle. Das *secY*-Gen wird in beiden Plasmide vom *lac*-Promotor exprimiert.
- Negativkontrolle pBGS18 (ca. 20 Kopien/Zelle)

Die Transformationsansätze wurden auf ME-Medium-Platten ausplattiert und auf Wachstum bei der nicht-permissiven Temperatur (42°C) untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Wachstumsverhalten der E.coli-Mutanten (secY24^{ts}) IQ85 und JM105/3-1 nach Transformation mit verschiedenen Plasmiden, die Gram-positive (pDY1, pDY3, pTY3, pST120, pSY1) und Gram-negative (pKY3, pEY2) secY-Gene enthalten

	pDY1	pDY3	pTY3	pST120	pSY1	pKY3	pEY2	pBGS18
IQ85 *	---	---	---	---	---	+	+	---
JM105/3-1**	---	---	---	---	---	+	+	---

* Wachstum auf Minimalmedium E - Platten mit Glukose bei 42°C; ** Wachstum auf Minimalmedium E - Platten mit IPTG und Glycerin bei 42°C; + = Wachstum, --- = kein Wachstum

Die Ergebnisse zeigen, daß der Wachstumsdefekt der Mutanten IQ85 und JM105/3-1 nur durch die Plasmide pKY3 und pEY2, die das *secY*-Gen aus *E.coli* tragen, komplementiert werden konnte. Hingegen konnten die *secY*-Gene aus den Gram-positiven Bakterien das Wachstum der Mutanten nicht komplementieren.

In Flüssigmedium, sowohl in Minimal- als auch in LB-Vollmedium stellen die Zellen der temperatursensitiven Mutanten das Wachstum bei der nicht-permissiven Temperatur erst nach mehreren Stunden ein (Shiba et al., 1984). In Submers-Kulturen (ME-Medium) wuchsen die Defektmutanten mit den Plasmiden pKY3 und pEY2 sowohl bei permissiver als auch bei nicht-permissiver Temperatur am besten. Die übrigen Kulturen zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle während der Kultivierung bei 30°C und 42°C sogar ein schlechteres Wachstum. Kulturen, die die Plasmide pST120 und pSY1 mit dem *B.subtilis secY* enthielten, wiesen bei der nicht-permissiven Temperatur sogar einen noch stärkeren Wachstumsdefekt auf (Abbildung 12).

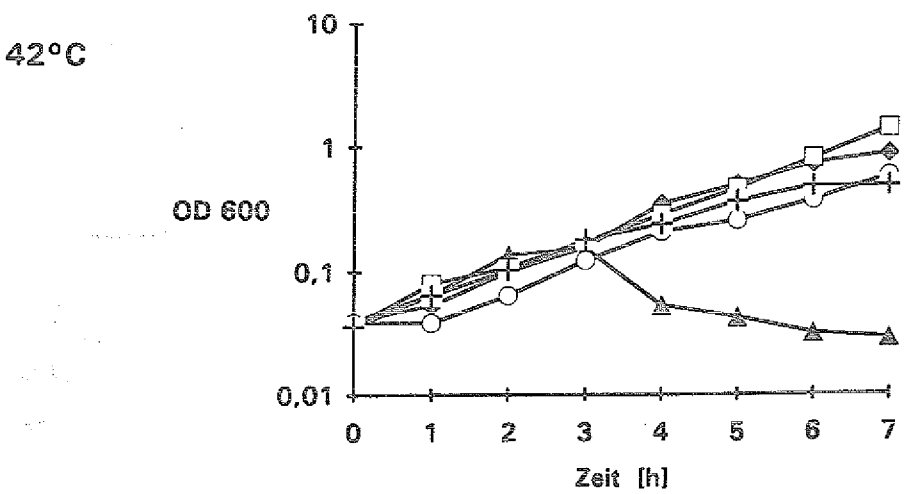


Abb. 12: Wachstum der E.coli Stämme IQ85/pBGS18 (◆), IQ85/pEY2 (□), IQ85/pSY1 (▲), IQ85/pDY3 (o) und IQ85/pTY3 (+) bei 42°C in Minimalmedium

3.4.2. Untersuchungen zum Translokationsdefekt der *E.coli*-Mutanten

Um zu untersuchen, ob die SecY-Proteine von *B.licheniformis* und *S.carnosus* eine Komplementation des Translokationsdefekts der *secY24*^{ts} *E.coli*-Mutanten bewirken können, wurden Pulse-Chase-Experimente mit nachfolgender OmpA-Antikörperfällung durchgeführt. Die radioaktive Markierung des Exportproteins OmpA ermöglicht die Untersuchung seiner Prozessierungskinetik. Darunter versteht man das Ausmaß und die Geschwindigkeit mit der die Signalsequenz des proOmpA-Proteins beim Transport durch die Cytoplasmamembran entfernt wird und entsprechend das reife OmpA-Protein entsteht. Sichtbar wird dies durch die Verschiebung der Proteinbanden des proOmpA-Proteins zum OmpA-Protein (ca. 36kD) auf einem SDS-Gel.

Durch verschiedene Induktionsbedingungen und -zeiten bei der Anzucht der Bakterienkulturen für die radioaktive Markierung der Proteine sollte die SecY-Proteinmenge variiert werden. Dazu wurden die Stämme IQ85 und JM105/3-1, welche die in 3.4.1 aufgeführten Plasmide enthielten, 2-3 Stunden in Minimalmedium (ME-Medium) bei 30°C angezogen, anschließend halbiert und bei 30°C bzw. 42°C zwei Stunden weiter inkubiert. Nach der radioaktiven Markierung der Proteine durch Zugabe von ^{35}S-Methionin wurden zu verschiedenen Zeiten (Chasezeiten) Proben entnommen.

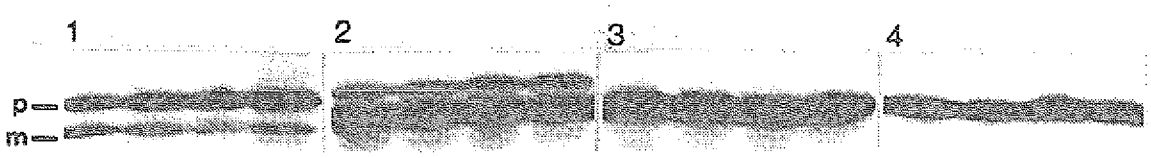


Abb. 13: Kinetik der proOmpA Prozessierung in *E.coli* -Mutante IQ85 mit den Plasmiden pST120 [*B.subtilis secY*] (1), pDY1 [*B.licheniformis secY*] (2), pHSG576 [Negativkontrolle] (3) und pKY3 [*E.coli secY*](4) nach Kultivierung bei 30°C. Chasezeiten: 0, 1, 2 und 4 min; p = proOmpA, m = OmpA.

Wie in Abbildung 13 dargestellt, zeigte es sich, daß die Plasmide pST120 mit dem *B.subtilis secY* und pDY1 mit dem *B.licheniformis secY* bei der permissiven Temperatur eine Verschlechterung der Translokationsaktivität des Stammes IQ85 bewirken. Die Plasmide pDY3 (*B.licheniformis secY*) und pTY3 (*S.carnosus secY*) zeigten das gleiche Verhalten (nicht abgebildet). Die Beeinträchtigung der Translokationsaktivität bei der permissiven Temperatur durch die *secY*-Gene aus Gram-positiven Bakterien konnte ebenfalls unter induzierten Bedingungen im Stamm JM105/3-1 beobachtet werden. Gleiches Verhalten wurde, in

abgeschwächter Form, auch im reprimierten Zustand beobachtet, da der *lac*-Promotor, der vor den *secY*-Genen liegt, nicht vollständig reprimiert werden kann (nicht dargestellt). Diese Daten deuten darauf hin, daß eine Interferenz durch die Gram-positiven SecY-Proteine mit dem Proteinexport von *E.coli* stattfindet. Dies kann z.B. auf einer falschen oder fehlerhaften Wechselwirkung des Gram-positiven SecY-Proteins zu SecE oder zu SecA beruhen.

Um zu untersuchen, ob der *E.coli*-Wildtypstamm JM109 ebenfalls durch die Gram-positiven SecY-Proteine in seinem Translokationsverhalten beeinträchtigt wird, wurde ein Pulse-Chase-Experiment durchgeführt, in dem der Wildtyp in Minimalmedium drei Stunden bei 37°C mit Glukose angezogen und anschließend 30 Minuten mit 1mM IPTG induziert wurde (Abbildung 14).

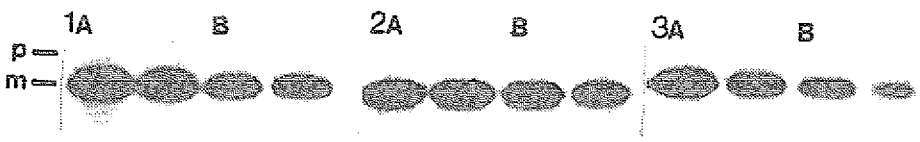


Abb. 14: Pulse-Chase-Experiment: *E.coli* -Wildtypstamm JM109 mit den Plasmiden pSY1 (1), pDY3 (2) und pTY3 (3) ; Kulturen angezogen mit A: Repression mit 0,5% Glukose; B: Induktion mit 1mM IPTG; Proben nach je 0 und 5 min Chasezeit. p = proOmpA; m = OmpA.

Die Translokationsaktivität des *E.coli*-Wildtyps JM109 wurde durch die Anwesenheit und Induktion der Gram-positiven *secY*-Gene von *B.subtilis, B.licheniformis* und *S.carnosus* nicht beeinträchtigt.

Eine Komplementation der Translokationsaktivität bei nicht-permissiver Temperatur, d.h. 42°C, konnte im Stamm IQ85 nicht beobachtet werden. Da dieser *E.coli*-Stamm nicht über den *lac*-Repressor und damit Kontrollmöglichkeit des *lac*-Promotors zur Regulation der Expressionsstärke der *secY*-Gene verfügte, wurden weitere Versuche im Stamm JM105/3-1 durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Bedingungen getestet, um eine Komplementation der Translokationsaktivität bei 42°C zu erreichen. Diese umfaßten mehrere Versuchsanordnungen, die verschiedentlich miteinander kombiniert wurden um 1. die SecY-Proteinmenge in der Zelle zu variieren und 2. den Zustand der Zellen zum Zeitpunkt der Untersuchung der Translokationsaktivität zu verändern. So wurde die Zeit der Kultivierung bei der permissiven Temperatur , die Repressions- und Induktionsbedingungen sowie die Markierungs- bzw. Chasezeiten variiert. Einige Ergebnisse sind in den Abbildungen 15 und 16 exemplarisch dargestellt.

In keinem dieser Experimente konnte eine Komplementation des Translokationsdefektes durch die Expression von SecY-Proteinen aus den Gram-positiven Bakterien *B.subtilis*, *B.licheniformis* und *S.carnosus* beobachtet werden.

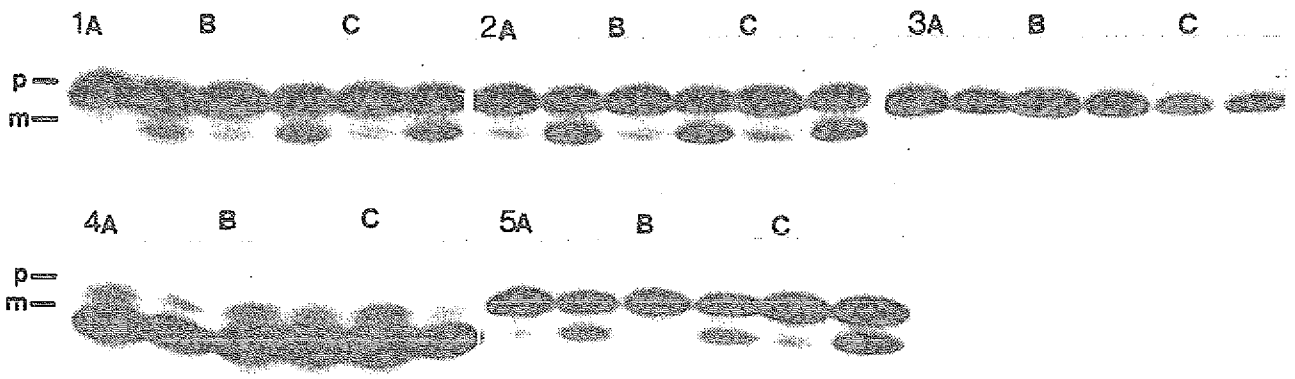


Abb. 15: Prozessierungskinetik von proOmpA bei 42°C im *E.coli*-Stamm JM105/3-1 mit den Plasmiden pSY1 (1) , pDY3 (2), pTY3 (3), pEY2 (4) und pBGS18 (5). Anzucht der Kulturen mit A: 5min Induktion mit 10μM IPTG; B: 5min Induktion mit 1mM IPTG; C: Repression mit 0,5% Glukose + 1mM ONPF); Proben nach je 0 und 5 min Chasezeit. p = proOmpA, m = OmpA.

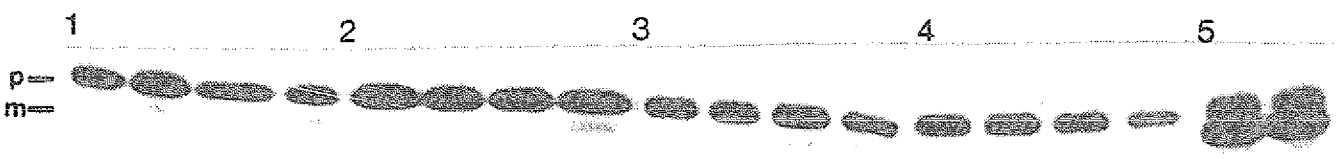


Abb. 16: Kinetik der Prozessierung von proOmpA in *E.coli*-Mutante JM105/3-1 mit den Plasmiden pBGS18 (1), pSY1 (2), pDY3 (3), pTY3 (4) und pEY2 (5) nach zwei Stunden Induktion der Kulturen mit 1mM IPTG bei 42°C. Proben nach den Chasezeiten 1, 2, 5 und 10 min, Ausnahme: pEY2 - Proben nach 0 und 10 min. p = proOmpA, m = OmpA.

Da es sich bei dem verwendeten Indikatorprotein (proOmpA) um ein Exportprotein eines Gram-negativen Bakteriums handelt, wurden Versuche durchgeführt, in denen ein sekretorisches Protein eines Gram-positiven Organismus (*S.hyicus* Lipase) als Indikatorprotein verwendet wurde. Aber auch hier konnte keine Wiederherstellung der Translokationsfähigkeit in den *E.coli*-Stämmen IQ85 und JM105/3-1 unter den getesteten Versuchsbedingungen erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

Die beschriebenen Ergebnise zeigen, daß Gram-positive SecY-Proteine anscheinend mit dem Exportapparat Gram-negativer Bakterien nicht kompatibel sind und daß weiterhin die Anwesenheit der SecY-Proteine in *E.coli secY*-Mutanten zu einer Interferenz mit dem Proteinexport führt.

3.5. Selektion von "rekombinanten"-*secY*-Genen von *B.licheniformis* und *S.carnosus*, die das Wachstum des temperatursensitiven *E.coli*-Stammes IQ85 komplementieren

Da in Wachstums- und Pulse-Chase-Experimenten keine Komplementation der temperatursensitiven *E.coli*-Stämmen IQ85 und JM105/3-1 mit den Gram-positiven *secY*-Genen festgestellt wurde, sollten spontane Mutationen in den *B.licheniformis* und *S.carnosus secY*-Genen isoliert werden, die das Wachstum dieser *E.coli*-Mutanten bei der nicht-permissiven Temperatur ermöglichen. Entsprechende Mutationen könnten Aufschluß darüber geben, welche Bereiche der Gram-positiven Bakterien für die Inkompatibilität in *E.coli* verantwortlich sind.

3.5.1. Isolierung von "rekombinanten"-*secY*-Genen

Um Mutationen in den Gram-positiven *secY*-Genen zu isolieren, wurden die *secY*-haltigen Plasmide (*B.licheniformis*: pDY3; *S.carnosus*: pTY3) in den *E.coli*-Stamm IQ85 transformiert, bei 30°C inkubiert und von Einzelkolonien Submers-Kulturen herangezogen. Ein Aliquot jeder Übernacht-Kultur (2ml) wurde auf Minimalmedium-Platten mit Glukose ausplattiert und bei 42°C inkubiert. Durch diese Selektion sollten Kolonien mit Plasmiden identifiziert werden, die durch eine Mutation eine Wachstumskomplementation der temperatursensitiven *E.coli*-Mutante ermöglichen. Alle gewachsenen Kolonien (100-200) wurden vereinigt, die Plasmid-DNS isoliert und erneut in den Stamm IQ85 transformiert, um somit Plasmid-kodierte Mutationen zu selektionieren. Von den 195 (pDY3) bzw. 23 (pTY3) entstandenen Kolonien wurden je zehn willkürlich ausgewählt und nochmals transformiert. Neun der zehn pDY3-Isolate und drei der zehn pTY3-Isolate komplementierten wiederum das Wachstum, so daß von ihnen die Plasmid-DNS isoliert wurde. Die Restriktionsanalyse dieser Plasmide ergab, daß alle neun pDY3-Plasmide eine identische Insertion in der Größe von 1,3-1,4kb mitten im *secY*-Gen trugen. Alle drei pTY3-Isolate trugen eine identische Vergrößerung von ca. 1,5-1,6kb, wobei die Insertionsstelle direkt vor der Klonierungsstelle des *secY*-Fragments lokalisiert werden konnte.

3.5.2. Sequenzanalyse der "rekombinanten" Plasmide

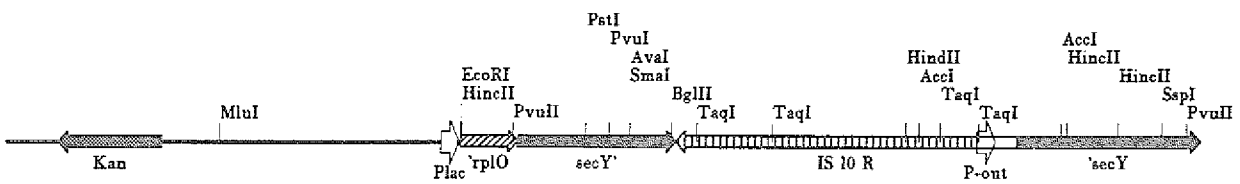
Die beiden Inserts wurden von beiden Seiten über eine Länge von ca. 500-600 bp ansequenziert. Dabei stellte sich heraus, daß im *B.licheniformis-secY* die Insertion bei Position 816 erfolgte, bezogen auf die Sequenz, wie sie in Abbildung 4 dargestellt ist. Dies entspricht einer Insertion an Position 596 des *secY*-Gens und somit dem periplasmatischen Bereich zwischen den Transmembranbereichen 5 und 6 (zwischen die Aminosäuren Tyrosin 198 und Alanin 199) des SecY-Proteins (Abbildung 17/A). Bei diesem Insert handelt es sich um das rechte Insertionselement 10 (IS 10 R; 1329bp) des Transposons 10 (Tn10) aus dem *E.coli*-Chromosom, das vermutlich aufgrund seiner funktionsfähigen Transposase ins Plasmid gesprungen ist. Auf dem rechten IS-Element liegt bei Position 90-120 ein Promotor, pOUT (Halling et al., 1982), der aus dem IS-Element gerichtet ist, was im Plasmid pDY3* einer Orientierung in Richtung C-Terminus des *secY*-Gens entspricht. Neben dem Leseraster für die Transposase gibt es noch vier weitere kodierende Bereiche für Polypeptide von mehr als 30 Aminosäuren, deren Translation und Funktion jedoch noch nicht untersucht wurden (4-165bp, 62-208bp, 349-534bp, 280-143bp) (Halling et al., 1982).

Die Sequenzierung des Inserts im Plasmid pTY3* ergab, daß die Insertion direkt in der PstI-Schnittstelle liegt, die auch zur Einklonierung des Fragments mit dem *S.carnosus-secY* in das Plasmid benutzt wurde (Abbildung 17/B). Vom Promotor aus betrachtet liegt am 5'-Ende des Inserts das Insertionselement 3 (IS 3; 1258bp), das mit 4-5 Kopien im *E.coli*-Chromosom vorkommt (Timmermann & Tu, 1985). Am 3'-Ende, d.h. direkt vor den letzten 45bp des *rplO*-Gens und dem sich daran anschließenden *secY*-Gen, liegen 245bp, die als Promotorbereich des Gens *argF* (kodiert für die Argininosuccinat-Lyase oder Ornithin-Carbamoyl-Transferase) identifiziert wurden, der entgegen der Transkriptionsrichtung des *secY*-Gens orientiert ist. Somit setzt sich das Insert folgendermaßen zusammen: hinter dem Promotor des Plasmids pTY3* liegt das IS-Element 3 mit 1258bp, an das sich der Promotorbereich des *argF*-Gens mit 245bp anschließt (inkl. dessen PstI-Schnittstelle). Das IS-Element 3 besitzt am rechten Ende einen Promotor, der nach außen gerichtet ist, und von dem bekannt ist, daß er z.B. *argE* aktivieren kann (Timmermann & Tu, 1985). Im isolierten Plasmid ist dieser Promotor in Richtung des *secY*-Gens orientiert, so daß ein Expression des *secY*-Gens von diesem Promotor aus möglich wäre. Außerdem besitzt das IS 3 verschiedene offene Leseraster, von denen der größte für ein Protein von 288 Aminosäuren kodiert (Transposase, Position: 362-1226), ein weiterer 99 Aminosäuren umfaßt (Pos.: 66-365) und ein letzter auf dem komplementären Strang von Position 1240 bis 976 identifiziert wurde und deren Funktion nicht bekannt sind (Timmermann & Tu, 1985).

Die Wachstumskomplementation der *E.coli*-Mutante IQ85 durch pDY3* bzw. pTY3* könnte dadurch erklärt werden, daß beide Inserts Promotoren bzw. promotor-ähnliche Strukturen

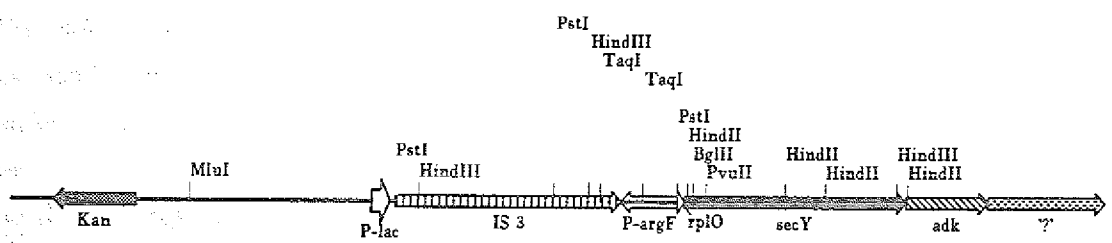
besitzen, die für eine niedrige Expressionsrate des *secY*-Gens von *S.carnosus* oder für die Expression der C-terminale Hälfte des *secY*-Gens von *B.licheniformis* verantwortlich sind. Da vermutet wird, daß eine funktionelle Komplementation durch die heterologen Proteine nur mit einer Proteinmenge stattfindet, die sich unterhalb eines kritischen Werts befindet, könnte die hier gebildete SecY-Menge für eine Komplementation ausreichen. Dies würde auch erklären, warum in diesem Fall eine Komplementation erreicht wurde, die unter Kontrolle des *lac*-Promotors nicht erreicht wurde (s. 3.4.1.). Es besteht die Möglichkeit, daß der ß-Galaktosidase-Promotor nicht so stark reprimiert werden kann, um die erforderliche, möglicherweise sehr niedrigen Konzentrationen an SecY-Protein entstehen zu lassen.

A



pDY3*

B



pTY3*

Abb. 17: Restriktionskarten der Plasmide pDY3* (A) und pTY3* (B). IS10R, Pout, IS3, PargF siehe Text; Plac = *lac*-Promotor; *rplO*, *secY*, *adk* siehe 3.2.1.; Kan = Kanamycin-Resistenzgen

3.5.3. Untersuchungen zur Komplementation des Wachstums und der Translokationsaktivität der "Mutanten-" Plasmide in temperatursensitiven *E.coli*-Mutanten

Es wurde untersucht, ob die C-terminale Hälfte des SecY-Proteins von *B.licheniformis* in der Lage ist, die *E.coli secY24*^{ts}-Mutante zu komplementieren. Wie für die α-Komplementation der ß-Galaktosidase beschrieben, bei der sich das α- und ß-Peptid zu einem enzymatisch aktiven Enzym zusammenfügen, könnte der C-Terminus des *B.licheniformis* SecY-Proteins mit dem SecY-Protein aus *E.coli* zu einer aktiven Form assemblieren und somit den mutierten Teil des *E.coli* SecY-Proteins ersetzen (*secY24*^{ts}-Mutation: Gly239⇒Asp hinter Transmembranbereich 6 im cytoplasmatischen Loop). Eine analoge Komplementation einer temperatursensitiven *E.coli secA*-Mutante durch den N-Terminus des SecA-Proteins von *B.subtilis* wurde von Overhoff et al. (1991) beschrieben. Ein weiteres Beispiel ist die in vivo Expression einer amino- und carboxyterminalen Hälfte der Lactose-Permease und deren Zusammenlagerung zu einem funktionsfähigen Komplex in der Membran (Bibi & Kaback, 1990). Andererseits wäre außerdem eine Stabilisierung des mutierten Teils vom *E.coli* SecY-Protein durch den C-Terminus des *B.licheniformis* SecY-Proteins oder anderer Polypeptide denkbar, die zu einem funktionsfähigen Protein führen.

Um die Komplementationsfähigkeit der N-terminalen und der C-terminalen Hälfte des *B.licheniformis secY*-Gens zu testen, wurden diese mit Hilfe der PCR-Technik aus dem Plasmid pDY3* in den Vektor pBGS18 umkloniert: pDN1 und pDC1. Es wurde entsprechend der Lage und Sequenz des Inserts jeweils das Start- (inkl. potentiellem Promotor pOUT) bzw. Stopsignal aus dem Insert verwendet. Die "rekombinierten", neu konstruierten und ursprünglichen Plasmide wurden in die *E.coli*-Mutanten IQ85 und JM105/3-1 eintransformiert und auf ihr Komplementationsverhalten (Tabelle 8) untersucht.

Tabelle 8: Komplementationsverhalten der E.coli-Mutanten IQ85 und JM105/3-1 nach Transformation mit den Plasmiden pEY2, pDY3, pDY3*, pDN1, pDC1, pTY3 und pTY3*

	pBGS18	pEY2	pDY3	pDY3*	pDN1	pDC1	pTY3	pTY3*
IQ85*	--	+ +	--	+ +	+ +	+ +	--	+ +
JM105/3-1**	--	+ +	--	--	--	--	--	--

* Wachstum auf Minimalmedium E -Platten mit Glukose bei 42°C; ** Wachstum auf Minimalmedium E -Platten mit IPTG bei 42°C (auf Glukose gleiches Verhalten außer pEY2, das hier ebenfalls kein Wachstum zeigt); + + = gutes Wachstum, -- = kein Wachstum

Die ursprünglichen Plasmide, pDY3 und pTY3, bewirkten, wie erwartet, kein Wachstum bei der nicht-permissiven Temperatur in beiden temperatursensitiven Stämmen. Die veränderten Plasmide pDY3* und pTY3* konnten jedoch die Komplementation des Wachstumsdefekts der *E.coli* - Mutante IQ85, aber nicht den der Mutante JM105/3-1 verursachen. Die Plasmide pDN1 und pDC1 mit den beiden Hälften des *secY*-Gens komplementierten ebenfalls den Wachstumsdefekt der Mutante IQ85. Es konnte damit gezeigt werden, daß das Komplementationsverhalten nicht nur auf Sequenzen der Insertionselemente zurückzuführen ist, da diese in den Konstrukten pDN1 und pDC1 nicht mehr enthalten sind. Der N- und C-Terminus des *B.licheniformis*-SecY-Proteins könnte jedoch möglicherweise in den beiden *E.coli*-Stämmen in unterschiedlicher Menge und mit verschiedener Stabilität entstehen, womit das differierende Komplementationsverhalten zu erklären wäre.

In Submerskultur war kein Unterschied im Wachstumsverhalten der IQ85- und JM105/3-1-Kulturen mit den Plasmiden festzustellen. Alle Plasmide mit den Gram-positiven *secY*-Genen verursachten in "rekombinierter" Form, als Hälften und als Original-Sequenzen sowohl bei 30°C als auch bei 42°C in beiden Stämmen ein etwas schlechteres Wachstum als die Stämme mit dem Plasmid pEY2 (*E.coli-secY*).

Auch in den Pulse-Chase-Experimenten, in denen die Komplementation des Translokationsdefekts der Stämme IQ85 und JM105/3-1 durch diese Plasmide untersucht wurden, konnte keinerlei Verbesserung der Prozessierungskinetik von proOmpA im Vergleich zu den Negativkontrollen festgestellt werden (in Abbildung 18 nur Proben von IQ85 dargestellt).

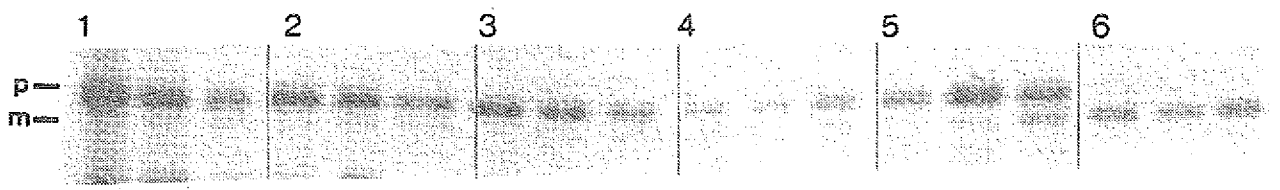


Abb. 18: Prozessierungskinetik von proOmpA in der *E.coli*-Mutante IQ85 mit den Plasmiden pDY3* (1), pDN1 (2), pDC1 (3), pTY3* (4), pBGS18 (5) und pEY2 (6); Kulturen zwei Stunden mit Glukose bei 42°C angezogen; Proben zu 0, 1 und 5 min Chasezeit. p = proOmpA; m = OmpA.

Da mit allen Plasmiden keine Komplementation der Translokationsaktivität beider Mutanten gezeigt werden konnte und auch eine Wachstumskomplementation nur im *E.coli*-Stamm IQ85 zu

beobachten war, wird der genetische Hintergrund des Stammes IQ85 für das Verhalten der Plasmide verantwortlich gemacht. Dieser Stamm ist durch NMG-Mutagenese hergestellt worden (Shiba et al., 1984) und scheint neben der *secY24*^{ts}-Mutation noch weitere, nicht untersuchte Veränderungen zu besitzen, die sich auf das Wachstumsverhalten in Anwesenheit der Plasmide pDY3*, pDN1, pDC1* und pTY3* auswirken.

3.6. Analyse von Mutationen im SecY-Protein von *E.coli*

3.6.1 Herstellung von Mutationen im *secY*-Gen von *E.coli* mit Hilfe einer ortspezifischen Oligomutagenese

Um Informationen über die Bedeutung einzelner Aminosäuren bei der Funktion von SecY zu erhalten, wurde eine ortspezifische Oligomutagenese durchgeführt. Dazu wurden konservierte Bereiche der SecY-Proteine im Alignment aller bisher bekannten SecY-Proteine ausgewählt, die möglicherweise für die Struktur des SecY-Proteins und/oder die Katalyse des Proteintransports oder für die Wechselwirkung mit anderen Komponenten des Sekretionsapparates von Bedeutung sind.

Da nicht bekannt ist, welche Aminosäuren für die o.g. Funktion von Bedeutung sind, wurden aus diesen konservierten Segmenten polare Aminosäuren ausgewählt, die aufgrund ihrer reaktiven funktionellen Gruppen in der Lage sind, Wechselwirkungen z.B. beim Protonenantiport einzugehen. Es wurden dann Oligonukleotide hergestellt, die folgende Aminosäureaustausche zur Folge hatten.

1. Zwischen Transmembransegment 4 (TMS 4) und Transmembransegment 5 (TMS 5) wurde die Glutaminsäure E 176 (negative Ladung) gegen Asparagin (N, neutral) und Arginin (R, positive Lad.) ausgetauscht:

TMS 4 TMS 5

....VTGTMFLMWLGEQITERIGNGISIIIF ....

⇓

N, R

2. Im Transmembransegment 5 (TMS 5) wurde die aromatische Aminosäure Phenylalanin F 192 durch die Aminosäure Alanin (Methylgruppe) ersetzt.

TMS 5

....ERGIGNGISIIIFAGIVAGLPAI....

⇓

A

3. Im Transmembransegment 8 (TMS 8) wurde die Hydroxylgruppe der aromatischen Aminosäure Tyrosin Y332 entfernt, indem Phenylalanin eingebaut wurde

TMS 8

....QPLYVLLYASAIIFFCFFYTALVFNP....

⇓

F

Nach erfolgter Oligomutagenese wurde durch Sequenzierung der mutagenisierten Bereiche die Anwesenheit der Mutation bestätigt (Abbildung 19).

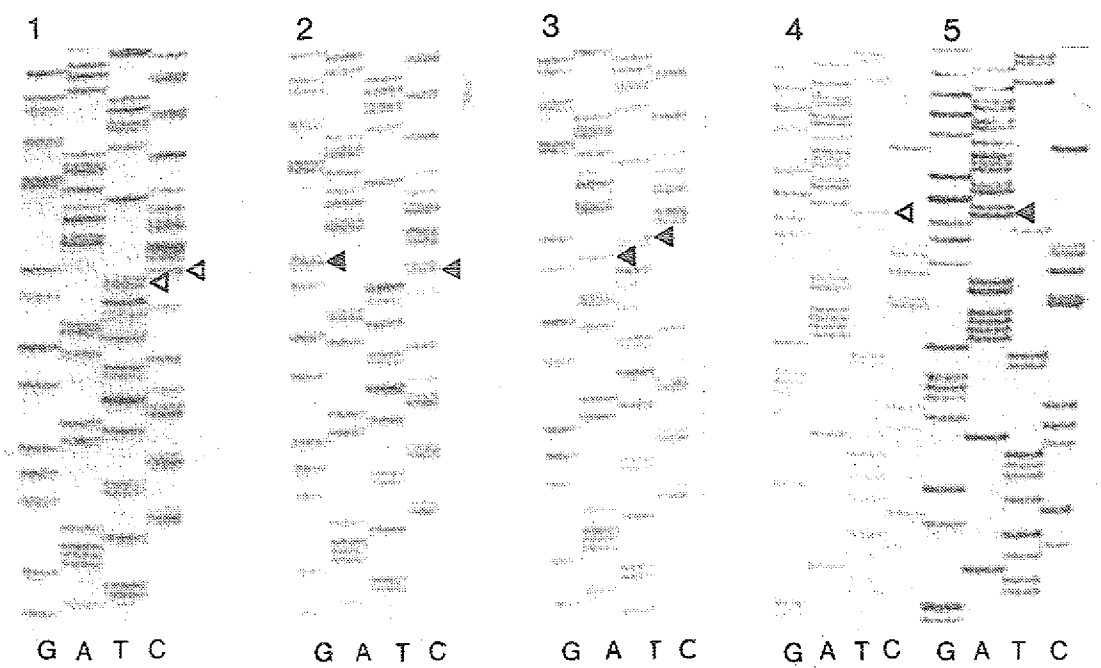


Abb. 19: Autoradiographien von DNS-Sequenzen der mutagenisierten Bereiche im *E.coli-secY*. Im linken Teil: neben Original-Sequenz von *secY* (1) Austausche E 176: N (2) und R (3). Im rechten Teil: neben Original-Sequenz von *secY* (4) Austausch Y 332: F (5). Austausche (auch in Original-Sequenz) mit Pfeil markiert.

3.6.2. Untersuchungen zur Funktionalität der mutierten *secY*-Gene

Die mutierten *secY*-Gene wurden in die *E.coli*-Stämme IQ85 und JM105/3-1 transformiert und auf Minimalmedium-Platten bei permissiver (30°C) und nicht-permissiver (42°C) Temperatur inkubiert. In beiden Stämmen wurde kein Unterschied im Komplementationsverhalten der verschiedenen mutierten Gene von dem des Wildtyp-*secY*-Gens festgestellt.
Im Pulse-Chase-Experiment konnte ebenfalls keine Veränderung der Prozessierungskinetik von proOmpA gegenüber der Kinetik, die das Wildtyp-*secY* in den Mutanten bewirkt, festgestellt werden (Abbildung 20).

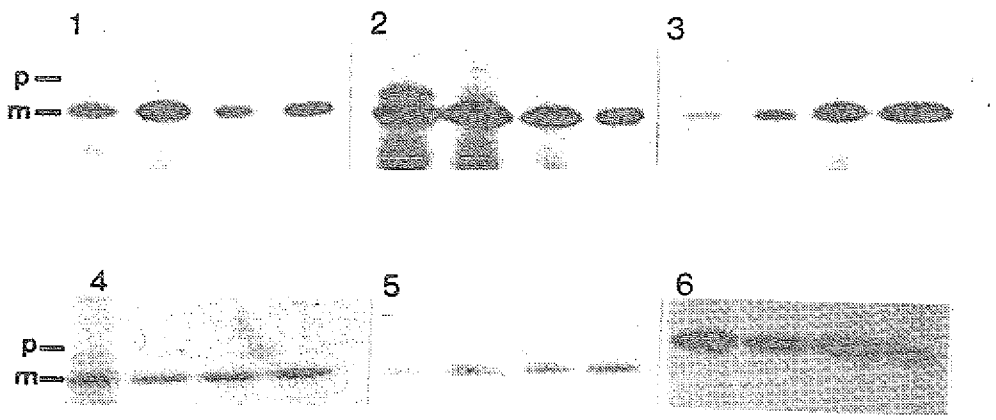


Abb. 20: Pulse-Chase-Experiment: Untersuchung der Prozessierungskinetik von proOmpA in dem *E.coli*-Stamm JM105/3-1 mit den Plasmiden, die die mutierten *secY*-Gene tragen. 1: E 176 ⇒ R, 2: E 176 ⇒ N, 3: F 192 ⇒ A, 4: Y 332 ⇒ F, 5: Wildtyp-*secY* auf Plasmid pKY3 und 6: Vektor pNO1575 als Negativkontrolle. p = proOmpA, m = OmpA.

Die untersuchten Aminosäureaustausche E 176 ⇒ R, E 176 ⇒ N, F 192 ⇒ A sowie Y 332 ⇒ F verursachten somit keine Funktionsbeeinträchtigung oder -änderung des SecY-Proteins und scheinen daher trotz der hohen Konservierung in den verschiedenen SecY-Proteinen keine essentielle Rolle bei der Funktion von SecY während der Proteintranslokation zu spielen.

4. DISKUSSION

4.1. Untersuchung der *secY*-Gene aus *B.licheniformis* und *S.carnosus*

4.1.1. Isolierung und Sequenzanalyse der *secY*-Gene aus *B.licheniformis* und *S.carnosus*

Ein Ziel der Arbeit war die Isolierung der Gene des SecY-Proteins, einem der Hauptbestandteile des Translokationsapparats, aus den Gram-positiven Bakterienstämmen *Bacillus licheniformis* DSM13 und P300 sowie *Staphylococcus carnosus* TM300. Mit Hilfe des *secY*-Gens aus *B.subtilis* konnten durch die Methode der DNS-DNS-Hybridisierung die *secY*-Gene von den *B.licheniformis*-Stämmen sowie von *S.carnosus* isoliert werden. Die beiden *B.licheniformis secY*-Gene liegen jeweils auf einem 4,1kb großen EcoRI-Fragment und das *S.carnosus secY* auf einem 2,9kb großen EcoRI-Fragment. Die Sequenz der beiden *B.licheniformis*-Gene stimmt bis auf zwei Nukleotide überein, was jedoch in der Aminosäureabfolge des SecY-Proteins keinen Austausch zur Folge hat. Ein Vergleich der beiden Gene wurde durchgeführt, da der *B.licheniformis*-Stamm P300 ein Industriestamm ist, der die alkalische Protease Subtilisin im Vergleich zum Wildtyp-Stamm DSM13 überproduziert. Dieser Überproduktion liegt u.a. eine Promotor-up-Mutation zugrunde, d.h. es wird verstärkt Subtilisin gebildet (persönliche Mitteilung, Henkel KGaA). Da industrielle Produktionsstämme durch mehrfache Zyklen von Mutagenese und Screening isoliert werden, wäre zusätzlich auch vorstellbar, daß die erhöhte Produktivität auf einer Mutation im entsprechenden SecY-Protein beruht. Um diese Möglichkeit zu testen, wurden die SecY-Sequenzen der beiden *B.licheniformis*-Stämme DSM13 und P300 miteinander verglichen. Eine Beteiligung des SecY-Proteins an der Überproduktion des Subtilisins durch den Produktionsstamm P300 ist jedoch nicht ganz auszuschließen. Die Austausche könnten z.B. die Stabilität der mRNS und somit die SecY-Proteinmenge beeinflußen (Kennell, 1986).

Vor und hinter den *secY*-Genen befinden sich weitere ansequenzierte offene Leseraster. Vor den *secY*-Genen liegt in beiden Organismen das Gen *rplO*, das für das ribosomale Protein L15 kodiert. Hinter dem *secY*-Gen wurde in beiden Fällen das Gen *adk* der Adenylatkinase identifiziert. Die Anordnung der Gene in den untersuchten Stämmen entspricht damit der Anordnung bei *B.subtilis* und weiteren Gram-positiven Organismen wie *Micrococcus luteus* oder *Lactococcus lactis* (Ohama et al., 1989; Koivula et al., 1991). In *E.coli* ist vor dem *secY*-Gen ebenfalls das *rplO*-Gen lokalisiert (Cerretti et al., 1983). Hinter dem *secY*-Gen liegt hier jedoch ein Gen für ein weiteres ribosomales Protein, das L36 (Ito, 1990). Die *secY*-Gene von *B.licheniformis* und *S.carnosus* liegen wie bei *B.subtilis* und *E.coli* im ribosomalen *spc*-Operon, dessen Gene von einem vor dem Beginn des Operons gelegenen Promotor abgelesen werden (Suh et al., 1990; Cerretti et al., 1983). Da direkt vor den *secY*-Genen von *B.licheniformis* und *S.carnosus* keine potentiellen Promotorstrukturen identifiziert werden konnten, erfolgt die Transkription dieser *secY*-Gene sehr

wahrscheinlich ebenfalls vom Promotor des *spc*-Operons. Weiterhin werden die beiden *secY*-Gene, wie für *E.coli* gezeigt, vermutlich translationsgekoppelt mit dem davor liegenden Gen exprimiert (Akiyama & Ito, 1985). Hierfür spricht der Befund, daß in *B.licheniformis* zwischen den beiden Genen nur ein Basenpaar liegt und in *S.carnosus* sogar eine Überlappung der kodierenden Sequenzen von *rplO* und *secY* vorliegt. In *E.coli* wurde die Translationskopplung der beiden durch 7bp getrennten Gene dadurch gezeigt, daß eine 'amber'-Mutation im Gen *rplO* (ts215) durch einen polaren Effekt eine reduzierte Expression des *secY*-Gens verursacht (Ito et al., 1984; Akiyama & Ito, 1985). Zudem wird *secY* in *E.coli* mit einer niedrigeren Rate exprimiert als die ribosomalen Proteine, was jedoch auf einen uneffizienten Start der Translation und/oder eine Instabilität der mRNS zurückgeführt wird (Ueguchi et al., 1989).

4.1.2. Untersuchung der Aminosäuresequenz und Vergleich mit bekannten SecY-Proteinen

Die 431 Aminosäuren umfassende Proteinsequenz des *B.licheniformis* SecY weist 84% identische Aminosäuren mit dem *B.subtilis* SecY auf. Das 430 Aminosäuren große *S.carnosus* SecY besitzt 59% gleiche Aminosäuren mit dem homologen *B.subtilis* Protein. Der Prozentsatz identischer Aminosäuren im Vergleich mit dem SecY-Protein von *E.coli* und anderen bekannten SecY-Proteinen, darunter zwei SecY aus Archaebakterien, liegt zwischen 40 und 20%. Werden alle Austausche von Aminosäuren mit gleichen chemischen Eigenschaften in die Betrachtung mit einbezogen, dann werden Sequenzhomologien von mehr als 50% erhalten. Daraus erkennt man, daß alle bisher bekannten SecY-Proteine einen hohen Grad an Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz besitzen, der möglicherweise Rückschlüsse auf die Bereiche des Proteins zuläßt, die für Struktur, Wechselwirkung mit anderen Sec-Proteinen und die Funktion von Bedeutung sind.

Diese Ähnlichkeit konnte auch mit Hilfe einer Hydrophobizitätsvorhersage gezeigt werden. Die *B.licheniformis* und *S.carnosus* SecY-Proteine besitzen, wie das *E.coli* SecY, zehn hydrophobe Segmente. Akiyama & Ito (1987, 1989) konnten durch Analyse einer größeren Anzahl von Fusionsproteinen (SecY-LacZ und SecY-PhoA) beweisen, daß diese Segmente, die sich aus der Hydrophobizitätsanalyse nach Kyte & Doolittle (1982) als Transmembranbereiche ergeben, tatsächlich den Bereichen entsprechen, mit denen das *E.coli* SecY in die Membran integriert ist. Außerdem wurde die Sequenz des SecY-Proteins aus *B.subtilis* (Suh et al.,1990; Nakamura et al.,1990), aus Bacillus sp. C125 (Kang et al.,1992), aus *Methanococcus vannielii* (Auer et al., 1991), aus *Cryptomonas* ϕ (Douglas, 1992) und aus *Haloarcula marismortui* (Arndt, 1992) ebenfalls der Hydrophobizitätsanalyse unterzogen. In allen Proteinen dieser Gram-positiven Bakterien, Archaebakterien und Plastiden wurden zehn hydrophobe Bereiche als potentielle Transmembranregionen identifiziert. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß die beiden Gram-

positiven SecY-Proteine ebenfalls mit zehn Transmembransegmenten in der Cytoplasmamembran verankert sind (Abbildung 21).

Der Vergleich der bekannten SecY-Proteinsequenzen zeigt weiterhin, daß bestimmte Bereiche des Proteins eine besonders hohe Homologie aufweisen. Diese Bereiche entsprechen den Transmembransegmenten 2, 5, 9 und 10 sowie den hydrophilen Bereichen, die die Transmembransegmente 4 und 5 sowie 8 und 9 miteinander verbinden. Besonders auffällig ist die besonders starke Konservierung der Aminosäurezusammensetzung der Membran-durchspannenden Domänen 2 und 5. Diese beiden Bereiche haben darüber hinaus auch eine signifikante Ähnlichkeit zu den entsprechenden Transmembranbereichen der bei Hefe und Säugern vorkommenden Sec61-Proteine (Stirling et al., 1989; Görlich et al., 1992). Die Tatsache, daß die am meisten konservierten Bereiche in Proteinsegmenten gefunden wurden, die nach dem Topologiemodell von *E.coli* entweder in der Membran stecken oder auf der cytoplasmatischen Seite exponiert sind, korreliert mit der grundlegenden Funktionen des Translokators, dessen Hauptbestandteil SecY bzw. Sec61 sind. Diese umfaßt die Erkennung der Signalsequenz der Exportproteine (Emr et al., 1981; Sako & Iino, 1988) und deren Transfer durch die Membran (Ito, 1984). Dazu wird die Wechselwirkung mit anderen Komponenten der Translokationsmaschinerie in der Zelle benötigt. Darunter versteht man die bei *E.coli* bekannte Wechselwirkung mit dem SecE und dem Bande1-Protein (Brundage et al., 1990; Bieker & Silhavy, 1990; Bieker-Brady & Silhavy, 1992) sowie dem SecA-Protein als peripheren Teil des Translokators (Fandl et al., 1988; Hartl et al., 1990) und eventuell bislang noch unbekannten Faktoren. An diesen Funktionen sind möglicherweise die konservierten Bereiche des SecY-Proteins beteiligt.
Mit Ausnahme der *secY100*-Mutation (Ito et al., 1989) betreffen alle bisher bekannten *secY/prlA*-Mutationen keine der strikt konservierten Aminosäuren. Dies könnte darauf hinweisen, daß die konservierten Aminosäuren strukturell und funktionell wichtige Aminosäuren sind. Mutationen dieser Aminosäuren konnten wohl deshalb nicht isoliert werden, weil der damit möglicherweise verbundene vollständige Verlust der SecY-Funktion aufgrund der essentiellen Bedeutung der SecY-Aktivität (Ito et al., 1983; Nishiyama et al., 1991) zum Tod der Zellen führen würde.

4.1.3. Nachweis der Expression von *B.licheniformis* SecY in *E.coli*

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der *B.licheniformis* und *S.carnosus* SecY-Proteine in temperatursensitiven SecY-Mutanten von *Escherichia coli*. Dazu wurde zuerst die Expression der Gram-positiven SecY-Proteine ausgehend vom *lac*-Promotor in *E.coli* nachgewiesen. Über den Nachweis von *E.coli*-SecY war bekannt, daß er schwierig zu führen ist, weil SecY in relativ kleinen Mengen in der Zelle gebildet wird und es aufgrund seiner

starken Hydrophobizität ein verändertes Laufverhalten im SDS-Gel zeigt (Ito, 1984). Nach vergeblichen Versuchen wurde 1984 von Ito im Maxizell-System mit einer Konstruktion, in der das *secY*-Gen mit den drei davor liegenden ribosomalen Genen unter der Kontrolle eines starken Promotors (Phage λ pL-Promotor) liegt, erstmals die Synthese von SecY nachgewiesen. Das so überproduzierte SecY-Protein ist sehr instabil. Die Instabilität ist auf das Fehlen von SecE zurückzuführen, mit dem SecY in der Membran wechselwirkt (Matsuyama et al., 1990). Deshalb wurde von Suh et al. (1990) die Expression des *secY*-Gens von *B.subtilis* durch eine Fusion der ersten 13 Kodons des *secY*-Gens vor das *lacZ*-Gen untersucht. Die Bildung des SecY-ß-Galaktosidase-Fusionsproteins wurde durch Messung der ß-Galaktosidase-Aktiviät nachgewiesen. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression des *B.licheniformis*-SecY-Proteins in *E.coli* mit Hilfe von Fusionsproteinen untersucht.

Ein SecY-PhoA (alkalische Phosphatase) -Fusionsprotein, das durch die Transposition des Transposons Tnp*hoA* in das *secY*-Gen von *B.licheniformis* entstand, enthielt den N-Terminus des SecY-Proteins einschließlich des ersten Transmembransegments, an welchen die alkalische Phosphatase anfusioniert war. Durch die beobachtete Aktivität der alkalischen Phosphatase, die nur auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran enzymatische Aktivität besitzt (Manoil & Beckwith, 1985), konnte einerseits die Expression des Fusionsproteins, aber auch dessen Insertion in die Membran nachgewiesen werden. Der erste Transmembranbereich wirkt dabei als Signalsequenz für die alkalische Phosphatase (Calamia & Manoil, 1992). Die hier gefundene Orientierung des ersten Transmembransegments steht im Einklang mit dem Ergebnis der Hydrophobizitätsanalyse. Diese zeigt, daß das *B.licheniformis* SecY zehn hydrophobe Domänen besitzt, die analog dem Topologiemodell von Akiyama & Ito (1987), als zehn Transmembranbereiche interpretiert werden. Durch diese ist das SecY-Protein in die Membran integriert, wobei der N- und der C-Terminus cytoplasmatisch orientiert sind.

Der C-Terminus des *B.licheniformis* SecYs wurde als Fusionspunkt für ein Hybridprotein aus einem um zwölf Aminosäuren verkürzten SecY und der cytoplasmatischen ß-Galaktosidase ausgewählt, deren Aktivität im Plattentest nachgewiesen werden konnte. Im Western-Blot wurde sichtbar, daß das Fusionsprotein in den *E.coli*-Stämmen JM109 und MC1061 gebildet wurde, jedoch vermutlich eine Abspaltung des ß-Galaktosidase-Anteils vom Fusionsprotein in großem Umfang stattfindet. Das Hybridprotein könnte sich an zwei verschiedenen Orten in der Zelle befinden. Der SecY-Teil könnte in die Membran eingebaut worden sein, an dessen Carboxyterminus die ß-Galaktosidase in korrekter Faltung und mit der Möglichkeit zu tetramerisieren ins Cytoplasma hineinragt. Andererseits könnte das Fusionsprotein im Cytoplasma liegen bleiben, so daß die Anteile des SecY-Proteins und der ß-Galaktosidase unabhängig voneinander falten. In beiden Fällen könnte ein besonders exponierter Bereich zwischen zwei gefalteten Proteindomänen entstehen, der von einer Protease leicht gespalten werden kann. Um

das Fusionsprotein zu stabilisieren, wurden aus der Vielzahl von Protease-defizienten Stämmen die Lon- bzw. OmpT-Protease-negativen *E.coli*-Stämme Y1089 und BL21 ausgewählt, in die das Hybridgen transformiert wurde. Der OmpT-Protease-defiziente Stamm wurde vor allem deshalb ausgesucht, weil im *E.coli*-SecY eine OmpT-Protease-Schnittstelle nachgewiesen werden konnte und es Hinweise auf weitere Konsensus-OmpT-Schnittstellen im SecY-Protein gibt (Akiyama & Ito, 1990), die im Fusionsprotein gegebenenfalls geschnitten werden könnten. Obwohl sich das Verhältnis von Fusionsprotein (ca. 1% des mit ß-Galaktosidase-Antikörpern detektierbaren Proteins) zu ß-Galaktosidase in den Protease-defizienten Stämmen nur wenig zugunsten des Fusionsproteins (3-5%) verschob, konnte durch den Nachweis des Fusionsproteins gezeigt werden, daß das *B.licheniformis*-SecY in *E.coli* exprimiert werden kann. Eine Überproduktion des *B.licheniformis* SecY-Proteins ist jedoch offensichtlich in Analogie zum reinen *E.coli*-SecY jedoch als ß-Galaktosidase-Fusionsprotein nicht möglich (Matsuyama et al., 1992). Andererseits konnte kürzlich eine Überproduktion des *E.coli* SecY-Proteins durch die Fusion an ein verkürztes SecA-Protein (SecA-C95*) nachgewiesen werden (Matsuyama et al., 1992), bei der das Fusionsprotein in Form von Einschlußkörpern (inclusion bodies) in der Zelle aggregiert. Es wird angenommen, daß das SecA-C95* aufgrund seiner starken Hydrophobizität das SecY-Protein effektiver als die ß-Galaktosidase schützt. Aufgrund der Tatsache, daß das SecA-C95* vor SecY fusioniert wurde, wird die Integration des Fusionsproteins in die Cytoplasmamembran verhindert (Matsuyama et al., 1992). Diese Überproduktion erfolgt, anders als die Überproduktion des nicht fusionierten, in die Membran integrierenden *E.coli* SecY-Proteins, SecE-unabhängig. Die Abhängigkeit von SecE wird mit der Komplexbildung von SecY und SecE in der Cytoplasmamembran erklärt, so daß beide Komponenten gleichzeitig überproduziert werden müssen, um stabil zu sein (Matsuyama et al., 1990). Die beobachtete Instabilität der SecY-LacZ-Fusion ist somit sehr wahrscheinlich auf die Instabilität des in die Membran eingelagerten SecY-Teils zurückzuführen.

4.1.4. Untersuchungen zur Komplementation der Wachstums- und Translokationsdefekte von *E.coli secY*-Mutanten

Die *secY*-Gene von *B.licheniformis* und *S.carnosus* wurden zur funktionellen Charakterisierung in den temperatursensitiven *E.coli-Stämmen* (*secY24*^{ts}) IQ85 und JM105/3-1 untersucht. Es wurde die Komplementationsfähigkeit der *secY*-Gene in Bezug auf das Wachstumsverhalten und die Translokationsfähigkeit untersucht.

Obwohl verschiedene Plasmide mit unterschiedlicher Kopienzahl und verschiedenen Promotoren zur Expression der Gene verwendet wurden, konnten die Gram-positiven SecY-Proteine von *B.licheniformis* und *S.carnosus* einschließlich des *B.subtilis*-SecYs das Wachstum der *E.coli*-Mutanten nicht komplementieren. Dies steht in Einklang mit Untersuchungen von Suh et al. (1990) und Nakamura et al. (1990), die ebenfalls keine Wachstumskomplementation der

temperaturempfindlichen *E.coli*-Stämme IQ85 und KI297 (*secY24*^{ts}) durch das *sec*Y-Gen von *B.subtilis* beobachten konnten. Von Auer et al. (1991) wurde jedoch gezeigt, daß das SecY aus dem Archaebakterium *Methanococcus vannielii* das Wachstum der temperatursensitiven *E.coli*-Mutante IQ292 (*secY24ts*, *lacI*^{q}) wiederherstellt. Das *Methanococcus secY* ist zwar mit dem *spc*-Operon assoziiert und das SecY-Protein besitzt nur 20,1% identische Aminosäuren mit dem *E.coli*-SecY, wird aber separat transkribiert. Dieser Unterschied in der Transkriptionskontrolle ist wahrscheinlich für das Komplementationsverhalten von entscheidender Bedeutung. Für die nicht zu erzielende Komplementation durch die *B.subtilis*, *B.licheniformis* und *S.carnosus* Proteine kann daher die Expressionsrate von Gram-positiven SecY-Proteinen in *E.coli* der entscheidende Faktor sein. Darüber hinaus können aber auch Bereiche der Proteine, in denen sich die Gram-positiven SecY-Proteine von denen der Gram-negativen und Archaebakterien unterscheiden, von ausschlaggebender Bedeutung sein. So zeigte es sich sogar, daß die Gram-positiven *secY*-Gene, vor allem das *B.subtilis secY*, das Wachstum der *E.coli*-Mutanten in Submerskultur bei der permissiven Temperatur verlangsamten. Dies steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung von Suh et al. (1990) und Nakamura et al. (1990), die ebenfalls eine Wachstumshemmung durch das *B.subtilis secY* auf den *E.coli*-Wildtyp (IQ86 bzw. KI298) feststellten. Das *E.coli-secY* bewirkte eine verstärktes Wachstum der *E.coli*-Mutanten bei permissiver und nicht-permissiver Temperatur, d.h. eine verstärkte Produktion von homologem SecY beeinflußt das Wachstumsverhalten von *E.coli* nicht negativ. Somit beeinträchtigt nur die Anwesenheit eines Gram-positiven SecY-Proteins die Proteintranslokation, so daß sich ein verlangsamtes Wachstum einstellt. Dies ist möglicherweise auf unproduktive Wechselwirkungen der Gram-positiven SecY-Proteine mit SecA, SecE oder anderen Faktoren des Gram-negativen Exportapparates zurückzuführen. Aufgrund von inkompatiblen Proteindomänen und/oder abweichenden Aktivitäten könnten diese Faktoren aus dem normalen Translokationsweg abgezogen werden und stünden dann für die Wechselwirkung mit dem *E.coli*-SecY nicht mehr zur Verfügung. Eine verlangsamte Proteintranslokation würde dann zu einer geringeren Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen führen.

In den Pulse-Chase-Experimenten zeigte sich in beiden *E.coli*-Mutanten ebenfalls der negative Einfluß der Gram-positiven *secY*-Gene. Hier konnte eine verlangsamte Prozessierungskinetik des Indikatorproteins proOmpA bei der permissiven Temperatur beobachtet werden. Dies ist ein indirekter Hinweis auf die Expression der Gram-positiven *secY*-Gene in *E.coli* und weist ebenfalls auf die o.g. Interferenz zwischen den Gram-positiven Genen und dem Proteinexport in der *E.coli*-Zelle hin. Temperatursensitive Mutanten reagieren sehr viel empfindlicher auf die Anwesenheit des heterologen SecY-Proteins als der *E.coli* -Wildtyp JM109, bei dem keine Interferenz festgestellt wurde. Dieser Unterschied im Einfluß auf die Physiologie des *E.coli*-Wildtyps im Vergleich zu den Mutanten ist wohl auf eine generell erhöhte Empfindlichkeit der *secY24*-Mutanten zurückzuführen. Ein weiterer Beleg für diese Empfindlichkeit der *secY24*^{ts}-Mutanten ist

die Hypersensitivität bei der permissiven Temperatur gegen Überproduktion von Exportproteinen wie z.B. ß-Lactamase (Ito et al., 1989).

Eine Komplementation des Translokationsdefekts von *E.coli secY24*-Mutanten konnte bei der nicht-permissiven Temperatur durch die SecY-Proteine von *B.licheniformis* und *S.carnosus* nicht nachgewiesen werden. Auch das *B.subtilis*-SecY konnte unter den getesteten Bedingungen keine Komplementation des Translokationsdefekts bewirken. Dies steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Suh et al. (1990), die ebenfalls eine Komplementation des Wachstums- und Translokationsdefektes einer *E.coli-secY24*^{ts}-Mutante mit dem *B.subtilis secY*-Gen nicht nachweisen konnten. Im Gegensatz dazu wurde von Nakamura et al. (1990) gezeigt, daß das *B.subtilis* SecY unter bestimmten Bedingungen die Translokationsfähigkeit einer temperatursensitiven *E.coli secY*- Mutante wiederherstellen kann. D.h. das *B.subtilis*-SecY ist in *E.coli* aktiv, muß allerdings in seiner Konzentration vermutlich so eingestellt werden, daß einer Interferenz vorgebeugt wird. Das in dieser Untersuchung von Nakamura et al. (1990) verwendete *secY*-Gen beginnt mit einem ATG-Startkodon (Start 2, Nakamura et al., 1990), das neun Aminosäuren hinter dem von Suh et al. (1990) vorgeschlagenen TTG-Startkodon (Start 1) liegt:

```
....L15: E   V   I   - SecY:M   F⇓ K   T   I   S   N   F   M   R   V .....
.........GAG GTG ATC TAA C TTG TTT AAA ACA ATC TCC AAC TTT ATG CGT GTG .....
          RBS 1                Start 1     RBS 2                Start 2
```

Darstellung der Protein- (oben) und DNS-Sequenz (unten) des secY-Gens aus B.subtilis unter Berücksichtigung der Interpretation von Suh et al. (1990) und Nakamura et al. (1990)

Vor dem ATG befindet sich jedoch eine schlechte Konsensus-Ribosomenbindungsstelle (RBS 2). Es ist daher wahrscheinlich, daß das TTG (Start1) als Startkodon verwendet wird, dem eine gute Konsensus-Ribosomenbindungsstelle (RBS 1) vorgelagert ist. Dieses TTG-Startkodon ist in einem der beiden von Nakamura et al. verwendeten Plasmide nicht vorhanden, sondern das *secY*-Gen wurde so in ein Plasmid einkloniert, daß eine Fusion zwischen dem *lacZ'*-Gen bis zum Stopkodon des *secY*-Gens entsteht (Fusionspunkt ist in obenstehender Darstellung mit Pfeil markiert), dem die ersten beiden Aminosäuren laut der Interpretation von Suh et al. (1990) fehlen. Damit ist die Transkription und auch die Translation des *B.subtilis secY*-Gens abhängig von der des *E.coli lacZ'*-Gens. Dieses unterliegt der Kontrolle des eigenen *(lac-)* Promotors und der entsprechenden Ribosomenbindungsstelle des *lacZ*-Gens. Entsprechend ist eine für *E.coli* optimale Kontrollmöglichkeit vorhanden, die es ermöglicht, Proteinsyntheseraten sehr gut zu kontrollieren. Nakamura et al. (1990) erhielten wahrscheinlich mit diesen Konstrukten die für eine Komplementation des Translokationsdefekts der *E.coli*-Mutante benötigte Menge Gram-positiven SecY-Proteins. Diese SecY-Proteinmenge reicht wohl aus, daß einerseits genügend *B.subtilis*

SecY für die Komplementation des Translokationsdefekts der *E.coli*-Mutante vorhanden ist, andererseits jedoch ist die Proteinmenge anscheinend zu gering um einen negativen Effekt auf die Proteintranslokation ausüben zu können. Die vorhandene Inkompatibilität wird sich vermutlich erst dann auswirken, wenn eine bestimmte Menge an essentiellen Faktoren (z.B. SecA, SecE) durch die Gram-positiven SecY-Proteine aus dem Exportapparat der Gram-negativen Zelle entzogen werden. Zudem sind auch prinzipielle Unterschiede in den SecY-Proteinen der verschiedenen Organismen denkbar, die die Substratspezifität oder andere noch unbekannte Aspekte ihrer Funktion betreffen können.

Eine analoge Situation wurde auch bei Untersuchungen des *B.subtilis* SecA-Proteins gefunden. So konnten Takamatsu et al. (1992) die *E.coli secA*-Mutante MM52 unter induzierenden Bedingungen (1mM IPTG) nicht mit dem *B.subtilis secA*-Gen komplementieren. Klose et al. (1993) wiesen jedoch eine Komplementation des Wachstums- und Translokationsdefekts verschiedener *E.coli secA*-Mutanten mit dem *B.subtilis secA* nach, indem sie eine Expression des *secA*-Gens unter reprimierenden Bedingungen (0,5% Glukose) wählten. Es lag in diesen Untersuchungen wahrscheinlich eine so geringe SecA-Proteinmenge in der Zelle vor, daß sich eine Inkompatibilität der heterologen Proteine nicht auswirken konnte. Die von Klose et al. (1993) angegebenen Bedingungen wurden auch in dieser Arbeit verwendet, konnten jedoch im Fall der *secY*-Komplementation kein analoges Verhalten verursachen. Außerdem ist auch von Sakaguchi et al. (1991) eine Komplementation der *E.coli*-Mutante IQ85 durch ein kleines (65 Aminosäuren), amphiphiles Peptid, Ysy6, aus der Hefe *Saccharomyes cerevisiae* nachgewiesen worden. Dieses Ysy6-Protein konnte jedoch nur zur Komplementation führen, wenn es mit niedriger Kopienzahl exprimiert wurde.

Die Proteinmenge der Gram-positiven SecY-Proteine ist mit den vorgenommen Konstruktionen, die keine *lacZ'*-Fusionen enthalten, scheinbar nicht so einzustellen, daß die Translokationsaktivität der *E.coli*-Mutanten durch die Gram-positiven SecY-Proteine wiederhergestellt werden kann.

Aber auch das *E.coli* SecY kann eine *B.subtilis secY*-Mutante nicht komplementieren (Breitling, persönliche Mitteilung). Die *secY*-Gene von *B.licheniformis* und *S.carnosus* sind jedoch in der Lage, eine *B.subtilis-secY*-Mutante zu komplementieren (Breitling, persönliche Mitteilung), was wiederum für eine Inkompatibilität zwischen den Gram-positiven und Gram-negativen Proteinen spricht.

Ebenso konnte keine Wiederherstellung der Translokationsfähigkeit der *E.coli*-Mutante bei Verwendung eines Gram-positiven Exportproteins, der *S.hyicus* Lipase, unter den getesteten Bedingungen beobachtet werden. Ein Gram-positiver Proteinvorläufer wurde entsprechend der Funktion des SecY-Proteins, die u.a. die Erkennung des Signalpeptids des sekretorischen Proteins umfasst, eingesetzt. Da es gravierende Unterschiede in der Länge und der Ladungsverteilung von Gram-positiven und -negativen Signalpeptiden gibt (von Heijne & Abrahamsén, 1989), wäre es

denkbar, daß mit Hilfe eines Gram-positiven Exportproteins die Funktion des Gram-positiven SecY-Proteins in *E.coli* nachgewiesen werden könnte. Dies war jedoch nicht der Fall, so daß wohl allgemein ein Unterschied der SecY-Proteine z.B. in der Wechselwirkung mit anderen zellulären Komponenten (z.B. SecE, SecA) oder in anderen wichtigen, noch unbekannten Aspekten ihrer Funktion besteht, zumal eine Prozessierung der Gram-positiven Präprolipase im *E.coli*-Wildtyp beobachtet werden kann (J.Meens, E.Frings; persönliche Mitteilung).

4.1.5. Komplementation des Wachstumsdefekts der *E.coli* Mutante IQ85

Durch Selektion auf Komplementation des Wachstumsdefektes des *E.coli*-Stammes IQ85 konnten zwei DNS-Fragmente als Insertionen in dem *B.licheniformis*- und vor dem *S.carnosus-secY*-Gen isoliert werden, die beide je ein Insertionselement enthalten. Dies sind die IS-Elemente 3 und 10, die neben dem Gen für die Transposase über verschiedene, unterschiedlich große, offene Leseraster verfügen, die Polypeptide von mehr als 30 Aminosäuren kodieren (Halling et al., 1982; Timmermann & Tu, 1985). Zusätzlich lag noch der Promotorbereich des *argF*-Gens am 3'-Ende des IS-Elements 3, das wahrscheinlich beim Springen des IS-Elements mitgenommen wurde. Ein möglicher Wirkungsort der nicht näher bekannten, auf den IS-Elementen kodierten Polypeptide wäre z.B. der Proteinsyntheseapparat der Zelle, wie dies auch für verschiedene Suppressoren der *secY*- und *secA*-Mutation beschrieben wurden und die den Wachstumsdefekt dieser Stämme unterdrücken können (*ssa* für *secA* bzw. *ssy* für *secY*). Diese Suppressormutanten betreffen Komponenten des Proteinbiosynthese-Apparates wie z.B. Aminoacyl-tRNS Synthetasen, tRNS-Moleküle, Translations-Initiationsfaktoren, ribosomale Proteine (S1, S15) (Shiba et al., 1984; Shiba et al., 1986 a,b; Taura et al., 1992). Die Wirkungsweise dieser meist kältesensitiven Suppressoren beruht auf einer Reduktion der Proteinbiosynthese. Dabei wird die Akkumulation von Vorläuferproteinen in den translokationsdefekten Mutanten reduziert und somit ein Überleben bei der nicht-permissiven Temperatur ermöglicht. Den Beweis, daß dieser Effekt auf einer reduzierten Proteinbiosynthese beruht, lieferten Lee & Beckwith (1986) dadurch, daß sie durch Zugabe subletaler Dosen von Chloramphenicol den Wachstumsdefekt der Exportmutanten supprimieren konnten. Weiterhin konnte eine Reduktion der Proteinbiosynthese auch bei einigen Suppressormutanten (*ssyA*, *ssyB* [=*nusB*, involviert in Regulation der Genexpression]) durch Messung der Kettenverlängerungsgeschwindigkeit des Enzyms ß-Galaktosidase nachgewiesen werden, während andere Mutationen keine Reduktion verursachen (*ssyE* [in *secY*], *ssyF* [=ribosomales Protein S1], *ssyG* [=IF2]; Shiba et al., 1986 a,b). Die Reduktion der Proteinbiosynthese verursacht bei diesen Suppressoren eine Wachstumsverzögerung. Obwohl eine signifikante Wachstumsverzögerung bei den IQ85 komplementierenden Fragmenten nicht beobachtet werden konnte, kann eine Reduktion der Proteinbiosynthese als Ursache für die Wachstumskomplementation nicht ausgeschlossen werden.

Da die Integration des IS-Elements 10 mitten im *B.licheniformis-secY* erfolgte, was einer Insertion im periplasmatischen Bereich zwischen den Transmembranbereichen 5 und 6 entspricht, wurde untersucht, ob die C-terminale Hälfte des SecY-Proteins von *B.licheniformis* in der Lage ist, die *E.coli secY*-Mutante zu komplementieren. Dieser Vorstellung liegt die bekannte α-Komplementation der ß-Galaktosidase zugrunde, bei der sich das α- und ß-Peptid zu einem enzymatisch aktiven Enzym zusammenfügen. Entsprechend könnte der C-Terminus des *B.licheniformis* SecY-Proteins mit dem SecY24^{ts}-Protein aus *E.coli* zu einer aktiven Form assemblieren und somit den mutierten Teil des *E.coli* SecY-Proteins ersetzen (secY^{24}-Mutation: Gly 239 ⇒Asp im cytoplasmatischen Loop hinter Transmembransegment 6). Eine analoge Komplementation einer temperatursensitiven *E.coli secA*-Mutante durch den N-Terminus des SecA-Proteins von *B.subtilis* wurde von Overhoff et al. (1991) beschrieben. Außerdem wurde von Bibi & Kaback (1990) in vivo die Expression der amino- und carboxyterminalen Hälfte der Lactose-Permease und deren Zusammenlagerung zu einem funktionell aktiven Komplex in der Membran beschrieben. Die Lactose-Permease ist wie das SecY-Protein ein integrales Membranprotein, das zwölf Transmembranbereiche besitzt und ihre Funktion liegt im Transport von ß-Galaktosiden wie z.B. Lactose (Calamia & Manoil, 1990).

Die beiden Teile des *B.licheniformis* SecY-Proteins, d.h. die amino- und carboxyterminale Hälfte, waren in der Lage, das Wachstum der *E.coli*-Mutante IQ85 bei der nicht-permissiven Temperatur zu komplementieren. Im Gegensatz dazu konnten alle DNS-Fragmente, d.h. die *B.licheniformis-secY*-Hälften einschließlich des IS-Element-haltigen *secY*-Gens sowie das *S.carnosus secY* mit dem davor integrierten IS-Element, den Wachstumsdefekt der *E.coli*-Mutante JM 105/3-1 nicht wiederherstellen. D.h. alle untersuchten Fragmente konnten den Wachstumsdefekt der Mutante IQ85 komplementieren, aber keines der Fragmente war in der Lage, das Wachstum der Mutante JM105/3-1 bei der nicht-permissiven Temperatur wiederherzustellen. Da die Aufnahme von Wachstumskurven keinen sichtbaren Unterschied im Wachstumsverhalten der beiden Mutanten ergab, wurde geschlossen, daß wahrscheinlich kleinere Effekte, wie z.B. bei der Proteinsynthese der Komplementation des Stammes IQ85 zugrunde liegen. Dieser Stamm ist aus einer NMG- und EMS-Mutagenese hervorgegangen (Shiba et al., 1984b) und trägt scheinbar noch weitere, nicht charakterisierte Mutationen, die die unterschiedliche Auswirkung der komplementierenden DNS-Fragmente ermöglichen. Es konnte schon in verschiedenen Fällen gezeigt werden, daß ein minimale Abnahme der Proteinsekretion einem defekten Proteinsekretionsapparat ermöglicht, die wichtigsten, zum Wachstum notwendigen Aufgaben zu erledigen (Shiba et al., 1984a, Lee & Beckwith, 1986). Beispiele dafür sind die Suppression von Wachstumsdefekten in *E.coli secA51(Ts)-*, *secD(Cs)-* und *secY24(Ts)*-Mutanten durch subletale Dosen an Chloramphenikol (Lee & Beckwith, 1986). Dagegen konnte der Wachstumsdefekt von Nullmutanten, d.h.

Mutanten, in denen einzelne Proteine des Proteintransportapparats erst gar nicht gebildet werden, durch diese Chloramphenikol-Gaben nicht supprimiert werden (Lee & Beckwith, 1986). Scheinbar können die amino- und carboxyterminalen SecY-Polypeptide aus *B.licheniformis* und das *S.carnosus* SecY nur in dem entsprechenden genetischen Hintergrund des Stammes IQ85 mit dem defekten *E.coli* SecY zu einem funktionellen Protein assemblieren oder einen stabilisierenden Effekt auf das SecY24^{ts}-Protein bewirken. Dazu könnte möglicherweise auch eine unterschiedliche Menge und Stabilität der gebildeten Polypeptide in den beiden Mutanten beitragen. Offensichtlich kommt es dabei nicht zur vollständigen Wiederherstellung der Funktionsfähigkeit des SecY-Proteins, da das Wachstum der Zellen nicht mit einer gleichzeitig sichtbaren Komplementation der Translokationsfähigkeit einhergeht. Dies ergibt sich aus den Pulse-Chase-Experimenten, in denen keine signifikante Änderung der Translokationsaktivität beider temperatursensitiver *E.coli*-Mutanten durch die verschiedenen Fragmente gezeigt werden konnte. Ein ähnliches Verhalten wurde bei der Suppression der *E.coli secA51(Ts)*-Mutante durch das ribosomale Protein L13 von *Staphylococcus carnosus* (Overhoff-Freundlieb & Freudl, 1991) gefunden. Hier wurde ebenfalls eine Wachstumskomplementation ohne vollständige Wiederherstellung der Translokationsaktivität beobachtet, die mit einer möglichen, nicht nachweisbaren Reduktion der Protensynthese erklärt wurde.

4.2. Analyse von Aminosäureaustauschen im *E.coli*-SecY

Es wurden bisher verschiedene Klassen von Mutationen im *E.coli* SecY-Protein identifiziert (als ● in Abbildung 21 dargestellt). Dieses sind erstens die sogenannten *prlA*-Mutationen, die die Translokation von Proteinen mit veränderter Signalsequenz erlauben [*prlA3* (Bankaitis & Bassford, 1985); *prlA401* (Bankaitis & Bassford, 1985); *prlA4* (Emr et al., 1981) = *prlA4-1* + *prlA4-2* (Iino & Sako, 1988); *prlA666* (Puziss et al., 1992)]. Außerdem werden durch die Mutation *prlA666* basische Aminosäuren in der aminoterminalen Region des reifen Teils im Vorläuferprotein toleriert. Daraus wurde geschlossen, daß SecY(PrlA) nicht nur mit der Signalsequenz, sondern auch mit dem reifen Teil des Proteins, der sogenannten Translokationsinitiationsdomäne (Andersson & von Heijne, 1991), wechselwirkt. Ferner wurden temperatursensitive Mutanten von SecY isoliert, deren Mutationsorte über die SecY-Sequenz verteilt sind. Eine Häufung dieser Mutationen, die einen Exportblock verursachen, ist vor allem im Transmembransegment (TMS) 7 zu beobachten [*secY24* (Shiba et al., 1984); *secY47* (Sako, 1991) ; *secY100* (Ito et al., 1989); *secY105* (Sako, 1991); *secY112* (Sako, 1991); *secY121* (Sako, 1991); *secY161* (Sako, 1991)]. Weiterhin wurden kältesensitive Mutanten isoliert, deren Mutationen im cytoplasmatischen Bereich 5 (C5 in Abbildung 21) liegen [*secY39* (Baba et al., 1990); *secY40* (Baba et al., 1990)]. Im cytoplasmatischen Bereich 5 wurde darüber hinaus auch eine dominant negative Mutation isoliert [*secY^{d}1* (Shimoike et al., 1992)]. Aus dieser und der

Beobachtung, daß die kältesensitiven Mutanten eine sehr viel schnellere Reaktion auf eine Temperaturveränderung zeigen, wurde geschlossen, daß dieser cytoplasmatische Loop 5 des SecY-Proteins wichtig für die Katalyse ist.

Alle Mutationen, außer der *secY100*-Mutation, betreffen keine der im Vergleich der SecY-Sequenzen strikt konservierten Aminosäuren. Da keine konditional letale Mutationen isoliert wurden, die eine der konservierten Aminosäuren betreffen, könnte man vermuten, daß Mutationen in diesen Aminosäuren einen vollständigen Verlust der SecY-Aktivität verursachen. Diese konservierten Aminosäuren könnten eine wichtige Rolle bei der Funktion und/oder der Struktur von SecY spielen.

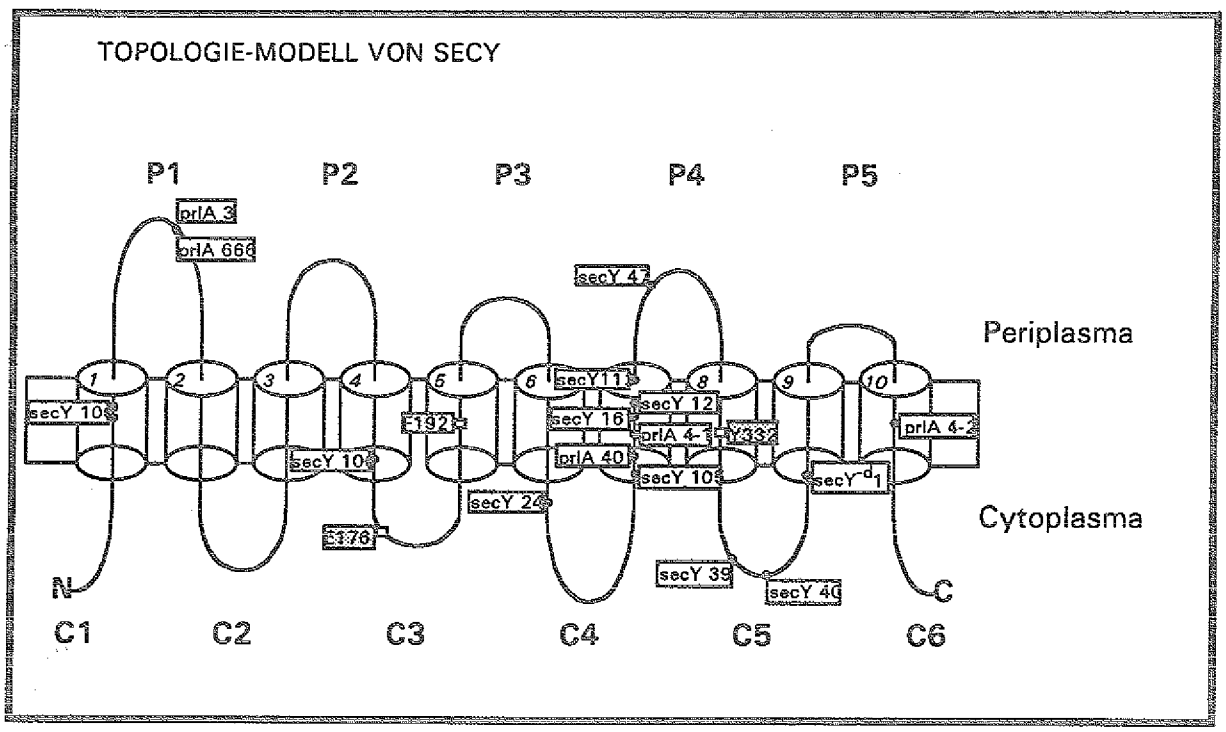


Abb. 21: Topologiemodell von SecY. Zylinder 1-10 stellen die Transmembransegmente 1-10 dar. P1-P5: Periplasmatischer Loop 1 bis 5; C1-C6: Cytoplasmatischer Bereich 1 bis 6
□ : in dieser Arbeit durchgeführter Aminosäureaustausch; ● : bekannter Aminosäure-austausch

Um Aussagen über die mögliche Bedeutung einzelner Aminosäuren machen zu können, wurden verschiedene Aminosäuren ausgesucht, die sich aus dem Vergleich der bisher bekannten SecY-Proteine als besonders konserviert erwiesen und die einen polaren Charakter besitzen. Aufgrund ihrer funktionellen Gruppen wären diese Aminosäuren in der Lage, sich an einem möglicherweise mit dem Proteintransport gekoppelten Protonenantiport zu beteiligen (Driessen & Wickner, 1991; Driessen, 1992). Diese Aminosäuren wurden mit Hilfe der Oligomutagenese ausgetauscht (mit □

in Abbildung 21 dargestellt) um Rückschlüsse auf eine Bedeutung dieser Aminosäuren für die Katalyse, Wechselwirkung mit anderen Komponenten und/oder die Struktur des SecY-Proteins ziehen zu können.

Die negativ geladene Aminosäure Glutaminsäure 176 (cytoplasmatischer Bereich 3 zwischen den Transmembranbereichen 4 und 5) wurde gegen die ungeladene Aminosäure Asparagin sowie die positiv geladene Aminosäure Arginin ausgetauscht. Damit wurde eine Aminosäure in einem cytoplasmatischen Loop ausgetauscht, um zu untersuchen, ob diese Aminosäure an einer Wechselwirkung von SecY mit cytoplasmatischen Faktoren (z.B. SecA; Fandl et al., 1988) oder dem Exportprotein beteiligt ist (Puziss et al., 1992; Sako, 1991). Zusätzlich wurden zwei Aminosäuren in den Transmembransegmenten 5 und 8 ausgetauscht, die möglicherweise an der Interaktion mit anderen Membranproteinen wie z.B. SecE oder SecD, am Protonenantiport oder an der Interaktion mit dem Vorläuferprotein während der Membranpassage beteiligt sind (Bieker & Silhavy, 1990; Nishiyama et al., 1992; Joly & Wickner, 1993). Dies waren die Aminosäuren F192, d.h. der aromatische Rest der Aminosäure Phenylalanin im Transmembransegment 5 wurde gegen die Methylgruppe der Aminosäure Alanin ausgetauscht und Tyrosin Y332 (im Transmembranbereich 8), dessen Hydroxylgruppe wurde durch den Einbau der aromatischen Aminosäure Phenylalanin entfernt wurde.

Es konnte jedoch keine Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit und Translokationsfähigkeit der *E.coli*-Mutanten IQ85 und JM105/3-1 bei permissiver und nicht-permissiver Temperatur im Vergleich zum Wildtyp-SecY festgestellt werden. Damit wurde gezeigt, daß die vorgenommenen Austausche keinen Einfluß auf die Funktionalität des SecY-Proteins, d.h. die Interaktion mit dem Exportprotein und dessen Translokation, haben. Außerdem sind sie wohl nicht an einer Wechselwirkung von SecY mit anderen Faktoren des Exportapparats bzw. des Translokators (Brundage et al., 1992) von *E.coli* beteiligt. Diese Ergebnisse stehen einerseits in Übereinstimmung mit einer Hypothese von Ito (1992). Er schlägt vor, daß der cytoplasmatische Loop 4 und das Transmembransegment 7 für die Interaktion mit anderen Komponenten von Bedeutung seien und daß der Bereich vom cytoplasmatischen Loop 5 bis zum Carboxyterminus von SecY für die Translokationsaktivität von SecY verantwortlich sei. Die in dieser Arbeit untersuchten Aminosäureaustausche liegen im cytoplasmatischen Loop 3 und den Transmembransegmenten 5 und 8 und sind scheinbar nicht essentiell für die Struktur, Wechselwirkung und Funktion von SecY während der Proteintranslokation. Dies paßt in die Theorie von Ito (1992). Andererseits können die Ergebnisse jedoch auch als Hinweis dafür interpretiert werden, daß das SecY nur einen passiven Tunnel darstellt und daß keine "aktiven" Gruppen am Transport beteiligt sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Gram-positive Bakterien sekretieren häufig große Proteinmengen in das Medium. Aus diesem Grund finden sie in der Industrie vielfach Anwendung in der Produktion extrazellulärer Enzyme. Über den Sekretionsmechanismus der Proteine ist bei diesen Organismen, im Gegensatz zu *Escherichia coli*, wenig bekannt.

1. In der vorliegenden Arbeit wurden die Gene des SecY-Proteins, einem der Hauptbestandteile des Translokationsapparats, von *Bacillus licheniformis* und *Staphylococcus carnosus* isoliert und in *Escherichia coli secY*-Mutanten charakterisiert. Die *B.licheniformis* und *S.carnosus secY*-Gene liegen in Analogie zum *E.coli* und *Bacillus subtilis secY* im *spc*-Operon, das für ribosomale Proteine kodiert. Das 431 Aminosäure umfassende *B.licheniformis* und das 430 Aminosäuren lange *S.carnosus* SecY-Protein enthalten zehn hydrophobe Bereiche, die Transmembransegmenten entsprechen. Ein Vergleich aller bisher bekannten SecY-Sequenzen ergab, daß 11 Aminosäuren (2%) strikt konserviert sind und 69 Positionen (12,5%) konservierte Austausche darstellen. Bereiche, in denen gehäuft konservierte Aminosäuren auftreten, sind die Transmembransegmente (TMS) 2, 5, 9 und 10 sowie die hydrophilen Bereiche, die TMS 4 und 5 sowie TMS 8 und 9 miteinander verbinden. Es besteht die Möglichkeit, daß die stark konservierten Regionen an der Translokationsaktivität von SecY beteiligt sind oder für die korrekte Wechselwirkung von SecY mit anderen Komponenten des Sekretionsapparats benötigt werden.

2. Die Aminosäureaustausche F192 und Y332, die in den TMS 5 und 8 des *E.coli*-SecYs vorgenommen wurden, hatten jedoch keinerlei Aktivitätsverlust von SecY zur Folge. Auch die Aminosäure E176, die im Bereich zwischen TMS 4 und 5 ausgetauscht wurde, scheint keine essentielle Rolle bei der Funktion von SecY während der Proteintranslokation zu spielen.

3. Die Expression des *B.licheniformis* SecY-Proteins konnte mit Hilfe einer Fusion zwischen SecY und der alkalischen Phosphatase sowie zwischen SecY und der ß-Galaktosidase nachgewiesen werden. Der Nachweis der Bildung des *B.licheniformis* SecY-Proteins in *E.coli* war die Voraussetzung für die Funktionsuntersuchung des SecY-Proteins durch Komplementations-experimente.

4. Eine Komplementation des Wachstumsverhaltens und der Translokationsaktivität der temperatursensitiven *E.coli secY24*-Mutanten IQ85 und JM105/3-1 mit den Gram-positiven *secY*-Genen von *B.licheniformis* und *S.carnosus* konnte nicht beobachtet werden. Die Anwesenheit der Gram-positiven SecY-Proteine wirkte sich sogar negativ auf das Wachstum und die Translokationsaktivität der *E.coli*-Mutanten bei der permissiven Temperatur aus. Möglicherweise gibt es eine Interferenz durch die Gram-positiven SecY-Proteine mit dem Proteinexport von *E.coli*, die wahrscheinlich auf einer Inkompatibilität der Gram-positiven SecY-Proteine mit dem Gram-negativen Exportapparat beruht. Diese Interferenz könnte eventuell

dadurch überwunden werden, daß eine SecY-Proteinkonzentration in der Zelle einen kritischen Wert nicht überschreitet.

5. Durch Selektion auf Wachstum bei der nicht-permissiven Temperatur konnten DNS-Fragmente als Insertionen in dem *B.licheniformis*- und vor dem *S.carnosus-secY*-Gen isoliert werden, die das Wachstum der *E.coli*-Mutante IQ85 komplementieren. Auf den Fragmenten befinden sich die Insertionselemente 3 und 10 sowie der Promotorbereich der *argF*-Gens. Auch weitere Konstrukte wie der amino- und carboxyterminale Teil des *B.licheniformis*-SecYs, verursachen eine Wachstumskomplementation der *E.coli*-Mutante. Der Translokationsdefekt dieser Mutante IQ85 wurde jedoch nicht sichtbar komplementiert. Der Wachstums- und der Translokationsdefekt der Mutante JM105/3-1 wurden durch die entsprechenden DNS-Fragmente dagegen nicht komplementiert. Es besteht daher die Möglichkeit, daß der genetische Hintergrund des durch chemische Mutagenese hergestellten temperatursensitiven IQ85-Stamm für die Komplementation verantwortlich ist. Dieser ermöglicht wahrscheinlich eine Assemblierung der *B.licheniformis*-Fragmente bzw. des *S.carnosus*-Proteins mit dem *E.coli*-SecY24^{ts}-Proteins zu einem funktionsfähigen Protein.

6. LITERATUR

Akiyama Y, Ito K (1985); The SecY membrane component of the bacterial protein export machinery: analysis by new electrophoretic methods for integral membrane proteins. EMBO J 12: 3351-3356

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

Akiyama Y, Ito K (1990); SecY protein, a membrane-embedded secretion factor of *E.coli*, is cleaved by the OmpT protease in vitro. Biochem Biophys Res Comm 167: 711-715

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

Arndt E (1992); The genes for ribosomal protein L15 and the protein equivalent to secY in the archaebacterium Haloarcula (Halobacterium) marismortui. Biochim Biophys Acta 1130: 113-116 assembly. Nature 333: 330-334

Auer J, Spicker G, Böck A (1991); Presence of a gene in the archaebacterium *Methanococcus vannielii* homologous to *secY* of eubacteria. Biochimie 73: 683-688

Baba T, Jacq A, Brickman E, Beckwith J, Taura T, Ueguchi C, Akiyama Y, Ito K (1990); Characterization of cold-sensitive mutants of *Escherichia coli*. J Bacteriol 172: 7005-7010

Bankaitis V, Bassford PJ (1985); Proper interaction between at least two components is required for efficient export of proteins to the *Escherichia coli* cell envelope. J Bacteriol 162: 169-178

Bardwell JCA, Craig EA (1984); Major heat shock gene of Drosophila and the *Escherichia coli* heat-inducible *dnaK* gene are homologous. Proc Natl Acad Sci USA 81: 848-852

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

Bibi E, Kaback HR (1990); In vivo expression of the lacY gene in two segments leads to functional lac permease. Proc Natl Acad Sci USA 87: 4325-4329

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

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-Brady K, Silhavy TJ (1992); Suppressor analysis suggests a multistep, cyclic mechanism for protein secretion in Escherichia coli. EMBO J 11: 3165-3174

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

Bochkareva ES, Lissin NM, Girshovich AS (1988); Transient association of newly synthesized unfolded protein with the heat-shock GroEL protein. Nature 336: 254-257

Boyd D, Beckwith J (1990); The role of charged amino acids in the localization of secreted and membrane proteins. Cell 62: 1031-1033

Brickman E, Soll L, Beckwith J (1973); Genetic characterization of mutations which affect catabolite-sensitive operons in *Escherichia coli*, including deletions of the gene for adenyl cyclase. J Bacteriol 116: 582-587

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

Brundage L, Fimmel CJ, Mizushima S, Wickner W (1992); SecY, SecE, and Band 1 form the membrane-embedded domain of *Escherichia coli* preprotein translocase. J Biol Chem 267: 4166-4170

Brundage L, Hendrick JP, Schiebel E, Driessen AJM, 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

Calamia J, Manoil C (1992); Membrane protein spanning segments as export signals. J Mol Biol 224: 539-543

Casadaban MJ, Cohen SN (1980); Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. J Mol Biol 138: 179-207

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 protein export gene. Nucl Acids Res 11: 2599-2616

Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972); Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E.coli* by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci USA 69: 2110

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

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

Dalbey RE, Wickner W (1985); Leader peptidase catalyzes the release of exported proteins from the outer surface of the *Escherichia coli* plasma membrane. J Biol Chem 260: 15925-15931

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

de Vrije GJ, Batenburg AM, Killian JA, de Kruijff B (1990); Lipid involvement in protein translocation in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 4: 143-150

Debabov VG (1982); The industrial use of *Bacilli*. In: Dubnau, D. (Ed.), The Molecular Biology of the *Bacilli*, Academic Press, New York, pp 331-370

Dev IK, Ray PH (1984); Rapid assay and purification of a unique signal peptidase that processes the prolipoprotein from *Escherichia coli* B. J Biol Chem 259: 11114-11120

Devereux J, Haeverli P, Smithies O (1984); .Nucl Acids Res 12: 387-395

Douglas SE (1992); A secY homologue is found in the plastid genome of Cryptomonas ϕ. FEBS 298: 93-96

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

Driessen AJM (1992); Precursor protein translocation by the *Escherichia coli* translocase is directed by the protonmotive force. EMBO J 11: 847-853

Driessen AJM, Wickner W (1991); Proton transfer is rate-limiting for translocation of precursor proteins by the *Escherichia coli* translocase. Proc Natl Acad Sci USA 88: 2471-2475

Eikmanns BJ, Kleinertz E, Liebl W, Sahm H (1991); A family of *Corynebacterium glutamicum/ Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. Gene 102: 93-98

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

Fandl JP, Cabelli R, Oliver D, Tai PC (1988); SecA suppresses the temperature-sensitive SecY24 defect in protein translocation in *Escherichia coli* membrane vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 85: 8953-8957

Gallusser A, Kuhn A (1990); Initial steps in protein membrane insertion. Bacteriophage M13 procoat protein binds to the membrane surface by electrostatic interaction. EMBO J 9:2723-2729

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

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

Görlich D, Prehn S, Hartmann E, Kalies KU, Rapoport TA (1992); A mammalian homologue of Sec61p and SecYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. Cell 71:489-503

Grodberg J, Dunn JJ (1988); OmpT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. J Bacteriol 170: 1245

Haandrikman AJ, Meesters R, Laan H, Konings WN, Kok J, Venema G (1991); Processing of the lactococcal extracellular serine proteinase. Appl Environm Microbiol 57: 1899-1904

Hanahan D (1985); Techniques for transformation of *E.coli*. DNA Cloning Volume 1, ed. D.M. Glover, IRL Press Oxford, Washington DC

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

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

Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM, Tilly K, Dennis DT, Georgopoulos CP, Hendrix RW, Ellis RJ (1988); Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. Nature 333: 330-334

Higgins DG, Sharp PM (1988); CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. Gene 73: 237-244

Hohn B (1979); In vitro packaging of lambda and cosmid DNA. Methods Enzymol 68: 299-309

Iino T, Sako T (1988); Inhibition and resumption of processing of the staphylokinase in some *Escherichia coli prlA* suppressor mutants. J Biol Chem 263:19077-19082

Innis MA, Tokunaga M, Williams ME, Loranger JM, Chang SY, Chang S, Wu HC (1984); Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* prolipoprotein signal peptidase (*lsp*) gene. Proc Natl Acad Sci USA 81: 3708-3712

Ito K (1984); Identification of the *secY* (*prlA*) gene product involves in protein export in *Escherichia coli*. Mol Gen Genet 197: 204-208

Ito K (1990); Structure, function, and biogenesis of SecY, an integral membrane protein involved in protein export. J Bioenerg Biomembr 22: 353-367

Ito K (1992); SecY and integral membrane components of the *Escherichia coli* protein translocation system. Mol Microbiol 6: 2423-2428

Ito K, Akiyama Y (1985); Protein blotting through a detergent layer, a simple method for detecting integral membrane proteins separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Biochem Biophys Res Comm 133: 214-221

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, Cerretti DP, Nashimoto H, Nomura M (1984); Characterization of an amber mutation in the structural gene for ribosomal protein L15, which impairs the expression of the protein export gene, *secY*, in *Escherichia coli*. EMBO J 3: 2319-2324

Ito K, Hirota Y, Akiyama Y (1989); Temperature-sensitive *sec* mutants of *Escherichia coli*: inhibition of protein export at the permissive temperature. J Bacteriol 171: 1742-1743

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

Joly JC, Wickner W (1993); The SecA and SecY subunits of translocase are the nearest neighbors of a translocating preprotein, shielding it from phospholipids. EMBO J 12: 255-263

Kaiser K, Murray NE (1979); Physical Characterization of the "Rac prophage" in *Escherichia coli* K12. Mol Gen Genet 175: 159-174

Kang SK, Kudo T, Horikoshi K (1992); Molecular cloning and characterization of an alkalophilic *Bacillus* sp. C125 gene homologous to *Bacillus subtilis secY*. J Gen Microbiol 138: 1365-1370

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

Kennell DE (1986); The instability of messenger RNA in bacteria. In: Maximizing gene expression, Butterworth Publishers, Stoneham, pp.101-142

Klose M, Schimz KL, van der Woelk J, Driessen AJM, Freudl R (1993); Lysine 106 of the putative catalytic ATP-binding site of the *Bacillus subtilis* SecA protein is required for functional complementation of *Escherichia coli secA* mutants in vivo. J Biol Chem 286: 4504-4510

Koivula T, Palva I, Hemilä H (1991); Nucleotide sequence of the *secY* gene from *Lactococcus lactis* and identification of conserved regions by comparison of four SecY proteins. FEBS Lett 288: 114-118

Kontinen VP, Saris P, Sarvas M (1991); A gene (*prsA*) of *Bacillus subtilis* involved in a novel, late stage of protein export. Mol Microbiol 5: 1273-1283

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

Kumamoto CA, Beckwith J (1983); Mutations in a new gene, *secB*, cause defective protein localization in *Escherichia coli*. J Bacteriol 154: 253-260

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

Kunkel TA (1985); Rapid and efficient site specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc Natl Acad Sci USA 82: 488-492

Kyhse-Andersen J (1984); J Biochem Biophys Methods 10: 203-209

Kyte J, Doolittle RF (1982); A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol 157: 105-132

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

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

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

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

Lecker SH, Driessen AJM, Wickner W (1990); ProOmpA contains secondary and tertiary structure prior to translocation and is shielded from aggregation by association with SecB protein. EMBO J 9: 2309-2314

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

Lill R, Cunningham K, Brundage LA, Ito K, Oliver D, 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 the leader and mature domains of precursor proteins. Cell 60: 271-280

Lloyd AD, Kadner RJ (1990); Topology of the *Escherichia coli uhpT* sugar-phosphate transporter analyzed by using TnPhoA fusions. J Bateriol 172: 1688-1693

Luirink J, High S, Wood H, Giner A, Tollervey D, Dobberstein B (1992); Signal-sequence recognition by an *Escherichia coli* ribonucleoprotein complex. Nature 359: 741-743

Mandel G, Wickner W (1979); Translational and post-translational cleavage of M13 procoat protein: extracts of both the cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* contain leader peptidase activity. Proc Natl Acad Sci USA 76: 236-240

Manoil C, Beckwith J (1985); TnPhoA: a transposon probe for protein export signals. Proc Natl Acad Sci USA 82: 8129-8133

Matsuyama S, Fujita Y, Mizushima S (1993); SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. EMBO J 12: 265-270

Matsuyama S, Fujita Y, Sagara K, Mizushima S (1992); Overproduction, purification and characterization of SecD and SecF, integral membrane components of the protein translocation machinery of *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta 1122: 77-84

Matsuyama S, Akimaru J, Mizushima S (1990); SecE-dependent overproduction of SecY in *Escherichia coli* - Evidence for interaction between two components of the secretory machinery. FEBS 269: 96-100

Matsuyama S, Fujita Y, Mizushima S (1992); Large-scale production of membrane proteins fused to a truncated SecA in *Escherichia coli*. Biosci Biotech Biochem 56: 1512-1514

Mèzes PSF, Lampen JO (1985); Secretion of proteins in Bacilli. in: Dubnau DA (ed), The molecular biology of the Bacilli, Vol II, Academic Press, Inc.

Michalowski CB, Pfanzagl B, Loeffelhardt W, Bohnert HJ (1990);The cyanelle S10 *spc* ribosomal protein gene operon from *Cyanophora paradoxa*. Mol Gen Genet 224: 222-231

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, Sonenshein AL, Peron J, Losick R (1982); Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. Mol Gen Genet 186: 339-346

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 273: 75-78

Nishiyama K, Kabuyama Y, Akimaru J, Matsuyama, Tokuda H, Mizushima S (1991); SecY is an indispensable component of the protein secretory machinery of *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta 1065: 89-97

Nishiyama K, Mizushima S, Tokuda H (1992); The carboxyl-terminal region of SecE interacts with SecY and is functional in the reconstitution of protein translocation activity in *Escherichia coli*. J Biol Chem 267: 7170-7176

Ohama T, Muto A, Osawa S (1989); Spectinomycin operon of *Micrococcus luteus*: evolutionary implications of organization and novel codon usage. J Mol Evol 29: 381-395

Ohkubo S, Muto A, Kawauchi Y, Yamao F, Osawa S (1987); The ribosomal protein gene cluster of *Mycoplasma capricolum*. Mol Gen Genet 210: 314-322

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

Overhoff-Freundlieb B, Freudl R (1991); Suppression of an *Escherichia coli secA*^{ts} mutant by a gene cloned from *Staphylococcus carnosus*. FEMS Microbiol Lett 84: 143-150

Phillips GJ, Silhavy TJ (1992); The *E.coli ffh* gene is necessary for viability and efficient protein export. Nature 359: 744-746

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 250: 1111-1117

Power SC, Adams RM, Wells JA (1986); Secretion and autoproteolytic maturation of subtilisin. Proc Natl Acad Sci USA 83: 3096-3100

Priest, FG (1977); Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriol Rev 41: 711-753

Pugsley, AP (1989); Protein Targeting, Academic Press, New York

Puziss JW, Strobel SM, Bassford Jr. PJ (1992); Export of maltose-binding protein species with altered charge distribution surrounding the signal peptide hydrophobic core in *Escherichia coli* cells harboring *prl* suppressor mutations. J Bacteriol 174: 92-101

Rescei PA, Gruss AD, Novick RP (1987); Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from Staphylococcus simulans. Proc Natl Acad Sci USA 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

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 H, 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, Kada T (1985); *Bacillus subtilis* gene involved in cell division, sporulation, and exoenzyme secretion. J Bacteriol 163: 648-653

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

Sakaguchi M, Ueguchi C, Ito K, Omura T (1991); Yeast gene which suppresses the defect in protein export of a *secY* mutant of *E.coli*. J Biochem 109: 799-802

Sako T (1991); Novel *prlA* alleles defective in supporting staphylokinase processing in *Escherichia coli*. J Bacteriol 173: 2289-2296

Sako Y, Iino T (1988); Distinct mutation sites in *prlA* suppressor mutant strains of *Escherichia coli* respond either to suppression of signal peptide mutations or to blockage of staphylokinase processing. J Bacteriol 170: 5389-5391

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

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

Scaramuzzi CD, Stokes HW, Hiller RG (1992); Characterisation of a chloroplast encoded *secY* homologue and *atpH* from a chromophytic alga - Evidence for a novel chloroplast genome organisation. FEBS 304: 119-123

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

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

Schiebel E, Driessen AJM, Hartl FU, Wickner W (1991); $\Delta\mu_H+$ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. Cell 64: 927-939

Schlegel HG (1985); Allgemeine Mikrobiologie, Thieme Verlag, Stuttgart-New York

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

Schmidt MG, Dolan KM, Oliver DB (1991); Regulation of *Escherichia coli secA* mRNA translation by a secretion-responsive element. J Bacteriol 173: 6605-6611

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

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

Shapira SK, Chou J, Richard FV (1983); Plasmid vectors for expression of hybridproteins coded by a cloned gene fused to *lacZ*-gen sequences encoding an ezymatically active carboxy-terminal protein of ß-galactosidase. Gene 25: 71

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

Shiba K, Ito K, Yura T (1984a); Mutation that suppresses the protein export defect of the *secY* mutation and causes cold-sensitive growth of *Escherichia coli*. J Bacteriol 160: 696-701

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

Shiba K, Ito K, Yura T, Cerretti DP (1984b); 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

Shimoike T, Akiyama Y, Baba T, Taura T, Ito K (1992); SecY variants that interfere with *Escherichia coli* protein export in the presence of normal *secY*. Mol Microbiol 6: 1205-1210

Smith NR, Gibson T, Gordon RE, Sneath PHA (1964); Type cultures and proposed neotype cultures of some species in the genus *Bacillus*. J Gen Microbiol 34:269-272

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

Spratt BG, Hedge PJ, te Heesen S, Edelman A, Broome-Smith JK (1986); Kanamycin-resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9. Gene 41: 337-342

Stader J, Gansheroff LF, 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

Stirling CJ, Rothblatt J, Hosobuchi M, Deshaies R, Schekman R (1992); Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. Mol Biol Cell 3: 129-142

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

Takamatsu H, Fuma SI, Nakamura K, Sadaie Y, Shinkai A, Matsuyama SI, Mizushima S, Yamane K (1992); In vivo and in vitro characterization of the *secA* gene product of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 174: 4308-4316

Takeshita S, Sato M, Toba M, Masahashi W, Hashimoto-Gotoh T (1987); High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for lacZα-complementation and chloramphenicol- or kanamycin-resistance selection. Gene 61: 63-74

Taura T, Ueguchi C, Shiba K, Ito K (1992); Insertional disruption of the *nusB* (*ssyB*) gene leads to cold-sensitive growth of *Escherichia coli* and suppression of the *secY24* mutation. Mol Gen Genet 234: 429-432

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 USA 76: 4350-4353

Ueguchi C, Wittekind M, Nomura M, Akiyama Y, Ito K (1989); The *secY-rpmJ* region of the *spc* ribosomal protein operon in *Escherichia coli*: Structural alterations affecting *secY* expression. Mol Gen Genet 217:1-5

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

van Dijl JM, de Jong A, Vehmaanperä J, Venema G, Bron S (1992); Signal peptidase I of *Bacillus subtilis*: patterns of conserved amino acids in prokaryotic and eukaryotic type I signal peptidase. EMBO J 11: 2819-2828

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

Vogel HJ, Bonner DM (1956); Acetylornithinase of *Escherichia coli*: Partial Purification and some Properties. J Biol Chem 218: 97-106

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

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

von Heijne G, Abrahamsén L (1989); Species-specific variation in signal peptide design. FEBS Letters 244: 439-446

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

Wickner W, Driessen AJM, Hartl FU (1991); The Enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. Annu Rev Biochem 60: 101-124

Wolfe PB, Rice M, Wickner W (1985); Effects of two *sec* genes on protein assembly into the plasma membrane of *Escherichia coli*. J Biol Chem 260: 1836-1841

Yanish-Perron CJ (1985); Improved M13 phage cloning vectors and host strains. Gene 33: 103-119

Young RA, Davis RW (1983); Yeast RNA polymerase II genes: isolation with antibody probes. Science 222: 778-782

Young RA, Davis RW (1983); Efficient isolation of genes by using antibody probes. Proc Natl Acad Sci USA 80: 1194-1198

Zhao X, Wu HC (1992); Nucleotide sequence of the *Staphylococcus aureus* signal peptidase II (*lsp*) gene. FEBS 299: 80-84

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie I der Forschungszentrum Jülich GmbH angefertigt.

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

Bei Herrn Professor Dr. C.P. Hollenberg bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. R. Freudl für die Betreuung, sowie die Diskussionen und Ratschläge, mit denen er diese Arbeit begleitet hat.

Allen Mitarbeitern des Institutes danke ich für die freundliche Aufnahme, ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Vor allem danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe: A. Bida, S. Crombach, G.Decker, E. Frings, M. Herbort, M. Klein, Dr. M. Klose, J. Meens und Dr. K.L. Schimz für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

Jül-2779
Juni 1993
ISSN 0944-2952