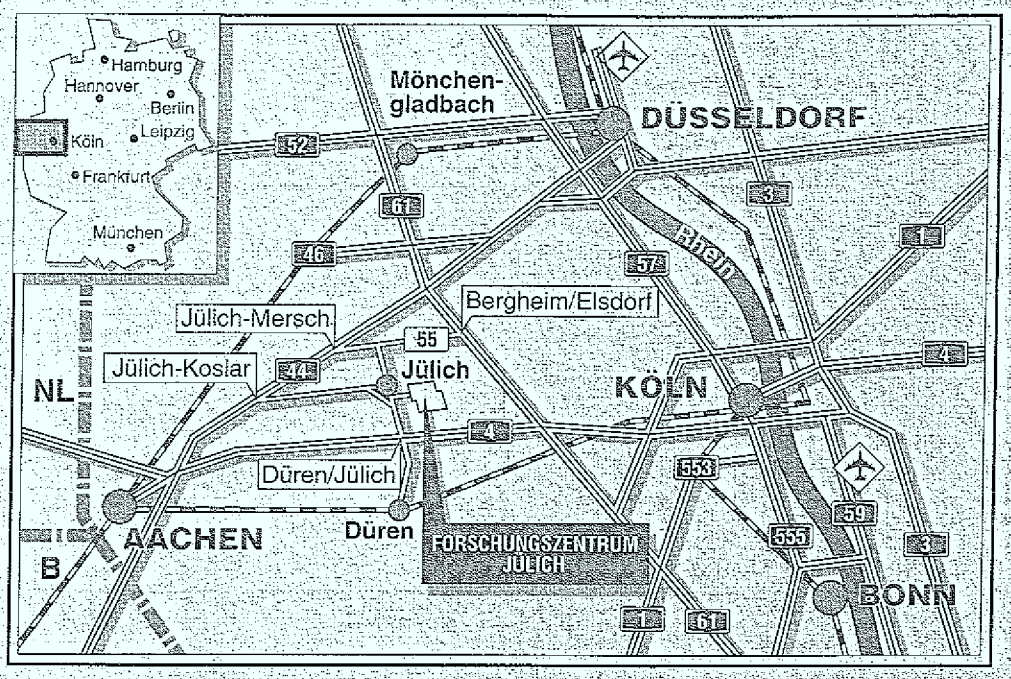
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH KFA

Institut für Biotechnologie

Isolierung und funktionelle Charakterisierung des *secA*-Gens aus *Staphylococcus carnosus* und eines azidresistenten *secA*-Allels von *Bacillus subtilis*

Michael Klein



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3072
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-3072
D61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

Isolierung und funktionelle Charakterisierung des *secA*-Gens aus *Staphylococcus carnosus* und eines azidresistenten *secA*-Allels von *Bacillus subtilis*

Michael Klein

Inhaltsverzeichnis

1.	**Einleitung**	**1**
	Abkürzungen	**12**
2.	**Material und Methoden**	**13**
2.1.	Bakterienstämme, Phagen und Plasmide	13
2.2.	Medien und Lösungen	14
2.3.	Verwendete Reagenzien und Bezugsquellen	16
2.4.	Mikrobiologische Methoden	16
2.4.1.	Kultivierung von Bakterien	16
2.4.2.	Stammhaltung	17
2.4.3.	Transformation von Bakterien	17
2.4.4.	In-vitro-Verpackung und Transfektion einer Cosmidgenbank von *Staphylococcus carnosus* TM300	18
2.4.5.	Transduktion von *B.subtilis* mit dem Phagen PBS1	19
2.5.	Gentechnische Methoden	20
2.5.1.	Präparation von DNA	20
2.5.1.1.	Präparation chromosomaler DNA	20
2.5.1.2.	Präparation von Plasmid DNA	21
2.5.2.	Allgemeine gentechnische Methoden	22
2.5.3.	Herstellung von Deletionsmutanten	24
2.5.4.	Herstellung und Aufreinigung synthetischer Oligonukleotide	24
2.5.5.	Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.5.6.	DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode	25
2.5.7.	DNA-DNA-Hybridisierung nach Southern	27
2.5.7.1.	Herstellung einer Digoxygenin-markierten DNA-Sonde	27
2.5.7.2.	Hybridisierung von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA	27
2.5.7.3.	Koloniehybridisierung	28
2.6.	Proteinchemische Methoden	29
2.6.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.6.2.	Herstellung von Gesamtzellextrakten	29
2.6.3.	Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern (Western-Blot)	30
2.6.4.	Pulse-chase-Experiment mit *B.subtilis*	30
3.	**Ergebnisse**	**32**
3.1.	Isolierung und Charakterisierung des *secA*-homologen Gens aus *Staphylococcus carnosus* TM300	32
3.1.1.	Nachweis eines *secA*-homologen Bereiches in der chromosomalen DNA aus *S.carnosus* und Klonierung eines hybridisierenden DNA-Fragmentes aus *S.carnosus* TM300	32
3.1.2.	Sequenzierung des *secA*-Gens aus *S.carnosus*	35
3.1.3.	Vergleich der Aminosäuresequenz des *S.carnosus* SecA-Proteins mit anderen bekannten SecA-Proteinen	37
3.1.4.	Funktionelle Charakterisierung der SecA-Proteine aus *S.carnosus*, *B.subtilis* und *E.coli* in *E.coli*	40

3.1.4.1. Expression der SecA-Proteine in *E.coli* 40
3.1.4.2. Heterologe Komplementation temperatursensitiver *E.coli secA*-Mutanten 42
3.1.5. Charakterisierung des *S.carnosus* SecA-Proteins in *B.subtilis* 43
3.1.5.1. Expression verschiedener *secA*-Gene in *B.subtilis* 43
3.1.5.2. Komplementation des Wachstumsdefektes der *B.subtilis secA*-Mutante NIG1152 45
3.1.5.3. Export des äußeren Membranproteins OmpA aus *E.coli* in *B.subtilis* NIG1152 46
3.1.5.4. Export der Lipase aus *S.hyicus* in NIG1152 48
3.2. Isolierung und Charakterisierung einer azidresistenten Mutante von *B.subtilis* 50
3.2.1. Isolierung der azidresistenten *B.subtilis* Mutante MIK10 ausgehend vom *B.subtilis* Wildtyp NIG1121 50
3.2.1.1. Bestimmung der minimalen letalen Azidkonzentration an Azid für *B.subtilis* Wildtyp NIG1121 50
3.2.1.2. Isolierung des azidresistenten Stammes *B.subtilis* MIK10 51
3.2.2. Charakterisierung der Mutation im *secA*-Gen von MIK10 51
3.2.3. Physiologische Charakterisierung von *B.subtilis* MIK10[*secA10*] und des SecA10-Proteins 53
3.2.3.1. Expression des SecA10-Proteins in MIK10 und *B.subtilis* Wildtyp NIG1121 53
3.2.3.2. Einfluß von Wildtyp SecA und SecA10 auf das Wachstum von *B.subtilis* MIK10[*secA10*] und NIG1121 in Gegenwart von Azid 54
3.2.3.3. Komplementation des Wachstumsdefektes der temperatursensitiven *B.subtilis secA*-Mutante NIG1152[*div341*^{ts}] durch SecA10 57
3.2.4. Vergleich der Prozessierungkinetik des pOmpA-Proteins in *B.subtilis* Wildtyp NIG1121 und *B.subtilis* MIK10[*secA10*] bei An- und Abwesenheit von Azid 58

4. Diskussion 60
4.1. Isolierung und Charakterisierung des *secA*-Gens aus *S.carnosus* 60
4.1.1. Homologievergleich des *S.carnosus* SecA-Proteins mit anderen SecA-homologen Proteinen 60
4.1.2. Komplementation des Wachstumsdefektes von *E.coli secA*-Mutanten 61
4.1.3. Komplementation einer *B.subtilis* secA-Mutante 62
4.1.4. Einfluß des SecA-Proteins aus *S.carnosus* auf den Proteinexport in *B.subtilis* 63
4.2. Isolierung und Charakterisierung einer Azidresistenten Mutante von *B.subtilis* 66
4.2.1. Isolierung der azidresistenten *B.subtilis* Mutante MIK10 und Charakterisierung des *secA10*-Gens 66
4.2.2. Charakterisierung des *secA10*-Allels 68

5. Zusammenfassung 71

6. Literatur 73

1. Einleitung

Bakterien besitzen anders als die komplex aufgebauten eukaryontischen Zellen keine intrazelluläre Kompartimentierung. Im Cytoplasma finden alle anabolen und katabolen Stoffwechselvorgänge statt, während an der Cytoplasmamembran z.B. die ATP-Synthese, die Stoffaufnahme und -abgabe oder die Reizaufnahme und Weiterleitung erfolgen. Da sehr viele dieser Prozesse durch Proteine vermittelt werden, hat die Insertion von Proteinen in die Membran und der Transport von Proteinen über die Membran eine zentrale Bedeutung für den Stoffwechsel der Zelle.

Bei Gram-negativen Bakterien ist der sich außen an die Cytoplasmamembran anschließende Bereich, das Periplasma, durch die äußere Membran vom umgebenden Medium abgetrennt, wobei jedoch niedermolekulare Substanzen durch Kanalproteine über die äußere Membran diffundieren können. Ein solches "extrazelluläres Kompartiment" ist wegen des Fehlens einer äußeren Membran bei den Gram-positiven Bakterien nicht zu finden, so daß Substanzen, die über die Cytoplasmamembran transportiert werden, in der Regel frei in das umgebende Medium diffundieren können. Einige exportierte Proteine können jedoch wahrscheinlich wegen ihrer Größe, Ladung oder Form die vernetzte Struktur der negativ-geladenen Zellwand nicht durchqueren (Harwood et al. 1990).

Zusammen mit allen anderen Proteinen werden Exportproteine im Zellinneren synthetisiert. Sie unterscheiden sich als Vorläuferproteine von den übrigen cytosolischen Proteinen durch ein N-terminales Signalpeptid. Der Vergleich der Signalpeptide vieler verschiedener Exportproteine ergab zwar keine konservierten Aminosäuresequenzen, es zeigte sich jedoch, daß der stukturelle Aufbau der Signalpeptide hoch konserviert ist. Sie besitzen eine positive Ladung an ihrem N-Terminus (n-Region), gefolgt von einem Bereich hydrophober Aminosäuren (h-Region) und einer als c-Region bezeichneten Konsensussequenz. Letztere dient als Erkennungsstelle für die Signalpeptidase I, die bei der Translokation des Proteins über die Cytoplasmamembran das Signalpeptid vom reifen Teil des Proteins abspaltet (von Heijne 1983, 1985). Die Funktion des Signalpeptids liegt in der Einschleusung des Exportproteins in den Proteinexport. Sie vermittelt dabei die Wechselwirkung des Vorläuferproteins mit den Komponenten des Exportapparates (Thom u. Randall 1988, Altman et al. 1990). Untersuchungen von Mutationen im Signalpeptid des Maltosebindeproteins deuten darauf hin, daß das SecA-Protein und das SecB-Protein (s.u.) im Bereich des Signalpeptids an das Vorläuferprotein binden können (Watanabe u. Blobel 1989a, b, Akita et al. 1990). Für die positive Ladung sowie für den hydrophoben Bereich wird angenommen, daß sie die Insertion des Vorläufers in die Membran ermöglichen, wobei der N-Terminus an der negativ-geladenen Innenseite der Cytoplasmamembran positioniert wird (Bosch et al. 1989, Jones et al. 1990, Yamane et al. 1990, Inouye et al. 1992). Das Entfernen der N-terminalen positiven Ladung, das Einführen einer Ladung in den hydrophoben Bereich sowie das Verkürzen oder Entfernen des hydrophoben Bereiches führt zur einer drastischen Verschlechterung oder zur völligen

Blockierung der Proteintranslokation (Puziss et al. 1989, Nakamura et al. 1989, Borchert u. Nagarajan 1990, 1991). Darüber hinaus wird dem Signalpeptid auch eine Rolle bei der Aufrechterhaltung einer transportkompetenten Konformation des neu synthetisierten Exportproteins zugeschrieben, wobei es die Faltung des Proteins in eine stabil gefaltete und somit transportinkompetente Struktur verlangsamt (Park et al. 1988, Liu et al. 1989).
Obwohl die beschriebenen Eigenschaften für alle Exportproteine mit einem N-terminalen Signalpeptid gelten, zeigen sich jedoch Unterschiede beim Vergleich der Signalpeptide von verschiedenen Organismengruppen (Tab.1). Die Variationen im Aufbau der Signalpeptide bestehen in erster Linie in ihrer unterschiedlichen Länge und in der unterschiedlichen Anzahl an positiven Ladungen in der n-Region (von Heijne u. Abrahmsén 1989, Simonen u. Palva 1993). Ursache hierfür können spezifische Anpassungen der Signalpeptide an die Komponenten der Exportapparate der jeweiligen Organismen sein. So schneiden die Signalpeptidasen von *E.coli* und *B.subtilis* ein von der α-Amylase abgeleitetes Signalpeptid an unterschiedlichen Stellen (Itoh et al. 1990). Prinzipiell ist es jedoch möglich, Exportproteine unterschiedlicher Herkunft in heterologen Organismen zu exportieren (Breitling et al. 1989, Nakamura et al. 1989, Meens et al. 1993).

		Bakterien	
Organismen	Eukaryonten	Gram-negativ	Gram-positiv
n-Region	4-5	5-6	7-8
Ladung	+0,8	+2	+3
h-Region	12-18	11-15	15-22
Ladung	0	0	0
c-Region	5	6	8
Ladung	polar	polar	polar
Länge insgesamt	≈24	≈23	≈32

Tab. 1: Vergleich der Signalpeptide verschiedener Organismen. Angegeben ist die Länge der Regionen in Aminosäuren sowie die Ladung (zusammengestellt nach von Heijne 1983, von Heijne u. Abrahmsén 1989)

Der Proteinexportapparat von *E.coli*

Zur Isolierung von Mutationen in den Genen von Komponenten des Exportapparates (Exportkomponenten) wurden artifizielle Exportproteine genutzt, die entweder wegen einer Mutation im Signalpeptid (Bieker-Brady u. Silhavy, 1992) oder als Fusionsprotein zwischen dem Signalpeptid eines Exportproteins und der ß-Galaktosidase nur sehr schlecht exportiert werden und in der Cytoplasmamembran stecken bleiben (Emr et al. 1981, Ito et al. 1981, Lee et al. 1989). Dadurch blockieren sie die Translokation aller anderen Exportproteine und führen zum Absterben der Zelle. Mutationen in den Exportkomponenten, die den Export der Signalsequenzmutanten erlauben bzw. die Fusionsproteine vom Export ausschließen, konnten im *secY*-, *secA*- und *secE*-Gen (Emr et al. 1981, Bankaitis u. Bassford 1985, Ryan u. Bassford 1985, Stader et al. 1989) bzw. im *secA*-, *secB*-, *secD*- und *secE*-Gen (*sec* für "secretion") isoliert werden (Oliver u. Beckwith 1981, Kumamoto u. Beckwith 1983, Gardel et al. 1987).
Die am Proteinexport in *E.coli* beteiligten Faktoren wurden eingehend charakterisiert und die Ergebnisse in einem detaillierten Modell des Proteinexportes zusammengefaßt (Abb. 1).

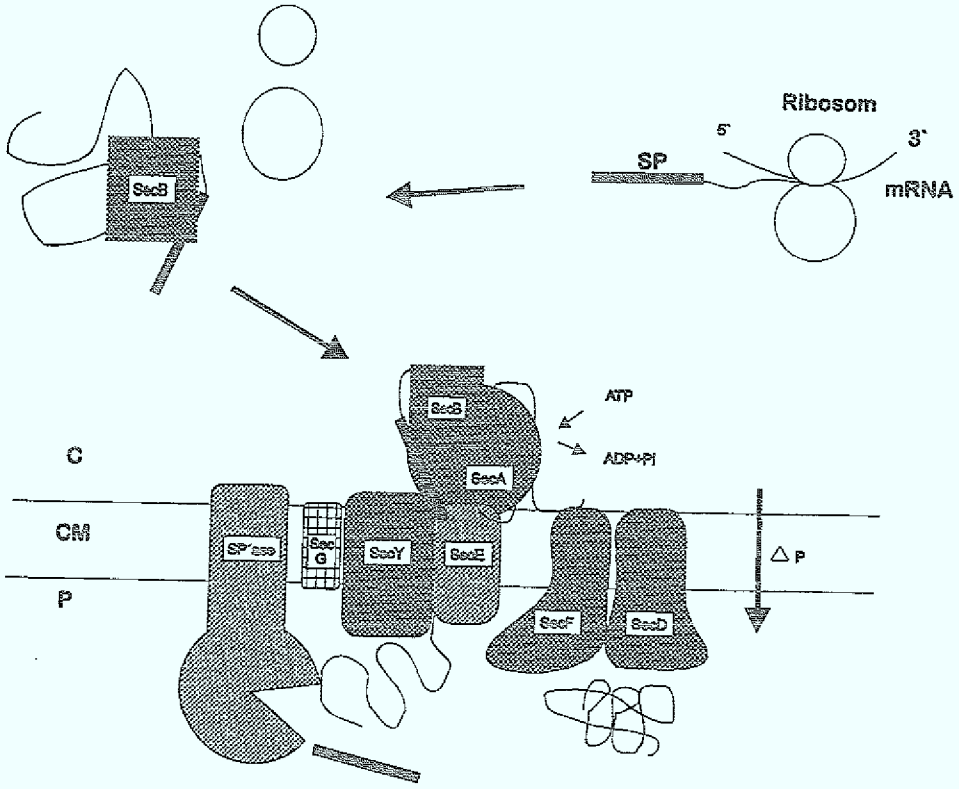


Abb. 1: Modell für die Translokation von Proteinen über die Cytoplasmamembran von *E.coli*. C: Cytoplasma, CM: Cytoplasmamembran, P: Periplasma, SP: Signalpeptid, SP`ase: Signalpeptidase, ΔP: Membranpotential. Das SecB-Protein bindet während oder nach der Synthese an das Exportprotein. Der Komplex aus SecB und Vorläuferprotein bindet seinerseits mit hoher Affinität an das membranassoziierte SecA-Protein. Die Bindung und Hydrolyse von ATP durch SecA führt zur Initiation der Translokation und zur Auflösung des Initiationskomplexes verbunden mit der Freisetzung des Vorläuferproteins von SecA und SecB. Das Signalpeptid wird durch die Signalpeptidase abgespalten und die weitere Translokation des Exportproteins durch das Membranpotential vorangetrieben. Die Loslösung des exportierten Proteins von der Membran erfolgt wahrscheinlich durch das SecD- und SecF-Protein.

Der Transport von Proteinen kann bei Bakterien zu verschiedenen Zeitpunkten der Proteinsynthese stattfinden. Die Proteine können dabei cotranslational (während der Synthese), posttranslational (nach der Synthese) oder sowohl co- als auch posttranslational exportiert werden (Smith et al. 1977, Smith 1980). Unabhängig vom Exportmodus muß das Exportprotein in einer lose gefalteten, transportkompetenten Konformation vorliegen, um mit dem Exportapparat funktionell in Wechselwirkung treten zu können (Weiss et al. 1988, Kusters et al. 1989). Da sich jedoch schon die wachsende Proteinkette spontan zu falten beginnt, müssen schon während der Synthese Chaperone an das Protein binden, um es in einer lose gefalteten Konformation zu halten.

Chaperone, für die ein Einfluß auf den Proteinexport nachgewiesen wurde, sind zum einen die eher unspezifisch wirkenden und zu den Hitzeschockproteinen gehörenden **GroEL/S-**, **DnaK-** und **DnaJ-**Proteine und zum anderen das exportspezifische **SecB**-Protein (Altman et al. 1991, Wild et al. 1992). Das im Cytoplasma löslich vorkommende SecB-Protein, das von allen bekannten Chaperonen den größten Einfluß auf den Proteinexport besitzt, hat ein Molekulargewicht von 16 kDa und bildet in seiner funktionellen Form ein Homotetramer (Kumamoto 1989, Kumamoto u. Nault 1989, Watanabe u. Blobel 1989a,b). Die Untersuchungen an *secB*$^-$-Mutanten zeigten, daß SecB für schnell wachsende Zellen mit einer hohen Proteinexportrate essentiell ist. Es beeinflußt dabei den Transport von vielen, jedoch nicht von allen Exportproteinen. Als typische von SecB-abhängige Exportproteine, deren Export in *secB*-defizienten Stämmen stark verlangsamt ist, gelten der Lambdarezeptor LamB, das äußere Membranprotein OmpA und das Maltosebindeprotein MalE, während das Ribosebindeprotein, die ß-Laktamase und die alkalische Phosphatase auch ohne SecB effizient exportiert werden können (Kumamoto u. Beckwith 1983, 1985, Kumamoto u. Gannon 1988, Collier et al. 1988, Kumamoto 1989). Durch Überexpression der Hitzeschockchaperone kann der Exportdefekt von *secB*$^-$-Mutanten komplementiert werden, wobei diese offensichtlich ebenfalls an die Vorläuferproteine binden und ihre Transportkompetenz zumindest teilweise erhalten (Altman et al. 1991, Wild et al. 1992). Die Bindung von SecB an das Vorläuferprotein findet wahrscheinlich sowohl im Bereich des Signalpeptids wie auch im reifen Teil des Proteins statt. Einerseits kann die Deletion eines großen Teils des hydrophoben Bereiches des Signalpeptids zum Verlust der Bindungsfähigkeit für SecB führen (Watanabe u. Blobel 1989a, Altman et al. 1990), andererseits deuten die Untersuchungen u.a. an Deletionsmutanten des OmpA- und des PhoE-Proteins auf die präferenzielle Bindung von SecB an ß-Faltblattstrukturen im reifen Teil des Exportproteins hin (MacIntyre et al. 1991, de Cock et al. 1992). Es wird jedoch auch die Möglichkeit diskutiert, daß das Signalpeptid die Faltung des Vorläuferproteins so beeinflußt, daß der Bindungsbereich für SecB im reifen Teil des Proteins exponiert wird (Weiss u. Bassford 1990).

Neben der Erhaltung der Transportkompetenz hat das SecB-Protein die Aufgabe, das Vorläuferprotein zum Translokatorkomplex in der Membran zu leiten ("Targeting"-Funktion). Der Komplex aus Vorläufer und SecB bindet dabei mit hoher Affinität an das SecA-Protein, wobei

es zur Ausbildung des Initiationskomplexes der Translokation kommt (Watanabe u. Blobel 1989b, Hartl et al. 1990). Die Bildung des Komplexes aus SecB, dem Vorläuferprotein und SecA erfolgt in erster Linie an der Membran, kann jedoch zum Teil auch schon im Cytoplasma stattfinden (Hartl et al. 1990, Cabelli et al. 1991, Chun u. Randall 1994, Economou u. Wickner 1994).

Das SecA-Protein hat als zentrale Komponente des Proteinexportapparates die Funktion, die Exportproteine in den Translokator in der Cytoplasmamembran einzuschleusen. Es hat ein Molekulargewicht von 102 kDa und kann in der Zelle sowohl als lösliches, membranassoziertes oder auch membraneingelagertes Protein auftreten (Cabelli et al. 1991). In-vitro-Studien von Driessen (1993) zeigten, daß das SecA-Protein während seiner Aktivität wahrscheinlich zu Dimeren, möglicherweise auch zu höheren Oligomeren zusammentritt. Ein Hauptcharakteristikum von SecA ist seine Fähigkeit, ATP zu binden und zu hydrolysieren, weshalb es auch als Translokations-ATP-ase bezeichnet wird (Lill et al. 1989). Es besitzt mindestens eine, möglicherweise aber bis zu drei ATP-Bindungsstellen, von denen eine im N-terminalen Bereich des Proteins nachgewiesen wurde und die typische Konsensussequenz für ATP-Bindungsstellen besitzt (Schmidt et al. 1988, Lill et al. 1989, Mitchell u. Oliver 1993). Die intrinsische ATP-ase-Aktivität des SecA-Proteins wird durch die Ausbildung des Initiationskomplexes um das acht- bis zehnfache stimuliert. Für diese Aktivierung ist die Wechselwirkung von SecA mit dem Vorläuferprotein sowie sauren Phospholipiden und dem SecY/E-Protein in der Membran notwendig (Lill et al. 1989, 1990). Die Energie von ATP wird dazu genutzt, die ersten Schritte der Proteintranslokation durchzuführen. Trifft das Vorläuferprotein mit dem SecA-Protein an der Membran zusammen, so erhöht sich die Affinität von SecA für ATP. Die Bindung von ATP an das SecA-Protein führt zu einer Konformationsänderung, die die Insertion einer ca. 30 kDa großen Domäne des SecA-Proteins in die Membran und die gleichzeitige partielle Translokation von ca. 20 Aminosäuren des Vorläuferproteins zur Folge hat. Zu diesem Zeitpunkt dissoziiert das SecB-Protein vom Initiationskomplex ab. Durch die Hydrolyse von ATP löst sich das Vorläuferprotein vom SecA und wird an den eigentlichen Translokator in der Membran übergeben. Gleichzeitig wird das SecA-Protein wieder von der Membran freigesetzt (Hartl et al. 1990, Chun u. Randall 1994, Economou u. Wickner 1994). Die weitere Translokation des Vorläuferproteins wird hauptsächlich durch das Membranpotential getrieben (Schiebel et al. 1991, Driessen 1992). Durch Zugabe von Ionophoren kann die Translokation sowohl in-vivo wie auch in-vitro blockiert werden. Beim OmpA-Protein führt die Inaktivierung von SecA nach der Initiation der Translokation nicht zu einer Blockierung der Translokation, während in anderen Fällen das SecA-Protein auch noch für die Translokation weiterer Teile des reifen Proteins erforderlich ist. Weiterhin zeigten In-vitro-Untersuchungen, daß das Fehlen eines Membranpotentials durch große Mengen an ATP kompensiert werden kann (Chen u. Tai 1986, Yamada et al. 1989, Arkowitz et al. 1993). Der Mangel an ATP während der Translokation führt zu Intermediaten von teilweise translokierten Proteinen, die durch erneute Zugabe von ATP vollständig über die Membran transportiert werden (Tani et al. 1989). Es ist

daher sehr wahrscheinlich, daß das SecA-Protein während der Translokation einen wiederholten Zyklus von Membraninsertion und -deinsertion durchlaufen kann und auf diese Weise den Export von Vorläuferproteinen bewirkt.
Für *E.coli* konnte gezeigt werden, daß SecA wie andere ATP-asen durch Azid gehemmt wird und daß es mit der höchsten Empfindlichkeit gegenüber Azid den Hauptangriffspunkt für die Wachstumshemmung durch Azid darstellt. Durch Mutationen im *secA*-Gen kann der durch Azid hervorgerufene letale Block im Proteinexport wieder aufgehoben werden, so daß die Zellen in der Lage sind, in Anwesenheit von Azid zu wachsen (Fortin et al. 1990, Oliver et al. 1990).
Die Synthese des SecA-Proteins, dessen Gen in einem aus den Genen genX-*secA*-mutT bestehenden Operon liegt, richtet sich nach den Anforderungen des Proteinexportes (Schmidt et al. 1988, 1991). Mutationen in den Komponenten des Proteinexportapparates sowie die Überproduktion von Exportproteinen können zu einer bis zu zwanzigfach erhöhten Menge von SecA in der Zelle führen. Das SecA-Protein, das in einem Bereich zwischen *genX* und *secA* an die eigene mRNA bindet, diffundiert bei hohem Bedarf an SecA von der mRNA ab und ermöglicht somit seine eigene Translation (Dolan et al. 1991, Schmidt et al. 1991).
Der integrale Teil des Proteinexportapparates besteht insgesamt aus sechs Proteinen: SecE, SecY, SecG, SecD, SecF sowie Signalpeptidase. Die zentralen Komponenten des Translokators in der Membran sind das SecY- und SecE-Protein, die sehr wahrscheinlich den eigentlichen Protein-führenden Kanal bilden. Das SecY-Protein hat ein Molekulargewicht von 49 kDa und durchspannt mit 10 hydrophoben Helices die Membran (Akiyama u. Ito 1987, Ito 1992). Das *secY*-Gen ist zusammen mit 11 weiteren Genen, die für ribosomale Proteine kodieren, im sog. *spc*-Operon organisiert, und seine Translation ist mit der des vor ihm liegenden L15-Protein gekoppelt (Cerreti et al. 1983). Viele verschiedene Mutationen im *secY*-Gen, die mit Signalsequenzmutanten des LamB-Proteins isoliert wurden, deuten auf eine enge Wechselwirkung des SecY-Proteins mit dem Signalpeptid hin (Emr et al. 1981, Osborne u. Silhavy 1993). Ebenso weisen "Photocrosslinking"-Experimente, die zur Vernetzung von Signalpeptiden mit dem SecY-Protein führten, auf eine enge Nachbarschaft von Signalpeptid und SecY während der Translokation hin (Joly u. Wickner 1993). Die Funktion von SecY erfordert ein Zusammenwirken mit dem SecE-Protein. Das *secE*-Gen liegt zusammen mit dem *nusG*-Gen in einem Operon und kodiert für ein 13,6 kDa großes Protein (Schatz et al. 1989, Downing et al. 1990). Von den drei Transmembranbereichen des SecE-Proteins ist lediglich der letzte Bereich mit der davor liegenden cytoplasmatischen Schleife für die Funktion essentiell (Schatz et al. 1991). Wie auch beim SecY kann durch Mutationen im *secE*-Gen der Exportdefekt von Signalsequenzmutanten behoben werden (Stader et al. 1989). In der Arbeitsgruppe von Silhavy wurde in genetischen Untersuchungen die direkte Wechselwirkung von SecY und SecE gezeigt (Bieker u. Silhavy 1990, Bieker-Brady u. Silhavy 1992). Darüber hinaus können SecY und SecE zusammen in einem Komplex aufgereinigt werden. Durch Immunfällung mit Antikörpern gegen das SecY- bzw. SecE-Protein kann jeweils auch das

SecE- bzw. SecY-Protein copräzipitiert werden (Joly et al. 1994). Bei der Aufreinigung des Translokators wurde zusätzlich noch ein weiteres Protein von 12 kDa identifiziert, das zusammen mit SecY und SecE im Komplex vorliegt (Nishiyama et al. 1993, Joly et al. 1994). Dieses Protein, das mit dem schon früher beschriebenen Bande I-Protein identisch ist, wird durch das *secG*-Gen kodiert und besitzt zwei oder drei Transmembranbereiche (Nishiyama et al. 1993). Die biochemischen Untersuchungen lassen vermuten, daß seine Aufgabe hauptsächlich in der Stabilisierung des Translokators in der Membran liegt. Genetische Untersuchungen zeigten, daß das SecG-Protein für den Proteinexport nur bei niedrigen Temperaturen (25°C) essentiell ist. Es kann jedoch im in-vitro-Translokationssystem den Proteinexport deutlich verbessern (Nishiyama et al. 1993, 1994).

Die Funktion im Proteinexport zweier weiterer Sec-Faktoren, des **SecD**- und des **SecF**-Proteins, ist ebenfalls noch nicht eindeutig geklärt. Ihre Gene sind die einzigen Gene von Exportkomponenten, die zusammen in einem Operon liegen. Zu diesem Operon gehören außerdem noch fünf weitere Gene, von denen zwei als *queA*- und *tgt*-Gen identifiziert worden sind (Gardel et al. 1990, Reuter et al. 1991). SecD und SecF sind integrale Membranproteine von 67 bzw. 35 kDa (Gardel et al. 1990). Wie beim *secA*- und *secB*-Gen lassen sich durch die Expression letaler Fusionsproteine Mutationen im *secD*- und *secF*-Gen induzieren. Vielfältige genetische Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von T. Silhavy sowie die Existenz von großen periplasmatischen Domänen sprechen für eine Funktion bei späten Schritten des Proteinexportes (Gardel et al. 87, Bieker-Brady u. Silhavy 1992). Die Zugabe von SecD-Antikörpern hemmt bei Spheroplasten die Freisetzung der prozessierten Proteine, was für einen Einfluß von SecD/F auf die Faltung der exportierten Proteine spricht (Matsuyama et al. 1993). Darüber hinaus deutet die Existenz von konditional-letalen Mutanten von *secD* und *secF* auf ihre Notwendigkeit für das Überleben der Zelle hin. Trotzdem ließ sich ihre Beteiligung am Proteinexport in-vitro bisher nicht nachweisen (Matsuyama et al. 1992, Pogliano u. Beckwith 1994). Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich darin, daß im in-vitro-Translokationssystem nicht unterschieden werden kann, ob prozessierte Proteine an die Membran assoziert sind oder sich frei in Lösung befinden.

Die beim Export des Vorläuferproteins stattfindende Abspaltung des Signalpeptids (Prozessierung) erfolgt durch die **Signalpeptidasen**. Man unterscheidet die Signalpeptidase I **(LepB)**, die für die Prozessierung von nicht-modifizierten Exportproteinen zuständig ist, von der Signalpeptidase II **(LspA)**, die für die Prozessierung von Lipoproteinen verantwortlich ist (Fikes et al. 1990, Munoa et al. 1991). LepB hat eine Größe von 37 kDa und besitzt zwei Transmembrandomänen, während LspA eine Größe von 18 kDa und vier Transmembrandomänen aufweist (Date u. Wickner 1981, Innis et al. 1984). Sie sind in ihrer Funktion nicht austauschbar, da sie unterschiedliche Erkennungssequenzen besitzen (Hayashi u. Wu 1990). Die Prozessierung der Vorläuferproteine erfolgt während oder kurz nach der Translokation und ist für die Loslösung des Exportproteins vom Translokator und der Membran notwendig. Das OmpA- und das MalE-Protein werden bei Abwesenheit der Signalpeptidase I zwar über

die Cytoplasmamembran transportiert, bleiben jedoch mit dem Signalpeptid an der Außenseite der Membran verankert (Dalbey u. Wickner 1985).
Darüber hinaus wurden Komponenten identifiziert, die Homologien zu zwei Bestandteilen des eukaryontischen SRP ("signal recognition particle") aufweisen. Es handelt sich hierbei um die **4,5S-RNA** und das **Ffh**-Protein ("fifty four homologue"), die der 7S-RNA bzw. dem 54 kDa-Protein des SRP homolog sind. Das Fehlen der 4,5S-RNA und des Ffh-Proteins führt in *E.coli* zu Wachstums- und Proteinexportdefekten (Phillips u. Silhavy 1992), die durch die entsprechenden eukaryontischen Faktoren partiell komplementiert werden können, während umgekehrt ein Hybrid-SRP aus bakteriellen und eukaryontischen Komponenten in einem eukaryontischen in-vitro-Translokationssystem zum Teil funktionell ist (Poritz et al. 1988, 1990, Bernstein et al. 1989, Römisch et al. 1989). Dieser SRP-homologe Weg stellt wahrscheinlich eine Alternative zum SecB dar, der jedoch ebenfalls von den übrigen Sec-Faktoren (SecA/E/Y/G) abhängig ist (Phillips u. Silhavy 1992). Weiterhin besitzt das **FtsY**-Protein von *E.coli* Ähnlichkeit zur α-Untereinheit des Docking-Proteins, welches zur Bindung des SRP an die ER-Membran dient, und die α- bzw. γ-Untereinheiten des Sec61-Proteinkomplexes weisen signifikante Ähnlichkeiten zum SecY- bzw. SecE-Protein auf (Römisch et al. 1989, Stirling et al. 1992). Ferner hat die Signalpeptidase der Eukaryonten die gleiche Erkennungssequenz wie die Signalpeptidase I, besteht jedoch im Gegensatz zu dieser aus mehreren Untereinheiten (Watts et al. 1983, Böhni et al. 1988).
Die Sekretion von Proteinen ins umgebende Medium ist bei den Gram-negativen Bakterien wegen der äußeren Membran von zusätzlichen Sekretionsfaktoren abhängig. Daher ist die Zahl von sekretorischen Proteinen bei Gram-negativen Bakterien sehr beschränkt.
Im Gegensatz dazu sind Gram-positive Bakterien in der Lage, viele verschiedene Proteine in großen Mengen in das umgebende Kulturmedium zu sekretieren. Auf Grund dieser Eigenschaft werden die Gram-positiven Bakterien schon seit langem für die industrielle Gewinnung von Enzymen genutzt (Priest 1977, 1989). Bei der Überproduktion und der Sekretion von heterologen Proteinen können jedoch verschiedene Probleme auftreten. Zum Einen können Inkompatibilitäten zwischen dem Exportprotein und dem heterologen Exportapparat die Sekretion des Proteins behindern (Puohiniemi et al. 1992). Ferner kann die Überproduktion eines potentiell exportierbaren Proteins eine Überlastung der Exportmaschine zur Folge haben, was zum Absterben der Zelle führen kann (Palva et al. 1982, Saunders et al. 1987). Um die Ursachen für die Limitierungen im Proteinexport der Gram-positiven Bakterien erkennen und gezielt umgehen zu können, ist es notwendig, den Mechanismus des Proteinexportes bei dieser Klasse von Mikroorganismen im Detail zu untersuchen.

Der Proteinexportapparat von *B.subtilis*

Ebenso wie bei Eukaryonten und Gram-negativen Bakterien werden Exportproteine bei Gram-positiven Bakterien mit einem N-terminalen Signalpeptid synthetisiert, das nach dem Membrandurchtritt durch spezifische Signalpeptidasen vom reifen Teil des Proteins abgespalten wird.

Die Signalpeptidase von *B.subtilis* (SipS), ein Protein von 21 kDa, besitzt signifikante Sequenzhomologie zur *E.coli* Signalpeptidase I sowie zu einer Untereinheit des eukaryontischen Signalpeptidase Komplexes (van Dijl et al. 1992). Anders als bei *E.coli* ist die Signalpeptidase SipS in *B.subtilis* nicht essentiell, was auf die Existenz weiterer Signalpeptidasen hindeutet.

Die gezielte Suche nach *sec*-homologen Faktoren erfolgte über die Ähnlichkeit ihrer Gene zu den *E.coli sec*-Genen und führte bei *B.subtilis* zur Identifizierung der *secA*-, *secY*- und *secE*-Gene (Suh et al. 1990, Overhoff et al. 1991, Joeng et al. 1993). Die erste Exportkomponente, die so nachgewiesen werden konnte, war das SecY-Protein, dessen Gen zur gleichen Zeit auch bei der Sequenzierung des spc-Operons von *B.subtilis* identifiziert wurde (Nakamura et al. 1990, Suh et al. 1990). Das *B.subtilis* SecY-Protein besitzt, analog zum *E.coli* SecY, eine aus 10 Transmembranbereichen bestehende Membrantopologie (Suh et al. 1990). Obwohl durch die Expression des *B.subtilis secY*-Gens in *E.coli secY*-Mutanten eine Verbesserung des Proteinexportes erreicht werden kann, wird der Wachstumsdefekt dieser Mutanten durch das heterologe *secY*-Gen nicht komplementiert (Nakamura et al. 1990).

Ähnlich wie bei den *secY*-Genen zeigen die in der Nähe des *secE*-Gens von *B.subtilis* gefundenen Gene *rpmG*, *secE*, *nusG*, *rplK* und *rplA*, die für Transkriptions- und Translationsfaktoren kodieren, eine im Vergleich zu *E.coli* konservierte Anordnung auf dem Chromosom (Jeong et al. 1993). Die Hydrophobizitätsanalyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz ergab eine große Ähnlichkeit des *B.subtilis* SecE-Proteins mit dem c-terminalen Transmembranbereich des *E.coli* SecE-Proteins, der für dessen Funktion von entscheidender Bedeutung ist (Murphy u. Beckwith 1994).

Neben den integralen Membrankomponenten des Translokators wurde bei *B.subtilis* auch ein *secA*-homloges Gen identifiziert (Overhoff et al.1991, Sadaie et al. 1991). In-vitro-Untersuchungen ergaben, daß das 90 kDa große *B.subtilis* SecA-Protein ähnliche Eigenschaften wie das *E.coli* SecA-Protein besitzt (Takamatsu et al. 1992, van der Wolk 1993). Darüber hinaus ist das *B.subtilis* SecA, wenn auch nur eingeschränkt, in der Lage, den Wachstums- und Proteinexportdefekt von *E.coli secA*-Mutanten zu komplementieren (Overhoff et al. 1991, Klose et al. 1993). Außer durch die gezielte Suche wurde das *secA*-Gen auch als sog. *div*-Gen identifiziert, welches nicht nur für den Proteinexport sondern auch für die Sporulation und Kompetenzentwicklung von Bedeutung ist (Sadaie et al. 1991).

Homologe Faktoren zum SecD- und SecF-Protein wurden bislang in *B.subtilis* noch nicht nachgewiesen. Es existieren jedoch Faktoren bei Gram-positiven Bakterien, die eine entsprechende Funktion übernehmen könnten. Das *prsA*-Gen von *B.subtilis* wurde über Mutationen identifiziert, die zu einer reduzierten Sekretion von überproduzierter α-Amylase führen (Kontinen u. Sarvas 1988). Darüber hinaus führt die Ausschaltung des *prsA*-Gens zu einer reduzierten Sekretion von Proteasen, wobei PrsA für das Überleben der Zelle jedoch nicht essentiell ist (Kontinen et al. 1991). Da PrsA als ein Lipoprotein an der Außenseite der Membran verankert ist, wird angenommen, daß es die Faltung exportierter Proteine beeinflußt.

Die Existenz eines in Funktion und Struktur ähnlichen Proteins bei *Lactococcus lactis*, das *PrtM*-Protein, deutet darauf hin, daß bei Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien möglicherweise unterschiedliche Faktoren an den späten Schritten des Proteinexportes beteiligt sind (Haandrikman et al. 1991).

Der Grund, warum Untersuchungen zum Proteinexport bei Gram-positiven Bakterien bei *B.subtilis* durchgeführt wurden, liegt darin, daß gentechnische Methoden vor allem bei *B.subtilis* gut etabliert sind. Da jedoch bei *B.subtilis* der Proteinexport durch den Wachstumszyklus stark beeinflußt ist, wurden systematische Untersuchung zum Proteinexport auf das Gram-positive Bakterium *Staphylococcus carnosus*, das keinen vergleichbaren Wachstumszyklus zeigt, ausgeweitet. Hierbei wurden homologe Faktoren zum SecY- und SecE-Protein in *S.carnosus* nachgewiesen. Ihre Aminosäuresequenzen zeigen große Übereinstimmungen mit dem SecY bzw. SecE von *B.subtilis*, während die Ähnlichkeit zum SecY- bzw. SecE-Protein von *E.coli* geringer sind. Untersuchungen zur heterologen Komplementation von *E.coli sec*-Mutanten zeigten im Fall des SecY-Proteins, daß zwischen den Exportkomponenten von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien offensichtlich signifikante Unterschiede bestehen, die ihre Funktionalität im heterologen System einschränken (Tschauder et al. 1992, Tschauder 1993, Meens et al. 1993).

Ziel der Arbeit:

Im ersten Teil der Arbeit sollte ein Gen aus dem Gram-positiven Bakterium *S.carnosus* isoliert werden, das zum secA-Gen von *E.coli* und *B.subtilis* homolog ist. Der Vergleich der beiden Gram-positiven SecA-Proteine mit dem *E.coli* SecA sollte Hinweise darauf liefern, ob und wo Unterschiede zwischen den Exportapparaten der Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien vorkommen und welche Auswirkungen diese Unterschiede auf den Export heterologer Proteine haben.

Im zweiten Teil sollte eine azidresistente Mutante von *B.subtilis* isoliert und die für die Resistenz verantwortliche Mutation charakterisiert werden. Hierdurch sollte die Frage geklärt werden, ob das SecA-Protein in *B.subtilis* analog der Situation in *E.coli* den Hauptangriffspunkt für die wachstumshemmende Wirkung von Azid darstellt und ob diese Hemmung auf einer Beeinflussung des Proteinexportes beruht.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaar
Ci	Curie
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat (N steht für eines der Nukleoside A: Adenosin, C:Cytidin, G: Guanosin, T: Thymidin)
ddNTP	Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
h	Stunden
IPTG	Isopropyl-ß-D-Thiogalaktopyranosid
kB	Kilobasen (=1000 Basenpaare Bp)
kDa	Kilo Dalton
mA	Milliampère
min	Minuten
µl/ml	Microliter/Milliliter
µg/ml	Microliter/Milliliter
NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid
OD600	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
RSA	Rinderserum-Albumin
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunden
SDS	Natrium-dodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
ü.N.	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
X-Phosphat	5-Brom-4-Chloro-2-Indolyl-Phosphat

Ein-Buchstaben Code der Aminosäuren

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

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme, Phagen und Plasmide

Tab. 2: In der Arbeit verwendete Bakterienstämme

		Genotyp	Referenz
Bacillus licheniformis	DSM13	Wildtyp	Smith et al. (1964)
Staphylococcus carnosus	TM300	Wildtyp	Schleifer u. Fischer (1982)
Bacillus subtilis	DB104	*his, nprR2, nprE18, ΔaprA3*	Kawamura u. Doi (1984)
	NIG1121	*met, his*	Sadaie u. Narui (1976)
	NIG1152	*met, his, div341*^{ts}	Miyakawa u. Komano (1981)
Escherichia coli	JM109	*mcrA, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, Δ(lac-proAB), F`[traD36, proAB*$^{+}$*, laqI*^{q}*ZΔM15]*	Yanisch-Perron et al. (1985)
	MC4100	*araD39, (argF-lac), U169, relA51, rps150*$^{-}$*, flbB5301, deoC1, ptsF25*	Casadaban (1976)
	MM66	MC4100(*genX*^{amb}*, supF*^{ts}*, Tn10, trp*^{amb})	Oliver u. Beckwith (1982)
	BA13	MC4100(*secA*^{amb}*, supF*^{ts}*, trp*^{amb}*, zch::Tn10*	Cabelli et al. (1988)
	BHB2688	*N205, recA, Lamda[imm434, cIts, b2, red3, EAM4, Sam]*	Hohn (1979)
	BHB2690	*N205, recA, Lamda[imm434, cIts, b2, red3, Dam15, Sam7]*	Hohn (1979)

Tab. 3: In der Arbeit verwendete Plasmide und Bakteriophagen

Plasmid	Resistenz	klonierte Gene	Referenz
pUC18/pUC19	amp	-	Vieira u. Messing (1982)
pTrc99a	amp	-	Amann et al. (1988)
pHSG576	cm	-	Takeshita et al. (1987)
pHC79	amp, tet	-	Hohn u. Collins (1980)
pWH1520	amp (*E.coli*) tet (*B.subtilis*)	-	Rygus u. Hillen (1991)
pMKL18	amp	$secA_{E.c.}$	Klose etal. (1991)
pMKL40	amp	$secA_{B.s.}$	Klose et al. (1991)
pJM20	cm	ompA	Meens et al. (1993)
pLipPS1	cm	lipase	Popp (1986)
PBS1	allgem. transduzierender *B.subtilis* Phage		O'Kane et al. (1985)

amp: Ampicillin-Resistenz, cm: Chloramphenicol-Resistenz, tet: Tetracyclin-Resistenz

2.2. Medien und Lösungen

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

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

M9-Medium (Miller 1972): pro l:
6g Na_2HPO_4
3g KH_2PO_4
0,5g NaCl
1g NH_4Cl
pH 7,3

autoklaviert und steril zugesetzt:
1ml 1M $MgSO_4$
1ml 100mM $CaCl_2$
40ml 10% Glukose

Agarplatten enthielten 1,5% Agar, **Weichagar** 0,8%.

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

4*SP-Medium: pro l:

56g K_2HPO_4
24g KH_2PO_4
8g $(NH_4)_2SO_4$
4g Na_3-Citrat*$2H_2O$
4g Hefeextrakt
0,8g $MgSO_4$*$7H_2O$
0,8g Casamino Acids
pH 7,2

SPI-Medium: Das 4*SP-Medium wurde mit H_2O (dest.) 1:4 verdünnt. 0,5% Glukose und falls notwendig 50µg/ml Aminosäuren wurden steril zugesetzt.

SPII-Medium: SPI ohne Zugabe von Aminosäuren

Sporulationsmedium (Schaeffer et al. 1965): pro l:

8g Nuthrient Broth
1g KCl
0,25g $MgSO_4$*$7H_2O$
17g Agar
980ml H_2O

autoklaviert und steril zugesetzt:

10ml 100mM $Ca(NO_3)2$
1ml 10mM $MnCl_2$
1ml 1mM $FeSO_4$

Medien und Lösungen zur Transduktion von *B.subtilis* (Cutting u. Horn 1990)

10*TSS (Tris Spizizen salts): pro l:

20g NH_4CL
3,5g K_2HPO_4*$3H_2O$
60g Tris/HCl
pH 7,5

TSS-Agar: pro l:

100ml 10*TSS
870ml H_2O
7g od. 15g Agar

autoklaviert und steril zugesetzt:

10ml $MgSO_4$ (0,1 M)
10ml FeCl(0,4%)/Na_3Citrat(0,4%)
10ml 50% Glukose

falls erforderlich mit 50µg/ml Aminosäuren supplementiert

T-Base: pro l:

2g $(NH_4)_2SO_4$
18,3g K_2HPO_4*$3H_2O$
6g KH_2PO_4
1g Na_3Citrat*$2H_2O$

BHIB (brain heart infusion broth) und **PAB (Penassay broth** entspricht **Bacto-antibiotic medium III)** Fertigmedien wurden wie vom Hersteller angegeben angesetzt.

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

S7 Minimalmedium:	20mM K-Phoshat-Puffer, pH 7 20mM Na-Glutamat, pH 7 10mM $(NH_4)_2SO_4$ 2mM $MgCl_2$ 0,7mM $CaCl_2$ 50µM $MnCl_2$ 5µM $FeCl_3$ 1µM $ZnCl_3$ 2µM Thiamin 100mM Glukose

2.3. Verwendete Reagenzien und Bezugsquellen

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

2.4. Mikrobiologische Methoden

2.4.1. Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung erfolgte, wenn nicht gesondert aufgeführt, in LB-Vollmedium bei 37°C für Wildtyp-Stämme und bei 30°C bei temperatursensitiven Stämmen. Für die Selektion auf Antibiotikaresistenz wurden, falls nicht gesondert aufgeführt, folgende Konzentrationen verwendet: Ampicillin 50µg/ml, Tetracyclin 15µg/ml, Kanamycin 40µg/ml und Chloramphenicol 30µg/ml. Zur Anzucht von *B.subtilis* in Mineralsalz-Medium wurde bei DB104 50µg/ml Histidin, bei NIG1121 und NIG1152 50µg/ml Histidin sowie 50µg/ml Methionin zugesetzt. Die Inkubation in Flüssigmedium wurde bei einem Volumen bis zu 5ml in einem Reagenzglasschüttler bei 200 upm, bei einem Volumen über 10ml auf einem Schüttler in Erlenmeyerkolben bei 130 upm durchgeführt.

2.4.2. Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte in Form von Glyzerinflüssigkulturen. ÜNK wurden zu 50% mit Glyzerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Die kurzfristige Aufbewahrung von Stämmen erfolgte bei *B.subtilis* auf Sporulationsmedium-Agarplatten und bei *E.coli* und *S.carnosus* auf Mineralsalzmedium-Agarplatten.

2.4.3. Transformation von Bakterien

Transformation von *E.coli* Stämmen (Cohen et al. 1972)

LB-Medium wurde aus einer ÜNK zu einer OD600 von 0,05 angeimpft und bis zur OD600 von 0,6 inkubiert. Die Temperatur betrug für temperatursensitive Stämme 30°C, für die übrigen 37°C. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 upm und 4°C geerntet, in 0,5 Volumen eiskalter, 50mM $CaCl_2$-Lösung resuspendiert und für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in 0,1 Volumen eiskalter 50mM $CaCl_2$-Lösung resuspendiert und noch einmal für 60 min auf Eis inkubiert.

0,5-1µg Plasmid-DNA wurde dann zu 100µl kompetenten Zellen hinzugegeben und 30 min auf Eis gehalten. Der anschließende Hitzeschock wurde 90 sek bei 42°C durchgeführt. Zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz wurde der Ansatz nach Zugabe von 2ml LB-Medium (+0,5% Glukose) für 60 min bei 30°C bzw. 37°C unter guter Belüftung inkubiert. Aliquots (50-100µl) wurden auf Selektionsagarplatten ausplattiert. Zur Aufbewahrung der kompetenten Zellen wurde die Zellsuspension zu 10% mit Glyzerin versetzt, in 200µl Aliquots schockgefroren und zwei bis drei Monate bei -70°C gelagert. Für eine Transformation wurden die Aliquots auf Eis aufgetaut und die DNA zugegeben (s.o.).

Transformation von *B.subtilis* Stämmen (variiert nach Sadaie u. Kada 1983)

Aus einer ÜNK des Rezipientenstammes in PAB (Penassay broth) wurde SPI-Medium angeimpft und falls erforderlich mit 50µg/ml Methionin und Histidin supplementiert. Die Kultur wurde bis zum Ende der exponentiellen Phase bei 130 upm im Erlenmeyerkolben mit Schikanen inkubiert und 1:10 in SPI mit 0,5mM $CaCl_2$ und 2,5mM $MgCl_2$ verdünnt. Nach 2-3 h weiterer Inkubation (s.o.), beim Übergang von spätexponentieller in die stationäre Wachstumsphase, wurden für die Wildtyp Stämme DB104 und NIG1121 ca. 1µg, für NIG1152 und MIK10 5-10µg Plasmid-DNA mit 1ml kompetenter Zellen vermischt und 1 h bei 110 upm weiterinkubiert. Dem Ansatz wurde 3ml LB-Medium (0,5% Glukose) zugesetzt und bei 130 upm für 1,5-2 h inkubiert. Die Zellen wurden nach Zentrifugation (Heraeus, 15 min, RT, 5000 upm) in 0,5ml LB-Medium aufgenommen und auf LB-Selektionsplatten mit 5µg/ml Tetracyclin oder Chloramphenicol ausplattiert. Nach 24 h Inkubation wurden die Kolonien auf LB-Agarplatten bei erhöhter Antibiotikakonzentration (30µg/ml) auf ihre Resistenz getestet.

2.4.4. In-vitro-Verpackung und Transfektion einer Cosmidgenbank von *Staphylococcus carnosus* TM300

Cosmidgenbank von *Staphylococcus carnosus* TM300

Für diese Genbank wurde chromosomale DNA von TM300 partiell mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* verdaut und in den mit *BamHI* linearisierten Vektor pHC79 ligiert. Die durchschnittliche Insertgröße lag bei 26000 bp. Die Wahrscheinlichkeit, daß das gesamte Genom von TM300 kloniert wurde, liegt bei 99,99% (Overhoff 1991).

Herstellung von in-vitro-Verpackungsmixen (Hohn 1979)

Das Cosmid pHC79 besteht aus Teilen des Vektors pBR322 und einem Bereich des Phagen λ einschließlich der "cos"-Stellen, die zur Verpackung des Cosmides in λ-Phagenköpfe notwendig sind. Die zur Herstellung der Verpackungsmixe benutzten Stämme BHB2688 und BHB2690 sind λ-lysogene Stämme, die jedoch die Phagenkomponenten E bzw. D nicht synthetisieren können und daher getrennt nicht in der Lage sind, komplette Phagenköpfe zu bilden. Durch die Vereinigung von Aufschlüssen der beiden Stämme in Anwesenheit von Cosmid-DNA ist es möglich, die Cosmide in die intakten Phagenköpfe einzuschließen.

Für beide Stämme wurden aus einer ÜNK 250ml LB-Medium zu einer OD600 von 0,1 angeimpft und bei 30°C und 130 upm bis zu einer OD600 von 0,3 inkubiert. Die Synthese der Phagenproteine wurde durch 15 min Inkubation im Wasserbad bei 45°C induziert und bei 37°C und 130 upm auf dem Schüttler fortgesetzt. Bei einer OD600 von 0,7 (BHB2688) bzw. 1 (BHB2690) wurden die Kulturen auf Eis abgekühlt und bei 4°C im Verhältnis 1:1 (nach OD600) gemischt. Die Zellen wurden zentrifugiert (Heraeus, 5000 upm, 4°C, 10 min), mit eiskaltem M9-Medium gewaschen und in 3ml Packaging-Puffer (40mM Tris/HCl pH 8, 10mM Spermidin/3HCL, 10mM Putrescin/2HCl, 0,1% ß-Mercaptoethanol, 7% Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Nach Zugabe von 30µl 100mM ATP erfolgte die Aliquotierung in 40µl-Portionen, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

In-vitro-Verpackung der Cosmide (Hohn 1979)

Zu 40µl gefrorenem Verpackungsmix wurden 14µl Cosmid-DNA zugesetzt und auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde der Ansatz ohne Blasenbildung gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Ein weiterer Verpackungsmix mit zusätzlich 10mM $MgCl_2$ und 10µg/µl DNase I wurde auf Eis aufgetaut, dem Ansatz zugesetzt und wieder gemischt. Nach einer weiteren Stunde bei 37°C wurden 500µl SM-Puffer (20mM Tris/HCl pH 7,6, 100mM NaCl, 10mM $MgSO_4$, 0,01% Gelatine) und 5µl Chloroform zugegeben und erneut gemischt. Zum Entfernen des Chloroform wurde der Ansatz 2 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Phagensuspension war nun gebrauchsfertig und konnte bei 4°C gelagert werden.

Infektion von *E.coli* JM109 mit verpackten Cosmiden (Sambroock et al. 1989)
JM109 wurde über Nacht in LB-Medium mit 0,4% Maltose und 10mM $MgCl_2$ zur Induktion der Synthese des λ-Rezeptorproteins LamB kultiviert. 100µl der ÜNK wurden mit max. 200µl Suspension der Phagenköpfe gemischt und 30 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Nach der Präadsorption der Phagenköpfe wurde der Ansatz mit 3ml LB-Weichagar gemischt und auf LB-Agarplatten (50µg/ml Ampicillin) ausplattiert.

2.4.5. Transduktion von *B.subtilis* mit dem Phagen PBS1

Plattenlysat (Cutting u. Horn 1990)
Mit einer über Nacht gewachsen Kolonie von *B.subtilis* NIG1121 wurden 10ml brain heart infusion broth (BHIB) im 100ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen angeimpft und bei 130 upm bei 37°C bis zu einer OD600 von 1,5-2 inkubiert. Die Zellen wurden dann mikroskopisch auf ihre Beweglichkeit kontrolliert und gegebenenfalls weiterinkubiert sowie alle 15 min erneut kontrolliert. Die Beweglichkeit der Zellen zeigt die Bildung von Flagellen an, die für die Anheftung von PBS1 an die Zelle notwendig sind.
In einem bei 40°C vorgewärmten Zentrifugengefäß wurden 0,1ml Kultur, 0,1ml einer Verdünnungsreihe von PBS1 in T-Base und 4ml TSSA-Weichagar ohne Blasenbildung gemischt, auf eine TSSA-Agarplatte ausgegossen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Der Weichagar einer Platte, die eine nahezu vollkommene Lyse (ca. 10000 trübe Plaques) aufwies, wurde geerntet und in 4ml BHIB aufgenommen. Das Gefäß wurde zur Suspendierung des Agars gut geschüttelt und 4-6 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde der Agar abzentrifugiert (Heraeus, 5000 upm, 10 min, RT), der Überstand abgenommen und durch Filtration (Porendurchmesser 0,45µm) oder Zugabe von Chloroform (50µl/ml) sterilisiert.

Transduzierendes Lysat (Cutting u. Horn 1990)
Von einer frischen LB-Agarplatte des Donorstammes wurden 10ml Penassay broth (PAB) in 100ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit einer Kolonie angeimpft und bei 130 upm und 37°C bis OD600 von 0,5-0,7 inkubiert. Waren die Zellen zu diesem Zeitpunkt nicht beweglich, wurden sie 15 min bei Raumtemperatur ohne Schütteln inkubiert und die Beweglichkeit erneut kontrolliert. Von den beweglichen Zellen wurden 0,8ml und 0,9ml mit 0,2ml bzw. 0,1ml des Plattenlysates gemischt und auf dem Schüttler für 30 min inkubiert. Anschließend wurden 8,5ml vorgewärmtes PAB hinzugegeben und weitere 30 min inkubiert. Nach Zugabe von Chloramphenicol (5µg/ml) zur Vermeidung des Bakterienwachstums wurden die Ansätze über Nacht bei 37°C in Ruhe inkubiert. Die Ansätze wurden zum Aufschluß der Zellen kurz geschüttelt (Vortex) und Zelltrümmer abzentrifugiert (Heraeus, 5000 upm, 15 min, RT). Nach Sterilisation (s.o.) war die Phagensuspension zur Transduktion oder Aufbewahrung bei 4°C bereit.

Bei der Herstellung des transduzierenden Lysates vom Bakterienpool der azidresistenten Klone (siehe 3.2.1.2) wurden die vereinigten Klone in 20ml PAB aufgenommen, bei 37°C inkubiert und fortlaufend die Beweglichkeit kontrolliert. Nach 3h wurden sie zur Herstellung des transduzierenden Lysates eingesetzt.

Transduktion von *B.subtilis* NIG1152 (Cutting u. Horn 1990)
Mit einer frisch gewachsenen Kolonie von *B.subtilis* NIG1152 wurden 10ml brain heart infusion broth (BHIB) in einem 250ml Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 30°C über Nacht bei 80 upm inkubiert. 10ml BHIB wurden mit 2ml Kultur versetzt und bei 130 upm und 30°C weiter inkubiert. Nach 3-4 h wurde die Beweglichkeit der Zellen erneut kontrolliert und gegebenenfalls bei Raumtemperatur bis zur Beweglichkeit ohne Schütteln gehalten (s.o). Zur Transduktion wurden 1ml der *B.subtilis* Kultur mit 0,1ml des transduzierenden Lysates (s.o) gemischt. Zur Kontrolle wurde 1ml Zellen ohne Phagen analog behandelt. Die Ansätze wurden unter langsamem Schwenken 30 min bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Zellen bei Raumtemperatur abzentrifugiert (Heraeus, 5000 upm, 10 min) und zweimal mit 10ml T-Base/0,5% Glukose gewaschen. Die Zellen wurden dann in 1ml T-Base/Glukose resuspendiert und je 0,1ml auf LB-Platten ausplattiert.

2.5. Gentechnische Methoden

2.5.1. Präparation von DNA

2.5.1.1. Präparation chromosomaler DNA

Präparation chromosomaler DNA aus *Staphylococcus carnosus* TM300 und *Bacillus licheniformis* DSM13
Bis auf die aufgeführten Unterschiede erfolgte die Präparation für beide Organismen nach der Methode von Rescei et al. (1987). 500ml PH-Medium wurden im 3l Erlenmeyerkolben mit 3ml ÜNK beimpft und bis zur OD600 von 0,6 bei 37°C kultiviert. Die Zellen wurden geerntet (Beckmann JA10, 15 min, 6000 upm, 4°C), mit 200ml Puffer (50mM Tris/HCl pH 7,8, 50mM EDTA/Na_2) gewaschen und in 100ml Puffer resuspendiert. Zum Aufschluß wurde *S.carnosus* TM300 Lysostaphin (20µg/ml) und Lysozym (500µg/ml) zugesetzt, während *B.licheniformis* DSM13 nur mit Lysozym (500µg/ml) versetzt wurde. Nach 2 h bei 37°C erfolgte die Zugabe von autolysierter Pronase (1mg/ml) sowie 10ml 10% SDS, und die Inkubation wurde für weitere 2 h fortgesetzt. Das Lysat wurde einmal mit einem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) und zweimal mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Der Überstand wurde mit 0,25 Volumen 2M $LiCl_2$-Lösung versetzt, mit 2 Volumen Ethanol (-20°C) überschichtet und die ausfallende DNA mit einen Glasstab der Lösung entnommen. Die DNA wurde mit 70% Ethanol (-20°C) gewaschen, die überschüssige Flüssigkeit im Vakuum entfernt (nicht vollkommen getrocknet) und der Niederschlag wurde vorsichtig in 200µl TE-Puffer (s.

2.5.1.2.) bei 4°C gelöst. Die Konzentration der DNA und deren Reinheit wurde über die Absorption bei 260 und 280nm bestimmt.

Präparation chromosomaler DNA aus *E.coli* MC4100 (Kaiser u. Murray 1979)
Die Zellen von 100ml ÜNK in LB-Medium wurden geerntet (Heraeus, 4°C, 5000 upm, 15min), mit 100ml TES-Puffer (10mM Tris/HCl pH 8, 1mM EDTA/Na_2, 50mM NaCl) gewaschen und zum Aufschluß in 3ml 25% Saccharose, 50mM Tris/HCl pH 8, 3mg/ml Lysozym resuspendiert. Nach 30 min bei 37°C erfolgte die Lyse der Zellen durch Zusatz von 800µl 250mM EDTA/Na_2 pH 8 und 15 min Inkubation auf Eis sowie nachfolgender Zugabe von 2ml Lysis-Mix (2% Triton X-100, 60mM EDTA/Na_2, 50mM Tris/HCl pH 8). Der Abbau von Proteinen erfolgte mit Pronase (100µg/ml) bei 37°C für 3 h. Phenolextraktion, Fällung und weitere Aufarbeitung erfolgte wie in 2.5.1.1 beschrieben.

2.5.1.2. Präparation von Plasmid DNA

verwendete Lösungen und Puffer:	Lösung A:	50mM Glukose
		25mM Tris/HCl pH 8
		10mM EDTA/Na_2
	Lösung B:	0,2N NaOH
		1% SDS
	Lösung C:	3M K-Acetat pH 4,8
	TE-Puffer:	10mM Tris/HCl pH 7,8
		1mM EDTA/Na_2

Fällung von Plasmid-DNA (Sambrook et al. 1989)
Die Fällung von DNA erfolgte in 70% Ethanol, 300mM K-Acetat pH 4,8 bei -20°C für 60 min. Anschließend wurde die Lösung 15 min zentrifugiert (Eppendorf, 14000 upm, 4°C), der Niederschlag mit 1ml 70% Ethanol (-20°C) überschichtet, noch einmal zentrifugiert (s.o.) und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die DNA wurde in TE-Puffer oder H_2O aufgenommen.

Minilysat (Birnboim u. Doly 1979)
Die Zellen aus 2ml ÜNK wurden für 8 min bei 13000 upm (Eppendorf, RT) abzentrifugiert, zur Lyse in 100µl Lösung A resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 200µl Lösung B zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 150µl Lösung C und nochmaliger 5 minütiger Inkubation auf Eis wurden chromosomale DNA und Proteine gefällt und anschließend das Lysat 10 min (s.o.) zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde einmal mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1) und einmal mit 1 Volumen Chloroform extrahiert, die Plasmid-DNA gefällt und in 20µl TE-Puffer gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese.

Präparative Plasmidisolierung (verändert nach Birnboim u. Doly 1979)
Ausgehend von 50ml ÜNK wurden die Zellen durch zehnminütiges Zentrifugieren (Heraeus, 5000 upm, 4°C) gewonnen. Die Lyse der Zellen erfolgte in drei Schritten (s.o.): 1. Resuspendieren der Zellen in 7,5ml Lösung A und 10 min Inkubation auf Eis; 2. Zugabe von 10ml Lösung B und weitere Inkubation für 10 min auf Eis; 3. Zugabe von 7,5ml Lösung C und nochmalige zehnminütige Inkubation auf Eis. Das Entfernen der Zelltrümmer, ausgefallener Proteine und chromosomaler DNA erfolgte durch 20 min Zentrifugation (s.o.). Dem Überstand wurden 15ml Isopropanol (-20°C) zugesetzt und anschließend 15 min abzentrifugiert (s.o.). Der Niederschlag wurde in 2ml H_2O gelöst und die RNA mit 2ml 5M $LiCl_2$/50mM, Tris/HCl pH 8 für 15 min auf Eis gefällt. Nach 15 min Zentrifugation (s.o.) wurde die DNA aus dem Überstand durch die Zugabe von 10ml Ethanol (-20°C) für 60 min bei -20°C gefällt, abzentrifugiert (Heraeus, 4°C, 15 min, 5000 upm) und in 400µl TE-Puffer aufgenommen. Die restliche RNA wurde durch Zugabe von 5µl RNase (10mg/ml) und 30 min Inkubation bei 37°C verdaut und die restlichen Proteine durch Extraktion mit Phenol/Chloroform sowie Chloroform entfernt. Die gereinigte Plasmid-DNA-Lösung wurde gefällt und in 200µl TE-Puffer gelöst. Die Konzentration wurde photometrisch und durch Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

2.5.2. Allgemeine gentechnische Methoden

Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et al. 1989)
Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe im elektrischen Feld wurden für Fragmente bis 1,5 kB Gele von 1,5-2% Agarose, bis 7 kB Gele von 1-1,5% Agarose und für Fragmente über 7 kB Gele von 0,6-1% Agarose angefertigt. Hierzu wurde die Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen (55-60°C) auf Gelträger gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10*Probenpuffer versetzt und die Elektrophorese in TAE-Puffer durchgeführt. Zum Anfärben der DNA wurde eine 1% Ethidiumbromidlösung verwendet.

10*TAE-Puffer: pro l:	48,4g Tris 11,42ml Essigsäure (96%) 7,44g EDTA/Na_2
10*Probenpuffer:	0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol 50% Glyzerin

Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen
Die DNA wurde in den vom Enzymhersteller mitgelieferten Puffern unter den angegebenen Bedingungen mit Restriktionsenzymen gespalten.

Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Zur Verhinderung von Religierungen der linearisierten Vektoren wurden vor der Ligation die 5`-Phosphatreste mit alkalischer Phosphatase entfernt. Hierzu wurde die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Boehringer Mannheim) gemäß Anweisung verwendet.

Umwandlung von überhängenden 3`- oder 5`-Enden in glatte Enden

Überhängende 3`-Enden von DNA-Fragmenten wurden mit der T4-DNA-Polymerase unter Ausnutzung der 3`-5`-Exonukleaseaktivität abgebaut (varriert nach Sambrook et al. 1989). Die in H_2O gelöste DNA wurde laut Herstelleranweisung mit dem mitgelieferten Reaktionspuffer versetzt und nach Zugabe des Enzyms 15 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe eines Nukleotidmixes zu einer Endkonzentration von 33µM je Nukleotid (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Der Ansatz wurde weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch zehnminütiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert und die DNA mit Phenol/Chloroform sowie Chloroform extrahiert und gefällt.

Zum Auffüllen von überhängenden 5`-Enden wurde die Klenow-DNA-Polymerase benutzt (Sambrook et al. 1989). Die DNA wurde hierzu im Puffer (50mM Tris/HCl pH 7,5, 10mM ß-Mercaptoethanol, 5mM $MgCl_2$, 50µg/ml RSA) aufgenommen und der Ansatz auf 0,2mM je Nukleotid (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) eingestellt. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 5 Einheiten Klenow-Enzym/1-2µg DNA gestartet und 30 min bei 37°C durchgeführt. Nach Inaktivierung des Enzyms bei 70°C für 10 min wurde die DNA aufgereinigt (s.o.).

Ligation von DNA-Fragmenten (Sambrook et al. 1989)

Im Ligationsansatz wurde ein molares Verhältnis von Fragment zu Vektor von 3:1 eingestellt. Der Ansatz enthielt 1/10 Volumen 10*Ligationspuffer (660mM Tris/HCl pH 7,5, 50mM $MgCl_2$, 10mM DTE, 10mM ATP) und die vorher in H_2O gelöste DNA. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C mit 0,5 Einheiten T4-DNA-Ligase.

Isolierung von DNA aus einem Agarosegel mittels des 'Geneclean-Kits'

Die Isolierung der DNA durch Geneclean nach Auftrennung im Agarosegel erfolgte wie in der Produktinformation angegeben (Dianova, Hamburg). Die DNA enthaltende Agarose wurde in 2,5 Volumen 6M NaJ-Lösung bei 50°C gelöst. Nun wurden je 3µg DNA 5µl Glasmilch zugegeben und der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit bindet die Kieselgel-matrix der Glasmilch die DNA. Zum Entfernen des NaJ wurde die Glasmilch dreimal mit "New Wash"-Waschlösung (im Kit enthalten) gewaschen. Vor jedem Waschvorgang wurde der Ansatz 30 sek bei 13000 upm (Eppendorf, RT) abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschen wurde der Überstand sorgfältig entfernt und die Glasmilch in H_2O oder TE-Puffer resuspendiert. Zum Lösen der DNA von der Glasmilch wurde der Ansatz 5 min bei 50°C inkubiert. Die Glasmilch wurde 5 min bei 13000 upm (s.o.) abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

2.5.3. Herstellung von Deletionsmutanten

Zur Einführung von Deletionen von einem Ende eines DNA-Fragmentes wurden die Vorschrift und Reagenzien des "Erase a base"-Kits benutzt (Promega Corp., Madison, Putney et al. 1981).

5µg DNA wurden mit Restriktionsenzymen so geschnitten, daß an dem zu deletierenden Bereich ein überhängendes 5`- oder ein glattes Ende entstand, das von der Exonuklease III angegriffen werden konnte. Um das gegenüberliegende Ende gegen den Abbau zu schützen, wurde hier mit Restriktionsenzymen ein überhängendes 3`-Ende erzeugt. Nach Reinigung und Fällung wurde die DNA in 60µl Exonuklease III-Puffer (66mM Tris/HCl pH 8, 660µM $MgCl_2$) aufgenommen und die Reaktion durch Zugabe von 175 Einheiten Exonuklease III gestartet. Der Abbau eines Einzelstranges in 3'-5'-Richtung durch die Exonuklease erfolgte nun bei 30°C mit ca. 120 bp/min. Im Abstand von 20 sek wurden 2,5µl Probe entnommen, in 7,5µl S_1-Nuklease-Lösung (12µl 7,4*S_1-Puffer [0,3M K-Acetat pH 4,6, 2,5M NaCl, 10mM $ZnSO_4$, 50% Glyzerin], 78µl H_2O, 25 Einheiten S_1-Nuklease) überführt und zum Abbau der einzelsträngigen DNA 30 min bei Raumtemperatur weiter inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1µl Stop-Puffer (0,3M Tris/HCl pH 8, 50mM EDTA/Na_2) beendet und die Enzyme 10 min bei 70°C inaktiviert. Um das überhängende 3'-Ende ebenfalls zu einem glatten Ende aufzufüllen wurde dem Ansatz 1µl Klenow-Gemisch (30µl Puffer [20mM Tris/HCl pH 8, 100mM $MgCl_2$], 5 Einheiten Klenow-DNA-Polymerase) und 1µl dNTP-Gemisch (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 125µM pH 7) zugesetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Plasmide wurden über Nacht bei 16°C religiert (s. 2.5.2.). Das Ausmaß der Deletionen wurde durch Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

2.5.4. Herstellung und Aufreinigung synthetischer Oligonukleotide

Die zur Durchführung der Polymerasekettenreaktion und zur Sequenzierung benötigten Oligonukleotide (Primer) wurden nach der Phosphoramiditmethode (Caruthers et al. 1987) mit dem DNA-Syntheziser (Modell 380, Applied Biosystems) hergestellt. Die DNA wurde mit 1ml 25% Ammoniak von der Synthesesäule eluiert und die Schutzgruppe am 3`-Ende durch Inkubation über Nacht bei 60°C entfernt. Der Ammoniak wurde im Vakuum bis auf 20-30µl entfernt und der Niederschlag in 300µl 300mM Na-Acetat pH 4,8 gelöst. Nach Zugabe von 2 Volumen 100% Ethanol wurde die DNA über Nacht bei -70°C gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (Eppendorf, 4°C, 13000 upm, 2 h) und mit 70% und 100% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde getrocknet und in 100µl TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

Zur Amplifikation des *B.subtilis secA*-Gens wurden folgende Primer verwendet:

OMKL23.1: GGCTCTAGAGATGATAGAGGAGCG

OMKL24. TGTGGTACACATTTGATTCACCTC

2.5.5. Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki et al. 1988)
Die Reaktion erfolgte im DNA-Thermal-Cycler (Cetus/Perkin-Elmer). Der Reaktionsansatz (50µl-100µl) enthielt 1/10 Volumen 10*Puffer (100mM Tris/HCl pH 8,3, 15mM $MgCl_2$, 500mM KCl, 1mg/ml Gelatine; vom Enzymhersteller mitgeliefert), 1/5 Volumen Nukleotid-Mix (dATP, dGTP, dTTP, dCTP je 1,25 mM), je 300-400µg der Oligonukleotide, 2,5 Einheiten/100µl der Taq-DNA-Polymerase und von der zu amplifizierenden DNA 5-10ng bei Plasmiden bzw. 300ng bei chromosomaler DNA. Durch die Zugabe des Enzyms wurde die Reaktion gestartet und der Ansatz zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten mit Mineralöl überschichtet. Bei der Synthese wurden 30 Zyklen durchlaufen, die jeweils mit der Denaturierung der Ziel-DNA bei 92°C für 2 min begannen, worauf das Anlagern der Primer bei 50°C für 1 min erfolgte. Die Synthese der DNA wurde bei 72°C für 2 min durchgeführt, wobei sich die Synthesezeit nach jedem Zyklus um 10 sek verlängerte. Nach Beendigung der Amplifikation wurde das Öl abgenommen und der Ansatz mit 300µl Chloroform extrahiert. Die DNA wurde gefällt und in 40µl TE gelöst.

2.5.6. DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger 1977)
Bei dieser Methode wird der Abbruch der DNA-Polymerasereaktion beim Einbau von Didesoxynukleotiden genutzt. Hierzu wurde die Ziel-DNA denaturiert, ein Oligonukleotid zum Start der Polymerasereaktion an die DNA gebunden und der neu synthetisierte Strang mit α-^{35}S-ATP markiert. Die Synthese der DNA erfolgte in vier Ansätzen, die außer den vier Desoxynukleotiden (dNTPs) zusätzlich ein Didesoxynukleotid (ddNTP) enthielten. Der statistische Einbau des ddNTP führt zum Syntheseabbruch, und durch Bestimmung der Kettenlänge kann die Position des Nukleotids bestimmt werden.

Denaturierung der DNA und Anlagerung des Primers
Zur Sequenzierung wurde doppelsträngige, zirkuläre Plasmid-DNA benutzt. 1,5-2µg Ziel-DNA (max. Volumen 8µl) wurden mit 40µl Denaturierungslösung (200mM NaOH, 200mM EDTA/Na_2) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die denaturierte DNA wurde nach Zugabe von 4µl Neutralisierungslösung (2M Ammoniumacetat pH 4,8) und 100µl Ethanol (100%, -20°C) bei -70°C 10 min gefällt. Danach wurde der Ansatz zentrifugiert (Eppendorf, 13000 upm, 10 min, 0°C) und der Niederschlag mit 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde dann in der vorgewärmten Vakuumzentrifuge max. 2 min getrocknet.
Zu der getrockneten DNA wurden 2,5ng Primer (17mer) und 2µl 5*Reaktionspuffer (200mM Tris/HCl pH 7,5, 100mM $MgCl_2$, 250mM NaCl) gegeben, auf 10µl mit H_2O aufgefüllt und 30 min bei 37°C inkubiert.

Sequenzreaktion: Markierung und Termination

Dem Primer-DNA-Gemisch wurde 1µl 0,1M DTT, 2µl verdünnter Labeling-Mix (s.u.) und 0,5µl α-^{35}S-ATP (10µM, 10µCi/µl) zugesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2µl Sequenase (Version 2.0, 1:8 verdünnt) gestartet und für 2-5 min bei Raumtemperatur fortgesetzt. Der Labling-Mix enthielt in konzentrierter Form je 7,5µM der Nukleotide dGTP, dTTP und dCTP und wurde je nach Anforderung (s. Herstellerhinweise) bis zu 1:15 verdünnt. Die Sequenase (T7-DNA-Polymerase) wurde im Puffer (10mM Tris/HCl pH 7,5, 5mM DTT, 0,5mg/ml RSA) verdünnt. Zur Termination der Reaktion wurde 2,5µl des A-, G-, T- oder C-Terminations-Mixes (s.u.) in vier Reaktionsgefäße gegeben und 1 min bei 37°C vorgewärmt. Je 3,5µl des Markierungsansatzes wurden zu jedem Terminations-Mix hinzugegeben, gemischt und 3-5 min bei 37°C inkubiert. Die Terminations-Mixe enthielten 50mM NaCl, 80µM jedes Desoxynukleotides und 8µM des angegebenen Didesoxynukleotides. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4µl Stop-Puffer (95% Formamid, 20mM EDTA/Na_2, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol FF) beendet. Vor dem Auftragen von 3µl Probe auf das Sequenzgel wurde der Ansatz für 1 min bei 95°C erhitzt und anschließend im Eisbad abgekühlt. Bis auf die Denaturierungs- und Neutralisierungslösung sowie die radioaktiven Nukleotide waren alle Reagenzien im Sequenase-Kit (Version 2.0) von USB, Cleveland, enthalten.

Polyacrylamid-Gelelektorphorese (Sambrook et al. 1989)

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

Zusammensetzung des Sequenzgels: pro 60ml:	25,2g Harnstoff, 6ml 10xTBE-Puffer 27,2ml H_2O 0,3ml 10% APS 9ml Acrylamid:Bisacrylamid(19:1) 60µl TEMED
10*TBE-Puffer: pro l:	108g Tris 55g Borsäure 40ml 0,5M EDTA/Na_2 pH 8

2.5.7. DNA-DNA-Hybridisierung nach Southern

Zur Hybridisierung wurde entsprechend der Vorschrift des "DNA-labeling and detection-Kits" (Boehringer, Mannheim) vorgegangen, der die Methode von Southern et al. (1975) zugrunde liegt.

2.5.7.1. Herstellung einer Digoxygenin-markierten DNA-Sonde

Die zu markierende doppelsträngige DNA wurde 10 min bei 95°C denaturiert und in Eiswasser rasch abgekühlt. Die Markierung erfolgte im Endvolumen von 20µl mit 1-3µg denaturierter DNA (10 min, 95°C), 2µl Hexanukleotidgemisch, 2µl dNTP Markierungsgemisch und 2 Einheiten Klenow-Enzym. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.5.7.2. Hybridisierung von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA

Transfer der DNA auf Nylonmembranen (variiert nach Southern et al. 1975)

Die mit Restriktionsenzymen verdaute DNA wurde in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und mit einer Vakuum-Blot-Apparatur (LKB 2016 VacuGene, Pharmacia/LKB) auf Nylonmembranen übertragen. Dabei wurde das Gel jeweils 10 min mit Depurinisierungslösung (0,25N HCL), Denaturierungslösung (1,5M NaCl, 0,5M NaOH) und Neutralisierungslösung (1M Tris/HCl pH 5, 2M NaCl) überschichtet. Die Übertragung der DNA auf die Membran erfolgte für 1 h mit 20*SSC (17,5% NaCl, 8,82% Na-Citrat, pH 7). Die DNA wurde zur Fixierung auf der Membran mit UV-Licht von 300nm für 3 min bestrahlt.

Hybridisierung der Ziel-DNA mit der Sonde

Die Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Prähybridisierung der Membranen für 4 h bei 42°C in Prähybridisierungslösung (5*SSC, 50% Formamid, 0,1% N-Laurylsarkosinat, 0,02% SDS, 1% Blocking Reagenz [Boehringer]). Zur Hybridisierung wurden die Membranen in Hybridisierungslösung (5*SSC, 20-40% Formamid, 0,1% N-Laurylsarkosinat, 0,02% SDS, 1% Blocking Reagenz, 5ng-10ng DNA-Sonde pro ml) über Nacht bei 42°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Sonde wurde vor der Zugabe in die Hybridisierungslösung 10 min bei 95°C denaturiert und in Eiswasser abgekühlt. Um überschüssige, ungebundene Sonde zu entfernen, wurden die Membranen zweimal 5 min bei Raumtemperatur in 2*SSC, 0,1% SDS und zweimal 15 min bei 42°C mit 0,1*SSC, 0,1% SDS gewaschen.

Nachweis der Sonde

Zur Vermeidung der unspezifischen Bindung des Antikörperkonjugates (s.u.) wurden die Membranen kurz in Puffer 1 (100mM Tris/HCl, 150mM NaCl, pH 7,5) equilibriert und 30 min in Blocking-Puffer (Puffer 1, 0,5% Blocking Reagenz) unter leichtem Schwenken bei

Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und durch Blocking-Puffer, der Anti-Digoxygenin-Antikörper gekoppelt an alkalische Phosphatase (1:5000, Boehringer) enthielt, ersetzt und die Membranen 30 min unter vorsichtigem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimal 15 minütiges Waschen mit Puffer 1 bei Raumtemperatur entfernt. Nach 2 min Equilibrierung in Puffer 2 (100mM Tris/HCl pH 9,5, 100mM NaCl, 50mM $MgCl_2$) wurden die Membranen im Dunkeln mit Färbelösung (10ml Puffer 2, 45µl Nitroblau-Tetrazoliumchlorid 100mg/ml, 35µl 5-Brom-4-chloro-2-indolyl-phosphat 50mg/ml) entwickelt. Die Farbreaktion wurde durch Überführung der Filter in TE-Puffer gestoppt.

Zum empfindlicheren Nachweis der Sonde wurde AMPPD (3-[2'-Spiroadamantan]-4-methoxy-4-[3"-phosphoryloxy]-phenyl-1,2-dioxetan) als Substrat der alkalischen Phosphatase verwendet. Alle nachfolgend aufgeführten Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Membranen wurden nach Hybridisierung und Entfernen ungebundener DNA (s.o.) kurz mit Puffer A (100mM Maleinsäure/NaOH pH 7,5, 150mM NaCl) gewaschen und 30 min in Puffer B (Puffer A, 1% Blocking Reagenz) unter leichtem Schwenken inkubiert. Dann wurden die Membranen in Antikörperkonjugat-Lösung (1:10000 in Puffer B) unter leichtem Schwenken 30 min inkubiert. Danach wurden die Membranen zweimal 15 min in Waschpuffer (Puffer A mit 0,3% Tween 20) gewaschen und in Puffer 2 (s.o.) equilibriert. Die AMPPD-Vorratslösung (23,5mM) wurde in Puffer 2 1:100 verdünnt und die Membranen 5 min darin inkubiert. Vor Exposition auf einem Röntgenfilm wurden die Membranen in Hybridisierungsbeutel eingeschweißt und 30 min bei 37°C präinkubiert.

2.5.7.3. Koloniehybridisierung

Die zur Hybridisierung vorgesehenen Klone wurden vereinzelt und bis zu Stecknadelkopf-großen Kolonien kultiviert. Zum Transfer der Kolonien wurden Biodyne-A-Membranen (Pall Filtrationstechnik GmbH, Dreieich) auf die bei 4°C vorgekühlten Agarplatten gelegt. Nach 1 min wurden die Membranen jeweils mit der Kolonieseite nach oben für 5 min in ca. 1ml Denaturierungslösung (s. 2.5.7.2.) gelegt, kurz auf trockenes Filterpapier abgelegt und 5 min in 1ml Neutralisierungslösung (s. 2.5.7.2.) inkubiert. Die DNA wurde mittels UV-Bestrahlung fixiert (s. 2.5.7.2.) und die Membranen in 2*SSC (s. 2.5.7.2.) 5 min gewaschen. Um die restlichen Proteine und Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Membranen über Nacht bei 37°C in einer Proteinaselösung (50mM Tris/HCl pH 7,6, 0,1% SDS, 50mM NaCl, 100µg/ml Proteinase K) geschwenkt. Danach wurden die Membranen 15 min in 2*SSC gewaschen und zur Hybridisierung wie bei 2.5.7.2. beschrieben eingesetzt.

2.6. Proteinchemische Methoden

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

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen. Die Konzentration an Acrylamid lag für die Untersuchungen der SecA-Proteine und der Lipase bei 10%, bei den Untersuchungen des OmpA-Proteins bei 12,5%. Das Trenngel wurde mit einem 6% Sammelgel überschichtet.

Trenngel: pro 30ml:	12,5/10ml Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8) 7,5ml 1,5M Tris/HCl pH 8,8 0,3ml 10% SDS 9,4ml 30% Glyzerin 0,3ml 10% APS 20µl TEMED
Sammelgel: pro 15ml:	2,5ml Acrylamid:Bisacrylamid 3,75ml 0,5M Tris/HCl pH 6,8 0,15ml 10% SDS 0,15ml 10% APS 8,45ml H_2O 10µl TEMED

Die Elektrophorese wurde bei 50mA in Laufpuffer (pro l: 30g Tris, 144g Glycin) mit 0,1% SDS durchgeführt. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel 45 min in Coomassie-Blau (pro l: 1,75g Serva Blau R, 454ml Methanol, 92ml Eisessig) geschwenkt und der überschüssige Farbstoff mit Entfärber (30% Ethanol, 10% Eisessig) entfernt.

2.6.2. Herstellung von Gesamtzellextrakten

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

2ml einer Kultur wurden 10 min zentrifugiert (Eppendorf, 13000 upm, RT) und der Überstand gründlich entfernt. Die Zellen wurden in 250µl Probenpuffer nach Lämmli (pro 100ml: 12,5ml 0,5M Tris/HCl pH 6,8, 20ml 10% SDS, 10ml Glyzerin, 5ml ß-Mercaptoethanol, 1 Spatelspitze Bromphenolblau) sorgfältig resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen und die Denaturierung der Proteine erfolgte durch 10 min Inkubation bei 95°C. Vor dem Auftragen der Proben wurde der Ansatz 10 min zentrifugiert (Eppendorf, 13000 upm).

Gesamtzellextrakt von *B.subtilis* (Kallio et al. 1986)

5ml Kultur wurden mit 1ml 40% TCA für 1 h auf Eis gefällt und der Niederschlag abzentrifugiert (Heraeus, 5000 upm, 20 min). Das Pellet wurde zweimal mit 80% Azeton gewaschen und in 2ml Aufschlußpuffer (20mM K-Phosphat pH 7,5, 15mM $MgCl_2$, 20% Saccharose, 1mM PMSF, 1mg/ml Lysozym) resuspendiert. Nach 20 min bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert und in 200µl 1% Triton X-100 resuspendiert. Darauf erfolgte die Zugabe von 200µl 2*Lämmli-Puffer und die Denaturierung durch 10 min erhitzen bei 95°C.

Kulturüberstände (Bensadoun u. Weinstein 1976)
Die Zellen wurden durch Zentrifugieren (s.o.) vom Kulturüberstand getrennt und die Proteine des Kulturüberstandes in 7% TCA 1 h auf Eis gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, das Pellet zweimal mit 80% Azeton gewaschen und in 200µl Lämmli-Puffer resuspendiert. Die Proteine wurden vor dem Auftragen 10 min bei 95°C denaturiert.

2.6.3. Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern (Western-Blot)

Die zu untersuchenden Proteine wurden vor der Übertragung auf Nitrocellulosemembranen im denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt (2.6.1.). Der Transfer im SemiDry-Blotting-Verfahren wurde nach Anweisung des Herstellers mit der Apparatur von Pharmacia/LKB im diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt. Danach wurden die Filter zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen in Blot-Lösung I (10mM Tris/HCL pH 7,5, 0,9% NaCl, 3% RSA) 1 h bei 37°C geschwenkt. Anschließend wurden die Filter in Blot-Lösung II (10mM Tris/HCl pH 7,5, 0,9% NaCl, 0,3% RSA) mit den primären Antikörpern (1:1000) gegen das Zielprotein überführt und noch einmal 1 h bei 37°C inkubiert. Versuche mit Antikörpern gegen das *E.coli* SecA-Protein wurden über Nacht bei 4°C gehalten. Die nicht gebundenen Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit Blot-Lösung II entfernt. Der Nachweis der primären Antikörper (aus Kaninchen) erfolgte durch Bindung von Peroxidase-Antikörperkonjugaten gegen Kaninchen IgG (sekundäre Antikörper). Dazu wurden die Membranen 1 h bei 37°C in Blot-Lösung II mit den sekundären Antikörpern (1:2000) inkubiert. Nun wurden die Membranen erneut zweimal gewaschen (s.o.) und zur Farbentwickelung in Lösung III (40mM Tris/HCl pH 7,5, 20% Ethanol, 600µg/ml Chloronaphthol, 0,15% H_2O_2) gebracht. Nach 5-10 min wurde die Reaktion durch Waschen in TE gestoppt. (Towbin et al. 1979, Hawkes et al. 1982)

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

Pulse-chase-Experimente dienen zur Untersuchung der Kinetik, mit der ein Vorläuferprotein in die reife Form überführt wird. Hierzu wurden alle Zellproteine mit ^{35}S-Methionin markiert und nach dem Zellaufschluß die Proteine von Interesse über Immunfällung isoliert. Die Darstellung der Proteine erfolgte nach Auftrennung im SDS-Gel mittels Fluorografie.
Zur Markierung wurde *B.subtilis* aus einer ÜNK in S7-Medium, das mit 50µg/ml aller Aminosäuren supplementiert war, in frischem Medium zu einer OD600 von 0,05 angeimpft und bis zu einer OD600 von 0,7-0,9 in Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 130 upm inkubiert. Die Inkubationstemperatur wurde den experimentellen Anforderungen angepaßt. Die Zellen wurden dann zweimal in S7-Medium ohne Aminosäuren gewaschen (Heraeus, 15 min, 5000 upm, RT) und zu einer OD600 von 0,7 in S7-Medium mit allen Aminosäuren außer Methionin resuspendiert. Nun wurden die Zellen je nach Versuchsbedingungen 45-90 min bei 130 upm weiter inkubiert. Zur Induktion der Genexpression vom lac-Promotor wurde den Kulturen 10 min vor

Markierung 0,5mM IPTG oder zur Hemmung mit Azid 5 min vor Markierung 1,5mM Na-Azid zugesetzt. Die Markierung erfolgte mit 2,4ml Zellsuspension und 100µCi ^{35}S-Methionin für 1 min. Danach wurde 100µl Chase-Lösung zugesetzt (25mg/ml Methionin, 1mg/ml Puromycin) und zu verschiedenen Zeiten 550µl Probe genommen, die sofort zu 150µl eiskaltem TCA (40%) gegeben wurden. Nach 30 min auf Eis wurde der Niederschlag abzentrifugiert (Eppendorf, 13000 upm, 20 min, RT) und dreimal mit 80% Azeton gewaschen. Zum Aufschluß der Zellen wurden das Pellet in Lysispuffer (10mM Tris/HCl pH 8, 25mM $MgCl_2$, 200mM NaCl, 5mg/ml Lysozym) resuspendiert und 20 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden 10µl 10% SDS zugegeben und die Zellen 10 min bei 95°C lysiert. Das Volumen des Ansatzes wurde mit STD-Puffer (10mM Tris/HCl pH 8,2, 0,9% NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% Na-Desoxycholat) auf 1ml erhöht, unlösliche Bestandteile durch Zentrifugieren (Eppendorf, 15 min, 13000 upm, RT) entfernt und der Überstand zur Immunfällung in ein neues Gefäß überführt.

Die Fällung der Proteine erfolgte mit 10µl Antikörper für 1,5-2h bei 30°C. Zur Isolierung des Protein-Antikörperkomplexes wurden nun 100µl Pansorbinzellen (10%, fixierte *Staphylococcus aureus* Zellen mit exponiertem Protein A) zugegeben und 1-2 h bei 30°C leicht geschwenkt. Die Pansorbinzellen wurden dann 3 min zentrifugiert und mit Waschlösung I (50mM Tris/HCl pH 8, 1M NaCl, 1% Triton X-100), Waschlösung II (50mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5M LiCl, 0,1% SDS) und 50mM Tris/HCl pH 7,5 gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 60µl 2*Lämmli-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden 10 min bei 95°C erhitzt und in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (2.6.1.).

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im Gel 30 min in 45% Isopropanol, 10% Essigsäure fixiert und zur späteren Fluorografie mit Amplify (Amersham Buchler) unter Schwenken 30 min imprägniert. Das Gel wurde mit einer Vakuum-Trocknungsapparatur auf Filterpapier getrocknet und ein Röntgenfilm (X-Ray, Fuij) ein bis mehrere Tage bei -70°C exponiert.

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung und Charakterisierung des *secA*-homologen Gens aus *Staphylococcus carnosus* TM300

Frühere Versuche zur Isolierung des *secA*-homologen Gens aus *Staphylococcus carnosus* zeigten, daß die heterologe Komplementation von *E.coli secA*-Mutanten nicht zur Isolierung des gesuchten Gens geeignet ist (Overhoff u. Freudl 1991). Demgegenüber führte die DNA-DNA-Hybridisierung mit einer *E.coli secA*-Sonde zur Klonierung des *secA*-Gens aus *Bacillus subtilis* (Overhoff et al. 1991). Für die Klonierung des *secA*-homologen Gens aus *S.carnosus* wurde daher in analoger Weise das *B.subtilis secA*-Gen als Sonde benutzt.

3.1.1. Nachweis eines *secA*-homologen Bereiches in der chromosomalen DNA aus *S.carnosus* und Klonierung eines hybridisierenden DNA-Fragmentes aus *S.carnosus* TM300

Zum Nachweis eines *secA*-homologen Bereiches im Chromosom von *S.carnosus* wurden die chromosomale DNA des Stammes TM300, sowie zum Vergleich die chromosomale DNA aus *B.subtilis* DB104 und *B.licheniformis* DSM13 im Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembranen übertragen. Im folgenden Southern-Hybridisierungs-Experiment wurde ein 2231 Bp DNA-Fragment des *secA*-Gens aus *B.subtilis* als Sonde verwendet, das über die Restriktionsschnittstellen AccI und PstI isoliert und mit Digoxygenin markiert wurde. Bei der Hybridisierung wurden sowohl niedrige (20% Formamid, nicht dargestellt) als auch hohe (40% Formamid, Abb.2) Stringenzbedingungen eingestellt, wobei die erhaltenen Ergebnisse für beide Bedingungen identisch waren (Abb.2). Die Größenbereiche, in denen die hybridisierenden Banden auftraten, sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Restriktions-enzym	*S.carnosus* TM300	*B.subtilis* DB104	*B.licheniformis* DSM13
EcoRI	4,4kB, 1kB	5,1kB, 0,7kB, 0,5kB	1,8kB, 1,1kB
HindIII	-	-	1kB, 0,8kB, 0,5kB

Tab. 4: Größe der mit einer DNA-Sonde des *B.subtilis secA*-Gens hybridisierenden Banden von chromosomaler DNA aus Gram-positiven Bakterien im Southern Blot. Obere Zeile: Herkunftsorganismen der DNA.

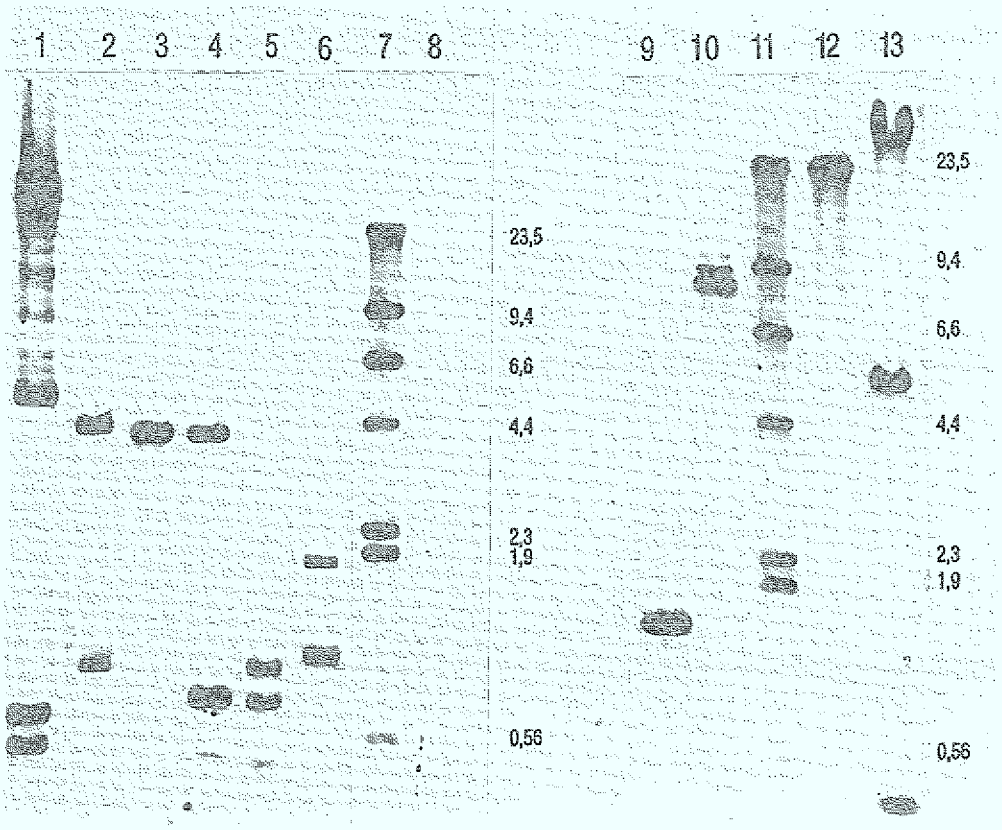


Abb. 2: Southern Hybridisierung von chromosomaler DNA und verschiedener Plasmide. Verwendete Sonden: *secA*-Gen aus *B.subtilis* (1-8), *secA*-Gen aus *S.carnosus* (9-13). Chromosomale DNA aus *B.subtilis* DB104*EcoRI (1) und *S.carnosus* TM300*EcoRI (2), *HindIII (9), *PstI (10), *XbaI (12), *SalI (13) sowie *B.licheniformis* DSM13*HindIII (5), *EcoRI (6). Kontrollplasmide mit Teilen des $secA_{S.c.}$-Gens: pC15*EcoRI (4), pTA4*EcoRI (3). Kontrollvektor: pHC79 (8). Digoxygenin markierter DNA-Längenstandard λ*HindIII (7,11).

Zur Klonierung des hybridisierenden Bereiches aus der chromosomalen DNA von *S.carnosus* wurde nun eine Cosmidgenbank von TM300 (Overhoff u. Freudl 1991) über DNA-DNA-Hybridisierung nach Klonen durchsucht, die das hybridisierende Fragment enthalten. Dazu wurden die Klone der Cosmidbank nach einer in-vitro-Verpackung in Lambda-Phagenköpfe in *E.coli* JM109 transfektiert. 1000 cosmidhaltige Klone mit einer Insertgröße von ca. 20 - 30 kB (Overhoff u. Freudl 1991) wurden vereinzelt und in 20 Gruppen zu je 50 Klonen zusammengefaßt. Im Southern-Blot der EcoRI-verdauten Cosmid-DNA zeigten sich bei einem der Pools Hybridisierungssignale bei 4,3 und 0,8 kB. Die Cosmid-DNAs der einzelnen Klone dieses Pools wurden daraufhin getrennt isoliert und im Southern-Blot analysiert. Das Cosmid pC15 (Abb.3) zeigte spezifische Hybridisierungssignale mit der *secA*-Sonde (Abb.2: 4). Zur Sequenzierung des hybridisierenden Bereiches wurden das 4,3 kB (pTA4) und das 0,8 kB (pTA1) EcoRI-Fragment in den Vektor pUC18 subkloniert. In der Sequenz des subklonierten Bereiches ließen sich zwei unvollständige Leserahmen erkennen. Aus dem Vergleich mit dem *secA*-Gen aus *B.subtilis* ließ sich erkennen, daß einer der Leserahmen für den N-terminalen Teil eines SecA-homologen Proteins kodiert. Der zweite Leserahmen entsprach einem Teil des Tetrazyclin-Resistenz-Gens des Vektors, der für die Herstellung der Genbank verwendet

wurde. Daraus ergab sich die Lokalisation des *secA*-Gens aus *S.carnosus* am Rand des Inserts von pC15, was darauf schließen ließ, daß nur ein Teil des *secA*-Gens auf dem Plasmid vorhanden war (Abb.3).

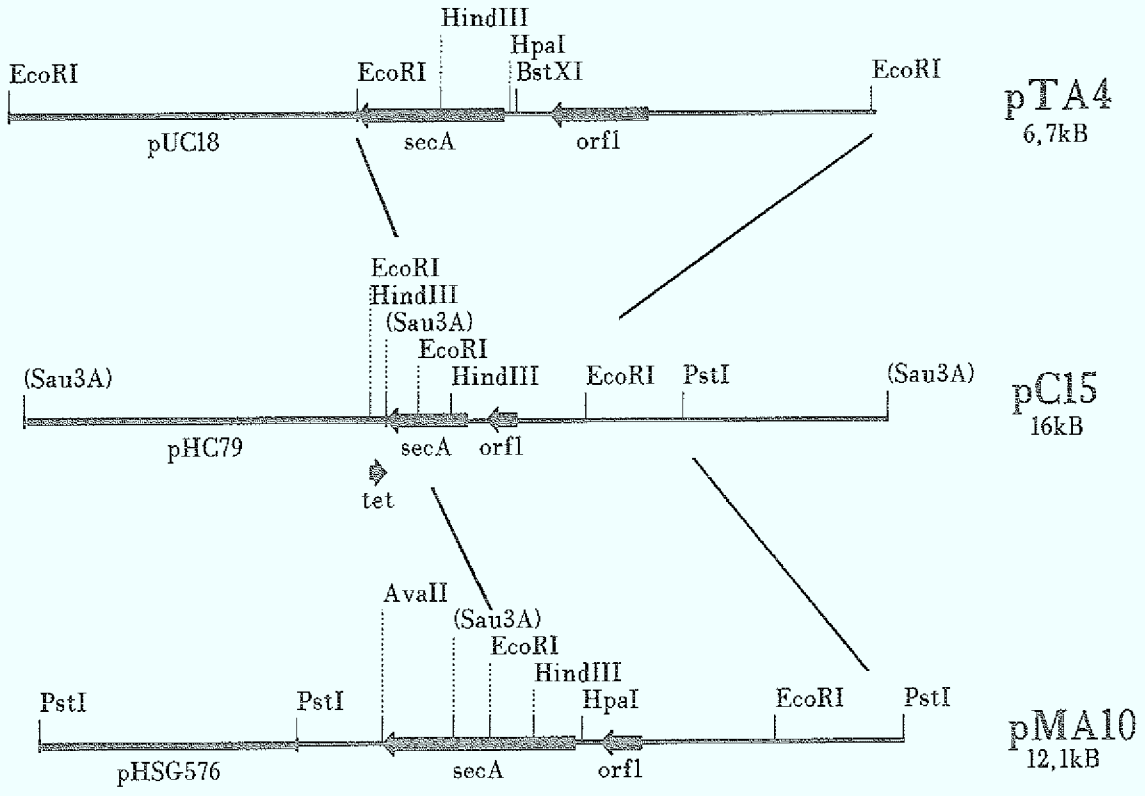


Abb. 3: Schematische Darstellung der Plasmide pTA4, pC15 und pMA10 mit verschiedenen Fragmenten der chromosomalen DNA von *S.carnosus*. tet: Tetrazyclin-Resistenz-Gen. Breite Balken: Vektoren, dünne Balken: DNA aus *S.carnosus*, breite Pfeile: Lage der Gene *orf1* und *secA* (s.u.)

Um eine geeignete Genbank zur Klonierung des gesamten *secA*-Gens aus *S.carnosus* herzustellen, wurde die chromosomale DNA von *S.carnosus* TM300 mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und mit einer DNA-Sonde des bereits klonierten Teils des *S.carnosus secA*-Gens hybridisiert. Die DNA-Sonde bestand aus einem EcoRI/HindIII-Fragment des *S.carnosus secA*-Gens, welches aus dem Plasmid pTA4 isoliert wurde. Zur Spaltung der chromosomalen DNA wurden Restriktionsenzyme ausgewählt, die in der bisher bekannten Sequenz des *secA*-Gens keine Schnittstellen aufwiesen. Wurde die DNA mit PstI verdaut, so konnte ein hybridisierendes Fragment in der Größe von 8,5 kB nachgewiesen werden (Abb.2: 10). Da die Restriktionsanalyse von pC15 auf eine PstI-Schnittstelle etwa 4 kB vor dem *secA*-Gen hinwies, sollte sich das gesamte *secA*-Gen auf diesem 8,5 kB Fragment befinden. Daher wurde eine partielle Genbank mit PstI verdauter DNA im Größenbereich von 6 - 10 kB angelegt. Hierfür wurde das Low-Copy-Plasmid pHSG576 verwendet, um toxische Effekte durch eine erhöhte

Gendosis bei der Klonierung in einen High-Copy-Vektor zu vermeiden (Takeshita et al. 1987). Die Genbank wurde in den *E.coli* Stamm JM109 transformiert und 400 Plasmid-tragende Klone in einer Koloniehybridisierung mit der Sonde des *secA*-Genfragmentes aus *S.carnosus* hybridisiert. Aus Klonen mit positivem Hybridisierungssignal wurde die Plasmid-DNA isoliert und erneut hybridisiert. Der resultierende Klon pMA10 (Abb.3) wies im Hybridisierungsexperiment mit einer *secA*-DNA-Sonde aus *B.subtilis* ein identisches Bandenmuster wie die chromosomale DNA von *S.carnosus* auf.

3.1.2. Sequenzierung des *secA*-Gens aus *S.carnosus*

Zur Sequenzierung des *secA*-Gens aus *S.carnosus* wurden verschiedene Fragmente des Inserts von pMA10 in das pUC18/19-Vektorsystem kloniert und mit den zugehörigen Standardprimern sequenziert. Die Basensequenz der Bereiche, die mit dieser Methode nicht sequenziert werden konnten, wurden mit geeigneten synthetischen Oligonukleotiden bestimmt. Es wurde ein Bereich von 3727 Bp sequenziert, in dessen Basensequenz zwei offene Leserahmen zu erkennen waren (Abb.4). Der erste Leserahmen reicht von Bp 56 bis 620, was einem Protein von 188 Aminosäuren entspricht. Der zweite Leserahmen kodiert für ein Protein von 844 Aminosäuren und erstreckt sich von Bp 1011 bis 3543. Vor dem ersten Leserahmen befindet sich eine gute Ribosomenbindungsstelle bei Bp 42-47. Eine promotorähnliche Sequenz ist in dem sequenzierten Bereich nicht zu erkennen, könnte sich jedoch weiter stromaufwärts befinden (Abb.4). Im Anschluß an den ersten Leserahmen befindet sich von Bp 636 bis 687 ein Bereich mit einer möglichen Terminatorstruktur. Die Suche nach homologen Proteinen in der Sequenzdatenbank zeigte, daß dieser erste Leserahmen zu 61,5% homolog zum *orf1*-Gen aus *B.subtilis* ist. Wie in *B.subtilis* liegt in *S.carnosus* das *orf1*-Gen vor dem *secA*-Gen. Im intergenen Bereich zwischen *orf1* und *secA*, der sich über 391 Bp erstreckt, lassen sich für das *secA*-Gen Konsensussequenzen möglicher Promotoren von Bp 784-813 (P_1) bzw. 875-901 (P_2) und eine Ribosomenbindungsstellen bei Bp 999-1004 erkennen (Abb.4). Die Computeranalyse der sich an das *secA*-Gen anschließenden Sequenz zeigte, daß sich hier in einem Abstand von 14 Bp eine Terminatorstruktur befindet, die einem rho-unabhängigen Terminator ähnelt. Die bei Ausbildung des Terminators freiwerdende Energie wurde mit $\Delta G^{o`}$=-132kJ/mol berechnet.

Bei der Suche nach Aminosäuremustern, die spezifisch für Domänen mit bekannter Funktion sind, wurden Bereiche mit Ähnlichkeiten zu ATP-Bindungsstellen entdeckt. Es handelt sich um die Region ^{96}MRTGEGKT^{103}, die dem A-Motiv, sowie ^{195}RPLHFAIIDEVDSIL^{209}, die dem B-Motiv von ATP-Bindungststellen entsprechen (Walker et al. 1982). Vergleichbare Konsensussequenzen sind auch in den SecA-Proteinen von *E.coli* und *B.subtilis* enthalten und deuten auf eine konservierte Funktion dieser Bereiche auch in *S.carnosus* hin.

```
                                                                                   orf1
1     TAATAGTGAGCATTACCAATAACAACACATATAGAGGTTAAAGGAGTCGATTACTATGATTAGATTTGAAATTCATGGAGACAACCTCACTATTACAGACGCAATC
                                                 RBS                M  I  R  F  E  I  H  G  D  N  L  T  I  T  D  A  I

107   CGTAATTACATTGAGGACAAAGTTGGTAAACTTGAACGTTACTTCACTAATGTGCCGAATGTGAATGCACATGTAAAAGTGAAAACTTATGCAAATTCTAGCACAA
       R  N  Y  I  E  D  K  V  G  K  L  E  R  Y  F  T  N  V  P  N  V  N  A  H  V  K  V  K  T  Y  A  N  S  S  T

213   AAATCGAAGTTACAATTCCGCTTAATGACGTGACACTTCGTGCAGAAGAAAGAAACGATGATTTATATGCTGGAATTGACAAGATCACTAACAAATTAGAATGTCA
      K  I  E  V  T  I  P  L  N  D  V  T  L  R  A  E  E  R  N  D  D  L  Y  A  G  I  D  K  I  T  N  K  L  E  C  Q

319   AGTTCGTAAATACAAAACACGTGTCAATCGTAAGAAACGTAAAGAAAGCGAACATGAACCATTCCCAGCAACTCCGGAAACTCCGCCGGAAACAGCTGTTGATCAT
       V  R  K  Y  K  T  R  V  N  R  K  K  R  K  E  S  E  H  E  P  F  P  A  T  P  E  T  P  P  E  T  A  V  D  H

425   GATAAAGATGATGAAATTGAAATCATCCGTTCTAAACAATTCAGCTTGAAACCAATGGATTCTGAAGAAGCGGTATTACAAATGGATTTACTTGGTACTGATTTCT
       D  K  D  D  E  I  E  I  I  R  S  K  Q  F  S  L  K  P  M  D  S  E  E  A  V  L  Q  M  D  L  L  G  T  D  F

531   TCATCTTCAATGACCGTGAAACTGATGGTACAAGCATTGTTTACCGCCGTAAAGACGGAAAATATGGTTTGATTGAAACTGTTGAAAACTAATATGTGATATTTGA
      F  I  F  N  D  R  E  T  D  G  T  S  I  V  Y  R  R  K  D  G  K  Y  G  L  I  E  T  V  E  N  -

637   AAGGGCTCTTGCTGCATTTTCTGCTGCAAGAGTTTCTTTTTTTGAGAAAGCCCTTATTAAGATTTGATTAATAAAAATACAATTGATTGATTTACACGGGGTGTCC
                                                  P1  ←35→                                  ←10→
743   ATGTCAAAATAAGAGGGATGTATTAAGTTCATAATTGTAATGTGAGCTCCGATGAGTGAGCGGCATATGATTATGATATCCATGTGGCACATGATGTTAACAAAAA
                                P2  ←35→                  ←10→
849   GAGAATGAAACTGTGAGAAGTACATCTTGATAAACACAACTAGGCAGTTTATTAAAAAATAATGAACAGTATCCTATGAGTTTTTAAGTATAAATTAAGCCATATA
                                                                                   secA
955   AATGGTAAGATAAATTGTTGTAAGCCAAACAGTTTTTATACCAAAGGAGCGAACAGAATGGGTTTTTAACAAAAATTGTTGACGGCAATAAGAGAGAAATCAAAC
                                                     RBS                M  G  F  L  T  K  I  V  D  G  N  K  R  E  I  K

1061  GCCTAAGTAAGCAAGCTGACAAAGTAATCTCATTAGAAGAAGAAATGTCAATTCTTACTGATGAAGAAATTAGAAATAAAACAAAAGCATTCCAAGAAAGATTGCA
       R  L  S  K  Q  A  D  K  V  I  S  L  E  E  E  M  S  I  L  T  D  E  E  I  R  N  K  T  K  A  F  Q  E  R  L  Q

1167  AGCAGAAGAAGATGTAAGCAAACAAGATAAAATTTTAGAAGAAATATTACCTGAAGCATTTGCGCTTGTCCGTGAAGGAGCTAAACGTGTATTTAATATGACACCT
       A  E  E  D  V  S  K  Q  D  K  I  L  E  E  I  L  P  E  A  F  A  L  V  R  E  G  A  K  R  V  F  N  M  T  P

1273  TATCCAGTTCAAATCATGGGTGGTATCGCCATTCATAATGGTGACATTTCAGAAATGAGAACAGGTGAAGGTAAAACATTAACTGCAACGATGCCGACTTATTTAA
       Y  P  V  Q  I  M  G  G  I  A  I  H  N  G  D  I  S  E  M  R  T  G  E  G  K  T* L  T  A  T  M  P  T  Y  L

1379  ACGCCTTAGCAGCACGTGGTGTGCATGTTATTACAGTCAATGAATACTTGGCAAGTTCTCAAAGAGAAGAAATGGCCGAGTTATATAATTTCCTTGGTTTATCAGT
      N  A  L  A  A  R  G  V  H  V  I  T  V  N  E  Y  L  A  S  S  Q  R  E  E  M  A  E  L  Y  N  F  L  G  L  S  V

1485  CGGATTGAACTTGAACAGCTTATCAACAGAACAAAAGCGTGAAGCTTATAATGCAGATATTACGTATAGTACAAATAATGAATTAGGCTTCGACTATTTACGCGAT
       G  L  N  L  N  S  L  S  T  E  Q  K  R  E  A  Y  N  A  D  I  T  Y  S  T  N  N  E  L  G  F  D  Y  L  R  D

1591  AACATGGTGAATTATTCAGAAGAACGTGTTATGCGTCCGCTTCATTTCGCTATCATTGATGAGGTCGACTCTATTTTAATCGATGAAGCGCGTACACCATTGATTA
       N  M  V  N  Y  S  E  E  R  V  M  R  P  L  H  F  A  I  I  D  E  V  D  S  I  L  I  D** E  A  R  T  P  L  I

1697  TTTCAGGGGAAGCTGAAAAATCAACATCTCTTTATACACAAGCAAATGTTTTCGCTAAAATGTTAAAAGCAGAAGATGATTATAATTATGATGAAAAAACAAAATC
      I  S  G  E  A  E  K  S  T  S  L  Y  T  Q  A  N  V  F  A  K  M  L  K  A  E  D  D  Y  N  Y  D  E  K  T  K  S

1803  AGTACAATTAACAGATCAAGGTGCTGATAAAGCTGAACGTATGTTCAAGTTAGATAACTTATATGATTTGAAAAACGTTGATATTATCACGCATATCAATACAGCA
       V  Q  L  T  D  Q  G  A  D  K  A  E  R  M  F  K  L  D  N  L  Y  D  L  K  N  V  D  I  I  T  H  I  N  T  A

1909  TTACGTGCTAACTATACATTGCAACGCGATGTAGATTACATGGTTGTAGATGGAGAAGTATTGATTGTCGACCAATTTACAGGTCGAACAATGCCAGGTCGTCGAT
       L  R  A  N  Y  T  L  Q  R  D  V  D  Y  M  V  V  D  G  E  V  L  I  V  D  Q  F  T  G  R  T  M  P  G  R  R

2015  TCTCTGAAGGACTTCACCAAGCGATTGAGGCTAAAGAAGGGGTTCAAATTCAAAATGAATCTAAAACAATGGCTTCTATCACATTCCAAAACTACTTCCGTATGTA
      F  S  E  G  L  H  Q  A  I  E  A  K  E  G  V  Q  I  Q  N  E  S  K  T  M  A  S  I  T  F  Q  N  Y  F  R  M  Y

2121  TAATAAATTAGCCGGTATGACAGGTACTGCTAAAACAGAGGAAGAAGAATTCCGTAACATTTATAATATGACAGTTACACAAATTCCAACGAACCGTCCTGTTCAA
       N  K  L  A  G  M  T  G  T  A  K  T  E  E  E  E  F  R  N  I  Y  N  M  T  V  T  Q  I  P  T  N  R  P  V  Q

2227  CGTGAAGATAGACCTGACTTGATTTTCATCAGCCAAAAAGGCAAGTTCGATGCTGTTGTTGAAGATGTTGTTGAAAAACATAAAAAAGGCCAACCAATTCTTTTAG
       R  E  D  R  P  D  L  I  F  I  S  Q  K  G  K  F  D  A  V  V  E  D  V  V  E  K  H  K  K  G  Q  P  I  L  L

2333  GTACTGTAGCGGTTGAAACAAGTGAATACATTTCACAACTATTGAAAAAACGCGGTGTGCGTCATGATGTCTTAAACGCTAAAAACCATGAACGCGAAGCTGAAAT
      G  T  V  A  V  E  T  S  E  Y  I  S  Q  L  L  K  K  R  G  V  R  H  D  V  L  N  A  K  N  H  E  R  E  A  E  I

2439  CGTATCTACAGCAGGTCAAAAAGGTGCAGTCACAATCGCAACAAACATGGCTGGTCGTGGTACCGATATTAAATTAGGCGAAGGTGTTGAAGAATTAGGCGGCCTT
       V  S  T  A  G  Q  K  G  A  V  T  I  A  T  N  M  A  G  R  G  T  D  I  K  L  G  E  G  V  E  E  L  G  G  L

2545  GCTGTTATTGGTACAGAACGTCATGAATCACGCCGTATCGATGATCAGTTGCGTGGTCGTTCTGGACGACAAGGTGACCGCGGAGAAAGCCGTTTCTATTTATCAT
       A  V  I  G  T  E  R  H  E  S  R  R  I  D  D  Q  L  R  G  R  S  G  R  Q  G  D  R  G  E  S  R  F  Y  L  S

2651  TACAAGATGAGTTGATGGTACGTTTCGGTTCTGAACGTCTGCAAAAAATGATGGGCCGATTAGGTATGGATGACTCTACACCGATTGAATCAAAAATGGTATCTCG
      L  Q  D  E  L  M  V  R  F  G  S  E  R  L  Q  K  M  M  G  R  L  G  M  D  D  S  T  P  I  E  S  K  M  V  S  R

2757  AGCTGTTGAATCTGCACAAAAACGTGTTGAAGGTAACAACTTCGATGCACGTAAACGTATCTTAGAATACGATGAAGTTTTACGTAAACAACGTGAAATCATTTAT
       A  V  E  S  A  Q  K  R  V  E  G  N  N  F  D  A  R  K  R  I  L  E  Y  D  E  V  L  R  K  Q  R  E  I  I  Y

2863  GGTGAACGTAATAATATTATCGATTCAGAATCAAGTTCTGAATTAGTCATTACAATGATACGCTCTACATTAGATCGTGCAATCAGTTATTATGTAAATGAAGAAT
       G  E  R  N  N  I  I  D  S  E  S  S  S  E  L  V  I  T  M  I  R  S  T  L  D  R  A  I  S  Y  Y  V  N  E  E

2969  TGGAAGAAATTGACTATGCGCCGTTTATTAATTTTGTGGAAGATGTTTTCTTGCACGAAGGTGAAGTCAAAGAAGATGAAATCAAAGGTAAAGGTAAAGATCGTGA
      L  E  E  I  D  Y  A  P  F  I  N  F  V  E  D  V  F  L  H  E  G  E  V  K  E  D  E  I  K  G  K  G  K  G  R  E

3075  GGATATTTTCGATACAGTATGGGCTAAAATTGAAAAAGCTTATGAAGCACAAAAAGCCAATATACCCGACCAATTCAATGAATTCGAACGTATGATTTTATTACGT
       D  I  F  D  T  V  W  A  K  I  E  K  A  Y  E  A  Q  K  A  N  I  P  D  Q  F  N  E  F  E  R  M  I  L  L  R
```

```
3181 TCTATTGATGGAAGATGGACAGACCATATCGATACAATGGATCAATTACGTCAAGGTATCCATTTACGTTCATACGGTCAACAAAACCCACTTCGCGACTATCAAA
      S  I  D  G  R  W  T  D  H  I  D  T  M  D  Q  L  R  Q  Q  I  H  L  R  S  Y  G  Q  Q  N  P  L  R  D  Y  Q

3287 ATGAAGGGCACCAACTATTTGATACAATGATGGTCAATATTGAAGAAGACGTCAGCAAATATATCTTGAAATCAATTATCACAGTAGATGATGATATTGAACGTGA
     N  E  G  H  Q  L  F  D  T  M  M  V  N  I  E  E  D  V  S  K  Y  I  L  K  S  I  I  T  V  D  D  D  I  E  R  D

3393 TAAAGCAAAAGAATATCAAGGACAACATGTATCAGCTGAAGATGGAAAAGAAAAAGTAAAACCGCAACCAGTTGTTAAAGATAATCACATCGGAAGAAATGATCCT
       K  A  K  E  Y  Q  G  Q  H  V  S  A  E  D  G  K  E  K  V  K  P  Q  P  V  V  K  D  N  H  I  G  R  N  D  P

3499 TGTCCATGCGGCAGCGGTAAAAAGTATAAAAATTGCTGCGGTAAATAGTAAGTTGTATTAGGACCACTGTTAAATAGCTTTAAGAGAGATGCTCAATTGAAATTGG
      C  P  C  G  S  G  K  K  Y  K  N  C  C  G  K  -  -

3605 GTTATCTTTCTAAGGGCTGTCAGCGGTCTTTTTTCAATCCAACAAAAATATGGATATATGCTAAAATAATAGAGTAATCTGGAAAATTAAACTGGAATTGGAGAGA

3711 TATGAAAATGGAATTAT
```

Abb. 4: Nukleotidsequenz des *secA*-Gens und des orf1-Gens aus *S.carnosus*, sowie die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen der entsprechenden Proteine. P_1,P_2: potentielle Promotoren des *secA*-Gens; ——→ : -10- bzw. -35-Region der Promotoren; RBS : Ribosomenbindungsstelle; * : ATP-Bindungsstelle A-Motiv; **: ATP-Bindungsstelle B-Motiv. Stopcodons sind durch einen Strich (-) gekennzeichnet. Mögliche Terminatoren sind unterstrichen (_____).

3.1.3. Vergleich der Aminosäuresequenz des *S.carnosus* SecA-Proteins mit anderen bekannten SecA-Proteinen

Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen homologer Proteine besteht die Möglichkeit, konservierte und damit funktionell wichtige Bereiche zu identifizieren. Die Aminosäuresequenzen von in der Sequenzdatenbank (EMBL-Sequenzdatenbank, Heidelberg) verfügbaren SecA-homologen Proteine wurden daher miteinander verglichen (Abb.5). Das SecA-Protein aus *S.carnosus* wurde mit den SecA-Proteinen der prokaryontischen Organismen *Escherichia coli* (Schmidt et al. 1988), *Bacillus subtilis* (Sadaie et al. 1991), *Caulobacter crescentus* (Kang u. Shapiro 1994) und *Synechococcus* PCC7942 (Nakai et al. 1994), sowie mit den SecA-Homologen aus den Plastiden der Algen *Antithamnion spec.* (Valentin 1993) und *Pavlova lutherii* (Scaramuzzi et al. 1992) verglichen. Neben dem A- und dem B-Motiv der ATP-Bindungsstelle, die bei allen Proteinen vorhanden ist, zeigen sich vor allem im N-Terminus bis Aminosäure 530 (*S.carnosus* SecA) der Proteine Bereiche konservierter Aminosäuren (Abb.5). Der Anteil an identischen Aminosäuren liegt hier bei 30,8%, während im C-terminalen Bereich nur 9% der Aminosäuren konserviert sind. Für verschiedene Gruppen der SecA-Proteine lassen sich jedoch auch im C-Terminus konservierte Bereiche erkennen, die sie von den übrigen SecA-Proteinen unterscheiden (Abb.5, umrahmte Felder). In dieser Hinsicht fällt eine Lücke im Alignment der Proteine ab Aminosäure 506 (*S.carnosus* SecA) auf, die zwischen zwei gut konservierten Bereichen liegt und den Übergang vom N- zum C-terminalen Teil der Proteine markiert.

Die SecA-Proteine wurden weiterhin mit Hilfe des PALIGN-Programms (Myers u. Miller 1988) jeweils einzeln miteinander verglichen und der Anteil an identischen und ähnlichen Aminosäuren bestimmt. Die Prozentzahl der Summe aus identischen und ähnlichen Aminosäuren entspricht dem Homologiegrad zwischen zwei untersuchten Proteinen und ist ein Maß für ihre evolutionäre Verwandtschaft (Tab.5).

	Sc	Bs	Ec	Cc	Sy	At	Pl
Sc		72,9	61,8	59,5	49,3	45,1	47
Bs	59,8		65,2	62,6	50,5	47,4	48,3
Ec	46,6	52,6		66,1	36	45,4	44,3
Cc	44	47,6	52,4		42,7	45,6	43,8
Sy	33,5	35,8	23,5	30,3		66,3	62
At	31,3	33,2	31,7	32,2	50,5		60,1
Pl	31,4	33,8	31,8	29,3	47,5	47	

Tab. 5: Vergleich der Homologie zwischen den SecA-Proteinen. Über der Diagonalen ist der Prozentsatz an identischen und ähnlichen Aminosäuren, unter der Diagonalen der Prozentsatz der identischen Aminosäuren angegeben. Sc: *S.carnosus*, Bs: *B.subtilis*, Ec: *E.coli*, Cc: *C.crescentus*, Sy: *Synechococcus* PCC7942, At: *Antithamnion spec.*, Pl: *P.lutherii*.

Der Verwandtschaftsgrad, der sich aus diesem Vergleich ergibt, spiegelt die bekannten phylogenetischen Beziehungen der Organismen untereinander wieder. Je näher sich die Organismen im Stammbaum stehen, um so höher ist auch der Homologiegrad der SecA-Proteine. So besitzen die SecA-Proteine aus den nahe verwandten Gram-positiven Bakterien *S.carnosus* und *B.subtilis* 59,8% identische Aminosäuren, wohingegen die SecA-Proteine aus *S.carnosus* und den Plastiden von *Antithamnion* nur 31,3% Aminosäuren gemeinsam haben.
Es stellte sich nun die Frage, ob die SecA-Proteine zwischen verschiedenen Organismen austauschbar sind und in einem heterologen System ihre Funktion ausüben können. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden die SecA-Proteine aus *S.carnosus*, *B.subtilis* und *E.coli* auf ihre Funktionalität in *E.coli* und *B.subtilis secA*-Mutanten untersucht.

Abb. 5: Vergleich der Aminosäuresequenzen von SecA-Proteinen aus verschiedenen Organismen. Sc: *Staphylococcus carnosus*, Bs: *Bacillus subtilis*, Ec: *Escherichia coli*, Cc: *Caulobacter crescentus*, Sy: *Synechococcus* PCC7942, At: *Antithamnion spec.*, Pl: *Pavlova lutherii*. I : identische Aminosäuren. . : Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften (I-L-M, A-S-T, N-Q, D-E, R-K, F-Y-W). Die Umrandungen kennzeichnen verschiedene Bereiche, die nur bei einigen der SecA-Proteinen konserviert sind. Der Vergleich wurde mit dem Computerprogramm CLUSTAL durchgeführt (Higgins u. Sharp 1988).

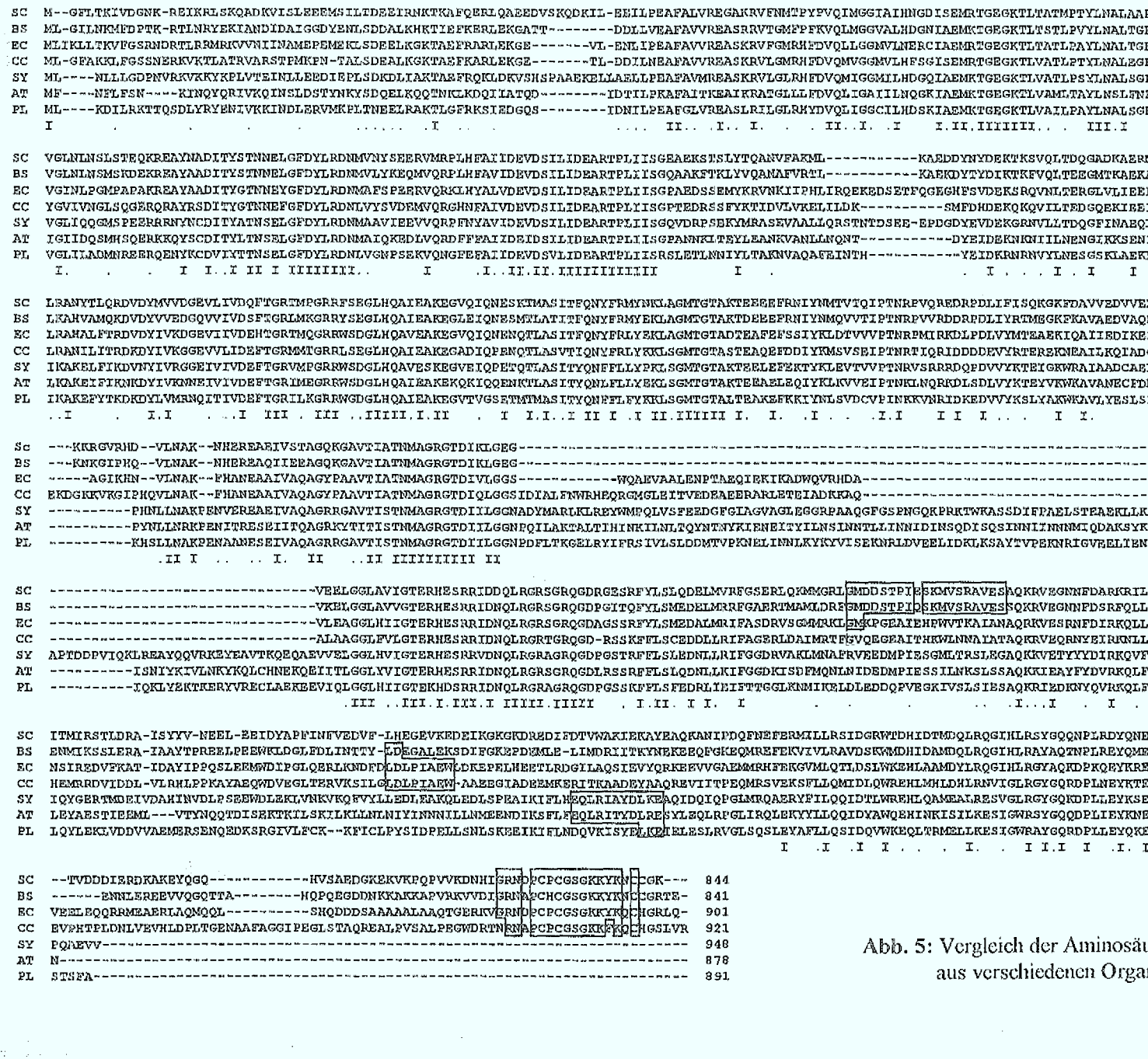


Abb. 5: Vergleich der Aminosäuresequenzen von SecA-Proteinen aus verschiedenen Organismen.

3.1.4. Funktionelle Charakterisierung der SecA-Proteine aus *S.carnosus*, *B.subtilis* und *E.coli* in *E.coli*

3.1.4.1. Expression der SecA-Proteine in *E.coli*

Zur Untersuchung der physiologischen Eigenschaften der SecA-Proteine in *E.coli* wurde das *secA*-Gen aus *S.carnosus* in den *E.coli* Expressionsvektor pTrc99a kloniert. Die Expression des *secA*-Gens im resultierenden Plasmid pMA12[pTrc99a::$secA_{S.c.}$] (Abb.6) liegt hierbei, vergleichbar den pUC18/19-Vektoren, unter Kontrolle des Laktose-Promotor/Operator-Systems und ist durch IPTG induzierbar (Yanisch-Perron et al. 1985). Entsprechende Plasmide, die das *secA*-Gen aus *E.coli* oder *B.subtilis* tragen, lagen mit den Plasmiden pMKL18[pUC18::$secA_{E.c.}$] bzw. pMKL40[pTrc99a::$secA_{B.s.}$] (Klose et al. 1993) bereits vor und wurden wie auch pMA12 in den *E.coli* Stamm MC4100 transformiert.

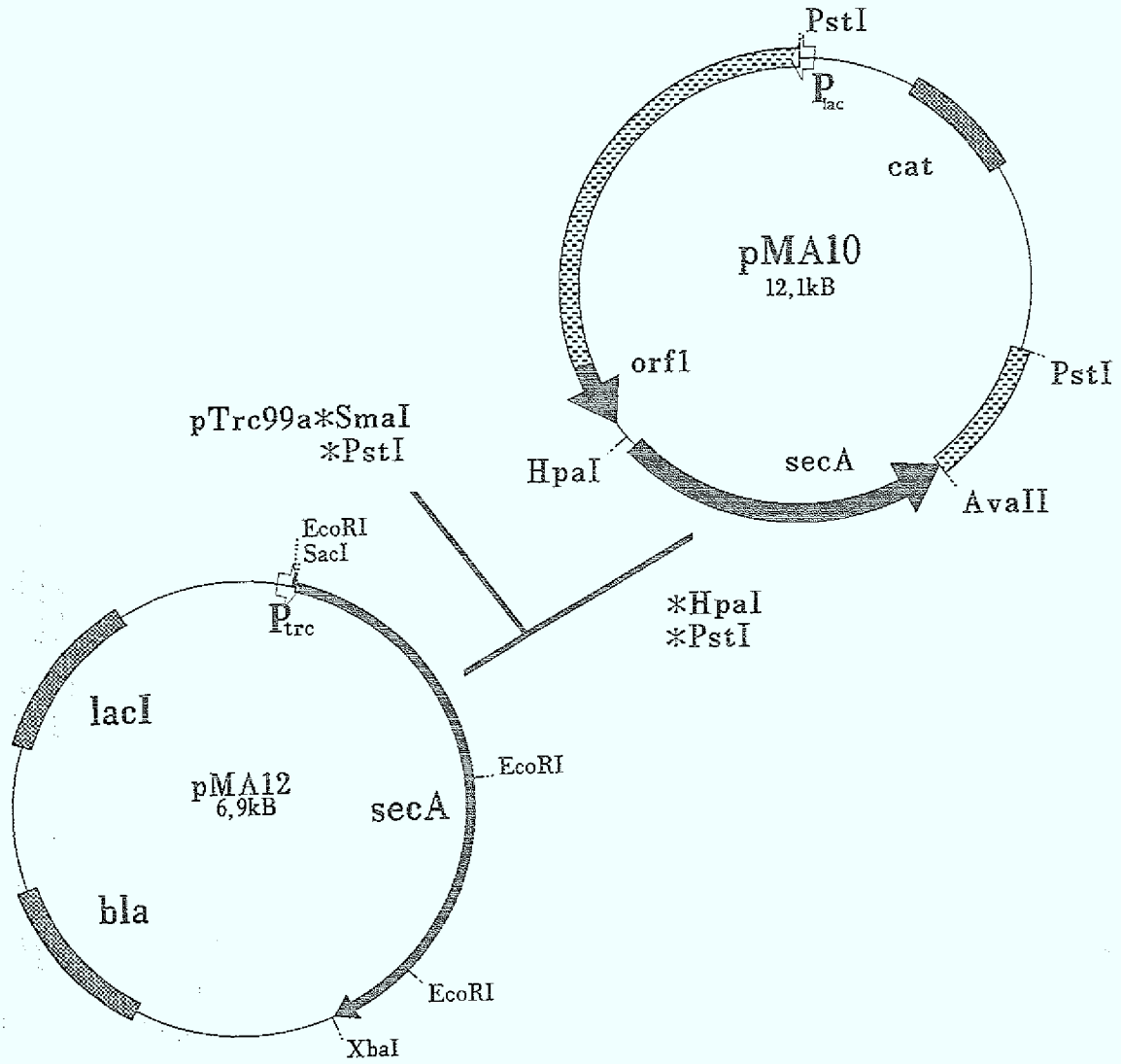


Abb. 6: Schema der Konstruktion von pMA12. cat: Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen; bla: ß-Laktamase-Gen; lacI: lacI-Repressor-Gen; P_{lac} : lac-Promotor; P_{trc}: synthetischer IPTG-induzierbarer Promotor. Ein 4 kB HpaI/PstI-Fragment aus pMA10 wurde in den mit SmaI und PstI verdauten Vektor ligiert.

Die Synthese der SecA-Proteine wurde 2 h nach Induktion mit 1mM IPTG in den Gesamtzellextrakten aus Zellfraktionen der jeweiligen Kulturen untersucht. Nach Auftrennung in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine im Western-Blot gleichzeitig sowohl mit Antikörpern gegen das SecA-Protein aus *E.coli* sowie mit Antikörpern gegen das SecA-Protein aus *B.subtilis* geblottet (Abb.7).

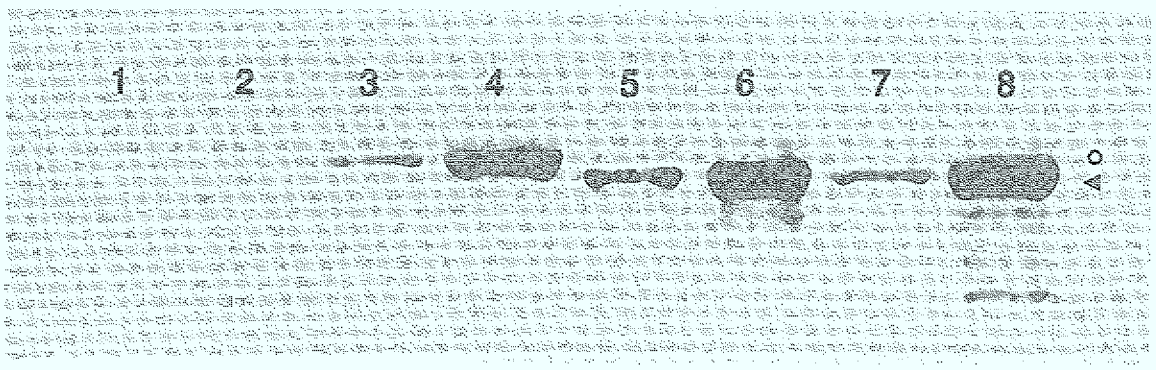


Abb. 7: Expression der SecA-Proteine aus *E.coli*, *S.carnosus* und *B.subtilis* in *E.coli* MC4100. Western-Blot mit Antikörpern gegen das SecA aus *E.coli* und aus *B.subtilis*. Gesamtzellextrakte von MC4100 mit pTrc99a (Vektor, 1,2), pMKL18 ($secA_{E.c.}$, 3,4), pMA12 ($secA_{S.c.}$, 5,6) und pMKL40 ($secA_{B.s.}$, 7,8) kultiviert mit 0,5% Glukose (1,3,5,7) oder 1mM IPTG (2,4, 6,8). Kreis: *E.coli* SecA-Protein. Pfeil: *B.subtilis* SecA und *S.carnosus* SecA-Protein. Entsprechend der OD600 der Ausgangskulturen wurden die Proteinmengen gleicher Zellzahlen aufgetragen.

Unabhängig von den Anzuchtbedingungen zeigte MC4100 mit dem Vektor allein (Abb.7: 1, 2) eine Proteinbande bei 100 kDa (Kreis). Diese entspricht dem *E.coli* SecA-Protein, welches ausgehend von der chromosomalen Kopie des *secA*-Gens synthetisiert wird. Banden vergleichbarer Stärke fanden sich auch bei den Stämmen, die zusätzlich eine plasmidkodierte Kopie des *S.carnosus* (Abb.7: 5, 6) oder *B.subtilis secA*-Gens (Abb.7: 7, 8) trugen. Dagegen ließ sich in Gegenwart des Plasmids pMKL18 eine erhöhte Menge an *E.coli* SecA-Protein auch schon unter nicht induzierten Bedingungen nachweisen (Abb.7: 3), während die Induktion mit IPTG zu einer starken Überexpression des *E.coli* SecA-Proteins führte. In den Spuren 5-8 zeigte sich zusätzlich zum *E.coli* SecA eine Bande bei ca. 90 kDa (Pfeil), die dem *S.carnosus* SecA-Protein (Abb.7: 5, 6) bzw. dem *B.subtilis* SecA-Protein (Abb.7: 7, 8) entspricht. Auch hier konnte durch Induktion eine vielfach erhöhte Synthese des plasmidkodierten Proteins erreicht werden. Die bei niedrigeren Molekulargewichten zu beobachtenden schwachen

Banden stellen wahrscheinlich SecA-spezifische Abbauprodukte dar, die bei Überexpression der Gram-positiven SecA-Proteine (Abb.7: 6, 8) auftraten. Bei reduzierter Synthese der Proteine (Abb.7: 3, 5, 7) war dieser Abbau nicht nachzuweisen. Im Western-Blot mit Antikörpern gegen das *E.coli* SecA-Protein zeigte das *S.carnosus* SecA vergleichbar schwache Kreuzreaktivität wie das *B.subtilis* SecA-Protein (Daten nicht gezeigt). Die dargestellten Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Daten von M. Klose et al. (1993), die die Expression des *E.coli* SecA bzw. des *B.subtilis* SecA-Proteins in *E.coli* JM109 beschrieben.

3.1.4.2. Heterologe Komplementation temperatursensitiver *E.coli secA*-Mutanten

Für das *B.subtilis* SecA-Protein wurde gezeigt, daß durch eine moderate Expression dieses Proteins der Wachstumsdefekt von temperatursensitiven *E.coli secA*-Mutanten komplementiert werden kann (Overhoff et al. 1991, Klose et al. 1993). Hieraus wurde gefolgert, daß das *B.subtilis* SecA-Protein, wenn auch nur eingeschränkt, in *E.coli* funktionell ist. Wie aus den Homologievergleichen (s. 3.1.3) hervorgeht, ist die Ähnlichkeit zwischen dem *B.subtilis* SecA und dem *E.coli* SecA deutlich höher als zwischen *S.carnosus* und *E.coli*. Es stellte sich deshalb die Frage, ob die größeren Unterschiede in der Aminosäuresequenz des *S.carnosus* SecA zum *E.coli* SecA-Protein auch zu einer Beeinträchtigung der Funktionalität des *S.carnosus* SecA-Protein in *E.coli* führen oder ob trotz dieser Unterschiede die für die Funktion in *E.coli* wichtigen Domänen erhalten geblieben sind. Dazu wurden die *E.coli* Stämme BA13[$secA^{amb}$, $subF^{ts}$] (Cabelli et al. 1988) und MM66[$genX^{amb}$, $supF^{ts}$] (Schmidt et al. 1988) mit den oben beschriebenen Plasmiden transformiert und die transformierten Stämme aus ÜNK auf Vollmedium mit 0,5% Glukose oder 1mM IPTG bei der nicht permissiven Temperatur (42°C) ausgestrichen. Das Wachstumsverhalten mit Glukose ist in Tabelle 6 zusammengefaßt.

		Komplementation des Wachstumsdefektes	
		Stamm	
secA-Allel	Plasmid	MM66	BA13
	-	-	-
	pUC19/pTrc99a	-	-
E.coli	pMKL18	+	+
B.subtilis	pMKL40	(+)	(+)
S.carnosus	pMA12	-	-

Tab. 6: Komplementation der *E.coli secA*-Mutanten MM66 und BA13 durch pUC19/pTrc99a (Vektor), pMKL18($secA_{E.c.}$), pMKL40($secA_{B.s.}$) und pMA12($secA_{S.c.}$) in Anwesenheit von 0,5% Glukose. +: Wachstum; - : kein Wachstum; (+) : eingeschränktes Wachstum.

Die Vektoren allein ermöglichten kein Wachstum der Mutanten bei der nicht-permissiven Temperatur, während pMKL18 sowohl bei Reprimierung wie auch bei Induktion der Expression des *E.coli* SecA-Proteins in der Lage war, den Wachstumsdefekt der Mutanten bei 42°C zu komplementieren. Demgegenüber ermöglichte das SecA aus *B.subtilis* nur auf reduziertem Syntheseniveau (0,5% Glukose) ein Wachstum der Mutante bei 42°C. Die Kolonien waren hierbei deutlich kleiner als mit pMKL18. Das SecA-Protein aus *S.carnosus* konnte unter keiner der getesteten Bedingungen den Wachstumsdefekt der Mutanten komplementieren. Auch die Variation der Induktionsbedingungen durch verschiedene Konzentrationen an Induktor oder Glukose führte nicht zur Komplementation der Mutanten.
Diese Beobachtungen zeigen, daß das *S.carnosus* SecA, anders als das SecA aus *B.subtilis*, unter vergleichbaren Bedingungen nicht in der Lage ist, das homologe SecA in *E.coli* zu ersetzen. Um nun zu untersuchen, ob das SecA-Protein aus *S.carnosus* in einem näher verwandten Organismus funktionell ist, wurde das *S.carnosus secA*-Gen in einer *B.subtilis secA*-Mutante exprimiert und die Komplementation des Wachstums- und Proteinexportdefektes der Mutante durch das *S.carnosus* SecA-Protein untersucht.

3.1.5. Charakterisierung des *S.carnosus* SecA-Proteins in *B.subtilis*

3.1.5.1. Expression verschiedener *secA*-Gene in *B.subtilis*

Zur funktionellen Untersuchung der SecA-Proteine in *B.subtilis* wurden die *secA*-Gene aus *S.carnosus*, *E.coli* und *B.subtilis* in den Expressions-Shuttle-Vektor pWH1520 kloniert. Dieser Vektor repliziert in *E.coli* und *B.subtilis* mit hoher Kopienzahl und ermöglicht die regulierbare Expression von Genen in *B.subtilis* mittels des durch Xylose induzierbaren *xylA*-Promotors (Rygus u. Hillen 1991). Zur Klonierung des *E.coli secA*-Gens wurde ein 2,8 kB XbaI/NdeI-Fragment aus pMKL18 isoliert und in den mit SpeI und SmaI geschnittenen Vektor zum Plasmid pWE10 ligiert (Abb.8). PWA11[pWH1520::$secA_{S.c.}$] wurde über die Ligation eines 2,7 kB BstXI/SphI-Fragmentes aus pMA12 in den mit SpeI und SphI geschnittenen Vektor konstruiert. PWMKL1[pWH1520::$secA_{B.s.}$] trägt zwischen der SpeI und Asp718-Schnittstelle des Vektors ein PCR-Fragment des *B.subtilis secA*-Gens von pMKL40 (Klose et al. 1993), welches mit den Oligonukleotiden OMKL23.1 und OMKL24 (2.5.4.) erhalten wurde. Die Enden des PCR-Fragmentes wurden mit XbaI und Asp718 geschnitten. In allen Fällen wurden die Klonierungsstellen durch Sequenzierung überprüft.

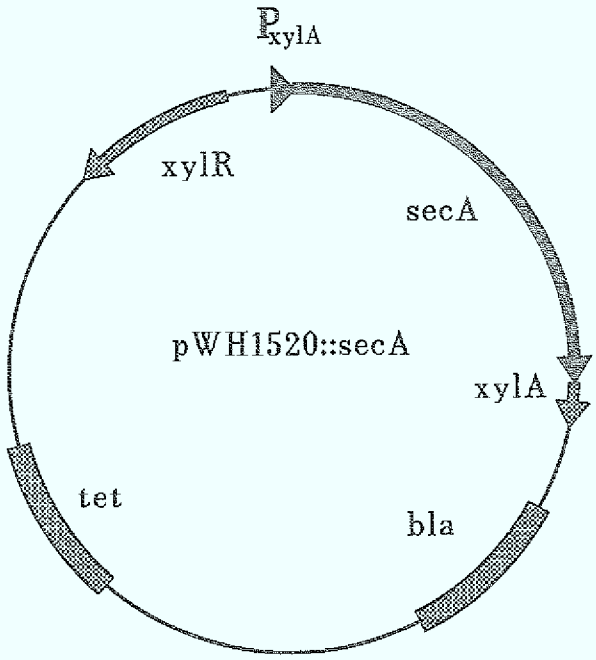


Abb. 8: Schematischer Aufbau der zur Expression der SecA-Proteine in *B.subtilis* benutzten Vektoren. xylA: Xyloseisomerase-Gen; xylR: Xylose-Repressor-Gen; tet: Tetrazyclinresistenz-Gen; P_{xylA}: xylA-Promotor

Nach der Transformation der Plasmide in den *B.subtilis* Wildtyp-Stamm NIG1121 und in die temperatursensitive *secA*-Mutante NIG1152[*div341*^{ts}] wurden Kulturen der transformierten Stämme 2 h mit 0,4% Xylose induziert und von der Zellfraktion Gesamtzellextrakte hergestellt. Analog dem Vorgehen bei *E.coli* wurden nach Elektrophorese im SDS-Polyacrylamidgel Western-Blot-Experimente mit Antikörpern gegen das SecA-Protein aus *B.subtilis* und aus *E.coli* durchgeführt. Die Ergebnisse waren für den Wildtyp und die Mutante identisch und sind in Abb.9 für den Wildtyp dargestellt.

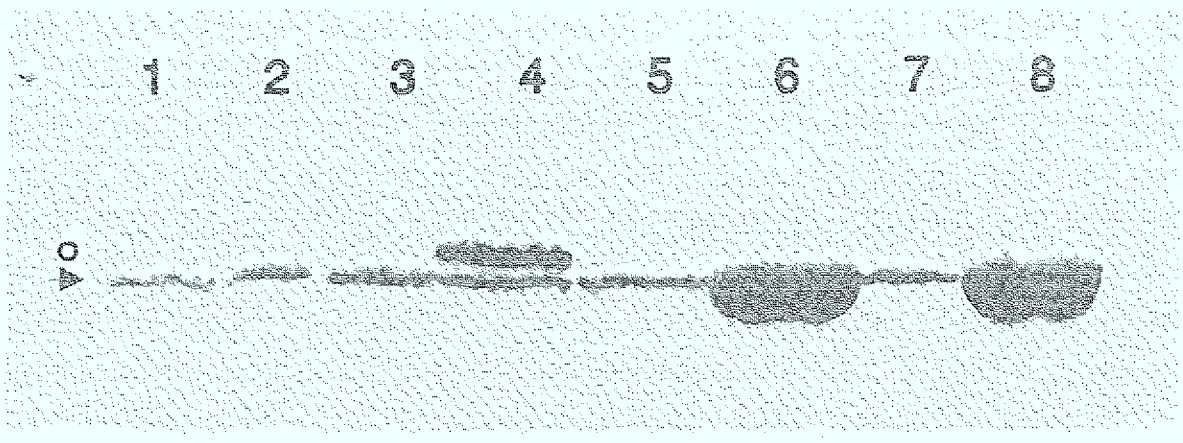


Abb. 9: Expression der SecA-Proteine aus *E.coli*, *S.carnosus* und *B.subtilis* in *B.subtilis*. Proben aus Kulturen mit Glukose (1,3,5,7) oder Xylose (2,4,6,8) von *B.subtilis* NIG1121^{WT} mit pWH1520 (Vektor, 1,2), pWE10 ($secA_{E.c.}$, 3,4), pWA11 ($secA_{S.c.}$, 5,6) und pWMKL1 ($secA_{B.s.}$,7,8). Kreis: *E.coli* SecA-Protein; Pfeil: Gram-positives SecA-Protein. Entsprechend der OD600 der Ausgangskulturen wurden Proteinmengen gleicher Zellzahlen aufgetragen.

Die Expression der plasmidkodierten SecA-Proteine war in allen Fällen von der Induktion mit Xylose abhängig (Abb.9: 4, 6, 8). Ohne Induktion (Abb.9: 3, 5, 7) war im Vergleich mit dem Vektor (Abb.9: 1, 2) keine Synthese der SecA-Proteine über das chromosomal-kodierte Niveau hinaus zu erkennen. Dabei war auffallend, daß das *E.coli* SecA-Protein nicht in dem Maß wie die Gram-positiven SecA-Proteine synthetisiert wurde. Da keine Abbauprodukte des Proteins festzustellen waren, war die verringerte Expressionsrate wahrscheinlich durch die mit TGAGAT schlecht konservierten Ribosomenbindungsstelle vor dem *E.coli secA*-Gen und damit durch eine niedrige Translationsrate bedingt. Trotzdem lag die Expressionsrate bei Induktion bei pWE10($secA_{E.c.}$) und noch in stärkerem Maße bei pWA11($secA_{S.c.}$) und pWMKL1($secA_{B.s.}$) über dem Niveau des chromosomal-kodierten *B.subtilis* SecA-Proteins.
Im weiteren wurde das Wachstumsverhalten der temperatursensitiven *B.subtilis secA*-Mutante NIG1152[$div341^{ts}$] in Anwesenheit der verschiedenen SecA-Proteine untersucht.

3.1.5.2. Komplementation des Wachstumsdefektes der *B.subtilis secA*-Mutante NIG1152

Zum Test auf Wachstumskomplementation wurden gleiche Zellzahlen der transformierten Stämme auf LB-Agarplatten mit 0,4% Glukose oder Xylose ausplattiert und bei 30°C sowie 42°C inkubiert. Die Ergebnisse sind in Tab.7 zusammengefaßt.

		NIG1152			
		30°C		42°C	
secA-Allel	Plasmid	G	X	G	X
	-	+	+	-	-
-	pWH1520	+	+	-	-
B.subtilis	pWMKL1	+	+	+	+
E.coli	pWE10	+	+	-	-
S.carnosus	pWA11	+	+	+	+

Tab. 7: Wachstum von *B.subtilis* NIG1152[$div341^{ts}$] mit pWH1520 (Vektor), pWMKL1($secA_{B.s.}$), pWE10($secA_{E.c.}$) und pWA11($secA_{S.c.}$) bei 30°C und 42°C nach 24 h Inkubation. + : Wachstum; - : kein Wachstum; G: 0,4% Glukose; X: 0,4% Xylose.

Im Gegensatz zum Komplementationsverhalten in *E.coli secA*-Mutanten ermöglichte das SecA-Protein aus *S.carnosus* sowohl unter induzierten wie auch unter nicht induzierten Bedingungen ein Wachstum der *B.subtilis* Mutante bei 42°C. Dabei war im Wachstum kein Unterschied zum *B.subtilis* SecA-Protein festzustellen. Dies deutete daraufhin, daß das *S.carnosus* SecA in *B.subtilis* in gleichem Maß wie das homologe SecA-Protein die Funktion

im Exportapparat ausüben kann. Demgegenüber konnte das SecA-Protein aus *E.coli* den Wachstumsdefekt nicht komplementieren. Es scheinen daher zwischen dem SecA-Protein aus *E.coli* und *B.subtilis* Unterschiede zu existieren, die den funktionellen Austausch der Faktoren in *B.subtilis* verhindern.

Um die Funktionalität des SecA-Proteins aus *S.carnosus* in *B.subtilis* genauer zu untersuchen und um sicherzustellen, daß es sich bei der beobachteten Wachstumskomplementation um die Komplementation des SecA-spezifischen Defektes im Proteinexport handelte, wurde im folgenden die Prozessierungskinetik von Exportproteinen in der temperatursensitiven *secA*-Mutante NIG1152[*secA*(div341^{ts})] unter verschiedenen Bedingungen untersucht.

3.1.5.3. Export des äußeren Membranproteins OmpA aus *E.coli* in *B.subtilis* NIG1152

Wie von Meens et al. (1993) gezeigt, wird das authentische pOmpA-Protein aus *E.coli* in *B.subtilis* Wildtyp mit einer zu *E.coli* vergleichbaren Kinetik über die Cytoplasmamembran transportiert. Um den Proteinexport in NIG1152(*secA*^{ts}) zu untersuchen, wurde das Plasmid pJM20[pEF1::ompA] (Meens et al. 1993), welches das Gen für das mit IPTG induzierbare pOmpA-Protein trägt, in NIG1152 Stämme transformiert, die zusätzlich die Plasmide zur Expression der SecA-Proteine aus *B.subtilis* bzw. *S.carnosus* oder den Vektor allein enthielten. Mit den resultierenden Stämmen wurden Pulse-Chase-Experimente durchgeführt. Dazu wurden die Stämme bei 30°C bis zur frühen exponentiellen Phase angezogen und anschließend weitere 90 Minuten bei 30°C bzw. 42°C inkubiert. 10 Minuten vor der Markierung mit ^{35}S-Met wurde die Synthese des pOmpA-Proteins induziert. Nach Zugabe von nichtradioaktivem Methionin wurden zu verschiedenen Zeiten Chase-Proben entnommen, das OmpA-Protein mit Antikörpern gefällt und nach Auftrennung im denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel durch Fluorografie sichtbar gemacht. Die Exportkinetik des pOmpA-Proteins in den verschiedenen Stämmen bei 30°C und 42°C ist in Abb.10 dargestellt.

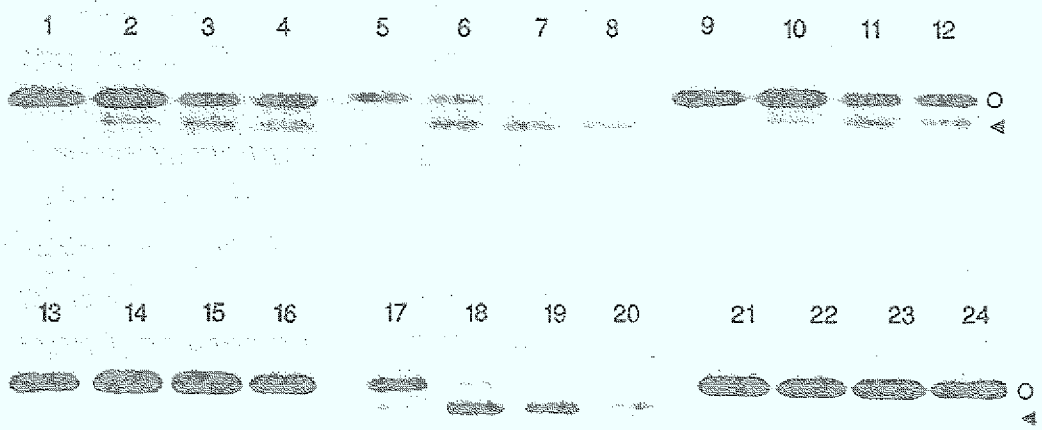


Abb. 10: Prozessierungskinetik von pOmpA in *B.subtilis* NIG1152[*div341*^{ts}] mit den Plasmiden pWH1520 (Vektor, 1-4, 13-16), pWMKL1 (*secA*$_{B.s.}$, 5-8, 17-20) und pWA11 (*secA*$_{S.c.}$, 9-12, 21-24) bei 30°C (1-12) und 42°C (13-24). Chasezeiten: 30 sek (1,5,9,13,17,21), 2 min (2,6,10,14,18,22), 5 min (3,7,11,15,19,23) und 10 min (4,8,12,16, 20,24). Kreis: pOmpA; Pfeil: mOmpA.

Im temperatursensitiven *B.subtilis* Stamm NIG1152[*div341*^{ts},pWMKL1(*secA*$_{B.s.}$)], der zusätzlich zum chromosomal-kodierten SecA(div341)-Protein das plasmidkodierte *B.subtilis* Wildtyp SecA-Protein ausprägte, war bei 30°C eine Prozessierungskinetik vergleichbar der des *B.subtilis* Wildtyp-Stammes zu beobachten (Abb.10: 5-8, vgl. Meens et al. 1993). Das Fehlen des Wildtyp SecA-Proteins in NIG1152[*div341*^{ts},pWH1520(Vektor)] führte dagegen zu einer deutlich verschlechterten Prozessierungsrate (Abb.10: 1-4). Die Mutation im chromosomalen *secA*(*div341*^{ts})-Gen hatte somit einen Defekt im Export des OmpA-Proteins zur Folge, der durch zusätzlich eingebrachtes Wildtyp SecA-Protein kompensiert werden konnte. Wie die Prozessierungskinetik von NIG1152[*div341*^{ts},pWA11(*secA*$_{S.c.}$)] bei 30°C zeigte, war das *S.carnosus* SecA-Protein nicht in der Lage, diesen Exportdefekt zu beheben, da auch hier die Prozessierung von pOmpA mit der gleichen Geschwindigkeit wie bei NIG1152 mit dem Vektor allein erfolgte (Abb.10: 9-12).

Die Inkubation bei nichtpermissiver Temperatur (42°C) führte bei dem nicht komplementierten Stamm NIG1152[*div341*^{ts},pWH1520] zu einer vollkommenen Blockierung der Prozessierung von pOmpA (Abb.10: 13-16). Dieser Exportdefekt wurde durch das Wildtyp SecA-Protein bei NIG1152[*div341*^{ts},pWMKL1] wieder aufgehoben, wobei hier eine schnellere

Kinetik als bei 30°C zu erkennen war (Abb.10: 17-20). Demgegenüber war das *S.carnosus* SecA in NIG1152[*div341*^{ts},pWA11] auch bei 42°C nicht in der Lage, die Prozessierung von pOmpA zu verbessern (Abb.10: 21-24). Wie mit dem Vektor allein zeigte die Mutante mit dem *S.carnosus* SecA-Protein selbst nach 10 Minuten keine prozessierte Form des OmpA-Proteins. Diese Daten deuten darauf hin, daß der Proteinexport auch bei Anwesenheit des *S.carnosus* SecA blockiert und daß somit das *S.carnosus* SecA-Protein in *B.subtilis* nicht funktionell war. Wie der Wachstumsdefekt der nicht komplementierten Mutante bei 42°C jedoch zeigte, führt ein derartiger Proteinexportdefekt zum Absterben der Zellen. Da die Untersuchungen zur Wachstumskomplementation hingegen gezeigt haben, daß der Wachstumsdefekt der Mutante durch pWA11(*secA*$_{S.c.}$) komplementiert wurde, war der beobachtete Block in der Prozessierung des pOmpA sehr wahrscheinlich auf eine spezifische Diskriminierung des OmpA-Vorläufers durch das *S.carnosus* SecA zurückzuführen. Um dies zu überprüfen wurde die Prozessierungskinetik der PräproLipase aus *S.hyicus*, einem typischen Gram-positiven Exportprotein, in *B.subtilis* NIG1152[*div341*^{ts}] untersucht. Wie von Götz et al. (1985) beschrieben, wird die Lipase als Vorläuferprotein mit einer Signalsequenz und einer Prosequenz synthetisiert. Während der Translokation des Proteins über die Zellmembran wird die Signalsequenz abgespalten. Das Propeptid wird dann bei der endgültigen Reifung des Proteins extrazellulär abgetrennt (Wenzig et al. 1990).

3.1.5.4. Export der Lipase aus *S.hyicus* in NIG1152

Zur Expression der *S.hyicus* Lipase wurde der *B.subtilis* Stamm NIG1152[*div341*^{ts}] mit pWH1520(Vektor), pWMKL1(*secA*$_{B.s.}$) oder pWA11(*secA*$_{S.c.}$) zusätzlich mit dem Plasmid pLipPS1 (Popp 1986) transformiert. Die Synthese der Lipase erfolgt konstitutiv ausgehend vom authentischen Lipasepromotor. Analog den Untersuchungen zum OmpA-Protein wurden Pulse-Chase-Experimente durchgeführt (Abb.11).

Die Prozessierung der *S.hyicus* präproLipase bei 30°C zeigte ähnlich wie beim Export des pOmpA-Proteins eine schnellere Kinetik beim Stamm mit dem zusätzlichen *B.subtilis* Wildtyp SecA-Protein (Abb.11: 5-8) als mit dem *S.carnosus* SecA (Abb.11: 9-12) oder dem Vektor allein (Abb.11: 1-4). Demgegenüber konnte anders als beim Export des OmpA-Proteins das *S.carnosus* SecA-Protein bei 42°C den SecA-spezifischen Proteinexportdefekt komplementieren (Abb.11: 21-24). Der Defekt in der Translokation wurde bei *B.subtilis* NIG1152[*div341*^{ts}] mit dem Vektor allein als Block in der Prozessierung der präproLipase angezeigt (Abb.11: 13-16). Die Effizienz der Prozessierung bei der Komplementation durch das *B.subtilis* SecA ist jedoch höher als beim *S.carnosus* SecA (vgl. Abb.11: 17 und 21). Unter allen Bedingungen, bei denen der Export der Lipase erfolgte, erkannte man, daß zu späteren Chasezeiten die Menge an prozessierter proLipase abnahm. Der Grund hierfür lag in der Überführung der prozessierten proLipase in die reife Lipase. Proportional zur Abnahme der 86 kDa

großen proLipase akkummulierte in gleichem Maß die 47 kDa große reife Lipase (Daten nicht gezeigt).

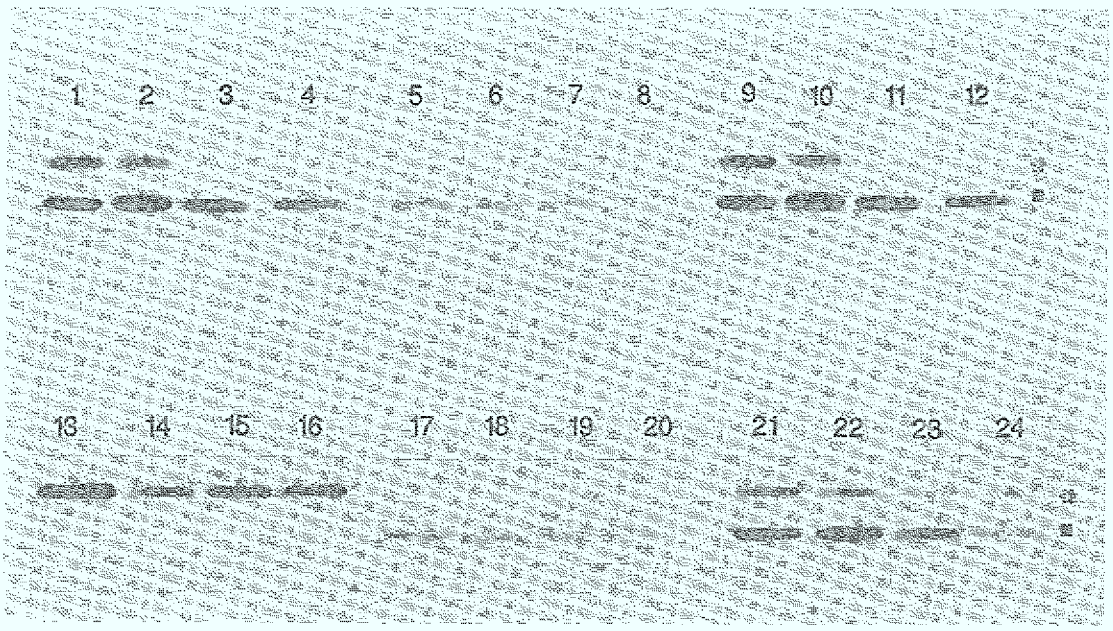


Abb. 11: Prozessierungskinetik der präproLipase aus *S.hyicus* in *B.subtilis* NIG1152[*div341*^{ts}] mit pWH1520 (Vektor, 1-4, 13-16), pWMKL1 (*secA*$_{B.s.}$, 5-8, 17-20) und pWA11 (*secA*$_{S.c.}$, 9-12, 21-24) bei 30°C (1-12) und 42°C (13-24). Chasezeiten: 30 sek (1,5,9,13,17,21), 2 min (2,6,10,14,18,22), 5 min (3,7,11,15,19,23) und 10 min (4,8,12,16,20,24). Stern: präpro-Lipase; Kasten: proLipase.

Diese Ergebnisse zeigen, daß das SecA-Protein aus *S.carnosus* sowohl den Wachstumsdefekt als auch den Proteinexportdefekt von *B.subtilis secA*-Mutanten komplementiert. Daraus kann geschlossen werden, daß anders als in *E.coli* das *S.carnosus* SecA-Protein in *B.subtilis* funktionell ist und daß es das homologe *B.subtilis* SecA-Protein ersetzen kann. Jedoch führte das *S.carnosus* SecA-Protein nicht zu einer vergleichbar schnellen Prozessierung des Vorläufers der präproLipase wie das *B.subtilis* Wildtyp SecA-Protein und zeigte beim Export des pOmpA-Proteins keine Komplementation des Exportdefektes. Bezüglich der Funktionalität des *S.carnosus* SecA-Proteins in *B.subtilis* scheint es daher gewisse Einschränkungen zu geben.

3.2. Isolierung und Charakterisierung einer azidresistenten Mutante von *B.subtilis*

Für die Translokation von Proteinen über die Cytoplasmamembran von *E.coli* ist die Hydrolyse von ATP durch das SecA-Protein notwendig (Lill et al. 1989). Die Hemmung dieser ATP-ase-Aktivität des SecA-Proteins durch Azid führt zu einer Blockierung des Proteinexportes und damit zum Absterben der Zellen (Oliver et al. 1990, Fortin et al. 1990). Untersuchungen an azidresistenten Mutanten von *E.coli* zeigten, daß das SecA-Protein der Hauptangriffspunkt für die Wachstumshemmung durch Azid ist. Wie in *E.coli* besitzt auch das SecA-Protein aus *B.subtilis* eine ATP-ase-Aktivität (van der Wolk et al. 1993), und sowohl das Zellwachstum wie auch der Proteinexport sind bei *B.subtilis* durch Azid hemmbar (Meens et al. 1993).
Es sollte nun geklärt werden, ob das SecA-Protein in *B.subtilis* analog zur Situation in *E.coli* der Hauptangriffspunkt für die inhibitorische Wirkung von Azid ist und ob Mutationen im *secA*-Gen das Wachstum und den Proteinexport in Anwesenheit von Azid ermöglichen können. Die letale Wirkung von Azid könnte dann auch in *B.subtilis* auf eine Hemmung des Proteinexportes zurückgeführt werden. Aus diesen Untersuchungen ergeben sich darüber hinaus weitere Hinweise darauf, ob das SecA-Protein in *B.subtilis* ähnlich wie bei *E.coli* eine zentrale Stellung im Proteinexport einnimmt.
Um diese Fragen zu klären, wurde eine azidresistente Mutante von *B.subtilis* isoliert, die für die Resistenz gegenüber Azid verantwortliche Mutation bestimmt und die Eigenschaften des veränderten Proteins untersucht.

3.2.1. Isolierung der azidresistenten *B.subtilis* Mutante MIK10 ausgehend vom *B.subtilis* Wildtyp NIG1121

3.2.1.1. Bestimmung der minimalen letalen Azidkonzentration für *B.subtilis*

Die Isolierung der azidresistenten *B.subtilis* Mutante erfolgte über die Selektion von spontanresistenten Klonen auf azidhaltigen Agarplatten. Wenn das SecA-Protein wie in *E.coli* auch in *B.subtilis* die höchste Empfindlichkeit gegenüber Azid aufweist, dürfen bei der Selektion von azidresistenten *secA*-Mutanten nicht zu hohe Azidkonzentrationen eingestellt werden. Durch zu hohe Konzentrationen an Azid können Mutationen in den Genen anderer ATP-asen, die höhere Azidkonzentrationen als das SecA-Protein tolerieren, induziert werden. Um den Druck auf Mutationen gezielt auf das Gen der azidempfindlichsten ATP-ase zu lenken, wurde zuerst die minimale letale Konzentration an Azid für *B.subtilis* bestimmt. Es wurden je 10^7 Zellen des *B.subtilis* Wildtyp Stammes NIG1121 auf Agarplatten mit steigenden Konzentrationen an Azid ausplattiert und bei 37°C inkubiert (Tab.8).

Azidkonzentration / mM	0	0,2	0,5	1	1,5	2
Wachstum	++	+	(+)	-	-	-

Tab. 8: Wachstum von *B.subtilis* Wildtyp NIG1121 nach 24 h Inkubation bei 37°C in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an Azid. ++ : große Kolonien; + : kleine Kolonien; (+) : sehr kleine Kolonien; - : kein Wachstum.

Bis 0,5mM war mit steigender Konzentration an Azid eine zunehmende Hemmung des Wachstums erkennbar. Bei 0,5mM war noch andeutungsweise Koloniebildung zu beobachten, während ab 1mM nur wenige spontanresistente Klone wuchsen. Die Häufigkeit des Auftretens der spontanresistenten Klone war bei 1mM Azid mit 10^{-5} deutlich höher als bei 2 und 3mM Azid (ca. 10^{-7}). Dies deutet auf die Entstehung von unterschiedlichen Mutationen in einem oder mehreren Genen hin, die zu verschieden hoher Azidresistenz führen.

3.2.1.2. Isolierung des azidresistenten *B.subtilis* Stammes MIK10

Im ersten Schritt wurden spontanresistente Klone von *B.subtilis* NIG1121 isoliert, die gegenüber 1mM Azid resistent waren. Dazu wurden ca. $5*10^8$ Zellen auf LB-Agarplatten mit 1mM Azid ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Nach 24 h waren 908 Kolonien unterschiedlicher Größe gewachsen. Um aus diesen Klonen die Mutationen im *secA*-Gen zu isolieren, wurden diese Klone zusammengefaßt und eine Transduktion mit dem allgemein transduzierenden Phagen PBS1 (O'Kane et al. 1985) in den temperatursensitiven *B.subtilis* Stamm NIG1152[*secA*(*div341*^{ts})] durchgeführt. Der Austausch des *secA(div341*^{ts}*)*-Gens gegen ein *secA*-Allel, das Temperatur- und Azidresistenz vermittelt, sollte zu einem Stamm führen, der bei 42°C in Anwesenheit von Azid wachsen kann. Die Transduktionsansätze wurden zuerst auf Agarplatten ohne Azid ausplattiert und bei 42°C inkubiert. Die hier gewachsenen Klone wurden dann auf Wachstum in Gegenwart von 1,5mM Azid getestet. Drei der Klone konnten auf Azid-Platten bei 42°C wachsen, wovon einer (MIK10) für die weiteren Untersuchungen verwendet wurde.

3.2.2. Charakterisierung der Mutation im *secA*-Gen von MIK10

Um die Mutation im azidresistenten *B.subtilis* Stamm MIK10 zu charakterisieren, wurde das *secA*-Gen von MIK10 kloniert. Es wird im folgenden als *secA10*-Gen bezeichnet. Die Isolierung des Gens erfolgte über PCR mit den Oligonukleotiden OMKL23.1 und OMKL24 (2.5.4.) als Primer. Da bei der Amplifikation von DNA über PCR Fehler in der Basensequenz auftreten können (Gelfand u. White 1990), wurden die ersten Schritte der Klonierung in doppelten

Ansätzen durchgeführt. Das resultierende 2,7 kB PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen XbaI und Asp718 verdaut und in den mit SpeI und Asp718 verdauten Vektor pWH1520 zum Plasmid pWAZ1 ligiert (vgl. Abb.8). Dieses Plasmid konnte sowohl zur Sequenzierung von *secA10* sowie zur Expression des entsprechenden Proteins genutzt werden. Die Sequenzierung des *secA10*-Gens erfolgte überlappend mit geeigneten Oligonukleotiden, die von der Sequenz des Wildtyp-Gens abgeleitet waren.

Durch den Vergleich der Basensequenz von *secA10* mit der des Wildtyp *secA*-Gens (Sadaie et al. 1991) wurde ein Austausch von A nach G an Position 1556 gefunden (Abb.12). Diese Mutation führt zum Austausch von Glutaminsäure gegen Glycin an Position 338 des SecA-Proteins und damit zum Austausch einer Aminosäure, die in allen 7 bekannten SecA-homologen Proteinen strikt konserviert ist.

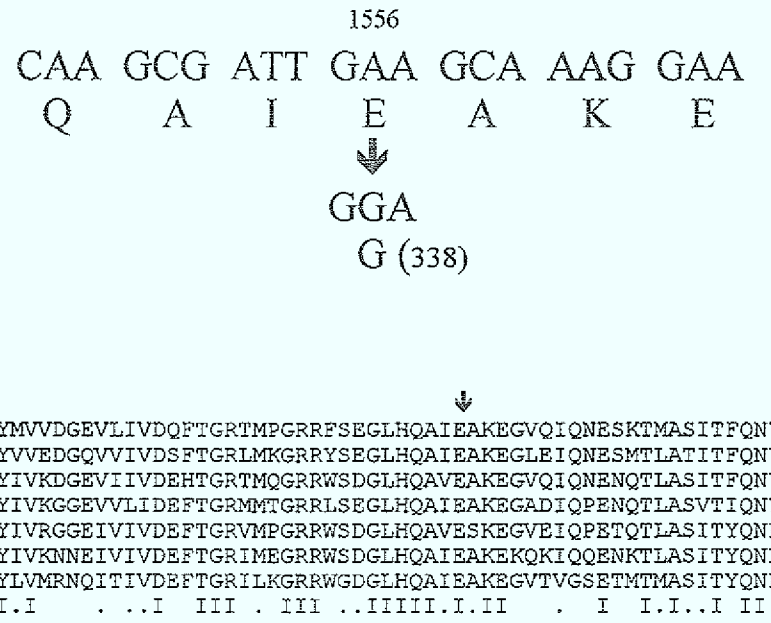


Abb. 12: Mutation des *secA10*-Gens von *B.subtilis* MIK10 und der Vergleich zu bekannten SecA-homologen Proteinen. Sc: *Staphylococcus carnosus*, Bs: *Bacillus subtilis*, Ec: *Escherichia coli*, Cc: *Caulobacter crescentus*, Sy: *Synechococcus* PCC7942, At: *Antithamnion spec.*, Pl: *Pavlova lutherii*.

Darüber hinaus entsteht durch den Basenaustausch eine BstXI-Restriktionsschnittstelle. Diese Schnittstelle wurde genutzt, um die Zuverlässigkeit der Klonierung von *secA10* zu kontrollieren und um PCR-Fehler auszuschließen. Von zwei separaten Präparationen von chromosomaler DNA von MIK10[*secA10*] wurden je 3 Amplifikationen des *secA10*-Genfragmentes durchgeführt und das Restriktionsmuster mit dem Restriktiomsenzym BstXI mit dem des *secA*-Wildtyp-Gens verglichen (Abb.13).

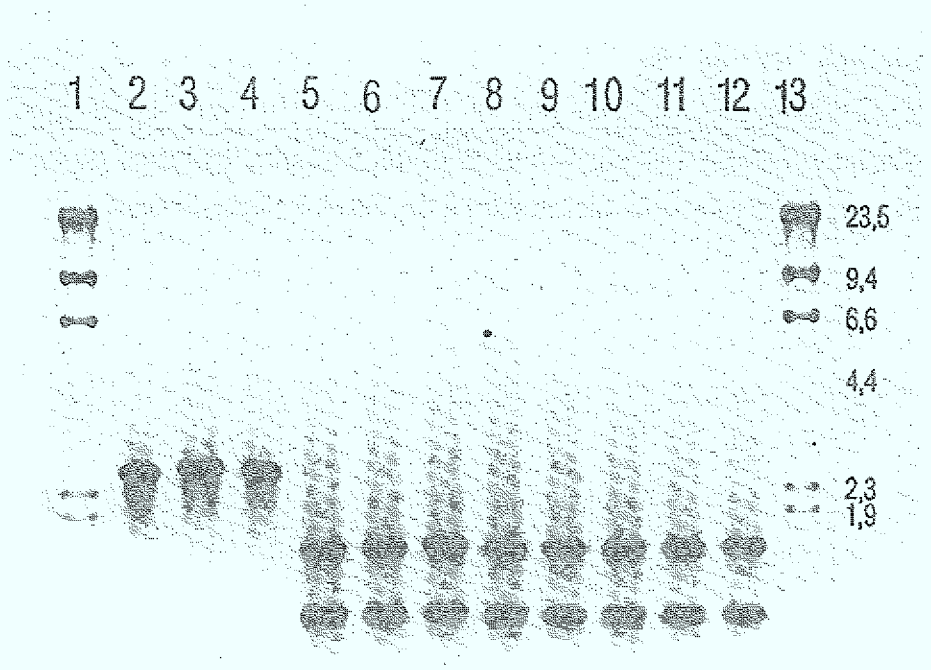


Abb. 13: Vergleich der PCR-Fragmente des *secA*^{WT}-Gens aus *B.subtilis* Wildtyp NIG1121 und *secA10*-Gens aus *B.subtilis* MIK10 im Restriktionsverdau mit BstXI. PCR-Fragmente von *secA*^{wt} von pWMKL1 (2,3) und *secA10* von pWAZ1 (4,5,6) oder chromosomaler DNA1 (7,8,9) und DNA2 (10,11,12). Unverdaut (2,4) oder mit BstXI geschnitten (3, 5-12). DNA-Längenstandard λ *HindIII (1,13).

Die unverdauten PCR-Fragmente zeigten in allen Fällen eine identische Größe von 2,7 kB. Während das Fragment des Wildtyp *secA*-Gens keine BstXI-Schnittstelle aufwies, konnten alle *secA10*-Derivate in zwei Fragmente von 1,6 und 1,1 kB gespalten werden. Dies beweist, daß die Mutation im *secA10*-Gen des Plasmids pWAZ1 auch auf der chromosomalen Kopie des *secA10*-Gens vorhanden ist.

3.2.3. Physiologische Charakterisierung von *B.subtilis* MIK10[*secA10*] und des SecA10-Proteins

3.2.3.1. Expression des SecA10-Proteins in MIK10 und im *B.subtilis* Wildtyp NIG1121

Wie von Y. Fortin et al. (1990) und Oliver et al. (1990) gezeigt, verhalten sich bei *E.coli* das Wildtyp *secA*- und das azidresistente *secA*-Allel kodominant: Der Phänotyp wird von dem *secA*-Allel bestimmt, welches in der Zelle im Überschuß vorhanden ist. Um das Dominanzverhalten von *secA10* gegenüber dem *B.subtilis* Wildtyp *secA*-Gen untersuchen zu können, wurden pWAZ1(*secA10*) und pWMKL1(Wildtyp-*secA*$_{B.s.}$) in die *B.subtilis* Stämme MIK10[*secA10*] und NIG1121^{WT} transformiert und die Expression der plasmid-kodierten SecA-Proteine durch

Xylose induziert. Ein Western-Blot von Gesamtzellextrakten mit anti-*B.subtilis*-SecA-Antikörpern ist in Abb.14 dargestellt.
Die Menge an Wildtyp SecA-Protein und SecA10-Protein ist unter reprimierten und induzierten Bedingungen im *B.subtilis* Wildtyp wie auch in der Mutante identisch. Es ist kein Einfluß des *secA10*-Allels auf die Expression oder Stabilität des SecA-Proteins erkennbar.

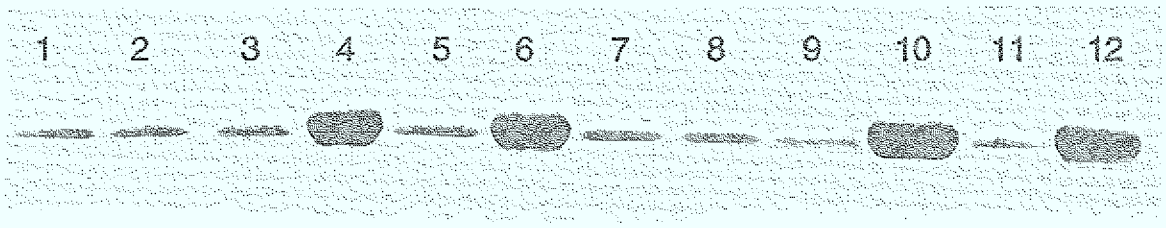


Abb. 14: Western Blot mit anti-*B.subtilis*-SecA-Antikörpern von Gesamtzellextrakten des *B.subtilis* Wildtyp NIG1121 (1-6) und der *B.subtilis* Mutante MIK10[*secA10*] (7-12) mit pWH1520 (Vektor, 1,2,7,8), pWMKL1 (WT-$secA_{B.S.}$, 3,4,9,10) oder pWAZ1 (*secA10*, 5,6,11,12). Vor dem Zellaufschluß wurden die Kulturen 2 h mit 0,5% Glukose (1,3,5,7,9,11) oder 0,5% Xylose (2,4,6,8,10,12) inkubiert. Entsprechend der OD600 der Ausgangskulturen wurden die Proteinmengen gleicher Zellzahlen aufgetragen.

3.2.3.2. Einfluß von Wildtyp SecA und SecA10 auf das Wachstum von *B.subtilis* MIK10[secA10] und NIG1121 in Gegenwart von Azid

Um die Sensitivität der transformierten Stämme gegenüber Azid zu bestimmen, wurden die entsprechenden Zellen auf LB-Agarplatten, die 1,5mM Azid und 0,5% Glukose oder Xylose enthielten, ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Das Wachstumsverhalten ist in Tabelle 9 zusammengefaßt.

		NIG1121				MIK10			
	Azid	-	-	+	+	-	-	+	+
secA-Allel	Plasmid	G	X	G	X	G	X	G	X
	pWH1520	+	+	-	-	+	+	+	+
WT	pWMKL1	+	+	-	-	+	+	-	-
secA10	pWAZ1	+	+	-	-	+	+	+	+

Tab. 9: Einfluß von 1,5mM Azid auf das Wachstum von *B.subtilis* Wildtyp NIG1121 und *B.subtilis* MIK10[*secA10*] mit pWH1520(Vektor), pWMKL1(WT-$secA_{B.S.}$) oder pWAZ1(*secA10*) auf LB-Agarplatten mit 0.5% Glukose (G) oder 0.5% Xylose (X) in An-(+) oder Abwesenheit (-) von 1,5mM Azid. + : Wachstum; - : kein Wachstum.

Entgegen den Verhältnissen bei *E.coli* war eine eindeutige Rezessivität des *secA10*-Allels gegenüber dem Wildtyp *secA*-Gen zu beobachten. Auch bei starker Überexpression konnte das SecA10-Protein in *B.subtilis* Wildtyp NIG1121 keine Resistenz gegenüber Azid vermitteln. In Übereinstimmung damit führte bei der *B.subtilis* Mutante MIK10[*secA10*] selbst eine sehr geringe Expression des Wildtyp SecA-Proteins (0,5% Glukose) wieder zur Sensitivität gegenüber Azid.
Eine mögliche Erklärung für das rezessive Verhalten des *secA10*-Allels gibt das Wachstumsverhalten von MIK10[*secA10*] bei niedrigen Temperaturen, welches auf einen Defekt des SecA10-Proteins hinweist. Beim Vergleich des Wachstums von MIK10[*secA10*] bei hohen (37-42°C) und niedrigen (25-30°C) Temperaturen wurde eine Kältesensitivität der Mutante festgestellt, die um so deutlicher ausfiel, je niedriger die Inkubationstemperatur war. Wie für verschiedene konditional-letale Mutanten in Proteinexportkomponenten bei *E.coli* (de Cock et al. 1989, Overhoff 1991) und *B.subtilis* (Miyakawa u. Komano 1981, Yoshikawa et al. 1993) gezeigt, ist mit dem Defekt im Proteinexport oft eine Anomalie der Zellmorphologie verbunden. Um zu überprüfen, ob auch MIK10[*secA10*] bei niedrigen Temperaturen eine veränderte Zellform besitzt, wurde die Zellmorphologie von MIK10[*secA10*] mit pWKL1(WT-$secA_{B.s.}$) bzw. dem Kontrollvektor pWH1520 bei verschiedenen Temperaturen verglichen. Da MIK10 nach dem Animpfen in Flüssigmedium bei 25°C kein Wachstum mehr zeigte, wurden die Stämme bei 37°C angezogen und anschließend auf 25°C, 30°C und 37°C geshiftet. Abb.15 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen der Zellen bei den verschiedenen Temperaturen.
Niedrige Temperaturen führten bei MIK10[pWH1520] zur Ausbildung von Filamenten, deren Länge das 20-30fache der Zellen bei 37°C betrug. Demgegenüber war die Filamentbildung bei MIK10[pWMKL1] deutlich verringert, obwohl auch hier eine leichte Tendenz zur Verlängerung der Zellen zu erkennen war. Im Vergleich dazu waren Wildtypzellen bei allen Temperaturen gleich gestaltet. Die Rezessivität des *secA10*-Allels gegenüber dem Wildtyp *secA* sowie die Kältesensitivität verbunden mit der Anomalie in der Zellmorphologie deuten daraufhin, daß die Mutation im *secA10*-Gen zu einem in seiner Funktion teilweise gestörten SecA-Protein führt.
Um weitere Informationen über die Eigenschaften des SecA10-Mutantenproteins zu erhalten, wurde daher die Komplementationsfähigkeit von *B.subtilis* $secA^{ts}$-Mutanten durch SecA10 untersucht.

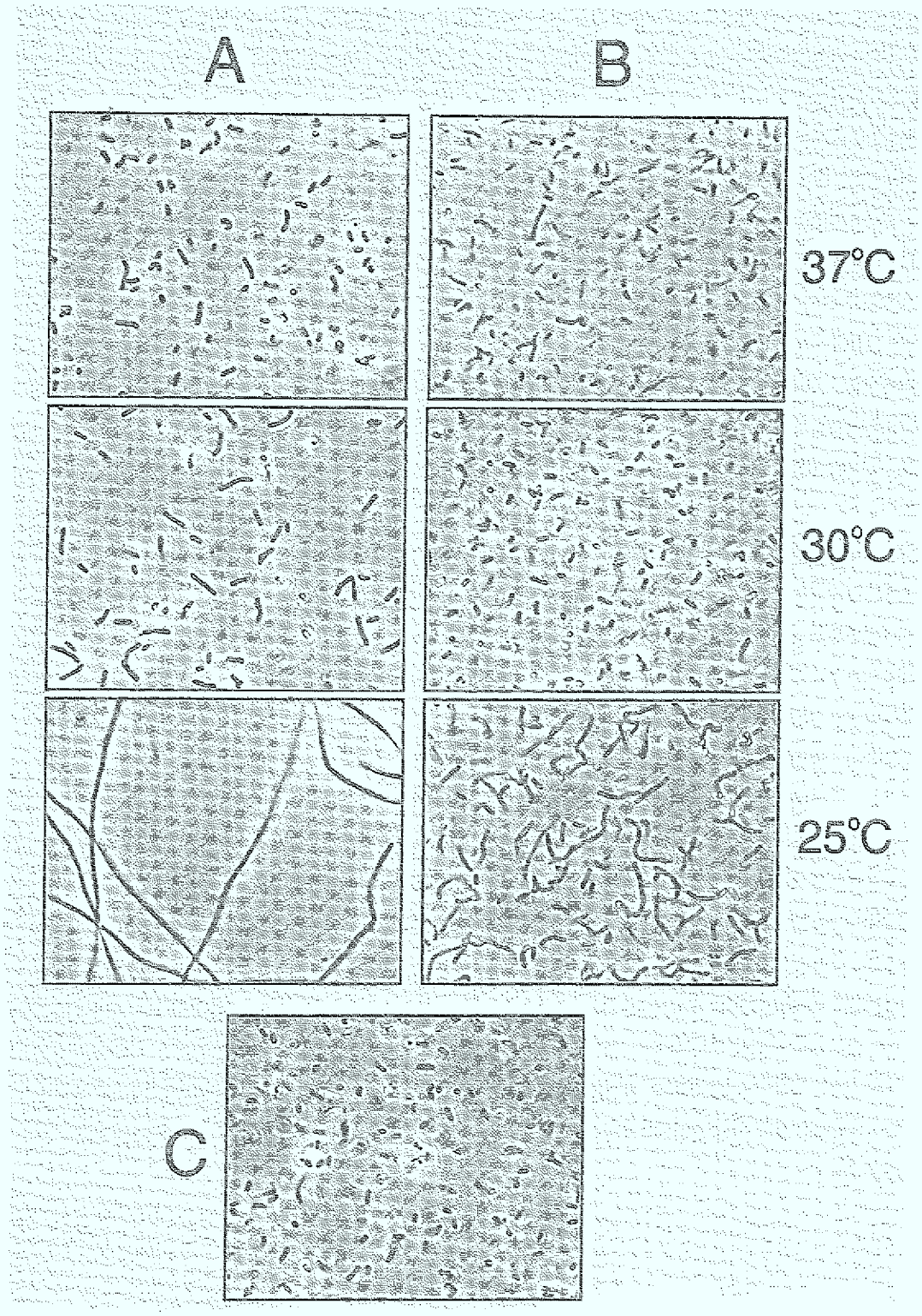


Abb. 15: Zellmorphologie von *B.subtilis* MIK10[*secA10*] mit pWH1520(Vektor) (A) oder pWMKL1(WT-$secA_{B.s.}$) (B) nach 12 h bei 25°C, 30°C oder 37°C in LB mit 0,5% Glukose. C : *B.subtilis* Wildtyp NIG1121 bei 30°C.

3.2.3.3. Komplementation des Wachstumsdefektes der temperatursensitiven *B.subtilis secA*-Mutante NIG1152[*div341*^{ts}] durch SecA10

B.subtilis NIG1152[*div341*^{ts}] wurde mit pWMKL1(WT-*secA*$_{B.s.}$), pWAZ1(*secA10*) und pWH1520(Vektor) transformiert und die transformierten Stämme bei 30°C und 42°C auf ihre Sensitivität gegen Azid getestet.

			30°C				42°C			
		Azid	-	-	+	+	-	-	+	+
secA-Allel	Plasmid		G	X	G	X	G	X	G	X
	pWH1520		+	+	-	-	-	-	-	-
WT	pWMKL1		+	+	-	-	+	+	-	-
secA10	pWAZ1		+	+	-	-	+	+	-	-

Tab. 10: Wachstum von *B.subtilis* NIG1152[*div341*^{ts}] mit pWH1520(Vektor), pWMKL1(WT-*secA*$_{B.s.}$) oder pWAZ1(*secA10*) nach 24 h auf LB-Agarplatten in An- (+) oder Abwesenheit (-) von 1,5mM Azid. G: 0,5% Glukose; X: 0,5% Xylose; + : Wachstum; - : kein Wachstum.

Obwohl SecA10 in der Lage war, den Wachstumsdefekt der *secA*^{ts}-Mutante zu komplementieren, vermittelte selbst eine hohe Expression des *secA10*-Gens bei Induktion mit Xylose sowohl bei 30°C wie auch bei 42°C keine Azidresistenz. Die Anwesenheit von pWMKL1(WT-*secA*$_{B.s.}$) führte zum gleichen Wachstumsverhalten. Das Fehlen der Azidresistenz bei 30°C von MIK10[pWAZ1] ist durch die Dominanz des chromosomal-kodierten temperatursensitiven *secA*(*div341*^{ts})-Allels gegenüber dem *secA10*-Allel bezüglich der Azidresistenz erklärbar. Darüber hinaus reichte offensichtlich eine geringe noch verbleibende Menge an bei 42°C aktivem SecA(div341^{ts})-Protein aus, um die beobachtete Empfindlichkeit gegenüber Azid hervorzurufen. Nach den vergleichenden Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der *B.subtilis* Stämme, die das SecA10-Protein exprimieren, wurde nun in Pulse-chase-Experimenten untersucht, in wieweit der Proteinexport durch das *secA10*-Allel beeinflußt wird.

3.2.4. Vergleich der Prozessierungskinetik des pOmpA-Proteins in *B.subtilis* Wildtyp NIG1121 und *B.subtilis* MIK10[*secA10*] bei An- und Abwesenheit von Azid

Zur Untersuchung des Proteinexportes von *B.subtilis* MIK10[*secA10*] und dem *B.subtilis* Wildtyp Stamm NIG1121 wurde die Prozessierungskinetik des pOmpA-Proteins bei 30°C und 37°C mit und ohne Azid untersucht. Die Synthese des OmpA-Proteins erfolgte ausgehend von dem Plasmid pJM20, das hierfür in die jeweiligen Stämme zusätzlich transformiert wurde (vgl. 3.1.5.3.).

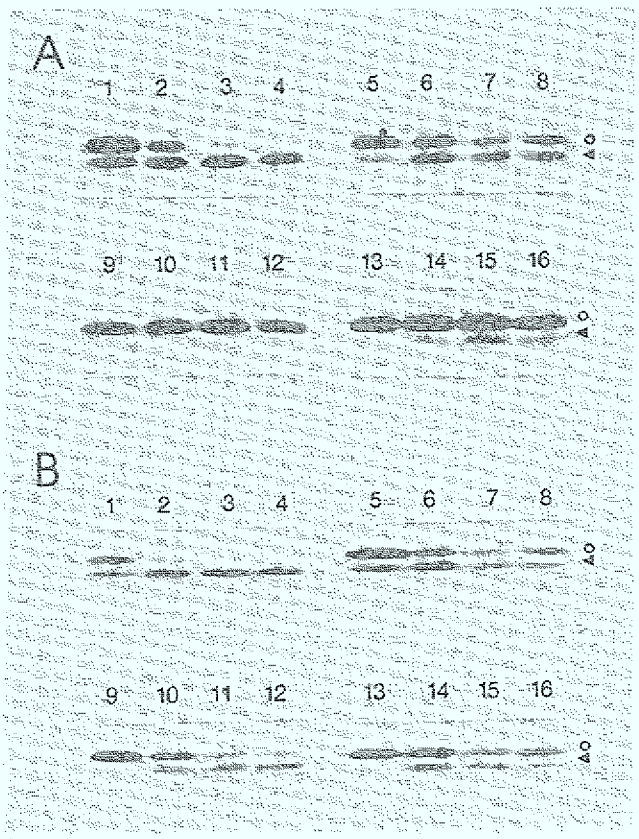


Abb. 16: Prozessierung von pOmpA in *B.subtilis* Wildtyp NIG1121 (1-4, 9-12) oder in der *B.subtilis* Mutante MIK10[*secA10*] (5-8,13-16). Die Zellen wurden in Abwesenheit (1-8) oder Anwesenheit (9-16) von 1,5mM Azid mit ^{35}S-Met bei 30°C (A) oder 37°C (B) markiert und Chaseproben nach 30 sek (1,5,9,13), 2 min (2,6,10,14), 5 min (3,7,11,15) und 10 min (4,8,12,16) entnommen. Kreis: pOmpA, Pfeil: OmpA.

Beim Vergleich der Prozessierungskinetik mit und ohne Azid zeigte der Wildtyp eine deutliche Inhibierung des Proteinexportes durch Azid. Der hemmende Effekt war bei 30°C wesentlich

stärker ausgeprägt als bei 37°C: Azid bedingte bei 30°C einen nahezu vollständigen Block in der Prozessierung, während bei 37°C durchaus noch eine teilweise Umwandlung von Vorläufer zu reifem Protein stattfand. Demgegenüber zeigte auch *B.subtilis* MIK10[*secA10*] bei Anwesenheit von Azid eine verlangsamte Prozessierung verglichen mit der Situation ohne Azid. Die Prozessierung ist in Anwesenheit von Azid jedoch im Vergleich zum Wildtyp deutlich beschleunigt. Die Prozessierungsrate bei MIK10 ohne Azid war dagegen sowohl bei 30°C wie auch bei 37°C deutlich niedriger als beim Wildtyp.

Diese Ergebnisse zeigen einerseits, daß die *secA10*-Mutation zu einem SecA-Protein führt, das verglichen mit dem Wildtyp SecA-Protein eine deutlich verringerte Empfindlichkeit gegenüber Azid aufweist und dem Stamm MIK10 infolge dessen das Wachstum in Anwesenheit von Azid ermöglicht. Andererseits wurde die Vermutung bestätigt, daß das SecA10-Protein teilweise in seiner Funktion beeinträchtigt ist.

4. Diskussion

4.1. Isolierung und Charakterisierung des *secA*-Gens aus *S.carnosus*

Zum Vergleich des SecA-Proteins aus *S.carnosus* mit den SecA-Proteinen aus *E.coli* und *B.subtilis* wurde das *secA*-Gen von *S.carnosus* TM300 isoliert. Das Gen wurde über DNA-DNA-Hybridisierung mittels einer Sonde des *secA*-Gens aus *B.subtilis* auf einem 8 kB großen PstI-Fragment lokalisiert und anschließend kloniert. Auf einem internen Bereich dieses Fragmentes von 3,73 kB, welcher das *secA*-Gen sowie angrenzende Bereiche umfaßte, konnten durch Computeranalyse zwei potentielle Leserahmen identifiziert werden. Diese zeigen in ihrer Sequenz und Organisation große Ähnlichkeit mit dem *orf1*- und dem *secA*-Gen von *B.subtilis*. Vor beiden *secA*-Strukturgenen sind mögliche spezifische Promotoren zu finden. Ebenso finden sich hinter den *secA*-Genen mögliche Transkriptionsterminatoren (Sadaie et al. 1991). Hinter dem *orf1*-Gen lassen sich dagegen bei *B.subtilis* und *S.carnosus* nur schwache Terminatoren erkennen. Die abgeleiteten Orf1-Proteine zeigen keine signifikante Homologie mit dem GenX-Protein, dessen Gen bei *E.coli* stromaufwärts des *secA*-Gens liegt. Über die Funktion von *orf1* ist bisher noch nichts bekannt. Bei *E.coli* wird für den Bereich zwischen *genX* und *secA* angenommen, daß die mRNA in dieser Region Sekundärstrukturen ausbildet, die bei der Regulation der Expression des SecA-Proteins in Abhängigkeit vom Zustand des Proteinexportes als sogenanntes "Secretion-Responsive Element" eine Rolle spielen (Schmidt et al. 1991). Das SecA-Protein bindet in dieser Region an die eigene mRNA und reguliert so die Effizienz der Translation. Die Berechnung der mRNA-Faltung des intergenen Bereiches zwischen *orf1* und *secA* von *S.carnosus* und *B.subtilis* zeigt ähnliche Sekundärstrukturen, die mit $\Delta G^{0'}$ von -115,6 bzw. -54,3 kJ/mol eine ausreichende Stabilität aufweisen. Es ist daher denkbar, daß bei den Gram-positiven Organismen, ähnlich wie bei *E.coli*, ebenfalls eine Regulation der Expression des SecA-Proteins existiert. Zur Klärung der Expressionskontrolle sind jedoch Promotorkartierung, Transkriptlängenbestimmung und Untersuchnungen zur Proteinexpression unter verschiedenen Bedingungen notwendig.

4.1.1. Homologievergleich des *S.carnosus* SecA-Proteins mit anderen SecA-homologen Proteinen

Das SecA-Protein aus *S.carnosus* hat mit 59,8% identischer Aminosäuren eine größere Ähnlichkeit zum SecA-Protein aus *B.subtilis* als zum *E.coli* SecA-Protein (46,6%). Dagegen besitzen die SecA-Proteine aus *B.subtilis* und *E.coli* 52,6% identische Aminosäuren. Wird der Vergleich um weitere SecA-homologe Proteine aus anderen Gram-negativen Bakterien oder Chloroplasten von photosynthetischen Algen erweitert, läßt sich deutlich erkennen, daß die Ähnlichkeit zwischen den Proteinen steigt, je näher sich die Herkunftsorganismen in der Phylogenie stehen (Woese 1987).

Der Vergleich aller bislang bekannten SecA-Aminosäuresequenzen zeigt, daß sich die konservierten Bereiche überwiegend auf den N-terminalen Bereich der Proteine beschränken. Ein zentraler Teilaspekt der Funktion des SecA-Proteins in *E.coli* und *B.subtilis* liegt in der Initiation der Proteintranslokation, die mit Bindung und Hydrolse von ATP verbunden ist (Lill et al. 1989, Schiebel et al. 1991, Klose et al. 1993, van der Wolk et al. 1993). Die für ATP-asen charakteristischen Aminosäuremuster der ATP-Bindungsstelle sind bei allen SecA-Proteinen in der gleichen Region im N-Terminus lokalisiert. Wie für das SecA-Protein aus *B.subtilis* gezeigt, reicht ein 275 Aminosäuren großes N-terminales Fragment aus, um den Wachstums- und Proteinexportdefekt der *E.coli secA*-Mutante MM52, die ein vollständiges, jedoch nicht funktionelles SecA-Protein mit einer Mutation im extremen N-Terminus synthetisiert, zu komplementieren (Overhoff et al. 1991). Der C-terminale Bereich zeichnet sich dagegen durch sehr geringe Homologie aus. Bei einigen Proteinen existieren jedoch Bereiche identischer Aminosäuren, z.B. bei *S.carnosus* und *B.subtilis* von Aminosäure 569-587 (vgl. Abb. 4), die sie von anderen SecA-Proteinen unterscheiden. Der Nachweis von essentiellen Komponenten des Proteinexportapparates, wie SecA, SecY und SecE bei verschiedenen Organismen (Tschauder et al. 1992, Murphy et al. 1994) und der strukturell ähnliche Bau der jeweiligen Exportproteine zeigen, daß das Grundprinzip des Mechanismus des Proteinexportes bei Bakterien hoch konserviert zu sein scheint. Jedoch scheint es Organismus-spezifische Unterschiede zu geben, die den Export heterologer Proteine erschweren könnten (Puohiniemi et al. 1992, Simonen et al. 1992, diese Arbeit). Die Verteilung der konservierten Bereiche in der Sequenz der SecA-Proteine ist möglicherweise ein Indiz dafür, daß im N-terminalen Teil Domänen mit konservierter Funktion lokalisiert sind, wie z.B. die Bindung von ATP. Die Unterschiede im C-Terminus könnten dagegen für Organismus-spezifische Eigenschaften verantwortlich sein, die z.B. für eine Anpassung an die unterschiedlichen Längen der hydrophoben Bereiche und die unterschiedliche Anzahl an positiven Ladungen in den Signalpeptiden Gram-positiver und Gram-negativer Exportproteine von Bedeutung sind (von Heijne u. Abrahmsén 1989).

4.1.2. Komplementation des Wachstumsdefektes von *E.coli secA*-Mutanten

Der Defekt der *E.coli secA*-Mutanten BA13 und MM66 beruht darauf, daß die Synthese des SecA-Proteins bei nicht-permissiver Temperatur unter ein für den Proteinexport und damit für das Überleben der Zelle notwendiges Niveau absinkt. In-vitro-Untersuchungen zum Wildtyp SecA-Protein und zu mutierten SecA-Proteinen aus *B.subtilis* in diesen Mutanten ergaben Hinweise auf partielle Defizienzen in der Funktionalität des *B.subtilis* SecA-Proteins in *E.coli*: Obwohl für das *B.subtilis* SecA-Protein prinzipiell die gleichen Eigenschaften wie für das *E.coli* SecA nachgewiesen werden konnten, zeigte sich, daß die Affinität des *B.subtilis* SecA zu Membranen aus *E.coli* siebenmal geringer ist als die des *E.coli* SecA (van der Wolk 1993).

Weiterhin kann das *B.subtilis* SecA nicht im gleichen Maß in die *E.coli* Membran inserieren wie das *E.coli* SecA-Protein. Darüber hinaus wird durch Gram-negative Vorläuferproteine die Translokations-ATP-ase-Aktivität des *E.coli* SecA doppelt so stark aktiviert wie die des *B.subtilis* SecA (von der Wolk et al. 1993).
Die Untersuchungen an *E.coli secA*-Mutanten zeigten, daß das *B.subtilis* SecA-Protein nur bei niedriger Syntheserate den *secA*-Defekt komplementieren kann, d.h. die funktionelle Wechselwirkung des partiell aktiven SecA-Proteins mit dem *E.coli* Proteinexportapparat scheint prinzipiell möglich zu sein (Klose et al. 1993). Demgegenüber geht die Komplementationsfähigkeit des *B.subtilis* SecA-Proteins bei einem hohen Syntheseniveau verloren, was darauf hindeutet, daß das *B.subtilis* SecA-Protein unter diesen Bedingungen in inaktiver Form vorliegt. Möglicherweise führt die hohe Expressionsrate zu einer Aggregation des *B.subtilis* SecA-Proteins, so daß es für den Proteinexport nicht mehr zur Verfügung steht.
Anders als das *B.subtilis* SecA kann das SecA-Protein aus *S.carnosus* den Wachstumsdefekt der *E.coli secA*-Mutanten unter keinen Bedingungen komplementieren. Dieses könnte auf der Tatsache beruhen, daß das SecA-Protein aus *S.carnosus* weniger Ähnlichkeit mit dem *E.coli* SecA-Protein aufweist als das SecA-Protein aus *B.subtilis*. Daher könnten die für das *B.subtilis* SecA-Protein beschriebenen Defizienzen in der Funktionalität in *E.coli* beim *S.carnosus* SecA-Protein noch stärker ausgeprägt sein und seine funktionelle Wechselwirkung mit dem Proteinexportapparat vollständig verhindern.

4.1.3. Komplementation einer *B.subtilis secA*-Mutante

Nachdem die SecA-Proteine in *E.coli* eine Abstufung ihrer Funktionalität gezeigt hatten, stellte sich die Frage, ob sich die gleichen Unterschiede auch in *B.subtilis* nachweisen lassen. Bei der Expression der SecA-Proteine in *B.subtilis* war die Synthese des *E.coli* SecA-Proteins wahrscheinlich wegen der schlecht konservierten Ribosomenbindungstelle nicht so stark wie die der Gram-positiven SecA-Proteine. In den bis jetzt untersuchten Beispielen konnte eine heterologe Komplementation von Proteinexportmutanten jedoch nicht durch die starke Überexpression, sondern eher durch ein reduziertes Expressionsniveau des untersuchten Faktors erreicht werden (Nakamura et al. 1990, Klose et al. 1993). Es ist daher nicht zu erwarten, daß die bei Induktion im Vergleich zu den Gram-positiven SecA-Proteinen schwächere Synthese des *E.coli* SecA-Proteins von pWE10 einen Einfluß auf die Komplementationsfähigkeit des *E.coli* SecA hattte.
Während das *E.coli* SecA-Protein nicht in der Lage war, den Wachstumsdefekt der *B.subtilis secA*-Mutante zu komplementieren, konnten das homologe SecA aus *B.subtilis* und das SecA aus *S.carnosus* sowohl unter niedriger Expressionsrate wie auch unter Überproduktionsbedingungen den Wachstumsdefekt der *secA*-Mutante effektiv komplementieren. Dies kann einerseits bedeuten, daß das SecA-Protein aus *E.coli* in *B.subtilis* anders als das *B.subtilis*

SecA in *E.coli* keine Wechselwirkung mit dem Exportapparat des Wirtsorganismus eingehen kann. Andererseits kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß die hier untersuchten Expressionsbedingungen zur heterologen Komplementation durch das *E.coli* SecA in *B.subtilis* ungeeignet waren. Gegen die letzte Möglichkeit sprechen jedoch die Untersuchungen von Takamatsu et al. (1992), die bei anderen Expressionsraten in der gleichen *B.subtilis secA*-Mutante ebenfalls keine Komplementation mit dem *E.coli* SecA erreichen konnten. Möglicherweise fehlen dem *E.coli* SecA wichtige Eigenschaften, die für die Funktionalität in *B.subtilis* essentiell sind. So kann z.B. die Wechselwirkung von SecA mit den integralen Membrankomponenten des Exportapparates SecY/E gestört sein, so daß der Übertritt des Vorläuferproteins vom SecA an die Membrankomponenten gestört sein kann. Das SecA aus *S.carnosus* scheint dagegen nach den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen das *B.subtilis* SecA-Protein voll ersetzen zu können, da auch die im Western-Blot nicht nachweisbaren Mengen an *S.carnosus* SecA für die Komplementation ausreichen. Dieser Befund ist sehr wahrscheinlich auf die hohe Ähnlichkeit der beiden Gram-positiven SecA-Proteine zurückzuführen.

4.1.4. Einfluß des SecA-Proteins aus *S.carnosus* auf den Proteinexport in *B.subtilis*

Das Außenmembranprotein OmpA von *E.coli* wird in *B.subtilis* Wildtyp mit vergleichbarer Kinetik wie in *E.coli* exportiert (Meens et al. 1993). Demgegenüber führt der Proteinexportdefekt der *B.subtilis secA*-Mutante NIG1152 schon bei permissiver Temperatur zu einer deutlich verlangsamten Prozessierung des pOmpA-Proteins. Dieser Defekt bei 30°C, der auch für die α-Amylase und ß-Laktamase nachgewiesen wurde (Takamatsu et al. 1992), konnte durch das *B.subtilis* Wildtyp SecA-Protein, nicht jedoch durch das SecA-Protein aus *S.carnosus*, beseitigt werden. Entgegen den Ergebnissen der Wachstumskomplementation zeigte das *S.carnosus* SecA keine Komplementation des Translokationsdefektes von pOmpA bei 42°C. Auch Untersuchungen zur Lokalisierung des OmpA-Proteins zeigten, daß das OmpA-Protein selbst nach mehreren Stunden nicht ins Kulturmedium sekretiert wurde, sondern im Zellinneren akkumulierte (Daten nicht gezeigt) und bestätigten so die in den Pulse-Chase-Experimente beobachtete Blockierung des Exportes des OmpA-Proteins. Wegen der eindeutigen Ergebnisse aus der Wachstumskomplementation war es jedoch unwahrscheinlich, daß der beobachtete Block in der Prozessierung den tatsächlichen Zustand des Proteinexportes in der komplementierten *B.subtilis* Mutante anzeigte. Die Untersuchung der Prozessierung des Gram-positiven Exportproteins präproLipase bestätigte diese Vermutung. Obwohl auch hier die Prozessierung in Anwesenheit des *S.carnosus* SecA nicht so schnell erfolgte wie mit dem homologen Wildtyp SecA-Protein, war der Block in der Prozessierung der Lipase bei der nicht-permissiven Temperatur doch weitgehend aufgehoben. Das *S.carnosus* SecA-Protein kann also das homologe SecA-Protein in *B.subtilis* ersetzen. Es scheint dabei mit dem

Exportapparat von *B.subtilis* besser kompatibel zu sein als das *B.subtilis* SecA-Protein mit dem *E.coli* Exportapparat, da die Komplementation im ersten Fall nicht an besondere Expressionsbedingungen geknüpft ist.
Trotzdem müssen Einschränkungen für die Funktionalität des *S.carnosus* SecA-Proteins in *B.subtilis* gemacht werden. Diese zeigen sich einmal darin, daß auch die Prozessierung der Lipase nicht mit der Effizienz wie beim *B.subtilis* Wildtyp SecA erfolgt. Die untersuchte Lipase wurde aus einem *Staphylococcus* Stamm isoliert (Popp 1986), und es ist daher unwahrscheinlich, daß die Erkennung des Vorläuferproteins durch das *Staphylococcus* SecA gestört ist. Da die Lipase im *B.subtilis* Wildtyp sehr effizient exportiert wird und keine Inkompatibilität mit dem Exportapparat von *B.subtilis* aufweist (Meens et al. 1993), scheint hier eher die Wechselwirkung des SecA-Proteins aus *S.carnosus* mit dem übrigen Exportapparat von *B.subtilis* nicht optimal zu funktionieren.
Ebenso wie die Lipase wird auch das pOmpA in *B.subtilis* Wildtyp schnell exportiert, so daß die Ursache für die Defizienz in der Translokation von pOmpA möglicherweise in der Kombination des Gram-negativen Vorläufers mit dem SecA aus *S.carnosus* und dem Exportapparat von *B.subtilis* zu suchen ist. Hierbei können die Unterschiede zwischen den Exportproteinen von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, wie die unterschiedliche Länge und Ladung des Signalpeptides von Bedeutung sein (von Heijne u. Abrahamsén 1989). Prinzipiell ist es jedoch möglich, Gram-negative Exportproteine in *B.subtilis* zu exportieren (Meens et al. 1993) und auch ein Fusionsprotein aus Signal- und Propeptid der Lipase aus *S.hyicus* mit dem reifen Teil des OmpA-Protein wird bei *S.carnosus* ins Kulturfiltrat sekretiert (Meens 1994). Es gibt jedoch Untersuchungen zum Export von Fusionproteinen von OmpA und OmpF mit verschiedenen Gram-positiven Signalpeptiden, die auf eine eingeschränkte Kompatibilität dieser Exportproteine mit dem Gram-positiven Exportapparat hindeuten (Simonen et al. 1992). Da der reife Teil des OmpA-Proteins sowohl in *B.subtilis* wie auch in *S.carnosus* über die Membran translokiert werden kann, ist es wahrscheinlich, daß die Blokkierung der Translokation des pOmpA mit dem *S.carnosus* SecA-Protein in *B.subtilis* durch eine Störung der frühen Schritte des Exportes verursacht wird. Der Export von OmpA ist in *E.coli* stark von der Anwesenheit des Exportchaperons SecB abhängig (Lecker et al. 1990, Kumamoto 1991). Das SecB-Protein bindet hierbei an das pOmpA-Vorläuferprotein und verhindert seine schnelle Faltung in eine transportinkompetente Konformation. Ohne SecB erfolgt die Wechselwirkung von pOmpA mit dem Exportapparat nur sehr ineffizient (Hartl et al. 1990). Der Export des OmpA-Proteins in *B.subtilis* könnte daher darauf hindeuten, daß ein dem SecB vergleichbarer Faktor in *B.subtilis* existiert, der die Wechselwirkung von pOmpA mit SecA, das sogenannte "Targeting", unterstützt. Im Fall des *S.carnosus* SecA in *B.subtilis* besteht die Möglichkeit, daß die Wechselwirkung des *B.subtilis* Chaperons mit dem *S.carnosus* SecA-Proteins gestört ist.
In *E.coli* bindet lösliches SecA-Protein bei Zugabe von Vorläuferproteinen mit hoher Affinität an die Translokatoren in der Membran (Hartl et al. 1990, Hendrick u. Wickner 1991). Die

Initiation der Translokation erfolgt nach Bindung von ATP durch Coinsertion des SecA-Proteins mit dem Vorläuferprotein in die Membran (Economou u. Wickner 1994, Kim et al. 1994). Das Vorläuferprotein bildet dabei wahrscheinlich mit seinem N-terminalen Bereich eine Haarnadelstruktur aus, wobei die positiven Ladungen den extremen N-Terminus des Signalpeptides auf der cytoplasmatischen Seite der Membran positionieren (Jones et al. 1990, Yamane et al. 1990). Die hierfür erforderlichen vielfältigen Konformationsänderungen des SecA-Proteins sind von der Bindung des Vorläuferproteins an das SecA abhängig. Das *B.subtilis* SecA-Protein dringt bei der Initiation der Translokation weniger tief in die Membran ein als das *E.coli* SecA (van der Wolk 1993, Breukink et al. 1992). Möglicherweise erleichtert bei *B.subtilis* die Verlängerung des hydrophoben Bereiches und die höhere Ladung des Signalpeptides der Gram-positiven Vorläuferproteine die Ausbildung der initialen Haarnadelstruktur und die Positionierung des Vorläufers in der Membran. Da das *S.carnosus* SecA nicht optimal an den Exportapparat von *B.subtilis* angepaßt zu sein scheint, könnte die Kombination der mit 21 Aminosäuren sehr kurzen Signalsequenz des pOmpA mit dem *S.carnosus* SecA Protein in *B.subtilis* den beobachteten Defekt bei der Initiation der Translokation hervorrufen. Möglicherweise weist das *S.carnosus* SecA-Protein eine gegenüber den SecA-Proteinen von *E.coli* und *B.subtilis* noch weiter verringerte Eintauchtiefe in die Membran auf. Dies könnte bei Proteinen mit kurzen Signalpeptiden dazu führen, daß das Signalpeptid nicht effektiv mit dem Translokator wechselwirken kann.

Es ist zu betonen, daß aus dem in diesen Experimenten beobachteten Exportdefekt des OmpA-Proteins noch keine Aussagen über den Export des authentischen OmpA-Proteins in *S.carnosus* getroffen werden können. Es kann sich hierbei um den additiven Effekt einer verschlechterten Vorläufererkennung zwischen dem pOmpA und dem *S.carnosus* SecA und einer nicht optimalen Wechselwirkung zwischen dem *S.carnosus* SecA und dem *B.subtilis* Exportapparat handeln (s.o.). Um die Ursachen für die beobachteten Defizienzen im Export des pOmpA zu klären, müssen Experimente mit Fusionsproteinen aus dem Signalpeptid der präproLipase und dem reifen Teil des OmpA-Proteins bzw. aus dem Signalpeptid von pOmpA und dem reifen Teil der Lipase in *B.subtilis* und *S.carnosus* durchgeführt werden. Eine genaue Untersuchung derartiger Inkompatibilitäten zwischen Exportapparat und Exportproteinen ist für den Export von heterologen Proteinen in Gram-positiven Wirtsorganismen von großer Bedeutung.

4.2. Isolierung und Charakterisierung einer azidresistenten Mutante von *B.subtilis*

Das SecA-Protein nimmt in *E.coli* eine zentrale Stellung beim Export von Proteinen ein (Cabelli et al. 1988, Cunningham et al. 1989). Es vermittelt die Übergabe des Vorläufers an den Translokator in der Cytoplasmamembran, durch den die eigentliche Translokation des Proteins über die Membran erfolgt. Für die Überführung des Exportproteins von SecA in den Translokator ist die Bindung und Hydrolyse von ATP durch SecA notwendig (Schiebel et al. 1991, Economou u. Wickner 1994, Chun u. Randall 1994). Durch die Zugabe von Azid wird diese sogenannte Translokations-ATP-ase-Aktivität des SecA-Proteins und damit auch der Proteinexport und das Zellwachstum gehemmt (Lederberg 1950, Fortin et al. 1990, Oliver et al. 1990). Obwohl es in Bakterien neben dem SecA-Protein viele weitere ATP-abhängige Enzyme gibt, ist die Hemmung des SecA-Proteins durch Azid in *E.coli* primär für das Absterben der Zellen verantwortlich (Ciesla et al. 1974, Nuomi et al. 1987, Fortin et al. 1990, Oliver et al. 1990). Dies zeigen Mutationen im *secA*-Gen, die es der Zelle ermöglichen, bei sonst letalen Konzentrationen an Azid wieder zu wachsen. Alle anderen ATP-abhängigen Enzyme, die für das Wachstum der Zelle essentiell sind, müssen daher eine höhere Toleranz gegenüber Azid aufweisen. Darüber hinaus unterstreichen diese Befunde die Bedeutung eines funktionierenden Proteinexportes für das Überleben der Zelle.
Für das SecA-Protein aus *B.subtilis* wurden prinzipiell gleiche Eigenschaften der Translokations-ATP-ase-Aktivität wie für das *E.coli*-SecA-Protein nachgewiesen. (Takamatsu et al. 1992, van der Wolk 1993). Von Meens et al. (1993) konnte gezeigt werden, daß auch die Translokation von Proteinen über die Cytoplasmamembran von *B.subtilis* durch Azid gehemmt wird. Durch die Isolierung einer azidresistenten *secA*-Mutante von *B.subtilis* und die Charakterisierung der für die Azidresistenz verantwortlichen Mutation konnte die Frage geklärt werden ob analog zur Situation bei *E.coli* auch in *B.subtilis* das SecA-Protein der Hauptangriffspunkt für die Azidhemmung ist.

4.2.1. Isolierung der azidresistenten *B.subtilis* Mutante MIK10 und Charakterisierung des *secA*10-Gens

Die Selektion von azidresistenten Mutanten wurde schon 1950 von J. Lederberg genutzt, um grundlegende genetische Vorgänge wie Rekombination in Bakterien nachzuweisen. Die Azidkonzentration, ab der bei *E.coli* eine Wachstumshemmung zu beobachten war, lag wie auch bei *B.subtilis* bei ca. 0,5mM (Oliver et al. 1990). Mit steigender Konzentration an Azid nahm bei *B.subtilis* darüber hinaus das Auftreten von spontanresistenten Klonen um den Faktor 100 ab und lag mit 3mM Azid bei 10^{-7}. Vergleichbare Verhältnisse zeigten sich auch bei *E.coli*, wo bei 5mM Azid eine von 10^8 Zellen zu einem resistenten Klon mutierte (Lederberg 1950). Die unterschiedliche Frequenz im Auftreten von spontanresistenten Klonen bei niedrigen und hohen Azidkonzentrationen deutet daraufhin, daß mehrere verschiedene Mutationen für die Resistenz

gegenüber höheren Azidkonzentrationen verantwortlich sein müssen. Sehr wahrscheinlich müssen zusätzlich zum *secA* noch weitere Gene essentieller ATP-asen zu azidresistenten Allelen mutieren, um das Überleben der Zelle bei diesen hohen Azidkonzentrationen zu ermöglichen. Im Gegensatz zu *E.coli* ist *B.subtilis* ein strikt aerob wachsendes Bakterium und braucht dementsprechend zur Bildung von ATP die F_1F_0-ATP-ase (Berkley u. Goodfellow 1981). Da *B.subtilis*, anders als *E.coli*, keine Möglichkeit hat, den Pool an Redox-Äquivalenten durch Gärungsprozesse auszugleichen, hat die Hemmung der F_1F_0-ATP-ase bei *B.subtilis* größere Bedeutung als bei *E.coli* (Gottschalk 1979). Das seltene Auftreten von spontanresistenten Mutanten ab 2mM Azid beruht daher möglicherweise auf der Notwendigkeit einer weiteren Mutation außerhalb des *secA*-Gens in den unc-Genen der F_1F_0-ATP-ase.

Durch Transduktion von DNA azidresistenter *B.subtilis* Klone in den temperatursensitiven *B.subtilis* Stamm NIG1152[*secA*(*div341*^{ts})] konnte gezeigt werden, daß eine Mutation im *secA*-Gen für die Resistenz gegenüber Azid verantwortlich ist. Hierbei erlaubt der Austausch des temperatursensitven *secA*(*div341*^{ts})-Gens gegen das Azidresistenz vermittelnde *secA*-Gen (*secA*10) dem resultierenden Stamm MIK10[*secA*10] bei hohen Temperaturen und in Anwesenheit von Azid zu wachsen. Da nach der Transduktion zuerst temperaturresistente Klone selektioniert und anschließend deren Azidresistenz getestet wurde, konnte es sich bei MIK10 nicht um eine azidresistente Mutante handeln, deren Mutation außerhalb des *secA*-Gens liegt. Die Mutation im *secA*10-Gen bestand in einem Austausch von A nach G an Position 1556 in der DNA-Sequenz bzw. einem Austausch von Glutaminsäure an Position 338 zu Glycin und betraf damit eine Aminosäure, die in 6 weiteren SecA-homologen Proteinen strikt konserviert ist. Bei *E.coli* wurden vier azidresistente *secA*-Allele beschrieben, die zu den Aminosäureaustauschen R179Y, L645G (Oliver et al. 1990), A630Y und R656C (Fortin et al. 1990) führten. Diese Mutationen betreffen wie bei der in dieser Arbeit isolierten *B.subtilis* *secA*-Mutante stark konservierte Aminosäuren. Die Mutationen sind jedoch über das gesamte Protein verteilt und lassen sich nicht direkt mit den möglichen ATP-Bindungsstellen in Übereinstimmung bringen. Zur Erlangung der Azidresistenz ist offensichtlich keine Mutation an einer konkreten Azidbindungsstelle notwendig, vielmehr wird sehr wahrscheinlich die Konformation bestimmter Domänen oder des Gesamtproteins verändert. Untersuchungen zum Resistenzverhalten gegenüber Azid von Mutanten der aus fünf Untereinheiten bestehenden F_1-ATP-ase lassen analoge Schlußfolgerungen zu (Wise et al. 1984, Senior et al. 1984). Unterschiedliche Mutationen in der α- oder ß-Untereinheit der F_1-ATP-ase führen in-vitro zu einer erhöhten ATP-ase-Aktivität der F_1-ATP-ase in Anwesenheit von Azid (Takeda et al. 1985, Nuomi et al. 1987). Hierbei scheinen die Mutationen in einer Untereinheit die Konformation der anderen Untereinheit und damit sehr wahrscheinlich die Konformation des gesamten Komplexes zu verändern. Dafür sprechen auch Untersuchungen von Nuomi et al. (1987) zum Einfluß von verschiedenen Liganden auf die Konformation der F_1-ATP-ase von *E.coli*, die mittels des Fluoreszensverhalten von an die ß-Untereinheit gebundenem Autovertin

untersucht wurde. Es zeigte sich hierbei, daß Konformationsänderungen des F_1-Komplex, die durch die Zugabe von ATP, ADP oder Mg^{++} hervorgerufen werden, durch Azid stark modifiziert werden.
In-vitro Analysen der ATP-ase Aktivität eines azidresistenten SecA-Proteins von *E.coli* (Azi4-SecA) zeigten, daß die Azidkonzentration, die zu einer 50%igen Hemmung des *E.coli* Wildtyp SecA-Proteins führt, das Azi4-SecA-Protein nur zu 27% hemmt (Oliver et al. 1990). Die oben dargestellten Fakten machen es wahrscheinlich, daß diese verminderte Sensitivität des SecA-Proteins mit einer Konformationsänderung des SecA-Proteins zusammenhängt, die zu einer schlechteren Bindung von Azid führt oder die hemmende Wirkung von gebundenem Azid abschwächt. Um jedoch genauere Aussagen über die Bindungsstellen von Azid und/oder über den Mechanismus der Azidhemmung machen zu können, müßten Kristallisationen und Strukturanalysen von ATP-asen bzw. deren azidresistenten Formen in An- oder Abwesenheit von Azid durchgeführt werden.

4.2.2. Charakterisierung des *secA*10-Allels

Zur Untersuchung des Genproduktes von *secA*10 wurde das Gen induzierbar kloniert und die Expression im *B.subtilis* Wildtyp sowie in *B.subtilis* MIK10[*secA*10] nachgewiesen. Alle vier Mutationen in *E.coli*, die zu Azidresistenz führen, zeigen Kodominanz gegenüber dem Wildtyp *secA* (Fortin et al. 1990, Oliver et al. 1990). Die Ergebnisse von Fortin et al. (1990) deuten auf eine Korrelation zwischen dem Dominanzverhalten und der entsprechenden Mutation hin: Je höher die von der jeweiligen Mutante tolerierte Azidkonzentration ist, umso größer muß die in-trans synthetisierte Menge an Wildtyp SecA-Protein sein, um erneut eine Sensitivität des Stammes gegenüber Azid zu erreichen. Zur Ausprägung eines eindeutigen Phänotyps muß ein entsprechendes SecA-Allel in 6-10fachem Überschuß in der Zelle vorliegen (Fortin et al. 1990, Oliver et al. 1990). Unter diesen Umständen wird der Phänotyp des Stammes durch das überproduzierte SecA-Protein bestimmt. Im Vergleich zu den *E.coli* Mutanten wächst *B.subtilis* MIK10[*secA*10] nur bis 1,5mM Azid normal und das Wildtyp *secA*-Gen zeigt eine eindeutige Dominanz gegenüber dem *secA*10-Allel. Kommt es bei der Koexpression beider *secA*-Allele zur Ausbildung von Heterodimeren, so könnte die Konformation des SecA10-Proteins im Heterodimer im Vergleich zum reinen azidresistenten SecA-Protein so verändert sein, daß die Resistenz gegenüber Azid verringert wird oder sogar verloren geht. Für das *secA*10-Allel ist es jedoch wahrscheinlicher, daß das in seiner Funktion partiell defekte (s.u.) SecA10-Protein durch das optimal-funktionelle Wildtyp SecA-Protein von den Translokationsstellen verdrängt wird und somit nicht zur Ausbildung der Azidresistenz beitragen kann. Auf das Vorliegen einer solchen Defizienz des SecA10-Proteins deutete zuerst der Wachstumsdefekt von *B.subtilis* MIK10[*secA*10] bei 30°C und 25°C hin, der bei Wachstum in Flüssigmedium besonders deutlich wurde.

Bacillus Stämme, die unregelmäßige Zellformen ausbilden, werden auch unter dem Begriff des Lyt⁻-Phänotyps (Lytic-deficient strains), zusammengefaßt (Harwood 1990). Unter anderem zeigen sie die Tendenz zur Filamentbildung und verändertes Regenerationsverhalten von Protoplasten (Decastro-Costa u. Landman 1977). Die Ursachen für die Ausbildung dieser Phänotypen liegt in einer Störung der Regulation der Zellwandsynthese, hervorgerufen durch eine Minder- oder Überaktivität autolytischer Enzyme oder der sie regulierenden Effektoren im extrazellulären Bereich der Zellwand (Ghuysen et al. 1966, Herbold u. Glaser 1975). Wie für die temperatursensitive *B.subtilis secA*-Mutante NIG1152[*secA*(div341^{ts})] gezeigt, führt eine Störung im Proteinexport durch eine Mutation im *secA*-Gen zu einer reduzierten Sekretion von autolytischen Enzymen und damit verbunden zu filamentösem Wachstum (Miyakawa u. Komano 1981, Sadaie u. Kada 1985). Entsprechend ist der Wachstumsdefekt von *B.subtilis* MIK10[*secA*10] verbunden mit der Filamentbildung ein Hinweis dafür, daß durch die *secA*10-Mutation ein Defekt im Proteinexport hervorgerufen wurde. Unterstützt wird diese Vermutung durch den Befund, daß sich der kältesensitive Phänotyp durch das Wildtyp *secA*-Gen weitestgehend komplementieren ließ.

Die Komplementationsversuche mit der temperatursensitiven *secA*-Mutante zeigten jedoch, daß das SecA10-Protein in der Lage ist, in vergleichbarer Weise wie das Wildtyp SecA-Protein den Wachstumsdefekt bei hohen Temperaturen zu beheben, wobei jedoch weder bei 30°C noch bei 42°C Resistenz gegenüber Azid beobachtet wird. Wahrscheinlich wird bei Inkubation bei 30°C das SecA10-Protein auf Grund seines partiellen Defektes (s.u.) vom Proteinexport durch das SecA(div341)-Protein verdrängt und kann so keine Azidresistenz vermitteln. Ein ähnliches rezessives Verhalten des *secA*10-Allels konnte auch gegenüber dem *B.subtilis* Wildtyp *secA*-Gen beobachtet werden. Demgegenüber müssen an der Ausbildung des Phänotyps bei 42°C beide SecA-Spezies beteiligt sein. Zur Erklärung der Azidsensitivität bei 42°C besteht zum einen die Möglichkeit, daß das SecA(div341)-Proteins bei 42°C nicht vollständig inaktiviert wird und so ein Teil des Proteins noch am Proteinexport teilnehmen kann. Die Empfindlichkeit des Stammes gegenüber Azid wäre dann auf die Hemmung dieses im Vergleich zum SecA10-Protein voll aktiven Anteils an SecA(div341)-Protein zurückzuführen. Untersuchungen von A. Driessen (1993) zeigten, daß sich Heterodimere aus *B.subtilis* Wildtyp SecA-Protein und mutiertem SecA-Protein bilden können, die in ihrer Translokationsaktivität dem Homodimer des mutierten SecA-Proteins entsprechen. Es könnte daher auch die Ausbildung von Heterodimeren zwischen dem azidresistenten SecA10- und dem temperatursensitiven SecA(div341)-Protein für die Azidsensitivität verantwortlich sein. Hierbei würde die Faltung von SecA10 durch das SecA(div341)-Protein derart verändert, daß die Azidresistenz verloren geht, jedoch die Temperaturresistenz erhalten bleibt. Im Gegensatz dazu wurde in ähnlichen Experimenten bei *E.coli* immer ein eindeutig kodominantes Verhalten der *secA*-Allele beobachtet (Fortin et al. 1990, Oliver et al. 1990). Wird in einem azidresistenten *E.coli* Stamm das temperatursensitive und azidempfindliche SecA51-Protein aus *E.coli* MM52 ausgehend von einem Plasmid im Überschuß exprimiert, so ist der Stamm bei 37°C azidresistent, da

SecA51 bei dieser Temperatur inaktiviert wird. Demgegenüber können die Zellen bei 30°C in Anwesenheit von Azid nicht wachsen, da hier das azidsensitive SecA51-Protein aktiv und im Überschuß vorliegt (Oliver et al. 1990).
Beim Vergleich der Prozessierungskinetik bei 30°C und 37°C von *B.subtilis* Wildtyp und MIK10[*secA10*] wurde deutlich, daß die Translokation von Proteinen bei der höheren Temperatur schneller erfolgte als bei niedriger Temperatur. In einer zusammenfassenden Analyse verschiedener Proteinexportmutanten von *E.coli* geben Pogliano und Beckwith (1993) gute Hinweise dafür, daß der Proteinexport in *E.coli* an sich schon eine verminderte Effizienz bei niedrigen Temperaturen hat. So zeigten Mutation in der 5`-Region vor dem *secE*-Gen, die zu einer reduzierten Synthese des SecE-Proteins führten, einen letalen Exportdefekt nur bei niedrigen Temperaturen (25°C) (Schatz et al. 1991). Analog kann der Wachstumsdefekt von *B.subtilis* MIK10[*secA*10] bei 30°C und 25°C auf einen additiven Effekt des SecA10-Defektes und der generellen Kältesensitivität des Proteinexportes zurückzuführen sein. Demnach zeigen die Pulse-Chase-Experimente eindeutig, daß die Translokation des pOmpA bei MIK10[*secA*10] im Vergleich zum Wildtyp Stamm eine verringerte Sensitivität gegenüber Azid aufweist, obwohl insgesamt eine Verlangsamung der Prozessierung im Vergleich zur Situation ohne Azid zu beobachten war. Analoge Beobachtungen sind für azidresistente Mutanten von *E.coli* von Oliver et al. (1990) beschrieben worden. Diese Mutanten zeigen bei nicht-letalen Azidkonzentrationen einen verlangsamten Proteinexport, ohne daß das Wachstum beeinträchtigt wird. In Anlehnung an die Verhältnisse bei *E.coli*, wo das azidresistente $SecA^{azi4}$-Protein eine deutlich verringerte Sensitivität gegenüber Azid zeigt (vgl. 4.2.1., Oliver et al. 1990), kann die beschriebene Resistenz gegenüber Azid an einer im Vergleich zum Wildtyp-SecA schlechteren Bindung von Azid an das SecA10-Protein oder an einer verminderten Hemmung der ATP-ase Aktivität des SecA-Proteins durch Azid liegen. Es besteht darüber hinaus auch die Möglichkeit, daß die Konformation des SecA10-Proteins so verändert ist, daß die ATP-ase Aktivität schon ohne Azid gegenüber der des Wildtyp SecA-Proteins erhöht ist. Durch Zugabe von Azid würde die Hemmung in diesem Fall zu einer Restaktivität des SecA10-Proteins führen, die für den Proteinexport gerade noch ausreicht. Die Ergebnisse lassen somit den Schluß zu, daß das SecA-Protein von *B.subtilis* wie in *E.coli* den Hauptangriffspunkt für die Wachstumshemmung durch Azid darstellt und betonen die zentrale Rolle des SecA-Proteins für den Proteinexport durch die Plasmamembran auch in Gram-positiven Bakterien.

5. Zusammenfassung:

Gram-positive Bakterien können große Mengen von Proteinen ins Medium sekretieren und werden deshalb zur Herstellung von Enzymen in industriellem Maßstab verwendet. Überraschenderweise ist über den Mechanismus des Proteinexportes bei diesen industriell bedeutenden Bacillus Stämmen weniger bekannt als bei dem Gram-negativen Bakterium *Escherichia coli*. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Eigenschaften einer der zentralen Komponenten des Exportapparates, des SecA-Proteins, von Gram-positiven Bakterien untersucht.
Mit Hilfe des *secA*-Gens aus *B.subtilis* als Sonde konnte das *secA*-homologe Gen von *S.carnosus* isoliert werden. Das Gen von 2532 Bp kodiert für ein Protein mit 844 Aminosäuren, das damit im Größenbereich des SecA-Proteins aus *B.subtilis* (841 Aminosäuren) liegt und mit diesem 59,8% identische Aminosäuren aufweist. Die Organisation auf dem Chromosom deutet darauf hin, daß das *S.carnosus secA*-Gen ähnlich wie das *B.subtilis secA*-Gen von einem eigenen Promotor transkribiert wird. Weiterhin wurde vor dem *secA*-Gen von *S.carnosus* ein Gen identifiziert, das in seiner Lage und in der von im abgeleiteten Aminosäuresequenz große Ähnlichkeit mit dem *orf1*-Gen von *B.subtilis* hat. Der Vergleich des *S.carnosus* SecA-Proteins mit weiteren SecA-homologen Proteinen zeigt vor allem in der N-terminalen Region hoch konservierte Bereiche, die von Aminosäure 96-103 und 195-203 das A-Motiv bzw. B-Motiv der ATP-Bindungsstelle umfassen. Das *S.carnosus secA*-Gen wurde in verschiedenen *E.coli* und *B.subtilis* Stämmen exprimiert und die physiologischen Eigenschaften des *S.carnosus* SecA-Proteins wurden mit denen der SecA-Proteine aus *E.coli* und *B.subtilis* verglichen. Im Gegensatz zum SecA-Protein aus *B.subtilis* zeigte das *S.carnosus* SecA in *E.coli secA*-Mutanten keine Komplementation des Wachstumsdefektes. Die Ursache hierfür liegt sehr wahrscheinlich in strukturellen Unterschieden zwischen dem *S.carnosus* SecA und dem *E.coli* SecA, die eine Inkompatibilität zwischen dem *S.carnosus* SecA-Protein und dem *E.coli* Proteinexportapparat zur Folge haben. Demgegenüber konnte das *S.carnosus* SecA sowohl den Wachstumsdefekt als auch den Proteinexportdefekt der *B.subtilis secA*-Mutante NIG1152 komplementieren. Die Lipase aus *S.hyicus* wurde hierbei mit einer guten, wenn auch im Vergleich zum *B.subtilis* Wildtyp Stamm etwas verlangsamten Kinetik exportiert, während im Gegensatz dazu das äußere Membranprotein OmpA aus *E.coli* nicht exportiert wurde. Der Defekt beim Export des OmpA-Proteins könnte auf einer Defizienz bei der Ausbildung des Komplexes aus dem Gram-positiven *S.carnosus* SecA-Proteins und dem Gram-negativen Vorläufer beruhen und/oder durch eine Störung bei der Initiation der Translokation an der Membran bedingt sein.
Durch die Selektion auf azidhaltigem Nährmedium wurde die *B.subtilis* secA-Mutante MIK10 isoliert, die in Anwesenheit von Azid wachsen kann. Für die Resistenz gegenüber Azid ist eine Mutation im SecA-Protein verantwortlich, die auf in einem Austausch der in allen SecA-homologen Proteinen konservierten Glutaminsäure in Position 338 gegen Glycin besteht. Die Hemmung des Proteinexportes, der im Wildtyp bei Anwesenheit von Azid beobachtet wurde,

wurde durch diese Mutation wieder aufgehoben. Das Wildtyp *secA*-Gen zeigt dabei beim Test auf Azidresistenz eine deutliche Dominanz über das azidresistente *secA*-Allel. Die Mutation führte jedoch neben der Azidresistenz zu einem Wachstums- und Proteinexportdefekt bei niedrigen Temperaturen. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß das SecA-Protein in *B.subtilis*, wie in *E.coli*, den Hauptangriffspunkt für die Wachstumshemmung durch Azid darstellt und so die höchste Empfindlichkeit aller zellulären ATP-asen gegenüber Azid aufweist.

6. Literaturliste

Akita, M., Sasaki, S., Matsuyama, S., Mizushima, S., (1990) SecA interacts with secretory proteins by recognizing the positive charge at the amino terminus of the signal peptide in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 265:8164-8169

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

Altman, E., Emr, S.D., Kumamoto, C.A.(1990) The presence of both the signal sequence and a region of mature LamB protein is required for the interaction of LamB with the export factor SecB. J. Biol. Chem. 265, 30:18154-18160

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

Amann, E., Ochs, B., Abel, K.-J. (1988) Tightly regulated *tac* promotor useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. Gene 69:301-315

Arkowitz, R.A., Joly, J.C., Wickner, W. (1993) Translocation can drive the unfolding of a preprotein domain. EMBO J. 12, 1:243-253

Bankaitis, V.A., Bassford, P.J. (1985) Proper interaction of at least two components is required for efficient export of proteins to the *Escherichia coli* cell envelope. J. Bacteriol. 161:169-178

Bensadoun, A., Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interferring material. Anal. Biochem. 70:241-250

Berkley, R.C.W., Goodfellow, M. (1981) The aerobic endospore-forming bacteria: classification and identification. Academic Press, New York

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

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

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

Böhni, P.C., Deshaies, R.J., Schekman, R.W. (1988) Sec11 is required for signal peptide processing and yeast cell growth. J. Cell Biol. 106:1035-1042

Borchert, T.V., Nagarajan, V. (1990) Structure-function studies on the *Bacillus amyloliquefaciens* levansucrase signal peptide. In: Genetics and biotechnology of bacilli (Zukowski, M.M., Ganesan, A.T., Hoch, J.A. eds.), Vol. 3. Acad. Press, Inc. San Diego, Calif.. S.171-177

Borchert, T.V., Nagarajan, V. (1991) Effects of signal sequence alterations on the export of levansucrase in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 173:276-282

Bosch, D., de Boer, P., Bitter, W., Tommassen, J. (1989) The role of the positive charge of the signal sequence of *E.coli* outer membrane protein PhoE in export. Biochem. Biophys. Acta 979:69-76

Breitling, R., Gerlach, D., Hartmann, M., Behnke, D. (1989) Secretory expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* of the human interferon α genes directed by staphylokinase signals. Mol. Gen. Genet. 217:384-391

Breukink, E., Demel, R.A., de Korte-Kool, G., de Kruijff, B. (1992) SecA insertion into phospholipids is stimulated by negatively charged lipids and inhibited by ATP: a monolayer study. Biochemistry 31:1119-1124

Cabelli, R.J., Chen, L., Tai, P.C., Oliver, D.B. (1988) SecA protein required for secretory protein translocation into *E.coli* membrane vesicles. Cell 55: 683-692

Cabelli, R.J., Dolan, K.M., Qian, L., Oliver, D.B. (1991) Characterization of membrane-associated and soluble states of SecA protein from wild-type and *SecA51*(TS) mutant strains of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 266:24420-24427

Caruthers, M.H., Barone, A.D., Beaucage, S.L., Dodds, D.R., Fisher, E.F., McBride, L.J., Matteuci, M., Stabinsky, Z., Tang, J.-Y. (1987) Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramid method. Methods Enzymol. 154:287-313

Casadaban, M.J. (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to select promotors in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and mu. J. Mol. Biol. 105: 541-555

Chen, L., Tai, P.-C. (1986) Roles of H^+-ATPase and proton motive force in ATP-dependent protein translocation in vitro. J. Bacteriol. 167:389-392

Cerreti, D.P., Dean, P., Davis, G.R., Bedwell, D.M., Nomura, M. (1983) The *spc* ribosomal protein operon of *Escherichia coli*: sequence and cotranscription of the ribosomal protein genes and a protein export gene. Nucleic Acids Res. 11:2599-2616

Chun, S-Y., Randall, L.L. (1994) In vivo studies of the role of SecA during protein export in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 176, 14:4197-4203

Ciesla, Z., Mardarowicz, K., Klopotowski , T. (1974) Inhibition of DNA synthesis and cell division in *Salmonella typhimurium* by azide. Mol. Gen. Genet. 135:339-348

Collier, D.N., Bankaitis, V.A., Weiss, J.B., Bassford, B.J. (1988) The antifolding activity of SecB promotes the export of the *E.coli* maltose-binding protein. Cell 53: 273-283

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E.coli* by R-factor DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110-2114

Cunningham, K., Lill, R., Crooke, M., Rice, M., Moogre, K., Wickner, W., Oliver, D.B. (1989) SecA protein, a peripherical protein of the *Escherichia coli* plasma membrane, is essential for functional binding and translocation of proOmpA. EMBO J. 8:955-959

Cutting, S.M., Vander Horn, P.B. (1990) PBS1 generalised transduction. In: Molecular biological methods for *Bacillus* (Harwood, C.R., Cutting, S.M. eds.); John Wiley & sons, Ltd., Chichester. S.27-38

Dalbey, R.E., 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., Wickner, W. (1981) Isolation of the *Escherichia coli* leader peptidase gene and effects of leaderpeptidase over-production in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6106-6110

DeCastro-Costa, M.R., Landman, O.E., (1977) Inhibitory protein controls the reversion of protoplasts and L-form *Bacillus subtilis* to walled state. J. Bacteriol. 129:678-689

de Cock, H., Meeldijk, J., Overduin, P., Verkleij, A., Tommassen, J. (1989) Membrane biogenesis in *Escherichia coli* effects of a *secA* mutation.
Biochem. Biophys. Acta 985: 313-319

de Cock, H., Overeem, W., Tommassen, J. (1992) Biogenesis of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli*. Evidence for multiple SecB-Binding sites in the mature portion of the PhoE protein. J. Mol. Biol. 224:369-379

Dolan, K.M., Oliver, D.B. (1991) Characterization of *Escherichia coli* SecA protein binding to a site on its mRNA involved in autoregulation. J. Biol. Chem. 266:23329-23333

Downing, W.L., Sullivan, S.L., Gottesman, M.E., Dennis, P.P. (1990) Sequence and transcriptional pattern of the essential *Escherichia coli secE-nusG* operon.
J. Bacteriol. 172:6121-6127

Driessen, A.J.M. (1992) Bacterial protein translocation: kinetic and thermodynamic role of ATP and the proton motive force. TIBS 17:219-223

Driessen, A.J.M. (1993) SecA, the peripheral subunits of the *Escherichia coli* precusor protein translocase, is functional as a dimer. Biochemistry 32:13190-13197

Economou, A., Wickner, W. (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. Cell 78:835-843

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

Fikes, J.D., Barkocy-Gallagher, G.A., Klapper, D.G., Bassford, P.J. (1990) Maturation of *Escherichia coli* maltose-binding protein by signal peptidase I in vivo. Sequence requirements for efficient processing and demonstration of an alternate cleavage site.
J. Biol. Chem. 265:3417-3423

Fortin, Y., Phoenix, P., Drapeau, G.R (1990) Mutations conferring resistance to azide in *Escherichia coli* occur primarily in the *secA* Gene. J. Bacteriol. 172, 11: 6607-6610

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, 3:1286-1290

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

Gelfand, D.H., White, T.J. (1990) Thermostabel DNA polymerases. In: PCR protocols: A guide to methods and applications (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Snonsky, J.J., Withe, T.J. eds). Acad. Press. Inc. S. 27-38

Ghuysen, J-M., Tipper, D.J., Strominger, J.R. (1966) Enzymes that degrade bacterial cell walls. Methods Enzymol. 8:694-699

Gottschalk, G. (1979) Bacterial Metabolism: 6. Catabolic activities of aerobic heterotrophs. Springer Verlag Berlin, New York, Heidelberg: 141-177

Götz, F., Popp, F., Korn, E., Schleifer, K.H. (1985) Complete nucleotide sequence of the lipase gene from *Staphylococcus hyicus* cloned in *Staphylococcus carnosus*.
Nucleic. Acids Res. 13:3895-3906

Haandrikman, A.J., Meesters, R., Laan, H., Konings, W.N., Kok, J., Veneman, G. (1991) Processing of the lactococcal extracellular serine protease.
Appl. Environm. Microbiol. 57:1899-1904

Hantke, K., Braun. V. (1973) Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. Eur. J. Biochem. 34:284-296

Hardy, K.G. (1985) Bacillus cloning methods. In: DNA cloning Vol.II (Glover, D.M. ed), IRL Press, Oxford, Washington D.C. S. 1-17

Hartl, F.-U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J.P., Wickner, W. (1990) The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E.coli* plasma membrane.
Cell 63:269-279

Harwood, C.R., Coxon, R.D., Hancock, I.C. (1990) The *Bacillus* cell envelope and secretion. In: Molecular Biology Methods for *Bacillus* (Harwood, C.R., Cutting, S.M. eds.), John Wiley & sons Ltd., Chichester. S: 327-369

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

Hayashi, S., Wu, H.C. (1989) Posttranslational modification and processing of *Escherichia coli* pro-lipoprotein in vitro using inverted membrane vesicles from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Abstr. 89th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1989, Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C. S.249

Hayashi, S., Wu, H.C. (1990) Lipoproteins in bacteria. J. Bioenerg. Biomemb. 22:451-471

Hendrick, J.P., Wickner, W. (1991) SecA protein needs both acidic phospholipids and SecY/E protein for functional high-affinity binding to the *Escherichia coli* plasma membrane. J. Biol. Chem. 266:24596-24600

Herbold, D.R., Glaser, L. (1975) Interaction of N-acetylmuramic acid-L-alanine amidase with cell wall polymers. J. Biol. Chem. 250:7231-7238

Higgins, D.G., Sharp, P.M. (1988) CLUSTAL: a package of performing multiple sequence aligments on a microcomputer. Gene 73:237-244

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

Hohn, B. (1979) In vitro packaging of Lambda and Cosmid DNA. Methods Enzymol. 68: 299-309

Jeong, S.M., Yoshikawa, H., Takahashi, H. (1993) Isolation and charaterization of the *secE* homologue gene of *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 10, 1:133-142

Innis, M.A., Tokunaga, M., Williams, M.E., Loranger, J.M., Chang, S.Y., Chang, S., Wu, H.C. (1984) Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* prolipoprotein signal peptidase (*lsp*) gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3708-3712

Inouye, S., Soberon, X., Franceschini, K., Nakamura, K., Itakura, K., Inouye, M. (1982) Role of the positive charge of the amino-terminal region of the signal peptide in protein secretion across the membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3438-3441

Joly, J.C., 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

Joly, J.C., Leonard, M.R., Wickner, W. (1994) Subunit dynamics in *Escherichia coli* preprotein translocase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4703-4707

Jones, J.D., McKight, C.J., Gierasch, L.M. (1990) Biophysical studies of signal peptides: Implications for signal sequence functions and the involvement of lipid in protein export. J. Bioenerg. Biomemb. 22: 213-232

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

Ito, K., 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

Itoh, Y., Kanoh, K., Nakamura, K, Takase, K., Yamane, K. (1990) Artificial insertion of peptides between signal peptide and mature protein: effect on the secretion and processing of hybrid thermostable α-amylases in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* cells. J. Gen. Microbiol. 136:1551-1558

Kaiser, K., Murray, N.E. (1979) Physical charaterization of the "Rac" prophage in *E.coli* K12. Mol. Gen. Genet. 175:159-174

Kallio, P., Simonen, M., Palva, I., Sarvas, M. (1986) Synthesis of OmpA of *Escherichia coli* K12 in *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. 132:667-687

Kang, P.J., Shapiro, L. (1994) Cell cycle arrest of a *Caulobacter crescentus secA* mutant. J. Bacteriol. 176, 16:4958-4965

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

Klose, M., Schimz, K.L., van der Wolk, J., Driessen, A.J.M., Freudl, R. (1993). Lysine 106 of the putative ATP-binding site of *B.subtilis* SecA protein is required for functional complementation of *E.coli secA* mutants in vivo. J. Biol. Chem. 286, 6: 4504-4510

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

Kontinen, V.P., 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

Kim, Y.J., Rajapandi, T., Oliver, D.B. (1994) SecA protein is exposed to the periplasmic surface of the E.coli inner membrane in its active form. Cell 78:845-853

Kumamoto, C.A. (1989) *Escherichia coli* SecB protein associates with exported protein precursors in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5320-5324

Kumamoto, C.A. (1991) Molecular chaperones and protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane. Mol. Microbiol. 5:19-22

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

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

Kumamoto, C.A., Gannon, P.M. (1988) Effects of *Escherichia coli secB* mutations on pre-maltose-binding protein conformation and export kinetics. J. Biol. Chem. 263: 11554-11558

Kumamoto, C.A., Nault A.K. (1989) Characterization of the *Escherichia coli* protein export gene *secB*. Gene 75: 167-175

Kusters, R., de Vrije, T., Breukink, E., de Kruijff, B. (1989) SecB protein stabilizes a translocation-competent state of purified prePhoE protein. J. Biol. Chem. 264, 35:20827-20830

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

Lecker, H.L., Driessen, A.J.M., 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, 7:2309-2314

Lederberg, J (1950) The selection of genetic recombination with bacterial growth inhibitors. J. Bacteriol. 59:211-215

Lee, C., Li, P., Inouye, H., Brickman, R., Beckwith, J. (1989) Genetic studies of the inability of the ß-galactosidase to be translocated across the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. J. Bacteriol. 171:4609-4616

Liebl, W. (1986) Expression fusionierter Gene und Sekretion ihrer Produkte in Staphylokokken. Dissertation TU München

Lill, R., Cunningham, K., Brundage, L.A., Ito, K., Oliver, D.B., Wickner, W. (1989) SecA protein hydrolyses ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *Escherichia coli*. EMBO J. 8, 3: 961-966

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

Liu, G., Topping, T.B., Randall. L.L. (1989) Physiological role during export for the retardation of folding by the leader peptide of maltose-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9213-9217

MacIntyre,S., Mutschler, B., Henning, U. (1991) Requirement of the SecB chaperone for export of a non-secretory polypeptide in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 227:224-228

Matsuyama, S.-I., Fujita Y., Mizushima, S. (1993) SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. EMBO J. 12 ,1:265-270

Matsuyama, S.-I., 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*. Biochem. Biophys. Acta 1122:77-84

Meens, J. (1994) Untersuchungen zur Signalsequenzfunktion und zur Funktion SecE-homologer Proteine in Gram-positiven Bakterien. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Meens, J., Frings, E., Klose, M., Freudl, R. (1993) An outer membrane protein (OmpA) of *Escherichia coli* can be translocated across the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 9,4: 847-855

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

Mitchell, C., Oliver, D. (1993) Two ATP-binding domains are needed to promote export by *Escherichia coli* SecA ATPase. Mol. Microbiol. 10, 3:483-497

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

Munoa, F.J., Miller, K.W., Beers, R., Graham, M., Wu, H.C. (1991) Membrane topology of *Escherichia coli* prolipoprotein signal peptidase (signal peptidase II). J. Biol. Chem. 266:17667-17672

Murphy, C.K., Beckwith, J. (1994) Residues essential for the function of SecE, a membrane component of the *Escherichia coli* secretion apparatus, are located in a conserved cytoplasmic region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2557-2561

Myers, E.W., Miller, W. (1988) Optimal alignment in linear space. CABIOS 4:11-17

Nakai, M., Nohara, T., Sugita, D., Endo, T. (1994) Identification and characterization of the SecA protein homologue in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. Biochem. Biophys. Res. Comm. 200, 2:844-851

Nakamura, K., Fujita, Y., Itoh, Y., Yamane, K.(1989) Modification of length, hydrophobic properties and electric charge of *Bacillus subtilis* α-amylase signal peptide and their different effects on the production of secretory proteins in *B.subtilis* and *Escherichia coli* cells. Mol. Gen. Genet. 216:1-9

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

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

Nishiyama, K., Mizushima, S., Tokuda, H. (1993) A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. EMBO J. 12, 9:3409-3415

Nuomi, T., Maeda, M., Futai, M. (1987) Mode of inhibition of sodium azide on H^+-ATPase of *Escherichia coli*. FEBS Lett. 213, 2:381-384

O'Kane, C., Cantwell, B.A., McConnell, D.J. (1985) Mapping of the gene for endo-ß-1,3-1,4-glucanase of *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Lett. 29: 135-139

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

Oliver, D.B., Beckwith, J. (1982) Regulation of a membrane component required for protein secretion in *Escherichia coli*. Cell 30: 311-319

Oliver, D.B., Cabelli, R.J., Dolan, K.M., Jarosik, G.P. (1990) Azide-resistant mutants of *Escherichia coli* alter the SecA protein, an azide-sensitive component or the protein export machinery. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8227-8231

Osborne, R.S., Silhavy J.S. (1993) PrlA suppressor mutations cluster in regions corresponding to three distinct topological domains. EMBO J. 12, 9:3391-3398

Overhoff, B (1991) Isolierung zweier Komponenten des Proteintranslokations-Apparates von *Bacillus* und *Staphylococcus*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

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

Palva, I., Sarvas, M., Lehtovaara, P., Sibakov, M., Kääriäinen, L. (1982) Secretion of the *Escherichia coli* ß-lactamase from *Bacillus subtilis* by the aid of alpha-amylase signal sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582-5586

Park, S., Liu, G., Topping, T.B., Cover, H.W., Randall, L.L. (1988) Modulation of the folding pathways of exported proteins by the leader sequence. Science 239:1033-1035

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

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

Pogliano, J.A., Beckwith, J. (1994) SecD and SecF facilitate protein export in *Escherichia coli*. EMBO J. 13, 3:554-561

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

Poritz, M.A., Strub, K., Walter, P. (1988) Human SRP RNA and *E.coli* 4,5S RNA contain a highly homologous structural domain. Cell: 55:4-6

Poritz, M.A., Bernstein, H.D., Strub, K., Zopf, D, Wilhelm, H., Walter, P (1990) An *E.coli* ribonucleoprotein containing 4,5S RNA resembles mamalian signal recognition particle. Science 250:1111-1117

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

Priest, F.G. (1989) Products and applications. In: Biotechnology Handbooks 2: *Bacillus* (Harwood, C.R., ed.) Plenum: London. S. 293-320

Puohiniemi, R., Simonen M., Muttilainen S., Himanen, J.P., Sarvas, M. (1992) Secretion of *Escherichia coli* outer membrane proteins OmpA and OmpF in *Bacillus subtilis* is blocked at an early intracellular step. Mol. Microbiol. 6, 8:981-990

Putney, S.D., Benkovic, S.J., Schimmel, P.R. (1981) A DNA fragment with an α-phosphorothiate nucleotide at one end is asymmetrically blocked from digestion by exonuclease III and can be replicated in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:7350

Puziss, J.W., Fikes, D.J., Bassford, P.J. (1989) Analysis of mutational alterations in the hydrophilic segment of the maltose-binding protein signal peptide. J. Bacteriol. 171:2303-2311

Rescei, P.A., Gruss, A.D., Novick, R.P. (1987) Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1127-1131

Reuter, K., Slany, R., Ullrich, F., Kersten, H. (1991) Structure and organization of *Escherichia coli* genes involved in biosynthesis of the deazaguanine derivative Queuine, a nutrient factor for eukaryotes. J. Bacteriol. 173: 2256-2264

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 *Escherichia coli* proteins with putative GTP-binding domains. Nature 340:478-482

Rygus, T., Hillen, W. (1991) Inducible high-level expression of heterologues genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35:594-599

Ryan, J.P., Bassford, P.J. (1985) Post-translational export of a maltose-binding protein in *Escherichia coli* strains harboring *malE* signal-sequence mutations and either prl^+ or *prl* suppressor alleles. J. Biol. Chem. 260:14832-14837

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

Sadaie, Y., Kada, T. (1985) *Bacillus subtilis* gene involved in cell division, sporulation, and exoenzyme secretion. J. Bacteriol. 163, 2:648-653

Sadaie, Y., Narui, K. (1976) Repair deficiency, mutator activitiy, and thermal prophage inducibility in *dna-8132* strains of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 126:1037-1041

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

Saiki, R.K., Gefland, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuoki, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, M.A. (1988) Primer-directed amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanger, F.G., Nicklen, S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5463-5467

Saunders, C.W., Schmidt, B.T., Mallonnee, R.L., Guyer, M.S. (1987) Secretion of human serum albumin from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 169:2917-2925

Scaramuzzi, C.D., Hiller, R.G., Stokes, H.W. (1992) Identification of a chloroplast-encoded *secA* gene homologue in a chromophytic alga: possible role in chloroplast protein translocation. Curr. Genet. 22:421-427

Schaeffer, P., Millet, J., Auber, J.P. (1965) Catabolic repression of bacterial sporulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 54:704-711

Schatz, P.J., Bieker, K.L., Otteman, K.M., Silhavy, T.J., Beckwith, J. (1991) One of three membrane 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, P.J., Riggs, P.D., Jaqc, A., Fath, M.J., Beckwith, J., (1989) The *secE* gene encodes an integral membrane protein required for protein export in *Escherichia coli*. Genes Dev. 3:1035-1044

Schiebel, E., Driessen, A.J.M., Hartl, F.-U., Wickner, W. (1991) $\Delta\mu H^+$ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. Cell 64:927-939

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

Schmidt, M.G., Dolan, K.M., Oliver, D.B. (1991) Regulation of *Escherichia coli secA* mRNA translation by a secretion-responsive element. J. Bacteriol. 173:6605-6611

Schmidt, M.G., Rollo, E.E., Grodberg, J., Oliver, D.B. (1988) Nucleotide sequence of the *secA* gene and *secA(Ts)* mutations preventing protein export in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170, 8:3404-3414

Senior, A.E., Latchney, L.R., Ferguson, A.M., Wise, J.G. (1984) Purification of F_1-ATPase from partial revertants of *Escherichia coli uncA* mutant strains. Arch. Biochem. Biophys. 228:49-53 23:1426-1432

Simonen, M., Palva, I., (1993) Protein secretion in *Bacillus* species. Microbiol. Rev. 57, 1:109-137

Simonen, M., Tarkka, E., Puohiniemi, R., Sarvas M. (1992) Incompatibility of outer membrane proteins OmpA and OmpF of *Escherichia coli* with secretion in *Bacillus subtilis*: fusions with secretable peptides. FEMS Microbil. Lett. 100:233-242

Smith, W.P. (1980) Cotranslational secretion of the diphteria toxin and alkaline phosphatase in vitro: involvement of membrane protein(s). J. Bacteriol. 141:1142-1147

Smith, N.R., Gibson, T., Gordon, R.E., Sneath, P.H.A. (1964) Type cultures and proposed neotype cultures of some species in the genus *Bacillus*. J. Gen. Microbiol. 34:269-272

Smith, W.P., Tai, P.-C., Thompson, R.C., Davis, D.B. (1977) Extracellular labeling of nascent polypeptides traversing the membrane of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:2830-2834

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

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

Stirling, C.J., 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, J.-W., Boylan, S.A., Thomas, S.M., Dolan, K.M., Oliver, D.B., Price, C.W. (1990) Isolation of a *secY* homologue from *Bacillus subtilis*: evidence for a common protein export pathway in eubacteria. Mol. Microbiol. 4:305-314

Takamatsu, H., Fuma, S.-I., Nakamura, K., Sadaie, Y., Shinkai, A., Matsuyama, S.-I., Yamane, K. (1992) In vivo and in vitro characterization of the *secA* gene product of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 174, 13: 4308-4316

Takeda, K., Miki, J., Kanazawa, H., Tsuchiya, T., Futai, M. (1985) Change of inhibitor sensitivities of *Escherichia coli* F1-ATPase due to a mutational substitution of Phe for Ser at residue 174 of the ß subunit. J. Biochem. 97:1401-1407

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

Tani, K., Shiozuka, K., Tokuda, H., Mizushima, S. (1989) In vitro analysis of the process of translocation of OmpA across the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. A translocation intermediate accumulates transiently in the absence of the proton motive force. J. Biol. Chem. 264:18582-18588

Thom, R.J., Randall, L.L. (1988) Role of the leader peptide of maltose-binding protein in two steps of the export process. J. Bacteriol. 170, 12:5654-5661

Towbin, H.G., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354

Tschauder, S., Driessen, A., Freudl, R. (1992) Cloning and molecular characterization of the *secY* genes from *Bacillus licheniformis* and *Staphylococcus carnosus*: comparitive analysis of nine members of the SecY famliy. Mol. Gen. Genet. 235: 147-152

Tschauder, S. (1993) Isolierung und Charakterisierung der *secY*-Gene aus *Bacillus subtilis* ind *Staphylococcus carnosus*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Valentin, K. (1993) SecA is plastid-encoded in a red alga: implications for the evolution of plastid genomes and the thylakoid protein import apparatus. Mol. Gen. Genet. 236:245-250

van Dijl, J.M., de Jong, A., Smith, H., Bron, S., Venema, G. (1991) Non-functional expression of *Escherichia coli* signal peptidase I in *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. 137:2073-2083

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

van der Wolk, J., Klose, M., Breukink, E., Demel, R.A., de Kruijff, B., Freudl, R., Driessen, A.J.M. (1993) Characterization of a *Bacillus subtilis* SecA mutant protein deficient in translocation ATPase and release from the membrane. Mol. Microbiol. 8:31-42

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

von Heijne, G. (1983) Patterns of amino acids near signal sequence cleavage sites. Eur. J. Biochem. 133:17-21

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

von Heijne, G. (1989) The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. Prot. Eng. 2:531-534

von Heijne, G., Abrahmsén, L. (1989) Species-specific variations in the signal peptide design. Implication for protein secretion in foreign hosts. FEBS Lett. 244:439-446

Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the α- and ß-subunits of ATP synthase, myosin kinases and other ATP-requiring enzymes have a common nucleotide binding fold. EMBO J. 1: 945-951

Watanabe, M., Blobel, G. (1989a) Binding of a soluble factor of *Escherichia coli* to preproteins does not require ATP and appears to be the first step in the protein export. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2248-2252

Watanabe, M., Blobel, G. (1989b) SecB functions as a cytosolic signal recognition factor for protein export in *E.coli*. Cell 48:695-705

Watts, C., Wickner, W., Zimmermann R. (1983) M13 procoat and preimmunoglobulin share processing specificity but use different membrane receptor mechanisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2809-2813

Weiss, J.B., Bassford, P.J. (1990) The folding properties of the *Escherichia coli* maltose-binding protein influence its interaction with SecB in vivo. J. Bacteriol. 172:3023-3029

Weiss, J.B., Ray, P.H., Bassford, J. (1988) Purified SecB protein of *Escherichia coli* retards folding and promotes membrane translocation of the maltose-binding protein in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8978-8982

Wenzig, E., Lottspeich, F., Verheij, B., de Haas, G.H., Gätz, F. (1990) Extracellular processing of the *Staphylococcus hyicus* lipase. Life Sci. Adv. 9:47-56

Wild, J., Altman, E., Yura, T., Gross, C.A. (1992) DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in *Escherichia coli*. Genes Dev. 6:1165-1172

Wise, J.G., Latchney, L.R., Ferguson, A.M., Senior, A.E. (1984) Defective proton ATPase of *uncA* mutants of *Escherichia coli*. 5`-Adenylyl imidodiphosphate binding and ATP hydrolysis. Biochemistry 23:1426-1432

Woese C.R. (1987) Bacterial Evolution. Microbiol. Rev. 51, 2: 221-271

Yamada, H, Yamagata, H., Mizushima, S. (1984) The major outer membrane lipoprotein and new lipoproteins share a common signal peptidase that exists in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. FEBS Lett. 166:179-182

Yamada, H., Matsuyama, S.-J., Tokuda, H., Mizushima, S. (1989) A high concentration of SecA allows proton motive force-independent translocation of a model secretory protein into *Escherichia coli* membrane vesicles. J. Biol. Chem. 264:18577-18581

Yamane, K., Akiyama, Y., Ito, K., Mizushima, S. (1990) A positively charged region is a determinant of the orientation of cytoplasmic membrane proteins in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 265, 34:21166-21171

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

Yoshikawa, H., Joeng, S.M., Hirata, A., Kawamura, F., Doi, R.H., Takahashi, H. (1993) Temperature-sensitive sporulation caused by a mutation in the *Bacillus subtilis secY* gene. J. Bacteriol. 175, 11: 3656-3660

Zhao, X., Wu, H.C. (1992) Nucleotide sequence of the *Staphyllococcus aureus* signal peptidase II (*lsp*) gene. FEBS Lett. 299:80-84

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

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

Besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. R. Freudl bedanken, der durch seine Diskussionsbereitschaft und seine Ratschläge maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe "Proteinsekretion" S. Crombach, G. Decker, E. Frings, M. Herbort, Dr. M. Klose, J. Meens und Dr. K.-L. Schimz danke ich für anregende Diskussionen und das gute Arbeitsklima. Besonderer Dank gilt A. Bida, die durch ihre tatkräftige Hilfe für den raschen Fortgang der experimentellen Arbeiten sorgte.

Allen Mitgliedern des Institutes für Biotechnologie I möchte ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit danken.

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

Jül-3072
Juni 1995
ISSN 0944-2952