

**Etablierung und Optimierung der sekretorischen
Gewinnung von thermostabilen Lipasen
in Gram-positiven Bakterien**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Henrike Brundiek

aus Greven

September 2007

Aus dem Institut für Biotechnologie I

des Forschungszentrums Jülich, Mitglied der Helmholtz-Gemeinschaft

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. R. Freudl

Koreferent: Prof. Dr. J.F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2007

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	- 1 -
I.1	MARGESCHNEIDERTE BIOKATALYSATOREN UND PRODUKTIONSSYSTEME FÜR DIE WEIßE BIOTECHNOLOGIE	
1.1.1	<i>Fallbeispiel: Lipasen aus extremophilen Mikroorganismen</i>	- 2 -
1.1.2	<i>Sekretorische Proteingewinnung in Gram-positiven Mikroorganismen</i>	- 5 -
I.2	ALLGEMEINES ZUM PROTEINTRANSPORT IN GRAM-POSITIVEN BAKTERIEN	- 6 -
I.3	DER GENERELLE SEKRETIOWEG	- 8 -
1.3.1	<i>Das Signalpeptid des Sec-Weges</i>	- 8 -
1.3.2	<i>„Targeting“ an die Sec-Translokase</i>	- 9 -
1.3.2.1	<i>Posttranslationales Targeting</i>	- 9 -
1.3.2.2	<i>Cotranslationales Targeting</i>	- 10 -
1.3.3	<i>Die Sec-Translokase</i>	- 11 -
1.3.3.1	<i>Wichtige Komponenten und strukturelle Eigenschaften der Sec-Translokase</i>	- 12 -
1.3.3.1.1	<i>Der SecYEG-Translokationskanal</i>	- 12 -
1.3.3.1.2	<i>Die SecA-ATPase</i>	- 13 -
1.3.3.1.3	<i>Akzessorische Komponenten: SecD, SecF, YajC</i>	- 13 -
1.3.3.1.4	<i>YidC</i>	- 13 -
1.3.4	<i>Späte Schritte der Sec-abhängigen Proteintranslokation</i>	- 14 -
1.3.5	<i>Die Gram-positive Zellwand als Hindernis</i>	- 15 -
1.3.6	<i>Engpässe des Sec-Weges für die Sekretion heterologer Proteine</i>	- 15 -
I.4	DER TAT-WEG ALS ALTERNATIVER SEKRETIOWEG FÜR DIE HETEROLOGE PROTEINSEKRETIOWEG	- 17 -
1.4.1	<i>Die Signalpeptide des Tat-Weges</i>	- 18 -
1.4.1.1	<i>Spezies- bzw. Translokase-Spezifität von Tat-Signalpeptiden</i>	- 19 -
1.4.2	<i>Wichtige Komponenten der Tat-Translokase</i>	- 20 -
1.4.3	<i>Abweichende Typen der Tat-Translokase in Gram-positiven Bakterien</i>	- 21 -
1.4.4	<i>Tat-Komplexe und deren Funktion während der Translokation</i>	- 21 -
1.4.5	<i>Möglicher Mechanismus der Tat-Translokation</i>	- 22 -
1.4.6	<i>Qualitätskontrolle durch die Tat-Translokase</i>	- 23 -
1.4.7	<i>Tat-Substrate und Chaperone</i>	- 23 -
1.4.8	<i>Proofreading von Tat-Substraten durch Chaperone der TorD-Familie</i>	- 24 -
1.4.9	<i>Arbeitsmodell für das Tat-Proofreading durch TorD</i>	- 26 -
1.4.10	<i>Mögliche Engpässe bei der Tat-abhängigen Sekretion heterologer Proteine</i>	- 26 -
I.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	- 28 -
II.	MATERIAL UND METHODEN	- 29 -
II.1	CHEMIKALIEN UND ENZYME	- 29 -
II.2	BAKTERIENSTÄMME, OLIGONUKLEOTIDE UND PLASMIDE	- 29 -
II.3	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	- 34 -
11.3.1	<i>Nährmedien</i>	- 34 -
11.3.2	<i>Kultivierungsbedingungen</i>	- 35 -
11.3.3	<i>Indikatoragarplatten mit Tributyrin oder Tween80 für Agardiffusionsassays</i>	- 35 -
11.3.4	<i>Wachstumskurven</i>	- 35 -
11.3.5	<i>Stammhaltung</i>	- 35 -
11.3.6	<i>Transformation von Bakterien</i>	- 36 -
11.3.6.1	<i>Transformation von chemokompetenten <i>E.coli</i> Stämmen</i>	- 36 -
11.3.6.2	<i>Transformation von elektrokompetenten <i>E.coli</i> Stämmen</i>	- 36 -

II.3.6.3	Transformation von <i>B.subtilis</i> Stämmen.....	- 37 -
II.3.6.4	Transformation von <i>C.glutamicum</i> Stämmen.....	- 38 -
II.3.6.5	Transformation von <i>S.carnosus</i> Protoplasten nach Götz und Schuhmacher	- 39 -
II.4	GENTECHNISCHE METHODEN.....	- 40 -
II.4.1	<i>Präparation von DNA.....</i>	<i>- 40 -</i>
II.4.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab.....	- 40 -
II.4.1.2	Plasmidisolierung im präparativen Maßstab (Midi- und Maxi-Präparation).....	- 41 -
II.4.1.3	Präparation chromosomaler DNA.....	- 41 -
II.4.2	<i>Aufreinigung von DNA</i>	<i>- 41 -</i>
II.4.3	<i>Phenol/Chloroform-Extraktion</i>	<i>- 41 -</i>
II.4.3.1	Entsalzung und Aufkonzentrierung von DNA-Lösungen durch Ethanolfällung ..	- 42 -
II.4.4	<i>Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen</i>	<i>- 42 -</i>
II.4.5	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	<i>- 42 -</i>
II.4.5.1	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	- 43 -
II.4.6	<i>Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase.....</i>	<i>- 43 -</i>
II.4.7	<i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	<i>- 43 -</i>
II.4.8	<i>Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....</i>	<i>- 43 -</i>
II.4.8.1	Durchführung der Kolonie-PCR.....	- 44 -
II.4.8.2	Durchführung der „Crossover-PCR“	- 44 -
II.4.8.3	Ortspezifische Mutagenese	- 45 -
II.4.8.4	Zufallsmutagenese durch epPCR	- 45 -
II.4.9	<i>DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode</i>	<i>- 46 -</i>
II.4.9.1	DNA-Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden (LI-COR-Apparatur)	- 46 -
II.4.9.2	DNA-Sequenzierung mit unmarkierten Oligonukleotiden (Kapillarsequenzier „3100-Avant“)	- 47 -
II.5	PLASMIDKONSTRUKTIONEN	- 48 -
II.5.1	<i>Konstruktion der Genfusion pproGTL und pproTSL.....</i>	<i>- 48 -</i>
II.5.2	<i>Konstruktion der Genfusion pGTL.....</i>	<i>- 48 -</i>
II.5.3	<i>Subklonierung der Lipase GTL mit ihrem authentischen Signalpeptid aGTL</i>	<i>- 50 -</i>
II.5.4	<i>Konstruktion der Genfusion TorA^{SP}GTL.....</i>	<i>- 50 -</i>
II.5.5	<i>Konstruktion der Genfusion TorA^{SP}TSL.....</i>	<i>- 50 -</i>
II.5.6	<i>Konstruktion der Genfusionen TorA^{SP}SHL, TorA^{SP}proSHL und TorA^{SP}Cut.....</i>	<i>- 51 -</i>
II.5.7	<i>Konstruktion der Plasmide pVW2-tatAC(C.g.), pVW2-tatABC(E.c.), pVW2-tatAC(E.c.), pVW2-tatC.....</i>	<i>- 51 -</i>
II.5.8	<i>Konstruktion der Plasmide pVW2-TorD und pVW2-TorDhis.....</i>	<i>- 52 -</i>
II.5.9	<i>Konstruktion der Plasmide pEK2-TorAGFP/TorDhis und pEK2-TorAGFP/TorDINV.....</i>	<i>- 52 -</i>
II.6	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	- 52 -
II.6.1	<i>Isolierung von Proteinen aus Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen</i>	<i>- 52 -</i>
II.6.1.1	Induktion der Genexpression.....	- 52 -
II.6.1.2	Herstellung von <i>E.coli</i> Gesamtzellextrakten	- 53 -
II.6.1.3	Herstellung von <i>B.subtilis</i> und <i>S.carnosus</i> Gesamtzellextrakten	- 53 -
II.6.1.4	Herstellung von Gesamtzellextrakten aus <i>C.glutamicum</i>	- 53 -
II.6.2	<i>Aufarbeitung von Kulturüberständen.....</i>	<i>- 54 -</i>
II.6.3	<i>Osmotischer Schock von E.coli Zellen</i>	<i>- 54 -</i>
II.6.4	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration.....</i>	<i>- 55 -</i>

II.6.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)	- 55 -
II.6.5.1	Coomassie-Färbung von Proteingelen	- 56 -
II.6.6	Immunologischer Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern (Western Blot)...	- 56 -
II.6.7	Herstellung polyklonaler Antikörper.....	- 57 -
II.6.8	Zymogramm-Techniken.....	- 58 -
II.6.8.1	Lipase-Aktivitätsfärbung mit α -Naphthylacetat	- 58 -
II.6.8.2	Lipase-Aktivitätsfärbung mit MUF-Palmitat	- 58 -
II.6.9	Photometrische Lipase-Aktivitätsbestimmung mit para-Nitrophenyl-Estern.....	- 58 -
II.6.10	Hochdurchsatz-Screening mit dem Tecan-Pipettierroboter.....	- 59 -
III.	ERGEBNISSE	- 61 -
III.1	ETABLIERUNG VON SEKRETIONSSYSTEMEN ZUR GEWINNUNG VON THERMOSTABILEN LIPASEN AUS	
	EXTREMOPHILEN BAKTERIEN	- 61 -
III.1.1	Etablierung der Sec-abhängigen Sekretion von thermostabilen Lipasen	- 63 -
III.1.1.1	Die Fusionslipase pproTSL ist instabil und wird sowohl intra- als auch extrazellulär stark proteolytisch abgebaut	- 64 -
III.1.1.2	Die Fusionslipase pproGTL wird zwar effizient sekretiert, ist aber kaum aktiv ..	- 68 -
III.1.2	Die Fusionslipase pGTL besitzt nur eine geringfügig erhöhte Aktivität in <i>S.carnosus</i> ..	- 69 -
III.1.3	Die Lipase aGTL wird zu einem signifikanten Anteil in den Kulturüberstand von <i>S.carnosus</i> sekretiert.....	- 70 -
III.1.4	Etablierung der TAT-abhängigen Sekretion der Modelllipase GTL in verschiedenen Wirtssystemen	- 72 -
III.1.4.1	In <i>S.carnosus</i> als Wirtssystem wird die thermostabile Lipase GTL Tat-abhängig sekretiert	- 74 -
III.1.4.2	In <i>B.subtilis</i> als Wirtssystem verursacht die Expression der thermostabilen Lipase TorA ^{SP} GTL eine Zelllyse.....	- 77 -
III.1.4.3	In <i>C.glutamicum</i> als Wirtssystem wird die Lipase TorA ^{SP} GTL Tat-abhängig sekretiert, jedoch akkumuliert ein signifikanter Anteil intrazellulär	- 79 -
III.1.4.4	Tat-abhängige Sekretion von TorA ^{SP} -Hybridvorläuferlipasen in <i>C.glutamicum</i> als Wirtssystem.....	- 81 -
III.2	OPTIMIERUNG DER SEKRETION REKOMBINANTER PROTEINE ÜBER DEN TAT-WEG IN GRAM-POSITIVEN	
	MIKROORGANISMEN	- 86 -
III.2.1	Strategie 1: Optimierung der Tat-abhängigen Sekretion durch eine verbesserte Anpassung eines Tat-abhängigen Signalpeptids an die Tat-Translokase von <i>C.glutamicum</i> ...	- 87 -
III.2.1.1	Auswahl und Anpassung eines geeigneten Modellenzym und Vektorsystems für das HTS-Verfahren.....	- 89 -
III.2.1.2	Entwicklung eines Hochdurchsatz-Screening-Verfahrens zur Identifizierung von TorA-Signalpeptid-Varianten mit einer veränderten Sekretion in <i>C.glutamicum</i> WT-Zellen	
III.2.1.2.1	Entwicklung eines Kultivierungs- und Induktionsverfahrens für das HTS-Screening	- 90 -
III.2.1.2.2	Bestimmung der systemimmanenten Messungengenauigkeit des HTS-Verfahrens	- 91 -
III.2.1.3	Zufallsmutagenese des TorA-Signalpeptids	- 92 -
III.2.1.3.1	Abschätzung einer Mindestbibliotheksgröße für das TorA-Signalpeptid.....	- 93 -
III.2.1.3.2	Aufbau und Weiterführung der TorA-Signalpeptidbibliothek.....	- 94 -

III.2.1.4	Beim Hochdurchsatz-Screening konnten keine <i>C.glutamicum</i> Zellen mit einer signifikant erhöhten Enzymaktivität im Kulturüberstand identifiziert werden	- 94 -
III.2.2	<i>Strategie 2: Coexpression heterologer und homologer Komponenten der Tat-Translokase</i>	
III.2.2.1	Zweivektorensystem zur Coexpression homologer und heterologer Tat-Translokasekomponenten.....	- 98 -
III.2.2.2	Coexpression heterologer Tat-Komponenten	- 99 -
III.2.2.2.1	Untersuchung der Komplementation der <i>C.glutamicum</i> Δ tatAC-Mutante durch <i>E.coli</i> Tat-Translokasekomponenten.....	- 99 -
III.2.2.2.2	Durch Expression von <i>E.coli</i> TatA und TatC Komponenten wird die Δ tatAC-Mutante nicht komplementiert	- 99 -
III.2.2.2.3	Durch Expression des <i>E.coli</i> TatABC-Systems wird die Δ tatAC-Mutante ebenfalls nicht komplementiert	- 99 -
III.2.2.2.4	Durch Coexpression von <i>E.coli</i> Tat-Komponenten im <i>C.glutamicum</i> WT wird die Translokation von TorA ^{SP} GFP blockiert.....	- 101 -
III.2.2.2.5	Wird das <i>E.coli</i> TatABC System vollständig im <i>C.glutamicum</i> WT exprimiert, tritt kein Exportblock auf	- 101 -
III.2.2.3	Coexpression homologer Tat-Komponenten.....	- 102 -
III.2.2.3.1	Durch Coexpression homologer Tat-Komponenten wird die Δ tatAC-Mutante komplementiert	- 102 -
III.2.2.4	Die Überexpression des <i>C.glutamicum</i> tatAC-Operons führt zu einer verbesserten Sekretion der Hybridlipase TorA ^{SP} GTLhis und TorA ^{SP} GFP	- 103 -
III.2.3	<i>Strategie 3: Ausnutzung des Tat-Proofreadings für eine verbesserte Sekretion rekombinanter Proteine durch Coexpression des Signalpeptid-spezifischen Chaperons TorD-</i>	105 -
III.2.4	Zweivektorensystem zur Coexpression des Chaperons TorD.....	- 105 -
III.2.5	Die Coexpression von TorD führt in <i>C.glutamicum</i> zu einem Exportblock des Hybridproteins TorA ^{SP} GFP.....	- 107 -
III.2.6	Die Coexpression von TorD verursacht nicht nur einen Exportblock von TorA ^{SP} GFP, sondern auch einen Exportblock weiterer TorA ^{SP} -Hybridproteine.....	- 108 -
III.3	UNTERSUCHUNG DES TORD-ABLÖSEPROZESSES ALS KRITISCHER SCHRITT WÄHREND DES TAT-PROOFREADINGS IN EINEM HETEROLOGEN MODELLSYSTEM	- 110 -
III.3.1	Modifikation des Zweivektorensystems zur Untersuchung des Ablöseprozesses von TorD während des Tat-Proofreadings im heterologen Umfeld von <i>C.glutamicum</i>	- 110 -
III.3.2	Validierung des modifizierten Zweivektorensystems zur Untersuchung des TorD-Ablöseprozesses im heterologen Modellsystem <i>C.glutamicum</i>	- 111 -
III.3.2.1	Die Coexpression von TorD verbessert die Translokation von TorA ^{SP} GFP ins Periplasma von <i>E.coli</i>	- 111 -
III.3.3	Untersuchung möglicher Faktoren, die bei dem Ablöseprozess des TorD Chaperons eine Rolle spielen können	- 113 -
III.3.3.1	Durch Coexpression von <i>C.glutamicum</i> TatA und TatC Komponenten kann die Blockade der Sekretion durch TorD in <i>C.glutamicum</i> nicht aufgehoben werden.....	- 113 -
III.3.3.2	Die Anwesenheit von TorD verhindert nicht die Sekretion von TorA ^{SP} GFP im <i>C.glutamicum</i> WT, wenn das <i>E.coli</i> tatABC Operon anwesend ist.....	- 114 -

IV. DISKUSSION	- 117 -
IV.1 ETABLIERUNG DER SEKRETORISCHEN GEWINNUNG VON THERMOSTABILEN LIPASEN IN GRAM-POSITIVEN BAKTERIEN	- 118 -
<i>IV.1.1 Das S.hyicus Propeptid als Sekretionscarrier für die Sec-abhängige Sekretion in S.carnosus</i>	<i>- 118 -</i>
IV.1.1.1 Sec-abhängigen Sekretion der Fusionslipase pproTSL.....	- 119 -
IV.1.1.2 Sec-abhängige Sekretion der Fusionslipase pproGTL	- 119 -
<i>IV.1.2 Sec-abhängige Sekretion der Lipase GTL mit dem S.hyicus Signalpeptid in S.carnosus (pGTL)</i>	<i>- 119 -</i>
<i>IV.1.3 Sec-abhängige Sekretion der Lipase GTL mit ihrem eigenen Signalpeptid in S.carnosus (aGTL)</i>	<i>- 120 -</i>
<i>IV.1.4 Auswahl eines Wirtssystems für die Tat-abhängige Sekretion der Lipase GTL</i>	<i>- 121 -</i>
IV.1.4.1 S.carnosus als Wirtssystem	- 121 -
IV.1.4.2 B.subtilis als Wirtssystem.....	- 122 -
IV.1.4.3 C.glutamicum als Wirtssystem.....	- 123 -
IV.2 STRATEGIEN FÜR DIE OPTIMIERUNG DER SEKRETION ÜBER DEN TAT-WEG IN GRAM-POSITIVEN BAKTERIEN...	
<i>IV.2.1 Strategie 1: Optimierung der Tat-abhängigen Sekretion durch gerichtete Evolution des E.coli TorA-Signalpeptids</i>	<i>- 128 -</i>
IV.2.1.1 Zufallsmutagenese und Hochdurchsatz-Screening zur Untersuchung von C.glutamicum Transformanten mit einer veränderten Enzymaktivität im Kulturüberstand	- 129 -
<i>IV.2.2 Strategie 2: Coexpression heterologer und homologer Komponenten der Tat-Translokase</i>	<i>- 130 -</i>
IV.2.2.1 Expression von E.coli Tat-Komponenten in der C.glutamicum ΔtatAC-Mutante und im C.glutamicum WT	- 130 -
IV.2.2.2 Coexpression homologer Tat-Komponenten im C.glutamicum WT	- 133 -
<i>IV.2.3 Strategie 3: Ausnutzung des Tat-Proofreadings für eine verbesserte Sekretion rekombinanter Proteine durch Coexpression des Signalpeptid-spezifischen Chaperons TorD-</i>	<i>- 134 -</i>
IV.2.3.1 In C.glutamicum ist die E.coli TorD Ablösung vom E.coli TorA-Signalpeptid blockiert	- 134 -
IV.3 DER TOR-D-ABLÖSEPROZESSES ALS KRITISCHER SCHRITT WÄHREND DES TAT-PROOFREADINGS IN EINEM HETEROLOGEN MODELLSYSTEM	- 136 -
<i>IV.3.1 Das E.coli TatABC-System ist an einer Ablösung von TorD beteiligt.....</i>	<i>- 138 -</i>
<i>IV.3.2 Weitere Strategien zur Verbesserung der Tat-abhängigen Sekretion in C.glutamicum – ein Ausblick</i>	<i>- 139 -</i>
V. ZUSAMMENFASSUNG.....	- 140 -
VI. SUMMARY	- 141 -
VII. LITERATUR	- 142 -
DANKSAGUNG.....	- 155 -

Abkürzungen

amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfa
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	Bromochloro-indolyl-phosphat
BHIS	“Brain-Heart-Infusion-Medium” mit Sorbitol
BSA	Rinderserumalbumin
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen
cm	Chloramphenicol
C-terminal	carboxyterminal
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat (N steht für eines der Nukleoside A: Adenosin, C: Cytidin, G: Guanosin, T: Thymidin)
DTT	1, 4-Dithiothreitol
E.C.	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)- Tetraacetat
ery	Erythromycin
EtOH	Ethanol
GFOR	Glucose-Fructose-Oxidoreduktase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GRAS	Generally recognized as safe
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
kan	Kanamycin
K _D	Dissoziationskonstante
LB	Luria Bertani
NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid
N-terminal	aminoterminal
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	offener Leserahmen: Open reading frame
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
T	Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
tet	Tetracyclin
TorA	Trimethylamin-N-Oxid-(TMAO)-Reduktase

TorA ^{SP}	Signalpeptid der TMAO-Reduktase bzw. Fusion eines Proteins mit diesem Signalpeptid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
v/w	Volumen pro Gewicht
vgl.	vergleiche mit
WT	Wildtyp
λ	Wellenlänge

Symbole für organische Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
N	nicht definierte Base
R	Purin (Adenin oder Guanin)
T	Thymin
Y	Pyrimidin (Cytosin oder Thymin)

Präfixe für Einheiten

k	Kilo (10^3 -fach)
m	Milli (10^{-3} -fach)
μ	Mikro (10^{-6} -fach)
n	Nano (10^{-9} -fach)

Einheiten

Ω	Ohm; abgeleitete physikalische Einheit des elektrischen Widerstandes, $1\Omega = 1V \cdot A^{-1}$
$^{\circ}C$	Grad; Celsius physikalische Basiseinheit der Temperatur
A	Ampere; physikalische Basiseinheit der Stromstärke
Å	Angström; abgeleitete physikalische Einheit der Länge (10^{-10} m)
bp	Basenpaar(e)
Da	Dalton; Molekulargewicht
F	Fahrad; abgeleitete physikalische Einheit der Kapazität, $1F = 1C \cdot V^{-1}$
g	Gramm; abgeleitete physikalische Einheit der Masse, $1g = 10^{-3} kg$
h	Stunde; abgeleitete Einheit der Zeit, $1h = 3600 s$
kb	Kilobasen
L oder l	Liter abgeleitete physikalische Einheit des Volumens, $1l = 10^{-3} m^3$
m	Meter; physikalische Basiseinheit der Länge
M	molar; abgeleitete physikalische Einheit der Konzentration, $1M = 1 mol \cdot l^{-1}$
min	Minuten abgeleitete Einheit der Zeit, $1min = 60 s$
mol	Mol; physikalische Basiseinheit der Stoffmenge (Teilchenanzahl $N_A = 6.0221 \cdot 10^{23} mol^{-1}$, AVOGADRO-Konstante)

rpm	<i>rotations per minute</i> Angabe der Umdrehungsgeschwindigkeit, 1 rpm = 1 Umdrehung · min ⁻¹
s	Sekunde, physikalische Basiseinheit der Zeit
U	Unit; Polymerase- Aktivität. 1U katalysiert den Umbau von 10 nM dNTPs bei 74°C innerhalb von 30 min in ein säureunlösliches Produkt.
V	Volt; abgeleitete physikalische Einheit der elektrischen Spannung, 1 V = 1 W · A ⁻¹
W	Watt; abgeleitete physikalische Einheit der Leistung, 1 W = 1 kg · m ² · s ⁻³

Drei- und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

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

I. EINLEITUNG

I.1 MAßGESCHNEIDERTE BIOKATALYSATOREN UND PRODUKTIONSSYSTEME FÜR DIE WEIßE BIOTECHNOLOGIE

Mit dem Schlagwort „Weiße Biotechnologie“, das Anfang dieses Jahrhunderts durch eine Initiative von europäischen Biotechnologiefirmen geprägt wurde (EuropaBio, 2003), ist der Einsatz von biotechnologischen Verfahren gemeint, die einer nachhaltigen und umweltverträglichen industriellen Wertschöpfung dienen. Im Mittelpunkt dieses Wertschöpfungsprozesses stehen Proteine (bzw. ihre spezifischen Eigenschaften), denn durch Proteine, genauer genommen Enzyme als Biokatalysatoren, werden die eigentlichen, wertschöpfenden, chemischen Reaktionen vorgenommen (Hollmann *et al.* 2006). Enzyme können dabei zur Produktion von Ausgangsstoffen dienen, Bestandteil eines Produktionsprozesses sein oder können selbst bereits die Produkte darstellen wie in Reinigungsmitteln oder in pharmazeutischen Produkten. In der industriellen Produktion werden Biokatalysatoren entweder zur Stoffumwandlung in intakten Zellen (Ganzell-Biotransformationen oder Zellsystemen) genutzt oder als isolierte Enzyme durch Beigabe zu einem Reaktionsgemisch eingesetzt (Braun *et al.*, 2006). Im letzteren Fall handelt es sich um die sogenannten industriellen bzw. technischen Enzyme.

Der Weltmarktumsatz dieser Enzyme liegt bei ca. 1,8 Mrd. Euro mit einer jährlichen Steigerungsrate von 10% (Dechema_e._V., 2004). Das Potenzial dieser Proteine liegt in ihrer Vielfältigkeit. Von den schätzungsweise über 10000 verschiedenen Enzymen, die in der Natur vorkommen, sind aktuell ca. 4000 bekannt (Buthe, 2006). Etwa 120 davon werden industriell genutzt (Braun *et al.*, 2006). Zu der wichtigsten Enzymgruppe zählen dabei die Hydrolasen, zu denen auch die Lipasen gehören (Straathof *et al.*, 2002). Besonders interessant für den industriellen Einsatz sind Enzyme aus extremophilen Mikroorganismen, die gegebenenfalls „rauen“ technischen Produktionsbedingungen standhalten können, wie besonders hohen Temperaturen oder Drücken (siehe Kapitel I.1.1).

Durchgesetzt zur Produktion industrieller Enzyme hat sich nur eine kleine Anzahl von gut charakterisierten Wirtssystemen wie z.B. *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis* oder *Saccharomyces cerevisiae*. Um konkurrenzfähig zu sein, müssen diese Produktionssysteme verschiedenen, kommerziellen Kriterien genügen. Wichtige Anforderungen an bakterielle Produktionssysteme sind z.B.: eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute des Zielproteins, eine geringe Proteaseaktivität, damit der Ertrag des gewünschten Proteins nicht beeinträchtigt wird, ein geringer Hintergrund von unerwünschten Proteinen, eine einfache genetische Handhabung, Wachstum auf billigen Nährmedien, Anerkennung als GRAS-Organismus („generally recognized as safe“) und Patentfreiheit (Widner, 2006) (siehe Kapitel I. 1.2).

Im Spannungsfeld zu diesen kommerziellen Anforderungen stehen die biologischen Eigenschaften des Zielproteins und seines Produktionssystems. Denn diese sind evolutionär an ihre biologische Aufgabe angepasst, nicht jedoch auf die spezifischen Erfordernisse eines industriellen Prozesses.

Daher werden zurzeit zwei unterschiedliche Strategien verfolgt, um Proteine als Biokatalysatoren zu nutzen oder ihre biologischen Produktionssysteme an industrielle Prozesse anzupassen: zum einen

„rationales Design“, um gezielt Veränderungen vorzunehmen und zum anderen die „gerichtete Evolution“, bei der das Prinzip von Zufall und Selektion ausgenutzt wird, um eine verbesserte Anpassung an den industriellen Prozess zu erlangen. Grundlage dieser Strategien sind zum einen moderne, biotechnologische Verfahren wie z.B. das Hochdurchsatz-Screening, gezieltes Proteindesign, oder das „Metabolic-Engineering“ und zum anderen umfassende Datenbanken wie Genom-, Proteom- und Metabolom-Banken. Ziel dieser Entwicklungen ist die Schaffung von unterschiedlichen Toolbox-Systemen, mit denen sich leicht Enzyme und deren Produktionssysteme nach Maß generieren lassen (Braun *et al.*, 2006).

I.1.1 Fallbeispiel: Lipasen aus extremophilen Mikroorganismen

Eine wichtige Gruppe biotechnologisch relevanter Enzyme stellen Lipasen (EC 3.1.1.3) dar. Diese äußerst vielseitigen Enzyme gehören zu den grenzflächenaktiven Serinesterasen, die in einer Gleichgewichtsreaktion die Carboxylesterbindung in langkettigen Triacylglyceriden (TAGs) spalten. Strukturelles Merkmal dieser Enzymgruppe ist neben dem Serin im aktiven Zentrum die α/β -Hydrolase Faltung (α/β hydrolase fold), die sie als Hydrolasen identifiziert. Typisch für viele Lipasen ist, dass sie eine offene und eine geschlossene Konformation einnehmen können. Im geschlossenen Zustand ist der Zugang zum aktiven Zentrum durch eine mobile Lidstruktur (Deckel) versperrt. Ausgelöst durch die Bindung an hydrophobe Grenzflächen und Überschreitung einer kritischen Micellenkonzentration (cmc) kommt es zu einer Konformationsänderung, so dass im offenen Zustand der Zugang zum aktiven Zentrum freigegeben wird. Dies äußert sich in einem sprunghaften Ansteigen der Enzymaktivität (Grenzflächenaktivierung). Im Unterschied zu Carboxyesterasen (EC 3.1.1.1), die keine Grenzflächenaktivierung aufweisen, bevorzugen Lipasen langkettige Triacylglyceride als Substrate ($C \geq 12$). Allerdings sind die Übergänge zwischen diesen beiden Enzymgruppen fließend, so dass sich viele Enzyme einer eindeutigen Einordnung entziehen.

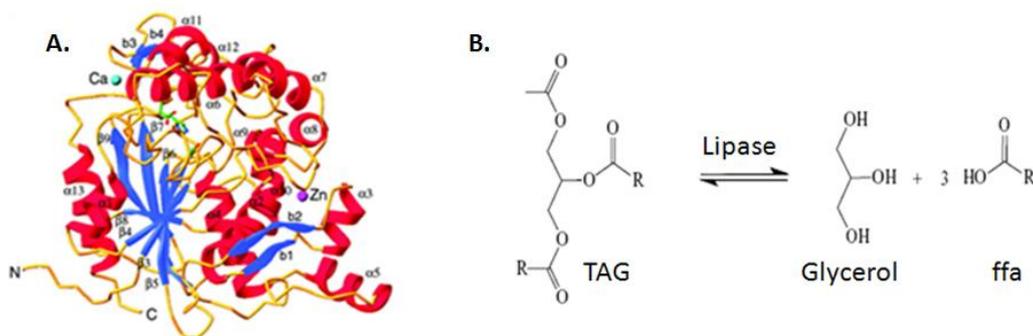


Abbildung 1-01 A. und B.: Proteinstruktur der thermostabilen Lipase aus *Geobacillus stearothermophilus* sowie Darstellung einer typischen Lipase katalysierten Reaktion

A.: Die Struktur zeigt den geschlossenen Zustand der Lipase. Im Vergleich zu mesophilen Lipasen weist diese Struktur drei Besonderheiten auf: 1. Durch Bindung eines Zinkatoms wird die Struktur der Lipase stabilisiert. 2. Die „ α/β hydrolase fold“ Struktur weist zusätzliche Insertionen auf, so dass die Lipase größer ist als viele mesophile Lipasen. 3. Eine vergrößerte Lid-Struktur verschließt das aktive Zentrum und gibt wahrscheinlich erst durch Thermoaktivierung das aktive Zentrum frei (abgeändert nach (Jeong *et al.*, 2002)).
B.: *In vivo* katalysieren Lipasen in einer Gleichgewichtsreaktion die Spaltung von Triacylglycerolen (TAGs) in Glycerol und freie Fettsäuren (ffa).

Lipasen besitzen zahlreiche Eigenschaften, die sie besonders attraktiv für die Anwendung in biotechnologischen Prozessen machen. Denn Lipasen akzeptieren nicht nur ein breites Spektrum an künstlichen und natürlich vorkommenden Estersubstraten, sondern üben zudem eine hohe Stereo- und Regioselektivität aus. Dies macht sie zu hochwertigen Biokatalysatoren in der Feinchemie und in der Pharmazie. Lipase katalysierte Reaktionen finden so z.B. Verwendung bei der Produktion von pharmakologischen Wirkstoffen wie dem Kalziumantagonisten Diltiazem® oder den Antitumorwirkstoffen Epothilon A und B. Weitere Anwendungsfelder finden sich in der Waschmittel-, Kosmetik-, Leder-, Papier- und Nahrungsmittelindustrie (Gupta *et al.*, 2004; Jaeger und Reetz, 1998; Jaeger und Eggert, 2002). Zudem wird gegenwärtig daran gearbeitet, Biodiesel, bei dem es sich um langkettige Fettsäuremethylester oder -ethylester handelt, aus Pflanzenölen durch Transesterifikation mittels Lipasen herzustellen (Chen *et al.*, 2006; Hernandez-Martin und Otero, 2007; Sanchez und Vasudevan, 2006). Gegenwärtig ist allerdings der Einsatz von Lipasen zur Biodieselproduktion für eine kommerzielle Anwendung noch zu teuer (Fukuda *et al.*, 2001). Ein neues, wichtiges Anwendungsfeld ist der Einsatz von enzymkatalysierten Reaktionen zur Modifikation bzw. Synthese von hochviskosen Fettsäureestern (De Greyt, 2004; Veit, 2005). Mit zunehmender Kettenlänge oder Zunahme des Sättigungsgrades eines Fettsäureesters nimmt seine Bioverfügbarkeit ab und seine Viskosität zu, so dass Wärme- und Stofftransporteigenschaften schlechter werden und der Schmelzpunkt ansteigt. Daher erfordern viele industrielle Prozesse, bei denen stark- bis hochviskose Fettsäureester synthetisiert bzw. modifiziert werden, Temperaturen, die weit über 40°C liegen. Beispiele für solche Reaktionen sind die enzymkatalysierte Synthese von bestimmten langkettigen Fettsäureestern (Emollient-Ester), die als Vorprodukte in Kosmetika Verwendung finden [Degussa, (Veit, 2005)], oder die enzymatische Interesterifikation von Hartfetten, durch die ihr Schmelzverhalten modifiziert und der Anteil von Transfettsäuren reduziert werden kann (De Greyt, 2004; Veit, 2005). Viele kosmetische Rohstoffe wie Stearinsäuren (C:18) oder langkettige Fette in Ölsamen schmelzen erst in einem Temperaturbereich von 70°C bis 90°C. Viele mesophile Enzyme (Royter 2006), inklusive den immobilisierten, eukaryontischen Lipasen aus *Thermomyces lanuginosa* (TLL) oder *Candida antarctica* (CALB), die kommerziell für diese Reaktionen eingesetzt werden (Novozyme), stoßen bei diesen hohen Prozesstemperaturen an ihre Grenzen, so dass es zu starken Aktivitätsverlusten und einer verminderten Lebensdauer dieser Enzyme kommt.

Daher sucht man gegenwärtig in der Industrie über Hochdurchsatzverfahren nach neuartigen Lipasen, die für dieses Einsatzgebiet geeignet sind (siehe Degussa, Veit 2005 und Proteus, <http://www.proteus.fr>).

Vor allem Lipasen aus extremophilen Mikroorganismen, die aufgrund ihrer Herkunft an raue Umweltbedingungen angepasst sind, sind bei diesem Enzymscreening von Interesse. In der wissenschaftlichen Literatur ist bereits die Isolierung, Aufreinigung und Charakterisierung einiger thermoaktiver Lipasen aus Extremophilen dokumentiert, die ein Aktivitätsoptimum $\geq 60^\circ\text{C}$ besitzen (siehe Tabelle 1-01).

Tabelle 1-01: Thermostabile Lipasen mit einem Aktivitätsoptimum $\geq 60^\circ\text{C}$

Organismus/ Lipase	T _{opt} [°C]	Halbwertszeit [t _{1/2}]	MG [kDa]	pH _{opt}	Referenz
<i>Bacillus</i> sp. Strain 398	68	30 min bei 55°C	50 _{app.}	8	(Kim <i>et al.</i> , 1994)
<i>Bacillus</i> sp. THL 027	70	k.A.	69 _{app.}	9,5	(Dharmstithi und Luchai, 1999)
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> ID-1	75	1h bei 60°C	43	k.A.	(Cho <i>et al.</i> , 2000)
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> IHI-91	60	20 min bei 60°C	43	8,5	(Markossian <i>et al.</i> , 2000)
<i>Geobacillus thermocantenuulatus</i> BTL-2	65	30 min bei 65°C	43	8,5	(Schmidt-Dannert <i>et al.</i> , 1996)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	68	30 min bei 55°C	43	9,5	(Kim <i>et al.</i> , 2002; Kim <i>et al.</i> , 2000)
<i>Pseudomonas cepacia</i> (neu: <i>Burkholderia cepacia</i>)	60	100% 30 min bei 75	32	6,5	(Sugihara <i>et al.</i> , 1992)
<i>Burkholderia cepacia</i>	90	16 h bei 90°C	k.A.	11	(Gupta <i>et al.</i> , 2004)
<i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i>	75	48 h bei 75°C	29	7-8	(Royter, 2006)
<i>Pyrococcus furiosus</i> [Esterase/Archaea]*)	100	50 min bei 126°C	k.A.	k.A.	(Ikeda und Clark, 1998)

*) Bei diesem Enzym aus dem Archaeon *Pyrococcus furiosus* handelt es sich um das lipolytische Enzym mit der größten Thermostabilität und -aktivität. Jedoch zählt dieses Enzym zu den Carboxyesterasen, die kurzkettige Fettsäuren bevorzugen. Es ist daher nicht für die Veresterung langkettiger Fettsäuren geeignet (Veit, 2005).

Unter diesen gehören die thermostabilen Lipasen aus der Gattung *Geobacillus* zu den am besten charakterisierten Enzymen. Ihr natürliches Habitat besitzen Geobacillen in heißen Ölbohrlöchern und heißen Quellen. Thermostabile *Geobacillus* Lipasen besitzen Temperaturoptima in einem Bereich von 60°C bis 75°C und sind alkaliphil (Cho *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2000).

Zu ihren bevorzugten Substraten gehören langkettige Fettsäuren wie Tristearin (C:18). Häufig weisen die *Geobacillus* Lipasen große Sequenzhomologien zueinander auf (d.h. mehr als 90% Homologie auf Ebene der Aminosäuresequenz). Auch bei der ersten aufgeklärten Struktur einer thermostabilen Lipase handelte es sich um eine Lipase aus der Gattung *Geobacillus* (siehe Abbildung 1-01) (Jeong *et al.*, 2002; Tyndall *et al.*, 2002). Neben den thermoaktiven Lipasen aus dieser Gattung wurden auch einige thermoaktive Lipasen in Bacillen, Pseudomonaden (bzw. *Burkholderia*) und in fakultativ anaeroben Mikroorganismen wie *Thermoanaerobacter* (Royter, 2006) identifiziert und charakterisiert.

Ist durch ein Hochdurchsatzscreening oder ein ähnliches Verfahren ein Enzym mit der passenden Kombination von Eigenschaften für die Veresterung bzw. Umesterung hochviskoser Fettsäuren identifiziert worden, muss als Nächstes geklärt werden, wie das gewünschte Protein in ausreichender Menge und Qualität produziert werden kann. Eine homologe Produktion des Zielproteins im betreffenden extremophilen Ursprungsorganismus kommt in den allermeisten Fällen aus praktischen und wirtschaftlichen Gründen sowie rechtlichen Aspekten nicht in Frage. Nicht optimierte, aufwendige Kultivierungsbedingungen, eine schwere genetische Manipulierbarkeit des extremophilen Mikroorganismus, eine zu geringe Produktivität des Enzyms im Ursprungsorganismus oder der Einsatz

von teurem Spezialequipment sowie fehlende rechtliche Zulassungen sprechen häufig gegen den Einsatz des extremophilen Mikroorganismus in biotechnologischen Produktionsverfahren. Daher folgt, dass diese Proteine rekombinant bzw. heterolog in mesophilen Wirtsorganismen produziert werden müssen. Da sie evolutionär jedoch nicht an diese Wirtssysteme angepasst sind, müssen Strategien als Teil einer Toolbox entwickelt werden, mit denen diese wirtschaftlich interessanten Enzyme in relevanten Mengen und ausreichender Qualität produziert werden können.

I.1.2 Sekretorische Proteingewinnung in Gram-positiven Mikroorganismen

Ein wichtiger Bestandteil dieser Toolbox zur effizienteren Gewinnung von industriellen Enzymen ist die Auswahl des richtigen Wirtssystems. Denn erst die richtige Wahl des Wirtssystems bestimmt, ob ein Protein in ausreichender Menge und Qualität gewonnen werden kann, und ist zudem maßgebend für die Art des „Downstream processing“, das einen erheblichen Kostenfaktor (bis zu 90% der Herstellungskosten) darstellen kann (Blanch und Clark, 1997).

Aufgrund ihrer einfachen und billigen Kultivierungsbedingungen, relativ hohen Raum-Zeit-Ausbeuten und der einfachen genetischen Manipulierbarkeit haben sich die beiden prokaryotischen Wirtssysteme *E.coli* und *B.subtilis* als Standard durchgesetzt. Wird für die intrazelluläre Proteingewinnung rekombinanter Proteine vornehmlich *E.coli* eingesetzt, dient *B.subtilis* als Standardsystem für die extrazelluläre bzw. sekretorische Proteingewinnung homologer Bulkenzyme wie Proteasen, Amylasen oder Lipasen. Gegenwärtig werden 50%-60% aller industriellen Enzyme in *B.subtilis* und nahe verwandten Arten mit teilweise sehr hohen Produktausbeuten von bis zu 25g/l sekretorisch gewonnen (Ferrari *et al.*, 1993; Quax, 2006; Schallmeyer *et al.*, 2004). Kommt es auf eine kostengünstige Proteinaufarbeitung an, ist eine sekretorische Proteingewinnung häufig wirtschaftlicher als eine intrazelluläre Herstellung. In Gram-positiven Wirtssystemen können Zielproteine direkt in das Kulturmedium abgeben werden, kostenintensive Produktaufarbeitungs- und Aufreinigungsschritte entfallen hierdurch. Anders als Gram-negative besitzen Gram-positive Bakterien keine äußere Membran als zusätzliche Barriere, sondern nur eine Cytoplasmamembran mit einer stark ausgebildeten Peptidoglykanzellwand. Ebenso fehlen Lipopolysaccharide, die in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien enthalten sind und die als Endotoxine pyrogen wirken können. Häufig kommt es in heterologen Wirtssystemen bei der Expression von rekombinanten Proteinen zur Bildung von unlöslichen, falsch gefalteten Proteinaggregaten, den sogenannten „Inclusion bodies“ (Einschlußkörpern). Müssen die rekombinanten Zielproteine intrazellulär aus Einschlußkörpern gewonnen werden, werden häufig zusätzliche Produktaktivierungs- und Aufarbeitungsschritte erforderlich, die bei einer sekretorischen Gewinnung der Zielproteine entfallen (Gurkan und Ellar, 2005; Mergulhao *et al.*, 2005; Singh und Panda, 2005; Ventura und Villaverde, 2006). Diese Merkmale prädestinieren Gram-positive Mikroorganismen für die sekretorische Gewinnung von industriellen Enzymen.

Beim Einsatz von *B.subtilis* als Produktionssystem für rekombinante Proteine existieren allerdings auch Nachteile. Weist *B.subtilis* bei der Produktion von homologen Proteinen hohe Sekretionsleistungen im g/l-Maßstab auf, werden heterologe Proteine meist in weitaus geringeren Mengen sekretiert. Eine

Hauptursache hierfür ist in *B.subtilis* das Vorhandensein zahlreicher intra- und extrazellulärer Proteasen. Durch die Entwicklung von Multideletionsstämmen, bei denen mehrere intrazelluläre und extrazelluläre Proteasen ausgeschaltet worden sind, hat man versucht dieses Problem zu beheben. Jedoch weisen viele dieser Multideletionsstämmen eine erhöhte Zellyse auf, die wiederum zu einer verringerten Produktausbeute führen kann (Westers *et al.*, 2004). Zudem besitzen Produktionsstämme wie *B.subtilis* oder *B.licheniformis* als „gute Sekretierer“ (Widner, 2006) einen hohen Hintergrund an unerwünschten, extrazellulären Proteinen. Daher besteht ein Bedarf an alternativen, Gram-positiven Produktionssystemen, die diese Nachteile nicht besitzen. Als Alternativen zu *B.subtilis* eignen sich neben weiteren Bacillusarten wie *B.megaterium*, *B.brevis* auch andere Gram-positive Mikroorganismen wie *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus carnosus* oder die GC-reichen Actinomyceten *Streptomyces lividans* und *Corynebacterium glutamicum*. Diese sekretorischen Produktionssysteme erfüllen verschiedene Kriterien für heterologe Wirtssysteme: Sie sind arm an extrazellulären Proteasen und besitzen GRAS-Status. In all diesen Systemen konnten heterologe Proteine stabil exprimiert und sekretorisch gewonnen werden. So konnte in *S.carnosus* das Peptidhormon Calcitonin im 2,0 g/l-Maßstab hergestellt werden (Dilsen *et al.*, 2000), in *S. lividans* wurde eine Xyloglucanase im 100-150 mg/l-Maßstab gewonnen (Sianidis *et al.*, 2006) und in *C.glutamicum* konnte der humane, epidermale Wachstumsfaktor im 160 mg/l-Maßstab produziert werden (Date *et al.*, 2006). Obwohl diese Beispiele belegen, dass diese alternativen Wirtssysteme prinzipiell für die sekretorische Proteingewinnung von heterologen Proteinen geeignet sind, lässt sich nur empirisch feststellen, welches Wirtssystem am besten für die sekretorische Gewinnung eines ganz bestimmten Proteins geeignet ist. Denn speziesspezifische Eigenheiten (wie die Ausstattung mit Chaperonen oder die Zellwandzusammensetzung) der Gram-positiven Wirtssysteme führen dazu, dass heterologe Proteine von Wirtssystem zu Wirtssystem in unterschiedlicher Menge und Qualität ins Kulturmedium abgegeben werden (Meissner *et al.*, 2007). Allerdings führt selbst der Vergleich verschiedener alternativ ausgewählter Wirtssysteme für die sekretorische Gewinnung von heterologen Proteinen häufig nicht zu den gewünschten hohen Produktausbeuten. Dies kann zu einem daran liegen, dass den heterologen Zielproteinen eine evolutionäre Anpassung an das Wirtssystem fehlt und zum anderen die Wirtssysteme darauf ausgelegt sind, Proteine in physiologisch relevanten Mengen zu sekretieren, nicht aber in wirtschaftlich relevanten. Dies hat zur Folge, dass es bei der heterologen Proteingewinnung auf den verschiedensten Ebenen zu Engpässen, sogenannten „Bottlenecks“, kommen kann. Daher wird im Folgenden auf die grundsätzlichen Mechanismen des bakteriellen Proteintransportes näher eingegangen und auf mögliche Probleme beim Proteintransport heterologer Proteine hingewiesen (siehe Kapitel I.3.6). Der Schwerpunkt liegt dabei auf dem Proteintransport in Gram-positiven Bakterien.

I.2 ALLGEMEINES ZUM PROTEINTRANSPORT IN GRAM-POSITIVEN BAKTERIEN

In Bakterien übernehmen extrazelluläre Proteine wichtige Aufgaben wie den Schutz vor Feinden, den Zugang zu Nährstoffressourcen oder die Zell-zu-Zellkommunikation. Zudem können sekretorische Proteine in pathogenen Bakterien maßgebend für die Virulenz sein (Tjalsma *et al.*, 2000; Tjalsma *et al.*, 2004). Um diese Aufgaben im Umfeld der Zelle erfüllen zu können, müssen sekretorische Proteine eine

Barriere, die Cytoplasmamembran, durchqueren, mit der sich die Zelle von der Umwelt abgrenzt. Diese semipermeable Membran besteht aus einer hydrophoben Phospholipid-Doppelschicht, die zwar für kleine, hydrophobe Substanzen sowie Wassermoleküle und Gase durchlässig ist, aber für Proteine und wasserlösliche Substanzen aufgrund ihrer Ladung und Größe eine Barriere darstellt. Eingebettet in diese Membran sind wie in einem komplexen Mosaik verschiedenste integrale und periphere Membranproteine, die diverse Aufgaben in der Membran übernehmen wie z.B., Elektronentransportkomplexe, Solut-Transporter oder Aquaporine [vgl. Fluid-Mosaik-Modell der Zellmembran (Singer und Nicolson, 1972)]. Diese Proteine ergeben zusammen mit den Zellwandproteinen und den ins Medium abgegebenen Proteinen das Sekretom Gram-positiver Zellen. Gemeinsam ist diesen Proteinen, dass sie über den Vorgang der Proteintranslokation in die Membran integriert bzw. durch diese hindurch transportiert werden. Obwohl Gram-positive Bakterien eine recht einfache Zellstruktur aufweisen, können mindestens vier subzelluläre Räume ausgemacht werden, die Zielorte sekretorischer Proteine darstellen: 1. die Membran, 2. die Grenzschicht zwischen Membran und Zellwand, 3. die Zellwand und 4. das Kulturmedium.

Um zu diesen Zielorten zu gelangen, schlagen sekretorische Proteine, nachdem sie an den Ribosomen synthetisiert worden sind, verschiedenste Routen, sogenannte „Pathways“, in der Zelle ein (Abbildung 1-02). Unter diesen lassen sich zwei Hauptwege unterscheiden, die für Gram-positive Mikroorganismen und die heterologe Proteingewinnung relevant sind. Dies ist zum einen der gut erforschte generelle Sekretionsweg (Sec-Weg: secretion), bei dem Proteine in einem weitestgehend ungefalteten Zustand über die Membran transloziert werden, und zum anderen der Tat-Weg (Tat: „Twin-Arginine-Translocation“), bei dem Proteine in vollständig gefalteter Form über die Membran exportiert werden (siehe Abbildung 1-02). Der Großteil aller sekretorischen Proteine gelangt über den essentiellen Sec-Weg durch die Membran oder wird über diesen Weg in die Membran inseriert. Im Gegensatz dazu ist der Tat-Weg, der weder ubiquitär verbreitet noch essentiell ist (mit Ausnahme eines halophilen Archaeons), zumeist für den Export eines Subsets von sekretorischen Proteinen zuständig.

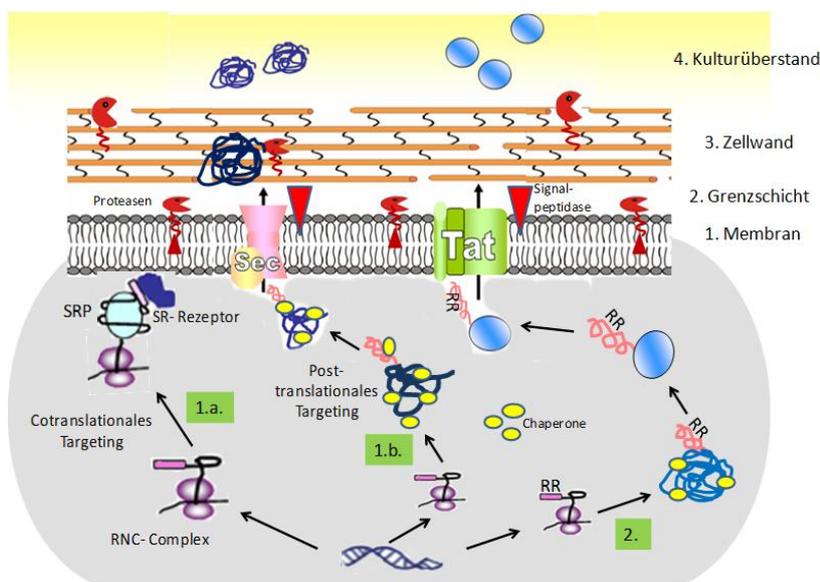


Abbildung 1-02:
Proteintranslokation über den Sec-Weg und den Tat-Weg in Gram-positiven Bakterien

1.a) Cotranslationales Targeting über den Sec-Weg,
 1.b.) Posttranslationales Targeting über den SRP-Weg,
 2.) Posttranslationales Targeting über den Tat-Weg

Daneben existieren noch Sonderwege in Gram-positiven Bakterien, mit denen kleine Proteine bzw. Peptide sekretiert werden können. In *B.subtilis* kann z.B. über ein ABC-Transportersystem das antibakterielle Peptid Sublancin 168 transloziert werden (Paik *et al.*, 1998) und in *Mycobacterien* werden durch das kürzlich identifizierte ESX-1/Snm-System (ESAT-6/Secretion in Mycobacteria) die beiden Virulenzfaktoren ESAT-6 und CFP-10 transloziert (Champion *et al.*, 2006).

I.3 DER GENERELLE SEKRETIONSWEG

Der Proteinexport eines sekretorischen Proteins über den Sec-Weg ist ein mehrstufiger Prozess. Um an einen Zielort wie z.B. das Kulturmedium zu gelangen, durchläuft ein sekretorisches Protein von der Synthese an den Ribosomen bis zur vollständigen Faltung und Ankunft im Kulturmedium mehrere Wegabschnitte: 1.) Zunächst werden die sekretorischen Proteine als Vorläuferproteine (Preproteine) an den Ribosomen synthetisiert, d.h. ihre Primärstruktur ist mit einem N-terminalen Signalpeptid ausgestattet, das bestimmend für den weiteren Verlauf des Translokationsweges wird (siehe Kapitel I.3.1). 2.) Als Nächstes interagieren Chaperone und Targetingfaktoren co- oder posttranslational mit dem Vorläuferprotein und übernehmen im Verlauf des sogenannten Translokase-Targetings den Schutz des Preproteins vor einem proteolytischen Abbau, halten dieses in einer translokationskompetenten, ungefalteten Konformation und führen es an die Sec-Translokase heran (siehe Kapitel I.3.2). 3.) Dann wird im zentralen Schritt der Proteintranslokation das Preprotein mit Hilfe der Sec-Translokase über einen ATP-abhängigen Mechanismus durch die Cytoplasmamembran geschleust (siehe Kapitel I.3.3). 4.) Schließlich wird das Preprotein von spezifischen Signalpeptidasen prozessiert, d.h. das Signalpeptid wird entfernt, und das Protein faltet sich in seine reife Form. Dies geschieht häufig in Anwesenheit von Faltungskatalysatoren (siehe Kapitel I.3.4). 5.) Als letztes Hindernis muss die Peptidoglykanzellwand vom reifen Protein überwunden werden, bevor es in das Kulturmedium gelangt (siehe Kapitel I.3.5).

I.3.1 Das Signalpeptid des Sec-Weges

Maßgebend dafür, dass ein neu synthetisiertes Vorläuferprotein über den Sec-Weg transloziert wird, ist das N-terminal lokalisierte Signalpeptid. Dieses ist in der Regel 20-30 Aminosäuren lang und besitzt eine dreigliedrige Grundstruktur (N-, H-, C-Regionen). Die N-Region (1-5 Aminosäuren) am N-Terminus des Signalpeptids enthält unter neutralen pH-Bedingungen positiv geladene Aminosäuren. Ihr folgt die zentrale, hydrophobe H-Region (7-15 Aminosäuren). In einer nicht-polaren Umgebung nimmt diese Region eine α -helikale Struktur ein. Die polare C-Region (3-7 Aminosäuren) am Carboxyterminus enthält ein Erkennungsmotiv (Ala-X-Ala) zwischen den Positionen -1 und -3 für die Signalpeptidase [-1,-3-Regel, (von Heijne, 1985)]. Befinden sich an den Positionen -1 und -3 im Signalpeptid kleine, nicht geladene Aminosäuren, so schneidet die Signalpeptidase das Signalpeptid hinter der -1-Schnittstelle ab. Liegt keine Schnittstelle im Signalpeptid vor, fungieren die Signalpeptide als Membrananker wie bei den integralen Membranproteinen (Facey und Kuhn, 2004). In Sec-abhängigen Substraten übernimmt das Signalpeptid wichtige Funktionen: Es verlangsamt die Faltung des Preproteins in eine translokationsinkompetente Konformation (Anti-Folding-Eigenschaft) und dient als erste Bindungsstelle für Chaperone und

Targetingfaktoren, die das Preprotein vor proteolytischem Abbau schützen und es zur Translokase dirigieren. Obwohl allgemein gilt, dass Sec-abhängige Signalpeptide gegenseitig austauschbar sind, sind sie nicht gleichwertig (Hegde und Bernstein, 2006). Denn bereits kleine Unterschiede in der Signalsequenz können Auswirkung auf das Targeting, die Translokation oder die Abspaltung der Signalsequenz haben. So können z.B. Unterschiede in der Ladung der N-Region des Signalpeptids die Sekretionsmenge eines Proteins stark beeinflussen (Chen und Nagarajan, 1994; Lammertyn und Anne, 1998). Auch die Länge und Gesamthydrophobizität des Signalpeptids spielen eine Rolle für die Sekretionseffizienz (Lammertyn *et al.*, 1998; Van Mellart *et al.*, 1999).

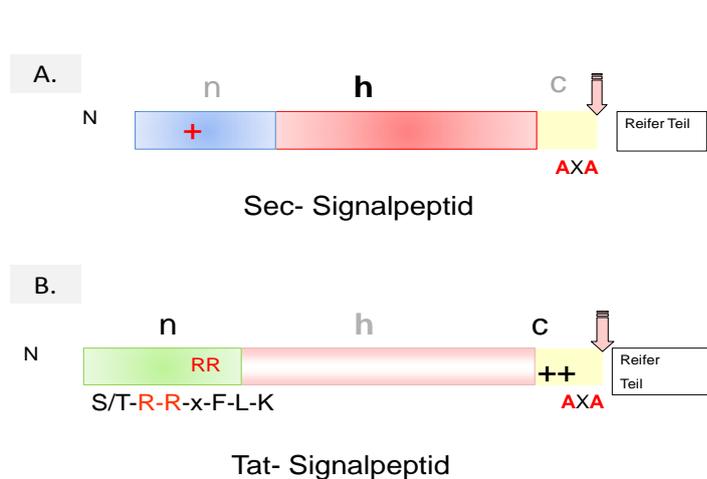


Abbildung 1-03: Schematische Darstellung von Sec- und Tat-Signalpeptiden

Signalpeptide besitzen einen dreigliedrigen Aufbau (N-,H-,C-Region: n, h, c). Der Pfeil kennzeichnet die Signalpeptidase-Spaltstelle. **A.** Sec-Signalpeptide besitzen außer der konservierten Erkennungssequenz für die Signalpeptidase keine weiteren konservierten Motive. Die H-Region (h) ist stark hydrophob. **B.** Bei Tat-Signalpeptiden ist die N-Region ungewöhnlich lang und beinhaltet das Zwillingsarginin-Konsensusmotiv. Die H-Region ist weniger hydrophob als bei Sec-Signalpeptiden. Die C-Region kann positive Ladungen enthalten.

I.3.2 „Targeting“ an die Sec-Translokase

Für ein Sec-abhängiges Preprotein gibt es zwei Möglichkeiten die Sec-Translokase zu erreichen: cotranslational über den SRP-Weg („SignReCognition Particle“) oder posttranslational über den SecB-Weg (bzw. mit Chaperonen als Targetingfaktoren). Während Gram-negative Bakterien wie *E.coli* über beide Targeting-Wege verfügen und den Großteil ihrer Exportproteine posttranslational über den SecB-Weg exportieren und den SRP-Weg hauptsächlich für integrale Membranproteine nutzen, verfügen Gram-positive Bakterien über kein SecB-Homolog. Sie nutzen daher wahrscheinlich den SRP-Weg für das Targeting an die Sec-Translokase. Allerdings wird gegenwärtig diskutiert, ob nicht CsaA als exportspezifisches Chaperon in *B.subtilis* die Abwesenheit eines SecB-Homologs kompensiert (Muller *et al.*, 2000a; Muller *et al.*, 2000b; Shapova und Paetzel, 2007).

I.3.2.1 Posttranslationales Targeting

SecB verhindert als Chaperon die Faltung des Preproteins in eine translokationsinkompatible Konformation, indem es bereits während oder kurz nach der Vorläufersynthese an das Preprotein ohne Spezifität für die Signalsequenz bindet. Über seine hohe Affinität zum SecA Protein, einer zentralen Komponente der Sec-Translokase, vermittelt es in seiner zusätzlichen Funktion als Targetingfaktor den Kontakt zwischen Vorläuferprotein und der Sec-Translokase. Eine ähnliche Funktion könnte das CsaA Protein in *B.subtilis* übernehmen (Muller *et al.*, 2000a; Muller *et al.*, 2000b). In *E.coli* unterstützen weitere

„Halte- und Falte“-Chaperonsysteme, wie Trigger Faktor (TF), Chaperone der DnaK-Familie und GroEL-Chaperone, SecB in seiner Funktion als Chaperon, indem sie sowohl zu sehr frühen Zeitpunkten wie TF oder später wie GroEL an die frisch synthetisierten Vorläuferproteine binden und diese in ihrer ungefalteten Konformation stabilisieren, so dass deren Aggregation verhindert wird (Jozwik und Wolska, 1999). Kommt es aber zu einer Falschfaltung von Proteinen oder kann ihre translokationskompetente Konformation nicht aufrecht erhalten werden, treten diese Chaperone in Kontakt mit cytosolischen Proteasen wie den Clp-Proteasen, so dass es im Rahmen einer cytosolischen Qualitätskontrolle zu einem Abbau unproduktiver Proteinkonformationen kommt (Jozwik und Wolska, 1999).

In der prokaryotischen Zelle greifen diese Chaperonsysteme auf den selben Pool neusynthetisierter Vorläuferproteine zu (Ullers *et al.*, 2007) und wirken synergistisch oder als gegenseitiges Backup-System, falls ein Chaperonsystem nicht in ausreichender Menge verfügbar ist (Genevaux *et al.*, 2004; Ullers *et al.*, 2007; Vorderwulbecke *et al.*, 2005; Ying *et al.*, 2005). Homologe zu DnaK, GroEL und Trigger Faktor (TF) wurden in Gram-positiven Bakterien wie *B.subtilis* identifiziert (Ling Lin *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2000a).

I.3.2.2 Cotranslationales Targeting

Das kotranslationale Targeting von Membran- und Exportproteinen über den SRP-Weg (Signal-Recognition-Particle Pathway) ist ubiquitär verbreitet (Luirink und Sinning, 2004). In Prokaryoten wurde dieser Weg hauptsächlich im Modellorganismus *E.coli* untersucht. Hier ist das Targeting über den SRP-Weg auf Membranproteine und ein Subset von Exportproteinen mit sehr hydrophoben Signalsequenzen beschränkt. Bei Gram-positiven Bakterien wie *B.subtilis* geht man hingegen davon aus, dass der größte Teil aller sekretorischen Proteine, die über den Sec-Weg transloziert werden, cotranslational an diese Translokase gelangen. Zum einen fehlt in Gram-positiven Bakterien ein SecB-Homolog und zum anderen besitzt der bakterielle SRP-Komplex, der in diesem Weg als Targetingfaktor fungiert, eine Präferenz für hydrophobe Signalpeptide, wie sie typisch für Gram-positive Bakterien wie *B.subtilis* sind (Zanen *et al.*, 2005).

Bei dem SRP-Komplex handelt es sich um einen ubiquitären Protein-RNA Komplex, dessen spezifische Zusammensetzung von Organismus zu Organismus variiert. Während das eukaryotische SRP ein komplexes Ribonucleoprotein darstellt, das aus sechs Proteinen und einem RNA Molekül besteht, gehört in *E.coli* nur das GTP-bindende Ffh Protein (fifty-four homolog) und die 4,5S RNA zu diesem Komplex (Luirink und Sinning, 2004). In *B.subtilis* tritt das Histon-ähnliche Protein HBSu als dritte Komponente dieses Ribonucleoproteinkomplexes auf, so dass hier ein ternärer Komplex bestehend aus Ffh, scRNA (Homolog zu 4,5S RNA) und HBSu vorliegt (Nakamura *et al.*, 1999).

Das Targeting über den SRP-Weg beginnt über eine Kontaktaufnahme zwischen SRP und dem am Ribosom naszierenden Vorläuferprotein (RNC: ribosome associated nascent chain), sobald ein hydrophobes Signalpeptid am Ribosom erscheint (Mitra *et al.*, 2006). Hierbei gilt: Je höher die Hydrophobizität des Signalpeptids ist, desto eher wird es durch SRP erkannt und desto geringer wird die Wahrscheinlichkeit für ein posttranslationales Targeting, das durch eine frühzeitige Bindung des Trigger Faktors (TF) ausgelöst wird (Ullers *et al.*, 2007). Als Nächstes nimmt SRP, nun im Komplex mit RNC,

Kontakt zum membrangebundenen SRP-Rezeptor (SR: FtsY in *E.coli*, Srb in *B.subtilis*) auf. Dieser Vorgang erfolgt über GTP-Bindung sowohl durch SRP als auch durch den SRP-Rezeptor. Danach transferiert der über SR an die Membran gebundene SRP/RNC-Komplex das Vorläuferprotein an die Sec-Translokase. Unter GTP-Hydrolyse dissoziieren SRP und der membrangebundene SR-Rezeptor aus dem Komplex von RNC und Translokase. Das Vorläuferprotein kann im Folgenden über den Kontakt zwischen Ribosom und Sec-Translokase cotranslational transloziert werden und SRP und der SRP-Rezeptor stehen für ein erneutes Targeting zur Verfügung.

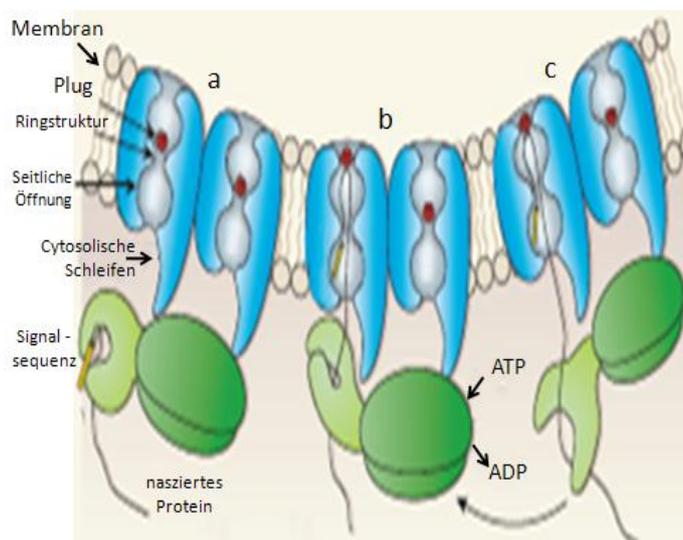
I.3.3 Die Sec-Translokase

Genetische, biochemische und biophysikalische Untersuchungen sowie Strukturaufklärungen haben in den letzten Jahren geholfen, ein umfassendes Bild des Translokationsgeschehens an der Sec-Translokase zu zeichnen. Am gründlichsten wurden dabei Komponenten und deren Funktionsweisen in *E.coli* untersucht. Durch die Bestimmung der Kristallstruktur des SecYEG Komplexes im Archaeon *Methanococcus jannaschii* (Van den Berg *et al.*, 2004) zusammen mit der Kryo-Elektronenmikroskopie des SecYEG Komplexes in *E.coli* (Mitra *et al.*, 2005) konnten grundlegende, strukturelle Elemente der Sec-Translokase identifiziert werden und in Übereinstimmung mit früheren genetischen Untersuchungen gebracht werden. So gelang es bestimmten prl-Mutationen, die durch „gain-of-function“-Mutationsanalysen gefunden wurden, und sec-Mutationen, die durch „loss of function“-Mutationsanalysen bestimmt wurden, charakteristische Strukturen des Translokationskanals zuzuordnen (Flower, 2007; Smith *et al.*, 2005).

Trotz zahlreicher Einzelbefunde ist es bisher allerdings nicht gelungen, ein abschließendes Modell der Sec-Translokation aufzustellen. Denn viele Fragen, die vor allem den Oligomerisierungsgrad der Sec-Translokase betreffen und Auswirkung auf den Mechanismus der Translokation haben, sind zurzeit noch nicht eindeutig geklärt (Osborne und Rapoport, 2007; Robson und Collinson, 2006; Rusch und Kendall, 2007). Prinzipiell sind aber sowohl Aufbau sowie Wirkungsmechanismus der Sec-Translokase in allen Bakterien, einschließlich der Gram-positiven Bakterien, hoch konserviert. Daher sollen im Folgenden gemeinsame Grundzüge der Sec-abhängigen Translokation aufgezeigt werden.

Abbildung 1-04: Gegenwärtiges Modell zur Sec-abhängigen Proteintranslokation nach Osborne und Rapport (Duong 07)

Die Abbildung veranschaulicht einige strukturelle Elemente eines dimeren SecYEG-Kanals (Blau) und einer monomeren SecA ATPase (Grün). a) geschlossener Zustand des Translokationskanals: SecA bindet an die cytosolischen Schleifen von SecYEG, b) SecA drückt die Signalsequenz als Haarnadelstruktur in den SecYEG-Translokationskanal. Dadurch wird der Translokationskanal geöffnet. c) offener Zustand des Translokationskanals: SecA unterstützt die Translokation weiterer Teile des Polypeptids und ist gleichzeitig an eine Kopie des SecYEG-Trimers gebunden.



1.3.3.1 Wichtige Komponenten und strukturelle Eigenschaften der Sec-Translokase

Bei der Sec-Translokase handelt es sich vereinfacht um einen Membranproteinkomplex, der mit Targetingfaktoren kooperiert, um Vorläuferproteine durch die Membran zu translozieren oder sie in die Membran zu inserieren.

1.3.3.1.1 Der SecYEG-Translokationskanal

Die Translokase besteht dabei aus einer Vielzahl von Komponenten, dessen wichtigste der hochkonservierte heterotrimere SecYEG-Komplex ist. Dieser Komplex bildet den Translokationskanal (Cannon *et al.*, 2005; Mitra *et al.*, 2005; Van den Berg *et al.*, 2004).

Das Membranprotein SecY ist in diesem Komplex das größte Protein. Es besitzt 10 Transmembransegmente (TMS) und bildet das strukturelle Innengerüst des seitlich offenen Translokationskanals. Dadurch, dass sich nach dem Prinzip eines „Clamp shells“ (Muschel) die Membransegmente TMS 1-5 und TMS 6-10 gegenüberliegen, wird eine laterale Öffnung des Translokationskanals zur Lipiddoppelschicht möglich.

Im Zentrum des Kanals ist eine hydrophobe Ringstruktur ausgebildet, die ähnlich wie ein Dichtungsring den Translokationskanal in der Mitte stark verengt. In *E.coli* wird dieser hydrophobe Ring von Isoleucinresten gebildet, die sich in einer Ebene gegenüberliegen. Auf der *trans*-Seite der Membran ist der Translokationskanal im geschlossenen Zustand durch einen beweglichen Plug (Stopfen) verschlossen. Dieser bewegliche Plug wird von einer kleinen, helikalen Schlaufe des SecY Proteins gebildet, die sich auf der *trans*-Seite der Membran befindet.

Neben dem SecY Protein sind auch SecE und SecG an der Bildung des Translokationskanals beteiligt. Das Protein SecE ist bedeutend kleiner als SecY und besitzt in *E.coli* drei TMS, in vielen anderen Bakterien aber nur ein TMS. Diese Komponente wirkt als strukturelle Klammer auf der Außenseite der SecY Struktur. Im offenen Zustand des Translokationskanals bindet die Plugstruktur an den Carboxyterminus von SecE. SecG ist die kleinste Komponente des SecYEG Komplexes. Dieses Protein besitzt in *E.coli* zwei TMS, aber in vielen anderen Bakterien nur ein TMS. Im Gegensatz zu SecY und SecE ist SecG für die Translokation nicht essentiell, wirkt aber auf diese stimulierend. Dieser Komponente wird eine strukturstabilisierende Rolle auf der Außenseite des Translokationskanals zugeschrieben (Robson und Collinson, 2006; Veenendaal *et al.*, 2004).

Rückblickend zeigen Studien, in denen nach Mutationen gesucht wurde, die den Exportblock von defekten Signalsequenzen aufheben („gain of function“-Mutationen), dass eine Vielzahl der identifizierten *prlA*-Mutationen (SecY-Mutationen) in Bereichen der hydrophoben Ringstruktur oder in Bereichen der Plugstruktur von SecY lokalisiert werden können. Viele *prl*-Mutationen, die SecE betreffen (*prlG*-Mutationen), konnten als Mutationen in der Nachbarschaft des hydrophoben Ringes oder auf dem C-Terminus von SecE lokalisiert werden, an den die Plugstruktur im offenen Zustand anbindet. Daher wurde die Hypothese entwickelt, dass alle *prlA*-Mutationen, die SecY betreffen, und alle *prlG*-Mutationen, die SecE betreffen, Veränderungen in der Struktur des SecYEG-Translokationskanals verursachen, die entweder den offenen Zustand des Translokationskanals stabilisieren oder den geschlossenen Zustand des Kanals destabilisieren (Flower, 2007; Smith *et al.*, 2005).

Ergebnis dieser prl-Mutationen ist in allen Fällen, dass es zu einem offenen oder leicht geöffneten Zustand des Translokationskanals kommt, so dass Vorläuferproteine über die Sec-Translokase transloziert werden können, ohne dass eine Öffnung des Translokationskanals durch Bindung einer Signalsequenz ausgelöst werden muss. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass das Sec-Signalpeptid dazu benötigt wird, den Translokationskanal vom geschlossenen in den offenen Zustand zu überführen (siehe 1-04).

1.3.3.1.2 Die SecA-ATPase

Die zentrale, energieliefernde Komponente der Sec-Translokase ist die SecA-ATPase, die daher auch als Nanomotor der Translokation bezeichnet wird. Durch ATP-Bindung und Hydrolyse liefert SecA zusammen mit dem Membranpotenzial die für die Translokation notwendige Energie. Die Aufgabe von SecA ist es, die Translokation zu initiieren und voranzutreiben. Zur Initiation der Translokation bindet SecA das Vorläuferprotein und schleust es in den Translokationskanal ein, dabei ändert es unter ATP-Verbrauch seine Konformation. Einmal an den Translokationskanal und die Membran gebunden, durchläuft SecA zyklische Konformationsveränderungen, bei denen es schrittweise 20-30 Aminosäuren in den Translokationskanal einschleust, so dass es schließlich zu einer graduellen Translokation des ungefalteten Polypeptides kommt (Economou *et al.*, 1995; Papanikolau *et al.*, 2007; van der Wolk *et al.*, 1998; Vrontou und Economou, 2004).

1.3.3.1.3 Akzessorische Komponenten: SecD, SecE, YajC

Neben diesen Hauptkomponenten der Sec-Translokase gibt es noch weitere akzessorische Proteine, die die Effizienz der Translokation beeinflussen können. Hierzu zählen die Membranproteine SecD, SecE und YajC, die als membranintegroaler Komplex vorliegen und die Translokation in *E.coli* positiv beeinflussen (Veenendaal *et al.*, 2004). Die Funktion dieses Komplexes ist noch nicht verstanden, diskutiert wird sowohl eine Funktion bei der Stabilisierung der Membran integrierten Form von SecA als auch eine Rolle bei der Stabilisierung von SecE (Hand *et al.*, 2006).

1.3.3.1.4 YidC

Auch das Membranprotein YidC stellt einen Kooperationspartner der Sec-Translokase dar. Es kann sowohl in Kooperation mit SecYEG die Insertion von integralen Membranproteinen unterstützen als auch eigenständig die Insertion von Membranproteinen vorantreiben. Gegenwärtig ist allerdings nicht aufgeklärt, auf welche Art und Weise diese Kooperation von SecYEG und YidC funktioniert (Chen *et al.*, 2005; Dalbey und Kuhn, 2004; Houben *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2003; Kiefer und Kuhn, 2007; Luirink *et al.*, 2005).

Ungeklärt ist auch, in welchem oligomeren Zustand SecYEG in der aktiven Sec-Translokase vorliegt. Die Sec-Translokase könnte im aktiven Zustand sowohl aus SecYEG-Monomeren als auch aus Dimeren oder sogar aus Tetrameren aufgebaut sein. Aktuell diskutiert wird eine „Back to Back“ Konformation eines SecYEG-Dimers, in dem abwechselnd ein SecYEG-Translokationskanal aktiv ist (Osborne und Rapoport, 2007). Genauso wenig ist bekannt, in welchem oligomeren Zustand die SecA-ATPase in der aktiven Translokase vorliegt. Während SecA in Lösung als Dimer vorliegt, ist sein oligomerer Zustand während der Membranbindung und während der Vorläufertranslokation noch nicht geklärt, auch wenn

vieles für einen monomeren Zustand von SecA spricht (Alami *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2003; Jilaveanu *et al.*, 2005; Jilaveanu und Oliver, 2006; Papanikolau *et al.*, 2007; Randall *et al.*, 2005).

I.3.4 Späte Schritte der Sec-abhängigen Proteintranslokation

Kurz nach oder während der Translokation erkennt eine membranständige Signalpeptidase des Typ I die Spaltstelle des Signalpeptids und spaltet es vom Vorläuferprotein ab. Während *B.subtilis* fünf Signalpeptidasen dieses Typs aufweist, besitzt *S.carnosus* zwei und *C.glutamicum* wie *E.coli* nur eine Signalpeptidase dieses Typs. Vermutet wird daher, dass *B.subtilis* als starker Sekretierer mehrere paraloge Signalpeptidasen besitzt, um die Prozessierung der sekretierten Proteine zeitlich und räumlich zu modulieren (van Roosmalen *et al.*, 2004).

In der Zwischenschicht zwischen Zellwand und Membran muss sich das frisch translozierte Protein schnell und korrekt falten, da es ansonsten im Rahmen einer Qualitätskontrolle von membran- und zellwandassoziierten Proteasen abgebaut wird. In *B.subtilis* reagiert z.B. das Zweikomponentensystem CssSR auf die Anwesenheit von falsch gefalteten oder sich langsam faltenden Proteinen, die in der Grenzsicht akkumulieren, indem es als Antwort auf den wahrgenommenen Sekretionsstress die beiden extrazellulären Proteasen HtrA und HtrB aktiviert (Darmon *et al.*, 2002; Hyyrylainen *et al.*, 2001). Ähnliche Regulationsmechanismen könnten auch in anderen Gram-positiven Mikroorganismen unter Sekretionsstress zum Tragen kommen.

Unterstützend auf die Faltung nach oder zeitgleich zur Translokation wirken hingegen sogenannte Faltungskatalysatoren wie die Peptidyl-propyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) oder die Disulfidoxidoreduktasen. Diese Faltungshelfer beschleunigen langsame Faltungsschritte, so dass sich die Lebensdauer von Faltungsintermediaten verkürzt und sie weniger proteolytisch angreifbar werden (Scholz *et al.*, 2006). In *B.subtilis* ist PrsA ein Faltungschaperon, das die Aktivität einer PPIase zeigt. Durch Überexpression dieses Lipoproteins konnte die Sekretion zahlreicher homologer und heterologer Proteine verbessert werden (Vitikainen *et al.*, 2004; Vitikainen *et al.*, 2005). Die Ausbildung von Disulfidbrücken kann durch membranintegrierte Disulfidoxidoreduktasen unterstützt werden. So wurden in *B.subtilis* zwei Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen (BdbB und BdbC) nachgewiesen, die die Bildung von Disulfidbrücken in Proteinen katalysieren (Bolhuis *et al.* 1999). Allerdings kam es trotz ihrer Anwesenheit bei der Faltung von heterologen Proteinen mit Disulfidbrücken zur Ausbildung von falschen Disulfidbrücken, so dass sich diese Proteine falsch falteten und proteolytisch abgebaut wurden (Sarvas *et al.* 2004).

Aber auch ohne diese Faltungshelfer existieren an der Grenzsicht zwischen Membran und Zellwand Bedingungen, die die Faltung sekretorischer Proteine positiv beeinflussen können. Denn sowohl durch die Anwesenheit von Metallkationen wie Ca^{2+} , Fe^{2+} und Mg^{2+} , die durch die negativ geladenen Teichonsäuren der Zellwand und der Membran in der Grenzsicht angereichert werden, als auch durch die Anwesenheit der negativ geladenen Teichonsäuren selbst wird die Faltung vieler sekretorischer Proteine unterstützt (Sarvas *et al.* 2004).

I.3.5 Die Gram-positive Zellwand als Hindernis

In Gram-positiven Bakterien stellt die Zellwand ein eigenes Kompartiment dar und ist die letzte Barriere, die sekretorische Proteine überwinden müssen, bevor sie in das Kulturmedium gelangen.

Vereinfacht kann die Gram-positive Zellwand als eine Art Polyelektrolytgel mit Ionenaustauschereigenschaften aufgefasst werden. Die starke negative Ladung und die begrenzte Porosität der Zellwand wirken dabei limitierend auf die Mobilität von Proteinen und anderen Substanzen. Anionische Teichon- und Teichuronsäuren, die kovalent an das Peptidoglykangrundgerüst der Zellwand gebunden oder als Lipoprotein in der Membran verankert sind, führen zu einer starken negativen Gesamtladung der Zellwand. Folge ist, dass Proteine und andere Substanzen über ionische Wechselwirkungen in der Zellwand festgehalten oder in ihrer Mobilität eingeschränkt werden. Behindernd auf die Zellwandpassage von Proteinen wirkt auch ihre begrenzte Porosität. Denn einer Abschätzung zufolge besitzt z.B. die Zellwand von *B.subtilis* eine durchschnittliche Porengröße von 2 nm bis 4 nm, so dass theoretisch Proteine bis zu einer Größe von 50 kDa ungehindert passieren können, aber die Mobilität sehr großer Proteine ähnlich wie in einem Molekularsieb eingeschränkt ist (Demchick und Koch, 1996) (Demchick und Koch, 1996).

Zudem weist die Zellwand Gram-positiver Bakterien im Vergleich zu der von Gram-negativen Bakterien einen sehr viel höheren Vernetzungsgrad auf und ist ca. zwanzigmal so dick (Sarvas *et al.*, 2004). Allerdings variiert dies mit der Wachstumsphase und ist von Organismus zu Organismus verschieden. Einen besonders hohen Vernetzungsgrad besitzt dabei die Zellwand in Staphylokokken, bei der 80-90% aller Peptide des Peptidoglykans vernetzt sind (Dmitriev *et al.*, 2005). In Corynebakterien weist die Zellwand zudem eine besonders geringe Permeabilität auf. Denn an eine stark ausgeprägte Arabinogalaktan-Peptidoglykanschicht ist eine äußere Lipidschicht, die hauptsächlich aus Mykolsäuren besteht, kovalent gebunden. Diese Lipidschicht setzt wahrscheinlich, ähnlich der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien, die Permeabilität für hydrophile und geladene Substanzen wie Proteine stark herab. Allerdings ermöglichen Zellwandporine in der Mykolsäureschicht wie PorA und PorB die Passage von hydrophilen Ionen und anderen hydrophilen Makromolekülen (Costa-Riu *et al.*, 2003).

Zudem sind in der Zellwand Gram-positiver Bakterien zahlreiche Proteine wie Proteasen, Peptidasen und Autolysine integriert, die einen Abbau von rekombinanten Proteinen, die die Zellwand passieren, bewirken können (Sarvas *et al.*, 2004). Diese Proteine sind an dynamischen Umbauprozessen der Zellwand beteiligt. Denn während der Wachstumsphase, der Zellteilung oder anderen Adaptionsphasen kommt es zu einem sogenannten Turnover der Zellwand, bei dem durch enzymatische Prozesse Fragmente der Zellwand ins Kulturmedium freigesetzt werden (Doyle *et al.*, 1988). Dadurch können Proteine, die durch die Zellwand festgehalten wurden, in das Kulturmedium gelangen.

I.3.6 Engpässe des Sec-Weges für die Sekretion heterologer Proteine

In den vorangegangenen Abschnitten wurde beschrieben, wie ein sekretorisches Protein bei Gram-positiven Bakterien über den Sec-Weg ins Kulturmedium gelangen kann und welche Interaktionen dabei eine Rolle spielen. Bei der Sekretion eines heterologen, industriellen Proteins werden die gleichen

Wegabschnitte durchlaufen, allerdings fehlt in diesem Fall eine evolutionäre Anpassung zwischen Zielprotein und Wirtsorganismus, so dass jetzt durch die Selbstregulation der prokaryotischen Zelle andere Regelnetzwerke in Kraft treten als bei der Sekretion homologer Proteine. Häufig handelt es sich dabei um Stressantworten der Zelle. Als Konsequenz folgt daraus, dass heterologe Proteine häufig nur ineffizient sekretiert werden und wirtschaftlich relevante Produktausbeuten nicht erzielt werden können. Ursachen hierfür sind sogenannte „Bottlenecks“, die auf verschiedenen Ebenen des Sekretionsweges angesiedelt sind. Für *B.subtilis* als Standardwirtssystem der sekretorischen Gewinnung industrieller Enzyme sind zahlreiche dieser Engpässe charakterisiert und potenzielle Lösungsansätze zu ihrer Behebung beschrieben worden (Li *et al.*, 2004; Westers *et al.*, 2004; Yamane *et al.*, 2004).

Einige Beispiele, die die Translokation von heterologen Proteinen über den Sec-Weg betreffen, sind in Tabelle 1-02 zusammengefasst. Das Konzept dieser Lösungsansätze lässt sich im Prinzip auf andere Gram-positive Wirtssysteme und Translokationssysteme wie den Tat- Weg übertragen. So stellt z.B. die Überexpression von spezifischen Chaperonsystemen, wie das Beispiel der Coexpression von PrsA für den Sec-Weg zeigt, eine rationale Möglichkeit dar, die Qualität und Menge von sekretierten heterologen Proteinen zu verbessern.

Tabelle 1-02: Engpässe und Probleme der Sec-abhängigen Sekretion heterologer Proteine, sowie potentielle Lösungsansätze in *B.subtilis*

(Bolhuis *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004; Ling Lin *et al.*, 2007; Westers *et al.*, 2004)

Ebene des Engpasses im Sec-Weg	Engpass	Lösungsansatz in <i>B.subtilis</i>
Signalpeptid	Zu hohe oder zu niedrige Gesamthydrophobizität des Signalpeptides führt zu einer stark verminderten Sekretion. Ladung der N-Region ist zu gering oder Ladung der C-Region ist zu hoch.	Modifizierung des Signalpeptids
cytosolische Chaperonsysteme	Durch Überlastung der Chaperonsysteme kommt es zur Aggregation und einer Falschfaltung der Vorläuferproteine, die ihren proteolytischen Abbau auslöst.	Coexpression von cytosolischen Chaperonen wie DnaK und GroE
Sec-Translokase	Proteinstau (Jamming) an der Translokase	Verringerung der Expressionsstärke
Prozessierung	Unzureichende Abspaltung des Signalpeptids durch TypI-Signalpeptidasen	Coexpression von Signalpeptidasen, Optimierung der Spaltstelle
Extrazelluläre Faltungskatalysatoren	Unzureichende und langsame Faltung nach der Translokation löst einen proteolytischen Abbau aus, fehlender Einbau von Disulfidbrücken	Überexpression von Foldasen wie PrsA und von Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen
posttranslokationale Qualitätskontrolle	Proteolytischer Abbau durch Proteasen Auslösung der Sekretionsstressantwort führt zur Aktivierung bestimmter Proteasen.	Deletion von Proteasen, Deletion des betreffenden Zweikomponentensystems
Zellwand	Retention von sekretorischen Proteinen in der Zellwand durch zu hohe Ladungen des Proteins oder durch zu geringe Porengröße der Zellwand (Molekularsiebeffekt der Zellwand)	Verringerung der Ladung des Zielproteins

Ein neuartiger Ansatz zur Verbesserung der Sekretionsleistung ist der Einsatz von Hochdurchsatzverfahren zur Optimierung der Translokation über den Sec-Weg (Brockmeier *et al.*, 2006). Nach dem Prinzip von Zufall und Selektion wird dabei nach geeigneten Kombinationen aus Signalpeptid und reifem Protein gesucht, die zu einer erhöhten Sekretion führen. So wurde in einem Ansatz ein bestimmtes Zielprotein mit einer Vielzahl von verschiedenen homologen Sec-abhängigen Signalpeptiden aus *B.subtilis* kombiniert und durch ein Hochdurchsatzscreening die beste Kombination aus Signalpeptid und Zielprotein identifiziert. Darüber hinaus gelang es auch, durch zufällige Mutagenese der N-Region eines Signalpeptids und anschließender Selektion die Sekretion einer bestimmten Kombination aus Signalpeptid und Zielprotein zu verbessern. Vorteil bei diesem nichtrationalen Ansatz der gerichteten Evolution ist, dass die zugrunde liegenden molekularbiologischen Zusammenhänge nicht bekannt sein müssen, um eine verbesserte Sekretion zu erzielen. Allerdings ist eine Grundvoraussetzung für diese Herangehensweise, dass geeignete Enzymeigenschaften existieren, die einfach quantifizierbar und proportional zur Menge an sekretiertem Enzym sind.

I.4 DER TAT-WEG ALS ALTERNATIVER SEKRETIONSWEG FÜR DIE HETEROLOGE PROTEINSEKRETION

Der Tat-Weg („Twin Arginine Translocation“) wurde Mitte der 90er Jahre als Sec-unabhängiger Proteintranslokationsweg in Chloroplasten (Δ pH-Weg) entdeckt und später in vielen Eubakterien und Archaea identifiziert. Mit Ausnahme der halophilen Archaeabakterien ist dieser Weg nicht essentiell und zumeist nur für den Export eines Teils aller sekretorischen Proteine zuständig. (Dilks *et al.*, 2005; Pohlschroder *et al.*, 2005). Das Hauptmerkmal dieses Translokationsweges ist, dass über ihn bereits im Cytosol gefaltete Proteine über die Cytoplasmamembran exportiert werden können. Für bestimmte heterologe Proteine kann die Sekretion über diesen Weg eine Alternative zur Translokation über den Sec-Weg darstellen. Denn Engpässe, die sich aus einer falschen oder langsamen Faltung nach der Sec-abhängigen Translokation ergeben, könnten durch Einsatz dieses Sekretionsweges als neue „Plattform der sekretorischen Proteingewinnung“ grundsätzlich umgangen werden.

Wie die Sec-Translokation kann die posttranslationale Translokation über den Tat-Weg in mehrere Schritte gegliedert werden: 1. Proteinbiosynthese eines gefalteten Vorläuferproteins, 2. posttranslationales Targeting an die Tat-Translokase, 3. Translokation durch die Tat-Translokase und 4. Zellwandpassage. Die Zellwandpassage wird vermutlich durch ähnliche Bedingungen der Zellwand bestimmt wie bei der Sec-abhängigen Zellwandpassage (siehe Kapitel I.3.5). Da sich Proteine (Tat-Substrate), die über diesen Weg exportiert werden, bereits vor der Translokation falten, kommen der cytosolische Reifungs- und Faltungskaskade und deren Qualitätskontrollsystemen besondere Bedeutung zu (siehe Kapitel I.4.7). Am gründlichsten wurde dieser Translokationsweg bisher in *E.coli* erforscht. Daher beziehen sich die folgenden Beschreibungen des Tat-Weges zumeist auf *E.coli* als Modellorganismus. Auf Gram-positive Bakterien sind diese wahrscheinlich übertragbar.

I.4.1 Die Signalpeptide des Tat-Weges

Aufgrund einer vergrößerten N-Region sind Tat-Signalpeptide häufig deutlich länger als Sec-Signalpeptide. Wie diese besitzen sie einen dreigliedrigen Aufbau bestehend aus einer basischen N-, einer hydrophoben H- und einer polaren C-Region mit einer Schnittstelle für die Signalpeptidase (Ala-X-Ala). Im Unterschied zu den Sec-Signalpeptiden haben Tat-Signalpeptide jedoch ein markantes Merkmal: Am Übergang von der N- zur H-Region befindet sich ein hoch konserviertes Konsensusmotiv (S/T-R-R-x-F-L-K), das als Zwillingssargininmotiv bezeichnet wird (siehe Abbildung 1-03 und Abbildung 1-05). Besondere Bedeutung innerhalb dieses Motivs kommt den beiden Argininresten (RR) zu, da sie eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Akzeptanz des gefalteten Vorläuferproteins durch die Tat-Translokase spielen. Denn sowohl durch biochemische Untersuchungen als auch durch „gain of function“ Mutationsanalysen konnten Wechselwirkungen zwischen den Zwillingssargininresten (RR) im Signalpeptid und Teilen der Tat-Translokase belegt werden, die das Vorläuferprotein zu einem frühen Translokationszeitpunkt binden (Alami *et al.*, 2002; Alami *et al.*, 2003; Kreutzenbeck *et al.*, 2007). Auch das stark konservierte Phenylalanin (F) im Konsensusmotiv ist an einer frühen Bindung durch Komponenten der Tat-Translokase beteiligt und wichtig für eine effiziente Translokation (Gerard und Cline, 2007; Stanley *et al.*, 2000). Wird es gegen weniger hydrophobe Aminosäuren mutiert, hat dies zwar keinen vollständigen Exportblock zur Folge, führt aber zu einer verminderten Sekretion des Vorläuferproteins (Gerard und Cline, 2007; Lee *et al.*, 2006; Stanley *et al.*, 2000).

Auffällig für Tat-Signalpeptide ist auch, dass ihre H-Region meist weniger hydrophob ist als die von Sec-Signalpeptiden. Wird die Hydrophobizität dieser Region künstlich erhöht, geht die Spezifität für eine Tat-abhängige Translokation verloren, so dass Tat-Vorläuferproteine in den Sec-Weg umgeleitet werden können (Cristobal *et al.*, 1999).

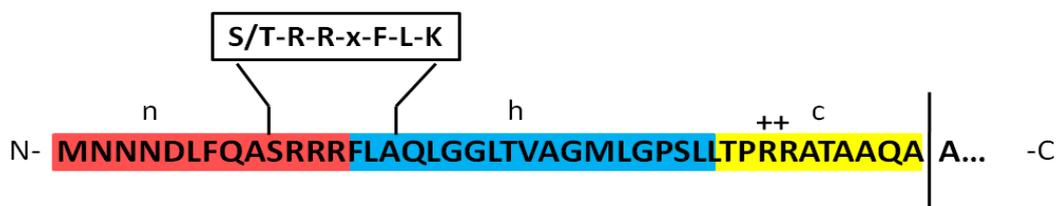


Abbildung 1-05: Schematische Darstellung der Struktur des TorA Signalpeptids

Das Signalpeptid der *E.coli* TMAO-Reduktase (TorA) ist ein Signalpeptid, das viele typische Merkmale eines Tat-abhängigen Signalpeptids aufweist wie das hoch konservierte Zwillingssargininmotiv am Übergang von der N- zur H-Region, zwei positiv geladene Argininreste als Sec-avoidance-Motiv in der C-Region und eine verlängerte N-Region. Die H-Region dieser Signalpeptids ist jedoch im Vergleich mit anderen TAT-Signalsequenzen stark hydrophob.

Ein weiteres, auffälliges Merkmal von Tat-Signalpeptiden ist, dass sich in der C-Region kurz vor der Schnittstelle der Signalpeptidase ein oder mehrere positiv geladene Aminosäurereste befinden können, die als „Sec-Avoidance“-Motiv bezeichnet werden (Blaudeck et al., 2003; Bogsch et al., 1997; Cristobal et al., 1999). Durch ihre Anwesenheit in der C-Region wird wie im Fall des Signalpeptids der TMAO-Reduktase (TorA) die falsche Einschleusung in den Sec-Weg verhindert.

In Signalpeptiden, in denen kein Sec-Avoidance-Motiv vorhanden ist, kann auch eine positive Gesamtladung im Anfangsbereich des reifen Proteins (aa: +1bis +16) eine Einschleusung von Tat-Substraten in den Sec-Weg verhindern (Tullman-Ercek et al., 2007). Neben diesen streng Tat-spezifischen Signalpeptiden gibt es in *E.coli* auch Tat-Signalpeptide, die keine Spezifität für den Tat- oder den Sec-Weg zeigen (Tullman-Ercek et al. 2007). Da für einen Teil der Tat-Substrate die Interaktion mit spezifischen Chaperonen, den sogenannten REMPs (Redox Enzyme Maturation Proteins), eine Rolle bei der Cofaktoraufnahme und Faltung spielt (Turner et al., 2004), hat man vorgeschlagen, Tat-Signalpeptide auf Grundlage ihrer Interaktion mit spezifischen Chaperonen in zwei Gruppen zu klassifizieren: (1.) Signalpeptide der Klasse A, die spezifisch von REMPs gebunden werden und gleichzeitig als Tat-Targetingsignale fungieren, und (2.) Signalpeptide der Klasse B, bei denen es sich ausschließlich um Targeting-Signale der Tat-Translokase handelt (Sargent et al., 2006; Sargent, 2007).

1.4.1.1 Spezies- bzw. Translokase-Spezifität von Tat-Signalpeptiden

Ein weiteres Merkmal Tat-spezifischer Signalpeptide ist, dass sie im Gegensatz zu Signalpeptiden des Sec-Weges in vielen Fällen nicht gegenseitig austauschbar sind. Stattdessen können sie eine hohe Spezifität für Translokasen eines bestimmten Typs innerhalb eines Organismus oder auch über die Artengrenze hinaus zeigen (Speziesspezifität).

So ist z.B. der Tat-abhängige Export der Glucose-Fruktose-Oxidoreduktase (GFOR) in *E.coli* blockiert, wenn das GFOR-Signalpeptid vorhanden ist (Speziesspezifität). Wird dieses Signalpeptid durch das in *E.coli* vorkommende TorA-Signalpeptid ersetzt, wird der Tat-abhängige Export dieses Proteins in *E.coli* wiederhergestellt (Blaudeck et al., 2001). Das *B.subtilis* PhoD Signalpeptid zeigt hingegen eine Spezifität für eine bestimmte Translokase. Es wird nur von seiner spezifischen Tat_{A_DC_D}-Translokase in *B.subtilis* transloziert, nicht aber von der zweiten, spezifischen Tat_{A_YC_Y} Translokase dieses Bakteriums. Ähnlich dem GFOR-Signalpeptid wird es auch nicht von der *E.coli* Tat-Translokase akzeptiert (Pop et al., 2002). Eine mögliche Ursache für diese Spezifität könnte sein, dass für die Translokation ein bestimmter Faktor wie z.B. ein Chaperon erforderlich ist, der im heterologen Wirtssystem fehlt. Eine andere Möglichkeit ist, dass es zu einer divergenten Anpassung innerhalb eines oder zwischen verschiedenen Mikroorganismen gekommen ist, so dass eine bestimmte Translokase nur ein Tat-Substrat eines bestimmten Typs akzeptiert. Neben diesen sehr spezifischen Signalpeptiden gibt es auch Tat-Signalpeptide, wie z.B. das TorA-Signalpeptid, die keine Spezifität für einen bestimmten Typus von Translokase zeigen. So konnte durch das TorA-Signalpeptid heterolog eine Tat-abhängige Sekretion in verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien vermittelt werden, allerdings mit unterschiedlicher Sekretionseffizienz und -qualität (Meissner et al., 2007).

I.4.2 Wichtige Komponenten der Tat-Translokase

Im Gram-negativen Modellorganismus *E.coli* wurden vier Gene identifiziert, die für Proteine des Tat-Exportweges kodieren. Während sich die Gene *tatA*, *tatB* und *tatC* in einem Operon befinden und den minimalen Satz an Komponenten darstellen, der für den Tat-Transport benötigt wird, liegt *tatE* monocistronisch in einem anderen Abschnitt des Chromosoms vor. Neben diesen Genen sind in Proteobakterien auch die Gene *tatD* (*E. coli*) und *tatF* (*Rhodobacter spec.*) translational an das *tat*-Operon gekoppelt. Beide Gene sind jedoch nicht essentiell für den Tat-Transport und stehen mit diesem wahrscheinlich nicht direkt in Verbindung (Lindenstrauss und Bruser, 2006; Wexler *et al.*, 2000).

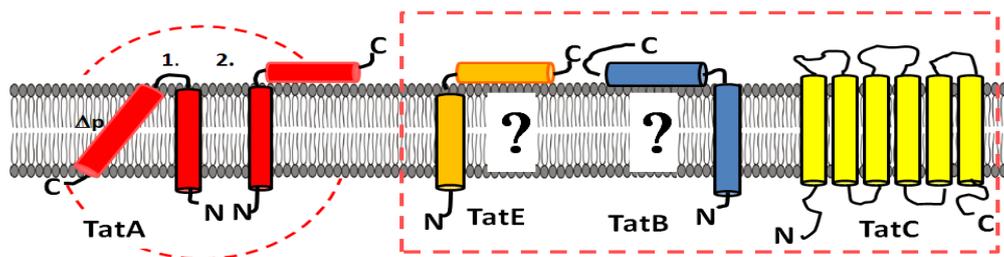


Abbildung 1-06: Mögliche Topologie der Tat-Proteine in *E.coli*.

Im Gegensatz zu TatC, bei dem es sich um ein Membranprotein mit sechs Transmembransegmenten handelt, bestehen die Membranproteine TatA/E und TatB aus einer Transmembranhelix gefolgt von einer amphipatischen Helix. Während für das TatA Protein eine N-in Topologie experimentell belegt ist und es in einer Membran in Abhängigkeit vom Membranpotential zwei unterschiedliche Topologieformen (1. zwei TMS und 2. eine TMS) annehmen kann (Chan *et al.*, 2007), handelt es sich bei der Darstellung von TatE und TatB um mögliche Topologien, die durch das Programm „TMbase“ (Hofmann und Stoffel, 1993) vorhergesagt wurden. Alternative Topologieprogramme wie THMM sagen eine N-out-Topologie voraus.

Jedes der Gene der Tat-Translokase kodiert für ein integrales Membranprotein (siehe Abbildung 1-06). Das TatC Protein (ca. 30kDa) ist die größte und am stärksten konservierte Komponente des Tat-Weges. Es besitzt nach strukturellen Voraussagen und biochemischen Untersuchungen sechs Transmembransegmente (Behrendt *et al.*, 2004; Ki *et al.*, 2004), und geht wahrscheinlich eine initiale Bindung mit dem Tat-Signalpeptid ein (Alami *et al.*, 2003; Kreutzenbeck *et al.*, 2007).

Die TatA/E (9/7 kDa) und TatB (18 kDa) Proteine bestehen jeweils aus einer Transmembranhelix gefolgt von einer amphipatischen Helix (Chanal *et al.*, 1998; Settles *et al.*, 1997). Das TatA Protein besitzt nach neuesten Erkenntnissen eine N-in Topologie (Chan *et al.*, 2007) und kann in der Membran in zwei Topologien auftreten (Chan *et al.*, 2007; Gouffi *et al.*, 2004). Im Vergleich zu den TatA Proteinen ist der unstrukturierte C-Terminus in TatB Proteinen verlängert. Sowohl auf der Sequenzebene als auch in ihrer Struktur und Funktion weisen diese Membranproteine eine gewisse Ähnlichkeit zueinander auf. So konnte durch Mutationen innerhalb des TatA Proteins ein bifunktionales TatA Protein erzeugt werden, das sowohl Funktionen von TatA übernehmen als auch TatB ersetzen konnte (Blaudeck *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu TatB ist das TatE Protein für den Tat-Weg in *E.coli* nicht essentiell, stellt aber ein funktionales Paralog zu TatA dar. Es wird ca. 100-fach schwächer exprimiert als TatA und ist wahrscheinlich aus einer kryptischen Genduplikation des *tatA* Gens hervorgegangen.

I.4.3 Abweichende Typen der Tat-Translokase in Gram-positiven Bakterien

Anders als zum TatABC-Aufbau in *E.coli* treten in Gram-positiven Bakterien abweichende Typen der Tat-Translokase auf. In diesen Bakterien sind die *tat* Gene häufig als *tatAC*-Gencluster organisiert, bei denen zusätzliche *tatA* oder *tatB* Gene auf gesonderten Genloci vorliegen können aber nicht müssen. Beispiele für den TatAC/B-Typ sind die Tat-Translokasen in *Mycobacterium smegmatis* und *Streptomyces lividans*. Neben dem *tatAC*-Gencluster besitzen sie ein *tatB* Gen auf einem anderen Genlocus. In *C.glutamicum* ist zudem ein zusätzliches *tatE* Gen auf einem gesonderten Genort nachweisbar. Ähnlich wie in *E.coli* überlappen sich die Funktionen der TatA und der TatE Proteine partiell in *C.glutamicum* (Kikuchi *et al.*, 2006). Aber im Gegensatz zu *E.coli* ist in *C.glutamicum* das TatB Protein nicht erforderlich, um eine basale Sekretion zu gewährleisten, wenn TorA^{SP}-GFP als Modellsubstrat verwendet wird (Kikuchi *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2001). Seine Anwesenheit verbesserte jedoch stark die Sekretionseffizienz in *C.glutamicum*.

Andere Gram-positive Bakterien wie Staphylokokken, Rickettsien und *B.subtilis* bilden aus TatA und TatC Proteinen sogenannte Minimaltranslokasen mit denen Tat-Substrate transloziert werden. Sie besitzen nur den *tatAC* Gencluster ohne ein *tatB* Gen aufzuweisen. In *B.subtilis* treten sogar zwei unabhängige *tatAC* Gencluster auf, aus denen zwei minimale Tat-Translokasen hervorgehen, durch die spezifische Tat-Substrate transloziert werden: PhoD ist dabei das Substrat der TatA_DC_D-Translokase und YwbN ist das spezifische Substrat der TatA_YC_Y-Translokase (Jongbloed *et al.*, 2004).

I.4.4 Tat-Komplexe und deren Funktion während der Translokation

Die unterschiedlichen Komponenten der Tat-Translokase bilden in der Cytoplasmamembran mindestens zwei Typen von hochmolekularen Komplexen aus, bei denen es sich möglicherweise um funktionelle Einheiten der Tat-Translokase handelt: einen TatA-Komplex, der stark in seiner Größe variiert, und einen TatBC-Komplex.

Unter Überexpressionsbedingungen kann der TatA-Komplex eine Größe von bis zu 600 kDa aufweisen und enthält in *E.coli* geringe Mengen an TatB (De Leeuw *et al.*, 2001; Sargent *et al.*, 2001). Untersuchungen dieses hochmolekularen Komplexes durch „Blue-Native-PAGE“ (Oates *et al.*, 2005) oder mit dem Elektronenmikroskop (Gohlke *et al.*, 2005) verdeutlichen, dass es sich beim sogenannten TatA-Komplex tatsächlich um eine Reihe von unterschiedlich großen Komplexen handelt, die in der Anzahl von TatA-Protomeren, aus denen sie aufgebaut sind, variieren. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen außerdem, dass diese TatA-Komplexe eine ringförmige Struktur mit jeweils einem Proteinkanal in ihrem Inneren ausbilden. Die Durchmesser dieser Proteinkanäle variieren dabei in einem Bereich von 30 Å bis 70 Å. Dies korreliert mit dem Größenbereich der bekannten Tat-Substrate von ca. 9 kDa bis ca. 142 kDa. Daher wird angenommen, dass es sich bei diesen Ringstrukturen um die Translokationskanäle der Tat-Translokase handelt, die als Anpassung an die Größe der Tat-Substrate in der Anzahl der TatA-Protomere variieren.

Der zweite biochemisch nachweisbare Komplex besteht hauptsächlich aus TatB und TatC Proteinen, die in diesem Komplex ein equimolares Verhältnis aufweisen. Dieser als TatBC bezeichnete Komplex enthält

in *E.coli* geringe Mengen an TatA unter Überexpressionsbedingungen, nicht aber unter nativen Expressionsbedingungen (McDevitt *et al.*, 2006). Je nach analytischer Methode schwankt die Größe dieses Komplexes von 370 kDa bis über 700kDa, doch in jedem Fall besteht er aus einer Vielzahl von TatB und TatC Proteinen (Bolhuis *et al.*, 2001; de Leeuw *et al.*, 2002; McDevitt *et al.*, 2005). Da die Proteine dieses Komplexes die initiale Bindungsstelle des Tat-Signalpeptids mit der Tat-Translokase darstellen, wird dieser Komplex als TatBC-Rezeptor bezeichnet (Alami *et al.*, 2003; Cline und Mori, 2001; de Leeuw *et al.*, 2002).

1.4.5 Möglicher Mechanismus der Tat-Translokation

Das TatC Protein innerhalb des TatBC-Komplexes besitzt wahrscheinlich eine Erkennungsstelle speziell für das Zwillingsargininmotiv (Alami *et al.*, 2003). TatB bindet vermutlich erst später an das Signalpeptid und fungiert als eine Art Bindeglied, das zwischen TatC, dem gebundenen Tat-Substrat und dem TatA-Translokationskanal vermittelt (Alami *et al.*, 2003). Erst nach der Bindung des Tat-Substrates an den TatBC-Rezeptor wird TatA in Abhängigkeit eines Protonengradienten rekrutiert (Mori und Cline, 2002). Energie in Form von NTPs wird zur Energetisierung des Tat-Weges nicht benötigt.

Eine dynamische Bildung eines [TatBC-Substrat-TatA]-Superkomplexes ist wahrscheinlich nur temporär und bricht als Komplex wieder auseinander, sobald das Substrat transloziert worden ist (Mori und Cline, 2002). Auch für die Proteintranslokation durch den TatA-Translokationskanal ist möglicherweise ein Protonengradient erforderlich, so dass es während des Proteinexportes zu einem Protonenimport kommt. Allerdings ist dies noch nicht eindeutig geklärt (Berks *et al.*, 2005). In Abbildung 1-07 ist das gegenwärtige Arbeitsmodell der Tat-Translokation für *E.coli* dargestellt, das auf Grundlage der Arbeiten von Alami *et al.* 2003 und Mori und Cline 2002 abgeleitet und modifiziert wurde.

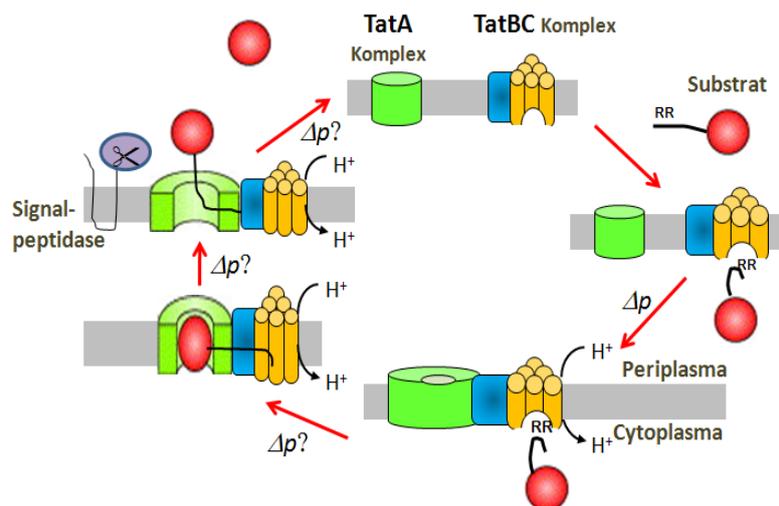


Abbildung1-07: Modell für die Tat-Translokation in *E.coli*

Das Tat-Signalpeptid wird durch den TatBC-Rezeptor gebunden, dabei interagiert das TatC Protein im TatBC Komplex mit dem Zwillingsargininmotiv. In Abhängigkeit eines Protonengradienten wird oligomerisiertes TatA durch TatBC, das sich nun im Komplex mit dem Vorläuferprotein befindet, rekrutiert. Anschließend wird das Vorläuferprotein in Gegenwart eines Protonengradienten durch den Translokationskanal (TatA-Komplex) transloziert. Nach der Translokation wird das Vorläuferprotein durch die TypI Signalpeptidase prozessiert. Der TatA-Komplex und der TatBC-Komplex dissoziieren, so dass das System wieder in seinen Ausgangszustand zurückkehrt (Berks *et al.*, 2005).

I.4.6 Qualitätskontrolle durch die Tat-Translokase

Eine notwendige Voraussetzung für den Export über den Tat-Weg ist ein korrekter Faltungszustand des Tat-Substrates. Denn falsch gefaltete oder nicht vollständig assemblierte Tat-Substrate werden von der Tat-Translokase nicht transloziert. So wird z.B. die NADP-abhängige, homotetramere Glucose-Fructose-Oxidoreduktase (GFOR) aus *Zymomonas mobilis* nur dann über den Tat-Weg exportiert, wenn der Cofaktor NADP gebunden ist und das Enzym in korrekter Faltung vorliegt (Halbig *et al.*, 1999). Auch der Tat-abhängige Export von heterologen Tat-Hybridproteinen mit Disulfidbrücken, wie z.B. Antikörperfragmenten oder aktivem PhoA Protein, ist nur in *E.coli* Mutanten möglich, die bereits einen Einbau der Disulfidbrücken im Cytosol ermöglichen (DeLisa *et al.*, 2003). Daher wird auf eine sogenannte Qualitätskontrolle der Tat-Translokase geschlossen, durch die falsch oder unvollständig gefaltete Proteine von einer Translokation ausgeschlossen werden. Ob es sich bei dieser Qualitätskontrolle um eine intrinsische Eigenschaft der Tat-Translokase oder eine mechanistische Inkompatibilität handelt, ist bisher nicht eindeutig geklärt.

Denn in *E.coli* konnte auch eine vorzeitige Einschleusung eines ungefalteten PhoA Proteins mit einem fusionierten Tat-Signalpeptid aus *Allochromatium vinosum* (HiPIP-PhoA) in die Tat-Translokase mit einem anschließenden Exportblock belegt werden (Bruser *et al.*, 2003)

I.4.7 Tat-Substrate und Chaperone

Eine wichtige Gruppe von Tat-Substraten repräsentieren heterooligomere, sekretorische Proteine mit komplexen Cofaktoren. Diese Proteine nehmen ihren Cofaktor bzw. ihre Untereinheiten während der Faltung im Cytoplasma auf. Daher sind sie darauf angewiesen, über den Tat-Weg in einer gefalteten Konformation transloziert zu werden. Häufig handelt es sich bei diesen Substraten in *E.coli* um Redoxenzyme mit komplexen Multiatomcofaktoren wie z.B. die [NiFe]-Hydrogenase, die TMAO-Reduktase oder die DMSO-Reduktase (Berks *et al.*, 2005; Jack *et al.*, 2005; Sargent *et al.*, 2006)

Diese Proteine besitzen häufig Signalpeptide der Klasse A, d.h. es existieren bestimmte Chaperone (REMPs) wie DmsD oder TorD, die während des Cofaktoreinbaus spezifisch an die Signalpeptide ihres Enzympartners (DmsA bzw. TorA) binden (Turner *et al.*, 2004).

Falls diese Proteine aus mehreren Untereinheiten bestehen, wie z.B. die [NiFe]-Hydrogenase, muss nicht jede Untereinheit ein Tat-Signalpeptid aufweisen, um über den Tat-Weg exportiert zu werden. So besitzt bei der [NiFe]-Hydrogenase, die aus einer großen und einer kleinen Untereinheit besteht, nur die kleine Untereinheit ein Signalpeptid. Die große Untereinheit assembliert mit der kleinen Untereinheit und wird mit dieser zusammen exportiert. Proteine wie die große Untereinheit werden daher auch als „Hitch-Hiker-Proteine“ (Huckepack-Protein) bezeichnet (Rodrigue *et al.*, 1999; Strauch und Georgiou, 2007). Auch komplexe, integrale Membranproteine können zu dieser Art Tat-Substrate zählen wie z.B. das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein (Bachmann *et al.*, 2006; De Buck *et al.*, 2007; Hatzixanthis *et al.*, 2003). Ohne Inanspruchnahme von YidC oder der Sec-Translokase inseriert dieses Protein über die Tat-Translokase in die Membran.

Neben der Gruppe der Tat-Substrate mit komplexen Cofaktoren existiert eine weitere Gruppe von Tat-Substraten, die weder komplexe Multiatomcofaktoren aufweisen noch aus mehreren Untereinheiten bestehen wie z.B. das cofaktorlose, monomere SufI oder die Amidasen AmiA und AmiC. Diese Proteine falten sich wahrscheinlich schnell im Cytoplasma, so dass sie nicht über den Sec-Weg exportiert werden können. Für diese Proteingruppe sind bisher keine spezifischen Chaperone (REMPs) nachgewiesen worden. Ihre Signalpeptide können zur Klasse B gezählt werden und besitzen nur Targetingfunktion (Sargent, 2007). An die Signalpeptide dieser Klasse können aber, wie auch an die Signalpeptide der Klasse A, globale Chaperone wie TF, DnaK oder GroEL binden, um eine Agglomeration während der Proteinfaltung zu verhindern. Wahrscheinlich binden diese globalen Chaperonsysteme generell an hydrophobe Stellen, wie sie in Signalpeptiden des Sec- und des Tat-Weges vorkommen oder auch von neu synthetisierten, ungefalteten Proteinen an ihrer Oberfläche präsentiert werden (Graubner *et al.*, 2007).

Das Chaperon SlyD, das gleichzeitig auch die Aktivität eines Faltungskatalysators (PPIase) zeigt (Scholz *et al.*, 2006), scheint wie DnaK verstärkt an Tat-Signalpeptide zu binden (Graubner *et al.*, 2007). Allerdings konnte mit Ausnahme von DnaK bisher kein direkter Einfluss der globalen Chaperonsysteme auf die Sekretionseffizienz oder die Stabilität von Tat-Substraten belegt werden. Im Fall von DnaK hingegen war in DnaK-Deletionsmutanten (Δ dnaK) die Sekretionseffizienz des homologen Tat-Substrates CueO stark verringert (Graubner *et al.*, 2007) bzw. auch seine cytoplasmatische Stabilität stark reduziert (Perez-Rodriguez *et al.*, 2007). Ob DnaK generell in der Lage ist, die Stabilität von Tat-Substraten zu verbessern, ist bisher allerdings nicht eindeutig geklärt (Graubner *et al.*, 2007; Perez-Rodriguez *et al.*, 2007).

Auch rekombinante Proteine, die sich im Periplasma von *E.coli* nicht richtig falten können, sind auf eine Faltung im Cytosol vor dem Export und damit wahrscheinlich auf die Unterstützung von globalen Faltungshelfern angewiesen. Ein Beispiel hierfür ist der Export des rekombinanten „Green Fluorescent Protein“ (GFP) in *E.coli*. Wird dieses Protein über den Sec-Weg in ungefalteter Form exportiert, ist es nicht in der Lage, sich im Periplasma in seine aktive Form zu falten. Nur wenn es sich bereits im Cytoplasma falten kann und über den Tat-Weg exportiert wird, ist es im Periplasma von *E.coli* aktiv und fluoresziert (Perez-Rodriguez *et al.*, 2007; Turner *et al.*, 2004).

1.4.8 Proofreading von Tat-Substraten durch Chaperone der TorD-Familie

Einige Redoxenzyme wie die TMAO-Reduktase, die [NiFe]-Hydrogenase oder die DMSO-Reduktase besitzen für sie typische Chaperone (REMPs), die bereits zu frühen Zeitpunkten der Faltung bzw. Proteinbiosynthese spezifisch an sie binden (Turner *et al.*, 2004). Auf diese Weise ermöglichen Chaperone wie DmsD, HyaE oder TorD den Einbau von komplexen Cofaktoren und die Assemblierung mit heterologen Untereinheiten. Wird z.B. die TMAO-Reduktase (TorA) in einem TorD-Deletionsstamm (Δ torD) überexprimiert, hat dies einen verstärkten proteolytischen Abbau dieses Enzyms zur Folge. Wird hingegen TorD zusammen mit der TMAO-Reduktase coexprimiert, kann der proteolytische Abbau dieses Enzyms reduziert werden (Ilbert *et al.*, 2003). Neben dieser Funktion als Chaperone, die die Cofaktorinsertion bei der Biosynthese ihrer Partnerenzyme unterstützen, besitzen Chaperone der TorD-

Familie wie DmsD und TorD eine zweite als Proofreading bezeichnete Funktion (Jack *et al.*, 2004). Haben sie an das DmsD- bzw. an das TorA-Signalpeptid gebunden, schirmen sie es von der Tat-Translokase ab und verhindern einen vorzeitigen Kontakt des noch ungefalteten Partnerenzym mit der Tat-Translokase. Dann wird ein Export ungefalteter oder nicht vollständig assemblierter Proteine verhindert bzw. unproduktive Wechselwirkungen zwischen Tat-Translokase und translokationsinkompetenten Enzymen kommen nicht zustande. Diese frühe Qualitätskontrolle im Verlauf des Tat-Weges wird als Tat-Proofreading bezeichnet.

Die durch TorD ausgeübte Qualitätskontrolle kann auch auf heterologe Tat-Substrate übertragen werden, sofern sie an das TorA-Signalpeptid fusioniert sind. So wies z.B. ein Hybridprotein aus TorA-Signalsequenz und einer Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase (TorA^{SP}-HybO) in Gegenwart von TorD eine verbesserte Assemblierung mit seinen Untereinheiten auf, und ein Hybridprotein aus TorA^{SP} und GFP (TorA^{SP}-GFP) zeigte in Gegenwart von TorD eine mehr als dreifach erhöhte Sekretionseffizienz in *E.coli* (Jack *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). Daher könnte die Coexpression von TorD in *E.coli* eine neue Strategie darstellen, die Tat-abhängige Sekretion von rekombinanten TorA^{SP}-Hybridproteinen zu verbessern.

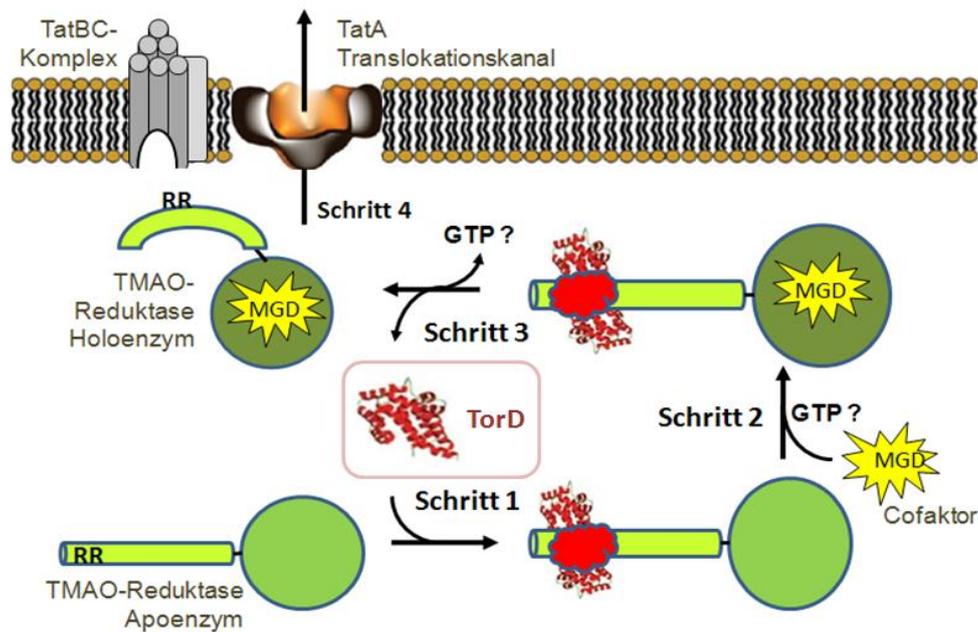


Abbildung 1-08: Aktuelles Arbeitsmodell für das Tat-Proofreading durch TorD

Nachdem das Tat-abhängige Apoenzym der TMAO-Reduktase (TorA) an den Ribosomen synthetisiert wurde, bindet TorD an das TorA-Signalpeptid und verhindert auf diese Weise den Export (Schritt 1). Als Nächstes erfolgt die Aufnahme des Molybdän-Cofaktors (MGD) durch das TorA-Apoenzym zusammen mit einer möglichen Bindung von GTP (Schritt 2). Dann erfolgt eine Freisetzung des TorDs aus der Bindung mit dem nun aktiven TorA, möglicherweise in Abhängigkeit einer GTP-Hydrolyse. Nach Ablösung vom Signalpeptid kann TorD erneut an die Signalpeptide neu synthetisierter Apoenzyme binden (Schritt 3). Im letzten Schritt wird das aktive Vorläuferprotein vom TatBC-Rezeptor gebunden und schließlich über den TatA-Translokationskanal transloziert (Schritt 4) (abgewandelt nach Sargent 2007).

I.4.9 Arbeitsmodell für das Tat-Proofreading durch TorD

Zurzeit sind viele Aspekte des Tat-Proofreadings durch TorD nicht eindeutig geklärt. In Abbildung 1-08 ist das aktuelle Arbeitsmodell für das Tat-Proofreading durch das TorD Chaperon dargestellt (Sargent *et al.*, 2006). Eine hypothetische GTP-Bindung und -Hydrolyse wurde dabei in das Arbeitsmodell integriert. Zunächst bindet TorD an das TorA-Signalpeptid und verhindert auf diese Weise den Export (Abbildung 1-08: Schritt 1). Ob Chaperone wie TorD das Signalpeptid ihres Partnerenzym in seiner Gesamtlänge binden oder nur einen bestimmten Teil davon abdecken, ist gegenwärtig noch unbekannt. Allerdings benötigt TorD kein intaktes Konsensusmotiv, um an das TorA-Signalpeptid zu binden (Hatzixanthis *et al.*, 2005). Zudem bindet TorD in seiner dimerisierten Form fester an das TorA-Signalpeptid als in seiner Form als Monomer (Tranier *et al.*, 2002; Tranier *et al.*, 2003). In der dimerisierten Form weist TorD eine extreme Form des Domainswappings auf, d.h. zwei Monomere bilden einen Dimer aus einander gegenüberliegenden Domänen aus. Zudem konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart des TorA-Signalpeptids die Bindung von GTP durch TorD verstärkt ist (Hatzixanthis *et al.*, 2005). Welche Bedeutung dies aber für den Mechanismus der Signalpeptidbindung hat, ist noch unklar (Sargent *et al.*, 2006).

Bei Aufnahme des Cofaktors durch das Apoenzym wird möglicherweise GTP gebunden (Abbildung 1-08: Schritt 2). Nach Reifung des Enzyms zum Holoenzym kommt es zu einem kritischen Schritt während des Tat-Proofreadings. Das TorD Chaperon muss sich aus der Bindung mit dem TorA-Signalpeptid ablösen und es wieder frei geben für eine Translokation (Abbildung 1-08: Schritt 3). Wie die Ablösung des TorD vom TorA-Signalpeptid funktioniert und die Freigabe für den Tat-Export erfolgt, ist unbekannt und wird gegenwärtig kontrovers diskutiert. Daher ist eine Ablösung des TorD Chaperons aus der Bindung mit dem Signalpeptid unter Hydrolyse von GTP in Abbildung 1-08 hypothetisch dargestellt. Für das DmsD Chaperon, das eng verwandt mit dem TorD Chaperon ist, wurde eine Bindung an Komponenten des Tat-Rezeptors (TatB, TatC) belegt (Papish *et al.*, 2003). Ob Ähnliches für TorD gilt, ist unbekannt, und ob dies bei der Bindung bzw. Ablösung vom TorA-Signalpeptid eine Rolle spielt, ist bisher nicht geklärt.

I.4.10 Mögliche Engpässe bei der Tat-abhängigen Sekretion heterologer Proteine

Für rekombinante Proteine, die Cofaktoren enthalten, sich schnell falten oder einen Engpass in späten Schritten der Sec-abhängigen Sekretion besitzen, kann die Sekretion über den Tat-Weg eine Alternative zur Translokation über den Sec-Weg darstellen. Ein gut dokumentiertes Beispiel hierfür ist die Translokation des TorA^{SP}-GFP Hybridproteins in einer aktiven Form über den Tat-Weg in *E.coli* (Thomas *et al.*, 2001). Eine kommerzielle Nutzung dieses Sekretionsweges für die Produktion industrieller Enzyme in Gram-positiven Bakterien steht, im Gegensatz zur Translokation über den Sec-Weg, bisher noch aus.

Prinzipiell besitzt der Tat-Weg in Gram-positiven Bakterien das Potential zur Sekretion von heterologen Proteinen wie Untersuchungen in *B.subtilis* (Gerlach *et al.* 2004), *S. lividans* (Schaerlaekens *et al.* 2004) und in *C.glutamicum* (Kikuchi *et al.*, 2006; Meissner *et al.*, 2007) zeigen. Allerdings war in vielen Fällen in den bisher untersuchten Wirtssystemen die Sekretionsmenge von rekombinanten Proteinen, die über den Tat-Weg sekretiert wurden, nur sehr gering (Schaerlaekens *et al.* 2004).

In *C.glutamicum* konnte allerdings das heterologe Tat-Hybridprotein „IMD aus *Athrobacter globiformis*“ im annähernd 100 mg/l-Maßstab über diesen Sekretionsweg gewonnen werden (Kikuchi *et al.*, 2006). Dies zeigt, dass die Auswahl eines geeigneten Gram-positiven Wirtssystems entscheidend für die Sekretionseffizienz eines rekombinanten Proteins über den Tat-Weg sein kann.

Gleichzeitig belegt die Tatsache, dass in vielen Fällen der Tat-abhängige Export von rekombinanten Proteinen nur sehr ineffizient erfolgt, dass zahlreiche Engpässe bei der Translokation dieser Proteine vorliegen müssen. Da Tat-abhängig exportierte Proteine bereits im Cytoplasma ihre vollständig gefaltete Konformation einnehmen und in diesem Faltungszustand über die Cytoplasmamembran transloziert werden, kann dies zu Problemen führen, die in Gram-positiven Bakterien sowohl auf Ebene der Zellwandpassage als auch auf Ebene der cytosolischen Reifungs- und Faltungskaskade vorliegen können. So sind Engpässe während der Zellwandpassage wahrscheinlich in *S.carnosus* dafür ein Grund, dass keine signifikanten Mengen Tat-abhängig sekretierter Hybridproteine im Kulturüberstand nachgewiesen werden können (Kikuchi *et al.*, 2006; Meissner *et al.*, 2007). Engpässe auf Ebene der cytosolischen Reifungs- und Faltungskaskade, die die Faltung eines heterologen Tat-Substrates oder die Interaktion mit cytosolischen Chaperonen, sowie das Targeting an die Tat-Translokase betreffen, sind ebenso wichtige Ursachen, die zu einer verminderten Sekretionseffizienz führen können. Unter Überexpressionsbedingungen von Tat-Substraten können sowohl die generellen Chaperonsysteme des Wirtsorganismus als auch die Tat-Translokasen überlastet werden, so dass es zu einem Exportblock und einem möglichen proteolytischen Abbau oder einer Aggregation des Substrates kommt (Chanal *et al.*, 2003; DeLisa *et al.*, 2004; Perez-Rodriguez *et al.*, 2007; Yahr und Wickner, 2001). Im Gegensatz zur Umsetzung von Lösungsansätzen zur Behebung von möglichen Engpässen der Sec-abhängigen Sekretion in Gram-positiven Bakterien wie *B.subtilis* (siehe Tabelle 1-02) sind Lösungsansätze zur Optimierung der Sekretion über den Tat-Weg in Gram-positiven Sekretionssystemen bisher kaum realisiert worden. Kommerziell sind bisher keine optimierten Sekretionssysteme für die Gewinnung von rekombinanten Proteinen über den Tat-Weg erhältlich, wobei aber ein großer Bedarf nach ihnen besteht (Bruser, 2007). Neben Standardaspekten wie der Verfügbarkeit von Vektorsystemen, Optimierung der Fermentationsbedingungen, des Codongebrauches oder der Proteinaufreinigung müssen daher neuartige Lösungsansätze entwickelt werden, um mögliche Engpässe der Tat-abhängigen Sekretion zu identifizieren und aufzuheben.

I.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

I. Etablierung eines Sekretionssystems zur sekretorischen Gewinnung von thermostabilen Lipasen

Thermostabile Lipasen aus extremophilen Mikroorganismen wie die Lipase GTL aus der *Geobacillus spec.*, die in der Lage sind hochviskose Fettsäureester umzusetzen, besitzen ein hohes Potenzial für die biotechnologische Anwendung (siehe Kapitel I.1.1). Allerdings fehlen mesophile, bakterielle Sekretionssysteme für ihre rekombinante Proteingewinnung (siehe Kapitel I.1.1). Daher war ein Ziel dieser Arbeit die sekretorische Gewinnung von thermostabilen Lipasen in Gram-positiven Wirtssystemen zu etablieren.

Aufgrund einer fehlenden evolutionären Anpassung von rekombinanten Protein an die Sekretionswege des Wirtssystems verläuft die sekretorische Proteingewinnung rekombinanter Proteine häufig ineffizient. Daher sollten nach einem Tool-Box-Prinzip verschiedene Gram-positive Wirtssysteme, Sekretionswege und Signalsequenzen mit einer thermostabilen Modelllipase kombiniert werden, um ein geeignetes Sekretionssystem ausfindig zu machen.

II. Optimierung des Tat-abhängigen Transportes

Prinzipiell können rekombinante Proteine in Gram-positiven Bakterien sowohl über den Sec-Weg in einer ungefalteten Konformation gewonnen werden als auch Tat-abhängig in einer gefalteten Konformation. Während die Sec-abhängige Proteinsekretion seit vielen Jahrzehnten zur Gewinnung von homologen und heterologen Proteinen eingesetzt wird und zahlreiche Strategien zur Behebung von Engpässen der Sekretion entwickelt wurden, wird die Gewinnung von Proteinen über den Tat-Weg bisher kaum kommerziell genutzt. Ein Grund hierfür ist, dass bisher kaum Lösungsansätze zur Optimierung der Tat-abhängigen Proteinproduktion in Gram-positiven Bakterien realisiert wurden. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, neue Lösungsansätze zur Verbesserung der Tat-abhängigen Proteintranslokation in Gram-positiven Bakterien zu entwickeln und zu evaluieren.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.1 CHEMIKALIEN UND ENZYME

In der vorliegenden Arbeit wurden analysereine Chemikalien der Firmen Merck AG (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) und der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe) verwendet. Biochemikalien und Enzyme, inklusive der dazugehörigen Puffer, stammten von den Firmen Roche Deutschland Holding GmbH (Grenzach-Wyhlen), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt a. M.). Zusätze für Nährmedien wurden von den Firmen Becton Dickinson/Difco (Heidelberg) und Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen. Nitrozellulosemembranen wurden von der Firma Schleicher & Schüll (Dassel) und PVDF-Membranen wurden von der Firma Millipore, Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen. Die Produkte anderer Hersteller sind an entsprechender Stelle aufgeführt.

II.2 BAKTERIENSTÄMME, OLIGONUKLEOTIDE UND PLASMIDE

Tabelle 2-01: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Art	Stamm	Genotyp	Referenz bzw. Herkunft
<i>Escherichia coli</i>	JM109	<i>F'</i> [<i>traD36</i> , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>] <i>endA1 recA1 hsdR17 thi-I mcrA</i> <i>supE44 gyrA96 relA1</i> Δ(<i>lac-proAB</i>)	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
	DH5α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-I relA1</i>	(Hanahan, 1983)
	MC4100	<i>F'</i> <i>araD139</i> Δ(<i>argF-lac</i>) <i>U169 rspL150</i> <i>relA1 flbB5301 fruA25 deoC1 ptsF25</i> <i>e14</i> ⁻	(Casadaban, 1976)
	BL21(DE3)	<i>F'</i> <i>ompT hsdSB (rB⁻, mB⁻) gal dcm</i> ⁺ <i>Tetr (DE3) endA</i>	(Studier und Moffatt, 1986)
<i>Bacillus subtilis</i>	168	<i>trpC2</i>	(Kawamura und Doi, 1984)
	Teb1030	<i>his nprE aprE bpf ispl, lipA, lipB</i>	(Eggert <i>et al.</i> , 2003)
	TatA _d C _d	<i>trpC2, tatA_d-tatC_d::Kan</i>	(Jongbloed <i>et al.</i> , 2004)
	TatA _y C _y	<i>trpC2, tatA_y-tatC_y::Spec</i>	(Jongbloed <i>et al.</i> , 2004)
	Total-tat ₂	<i>trpC2, tatA_c::Em, tatA_y-tatC_y::Sp,</i> <i>tatA_d-tatC_d::Kan</i>	(Jongbloed <i>et al.</i> , 2004)
DB 104	<i>his nprR2 nprE18 ΔaprA3</i>	(Kawamura und Doi, 1984)	
<i>Staphylococcus carnosus</i>	TM300	Wildtyp	(Schleifer und Fischer, 1982)
	S1	kommerzielle Starterkultur	Danisco GmbH, Niebüll
	DMC	S1Δ <i>tatC</i>	(Meissner, 2005)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC13032	Wildtyp	(Abe <i>et al.</i> , 1967)
	DCTC	ATCC13032 Δ <i>tatAC</i>	(Meissner 2005)

II. Material und Methoden

Tabelle2-02: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Plasmid	Resistenz	Relevante Eigenschaften	Referenz
pBluescriptTorA ^{SP}	amp ^R _{E.c.}	pBluescript-Derivat mit Signalsequenz der <i>E.coli</i> TMAO-Reduktase (ssTorA)	N. Blaudeck, persönliche Mitteilung
pBSMul3Cut	km ^R _{B.s.} amp ^R _{E.c.}	pBSMul3 mit Fragment der Cutinase aus <i>Fusarium solani</i> ohne Signalsequenz	(Brockmeier, 2006)
pEKex2	km ^R _{C.g., E.c.}	P _{tac} , lacI ^q , pBL1-Replikon, (Expressionsvektor mit mittlerer Kopienzahl in <i>C.glutamicum</i>)	(Eikmanns <i>et al.</i> , 1991)
pET-15bGTL	amp ^R _{E.c.}	pET-15b-Derivat mit ORF der <i>G.thermoleovorans</i> Lipase inklusive authentischer Signalsequenz (aGTL)	S. Markossian (persönliche Mitteilung)
pET-BLUE-1-Lip2	amp ^R _{E.c.}	pET-Blue-1-Derivat mit Lipase aus <i>Thermoanero bacter tengcongensis</i> (TSL)	(Royter, 2006)
pHSG575tatAC	cm ^R _{E.c.}	pHSG575 mit Tandem aus <i>E.coli</i> <i>tatA</i> und <i>tatC</i> Genen	(Blaudeck <i>et al.</i> , 2005)
pULS183K2	amp ^R _{E.c.}	<i>Staphylococcus hyicus</i> Prepro-Lipase (ppSHL) mit Nae1-Schnittstelle zur Fusion des Signalpeptids mit heterologen Genen; untranslated Region (UTR), Ribosomenbindungstelle der <i>S.hyicus</i> Lipase (RBS _{SHL})	J. Meens (persönliche Mitteilung)
pULS183K23	amp ^R _{E.c.}	<i>Staphylococcus hyicus</i> Prepro-Lipase (pproSHL) mit SnaB1-Schnittstelle zur Fusion des Prepro-Anteils mit heterologen Genen, UTR, RBS _{SHL}	J. Meens (persönliche Mitteilung)
pVWex2	tet ^R _{C.g., E.c.}	P _{tac} , lacI ^q , pHM1519-Replikon, (Expressionsvektor mit mittlerer Kopienzahl in <i>C.glutamicum</i>)	(Wendisch und 1997)
pXR100	amp ^R _{E.c.} cm ^R _{S.c.}	P _{xyl} , (Leervektor)	(Sandgathe <i>et al.</i> , 2003)
pXR100-TorACGT	amp ^R _{E.c.} cm ^R _{S.c.}	pXR100 mit Fusion aus ssTorA und CGTase (reifer Teil der Cyclodextrin-Glycosoltransferase)	(Vollstedt, 2004)
pXR-pproSHL-23	amp ^R _{E.c.} cm ^R _{S.c.}	pXR100 mit pproSHL, SnaB1-Schnittstelle, RBS _{SHL} , UTR	A. Bida (persönliche Mitteilung)
pXR-aGTL	amp ^R _{E.c.} cm ^R _{S.c.}	pXR100 mit aGTL, RBS _{SHL}	diese Arbeit
pK2-pGTL	amp ^R _{E.c.}	pULS183K2 mit Fusion von <i>S.hyicus</i> Lipase Presequenz und mGTL: pGTL-Fusion	diese Arbeit
pK23-pproGTL	amp ^R _{E.c.}	pULS183K23 mit Fusion von <i>S.hyicus</i> Lipase Preprosequenz und mGTL: pproGTL-Fusion	diese Arbeit
pXR-pGTL	amp ^R _{E.c.} cm ^R _{S.c.}	pXR100 mit pGTL-Fusion, UTR, RBS _{SHL}	diese Arbeit
pXR-pproGTL	amp ^R _{E.c.} cm ^R _{S.c.}	pXR100 mit pproGTL-Fusion, UTR, RBS _{SHL}	diese Arbeit

II. Material und Methoden

Plasmid	Resistenz	Relevante Eigenschaften	Referenz
pXR-TorAGTL	amp ^R _{E.c.} cm ^R _{S.c.}	pXR100 mit Fusion aus ssTorA und mGTL: TorAGTL-Fusion, RBS _{SHL}	diese Arbeit
pXR-pproTSL	amp ^R _{E.c.} cm ^R _{S.c.}	pXR100 mit Fusion von <i>S.hyicus</i> Lipase Preprosequenz (ppro) mit TSL: pproTSL-Fusion, RBS _{SHL} , UTR	diese Arbeit
pXR-TorATSL	amp ^R _{E.c.} cm ^R _{S.c.}	pXR100 mit Fusion aus ssTorA und TSL, RBS _{SHL}	diese Arbeit
pEK2-TorAGTL	km ^R _{C.g., E.c.}	pEKex2 mit TorA ^{SP} GTL-Fusion, RBS _{C.g.}	diese Arbeit
pEK2-TorATSL	km ^R _{C.g., E.c.}	pEKex2 mit TorA ^{SP} TSL-Fusion, RBS _{C.g.}	diese Arbeit
pEX2-TorAGTLhis	km ^R _{C.g., E.c.}	pEKex2 mit TorA ^{SP} GTL-Fusion ausgestattet mit 6- fach His-Tag, RBS _{C.g.}	diese Arbeit
pEK2-TorASHL	km ^R _{C.g., E.c.}	pEKex2 mit TorA ^{SP} SHL-Fusion, RBS _{C.g.}	diese Arbeit
pEK2-TorAproSHL	km ^R _{C.g., E.c.}	pEKex2 mit Fusion aus ssTorA und SHL-Lipase inkl. der Propeptidsequenz: TorA ^{SP} proSHL, RBS _{C.g.}	diese Arbeit
pEK2-TorACut	km ^R _{C.g., E.c.}	pEKex2 mit Fusion aus ssTorA und reifem Teil der Cutinase aus <i>Fusarium solani</i> (mCut): TorA ^{SP} Cut, RBS _{C.g.}	diese Arbeit
pVW2-TorD	tet ^R _{C.g., E.c.}	pVWex2 mit TorD aus <i>E.coli</i> MC4100	diese Arbeit
pVW2-TorDhis	tet ^R _{C.g., E.c.}	pVWex2 mit TorD aus <i>E.coli</i> MC4100 ausgestattet mit 6-fach His-Tag, RBS _{C.g.}	diese Arbeit
pEK2- TorAGFP/TorDhis	km ^R _{C.g., E.c.}	pEKex2 mit Tandem aus TorA ^{SP} GFP und TorDhis, RBS _{C.g.}	diese Arbeit
pEK2- TorAGFP/TorDINV	km ^R _{C.g., E.c.}	pEKex2 mit Tandem aus TorA ^{SP} GFP und invertiertem TorDhis, RBS _{C.g.}	diese Arbeit
pEK2-TorAGFP	km ^R _{C.g., E.c.}	pEKex2 mit Fusion aus ssTorA und GFP: TorA ^{SP} GFP, RBS _{C.g.}	(Meissner, 2005)
pEK2-TorAGTLhis (Not1)	km ^R _{C.g., E.c.}	pEK2-TorA ^{SP} GTLhis mit neuer Not1- Restriktionsschnittstelle an Position der Schnittstelle der Signalpeptidase	diese Arbeit
pVW2-tatAC (<i>C.g.</i>)	tet ^R _{C.g., E.c.}	pVWex2 mit <i>tatAC</i> Gencluster aus <i>C.glutamicum</i> , RBS _{C.g.}	diese Arbeit
pVW2-tatABC (<i>E.c.</i>)	tet ^R _{C.g., E.c.}	pVWex2 mit <i>tatABC</i> Gencluster aus <i>E.coli</i> , RBS _{C.g.}	diese Arbeit
pVW2-tatAC (<i>E.c.</i>)	tet ^R _{C.g., E.c.}	pVWex2 mit <i>tatA</i> und <i>tatB</i> Genen aus pHSG575tatAC, RBS _{C.g.}	diese Arbeit
pVW2-tatC (<i>E.c.</i>)	tet ^R _{C.g., E.c.}	pVWex2 mit <i>tatC</i> Gen aus <i>E.coli</i> , RBS _{C.g.}	diese Arbeit

II. Material und Methoden

Tabelle 2-03: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotid (Abk.)	Sequenz (5'-3')	verwendet zur Konstruktion von
01V01 aGTL-fw	CGGGATCCC GGAAGGGACTGGTTTAAATGAAATGCTGTCTCGTT	pXR-aGTL
02V01 mGTL-rv	CGGAATTCCGTTAAGGCCGCAAACCTCGCCAA	
03V01 mGTL(blunt)-fw	GAAGCAGAGGCCGGCGATGCAGCTTCACGCGCCAACGAT	pXR-pGTL und pXR-ppro-GTL
04V01 mGTL (EcoR1)-rv	GGAATTCCATATGGAATTCCTTAAGGCCGCAAACCTCGCCAA	
05V01 ssTorA (RBS _{SHL} -co1)	CGGGATCCC GGAAGGGACTGGTTTAAATGAACAATAACGATCTCTTTCAGGC	pXR-TorA-GTL
06V01 TorAGTL-co2/3	ATCGTTGGCGCGTGAAGCTGCCTTGCGCCGCAGTCGCAC	
07V01 TorAGTL-co3/2	GTGCGACTGCGGC GCAAGGCAGCTTCACGCGCCAACGAT	
08V01 mGTL-co4	CGGAATTCCGTTAAGGCCGCAAACCTCGCCAA	
12V01 TSL (blunt)-fw	GGTGATACGTAATGCAAAAAGGCTGTTGAAATTACATATAAC	pXR-ppro-TSL
13V01 pproTSL-rv	GCATCGCATGCGTCGACCTATCCCTTTAACAATTCCTTTTGGAAAAA	
09V01 ssTorA(RBS _{SHL}) -fw	CGAATTCGATGTAATGCAAAAAGGCTGTTGAAATTAC	pXR-TorA-TSL
11V01 TorATSL -rv	CGGGACGTCCTATCCCTTTAACAATTCCTTTTTTG	
31V01 ssTorA (RBS _{C.g.})-fw	GTTCTGCAGAAGGAGATATAGATATGAACAATAACGATCTCTTTCAGGC	pEK2-TorA-GTL, pEK2-TorA-SHL, pEK2-TorA-proSHL, pEK2-TorA-Cut
17V01 mGTL (BamH1) -rv	GCGGATCCCCGTTAAGGCCGCAAACCT	pEK2-TorA-GTL
18V01 TSL(BamH1) -rv	GCGGATCCACGTCCTATCCCTTTAACAATTCC	pEK2-TorA-TSL
40V01 mGTLhis-rv	GATCTAGGATCCCTAGTGATGGTGATGGTGATGAGGCCGCAAACCTCGCCAA	pEK2-TorA-GTLhis, pEK2-aGTLhis
24V01 TorA-SHL-co2/3	GGCTTCAGGTGCTGCTTTTACCGCAGTCGCACGTCGCG	pEK2-TorA-SHL, pXR-TorA-SHL
25V01 TorA-SHL-co3/2	CGCGACGTGCGACTGCGGTAAAAGCAGCACCTGAAGCC	
27V01 proSHL-co2/3	GTTGTTTGTGTTGTGCGAATCGTTTCGACGTCGCACGTCGCG	pEK2-TorA-SHL
28V01 proSHL-co3/2	CGCGACGTGCGACTGCGAACGATTCGACAACACAAAACAAAC	
32V01 SHL (C.g.)-rv	AGAGGATCCTCATCATTATGCGTTCTTTGTGCTT	pEK2-TorA-SHL, pEK2-TorA-proSHL

II. Material und Methoden

Oligonukleotid (Abk.)	Sequenz (5'-3')	verwendet zur Konstruktion von
41V01 TorA-Cut-co2/3	AGCAGGGTTACTAGTAGGGCGCCGCAGTCGCACGTCGCG	pEK2-TorA-Cut
42V01 TorA-Cut-co32	CGCGACGTGCGACTGCGGCGCCTACTAGTAACCCTGCT	
43V01 Cut-rv	CGGGATCCCGCTCAAGCAGAACCACGGACA	
46V01 ssTorA (BamH1)-co1	GGGATCCCGAAGGAGATATAGATATGAACAATAACGATC TCTTTCAGGC	
51V01 TorD(RBS _{C.g.})-fw	GTTCTGCAGAAGGAGATATAGATATGACCACGCTGACAG CACAA	pVW2-TorD
52V01 TorD-rev	AGAGGATCCTCATCATTATCTGTTTTGGTGGTTCGCAC	
61V01 TorDhis(BamH1)-rv	GATCTAGGATCCCTAGTGATGGTGATGGTGATGTCTGTT TTGGTGGTTCGCACTC	pVW2-TorDhis
66V01 TorD(RBS _{C.g.} EcoR1)-fw	GTTGGAATTCCAAGGAGATATAGATATGACCACGCTGA	pEK2-TorAGFP/TorDhis und pEK2-TorAGFP/TorDINV
65V01 TorDhis (EcoR1)-rv	GATCTAGGAATTCCTAGTGATGGTGATGGTGATGTCTG TT	
33V01 aGTL (RBSC.g)-fw	GTTCTGCAGAAGGAGATATAGATATGAAATGCTGTTCGGG TTATGTT	pEK2aGTLhis
53V01 mutTorAGTL (T-2A)-co2/3	GTTAACGCCGCGACGTGCGGCCGCGGCGCAAGGTG	pEK2-TorA-GTLhis (Not1)
54V01 mutTorAGTL (T-2A)-co3/2	CACCTTGCGCCGCGGCCGCGACGTGCGGCGGTTAAC	
78V01 C.g.1756SP-rv	TGCACCTTGCGCGCGGCCGCCGTTGGGATGGTGGGTAGT	
70V01 C.g.tatAC(RB S _{C.g.})-fw	TTCCTGCAGGAAGGAGATATAGATATGTCCCTCGGACCA TGGGAA	pVW2-tatAC (C.g.)
71V01 C.g.tatAC-rv	TTCCTGCAGGTAAGTACTAGAGCACGTCACCGAAGTCCG	
68V01 E.c.tatC-fw	GTTCTGCAGAAGGAGATATAGATATGTCTGTAGAAGATA CTCAACCGCT	pVW2-tatC (E.c.)
74V01 E.c.tatA-fw	GTTCTGCAGAAGGAGATATAGATATGGGTGGTATCAGTA TTTGCC	pVW2-tatABC (E.c.), pVW2-tatAC (E.c.)
69V01 E.c.tatC-rv	AGGGATCCCTCATCATTATTCTTCAGTTTTTTTCGCTTTC TG	pVW2-tatC (E.c.), pVW2-tatABC (E.c.), pVW2-tatAC (E.c.)
59V01 epPCR-fw	ATGACCATGATTACGCCAAGCT	TorA-Signalsequenzvarianten
60V01 epPCR-rev	CCCAGTACTTGAACCCAAACAT	

II.3 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

II.3.1 Nährmedien

Zusammensetzung verschiedener komplexer Nährmedien

LB (Luria Bertani)-Medium (Miller, 1972)

Vollmedium für <i>E.coli</i> , <i>S.carnosus</i> und <i>B.subtilis</i>	Bestandteil	Konzentration/ Menge
	Bacto- Trypton	10,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l	
NaCl	5,0 g/l	
ad 11 dH ₂ O, 20 min autoklaviert		

- Zur Herstellung von festen Nährböden wurde dem Medium 20g/l Agar zugesetzt.

2xYT-Medium

Vollmedium für <i>E.coli</i>	Bestandteil	Konzentration/ Menge
	Bacto- Trypton	16,0 g/l
Hefeextrakt	10,0 g/l	
NaCl	5,0 g/l	
ad 11 dH ₂ O, pH 7,2 mit 5 M NaOH eingestellt, 20 min autoklaviert		

BHIS-Medium

Vollmedium für <i>C.glutamicum</i>	Bestandteil	Konzentration/ Menge
	Brain Heart Infusion (BHI)	91,0 g/l
Sorbitol	37,0 g/l	
ad 11 dH ₂ O, 15 min autoklaviert		

Zur Herstellung von festen Nährböden wurde dem Medium 20g/l Agar zugesetzt.

Tabelle 2-04: Antibiotikakonzentrationen

- Zur Selektion auf Antibiotikaresistenz wurden den Nährmedien Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Antibiotikum	Stamm	Wirkkonzentration	Lösungsmittel
Ampicillin (amp)	<i>E.coli</i>	100,0 µg/ml	ddH ₂ O
Spectomycin (spec)	<i>B.subtilis</i>	100,0 µg/ml	ddH ₂ O
Erythromycin (em)	<i>B.subtilis</i>	1,0 µg/ml	ddH ₂ O
Chloramphenicol (cm)	<i>B.subtilis</i>	10,0 µg/ml	Ethanol (100%)
	<i>S.carnosus</i>	15,0 µg/ml	
Kanamycin (km)	<i>E.coli</i>	50,0 µg/ml	ddH ₂ O
	<i>B.subtilis</i>	50,0 µg/ml	
	<i>C.glutamicum</i>	25,0 µg/ml	
Tetracyclin (tet)	<i>E.coli</i>	7,5 µg/ml	Ethanol (70%)
	<i>B.subtilis</i>	15,0 µg/ml	
	<i>C.glutamicum</i>	3,0 µg/ml	

II.3.2 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung von *E.coli*, *B.subtilis* und *S.carnosus* erfolgte, soweit nicht anders aufgeführt, in LB-Vollmedium und von *C.glutamicum* in BHIS-Medium. Die Inkubation in Flüssigmedium wurde bis zu einem Volumen von 5 ml in Reagenzgläsern bei 170 rpm durchgeführt. Ab einem größeren Volumen erfolgte die Kultivierung in Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler bei 130 rpm. Während *C.glutamicum* Stämme bei 30°C inkubiert wurden, wurden *B.subtilis*, *S.carnosus* und *E.coli* Stämme bei 37°C angezogen.

II.3.3 Indikatoragarplatten mit Tributyrin oder Tween80 für Agardiffusionsassays

Indikatoragarplatten mit Tributyrin wurden hergestellt, indem zu 500 ml geschmolzenem LB-Agar oder BHIS-Agar, die zuvor mit Antibiotika und Induktoren versetzt worden waren, 15 ml einer Emulsion aus 50% (v/v) Tributyrin und 5% (w/v) Gummi Arabicum gegeben wurde. Durch kräftiges Schütteln wurde der flüssige Agar mit der Tributyrin-Emulsion gut durchmischt. Zur Schaumreduktion wurde der Tributyrin-Agar vor dem Gießen 10 Minuten in einem 50°C warmen Wasserbad aufbewahrt.

Zur Herstellung von Tween80-Indikatoragarplatten wurden LB-Agar oder BHIS-Agar mit 1% Tween 80 versetzt und die entsprechenden Antibiotika und Induktoren zugesetzt.

Die Lipase-Aktivität auf diesen Indikatoragarplatten wurde durch die Bildung von klaren Höfen um eine Einzelkolonie angezeigt.

II.3.4 Wachstumskurven

Die Aufnahme von Wachstumskurven erfolgte in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen bei einem Kulturvolumen von 50 ml. Das Flüssigmedium wurde mit Übernachtskulturen (ÜNK: 12h bis 14h), sofern nicht anders erwähnt, auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und je nach Stamm bei 30°C oder 37°C und 130 rpm inkubiert.

II.3.5 Stammhaltung

Die Stammhaltung sämtlicher Bakterienstämme erfolgte in Form von Glycerinkulturen. Stationär gewachsene Bakteriensuspensionen (ÜNK) wurden zu 50% mit Glycerin versetzt, gut durchmischt und in 1 ml Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -20°C bzw. -80°C. Die kurzfristige Aufbewahrung erfolgte bei 4°C auf LB-Nährböden bzw. BHIS-Nährböden, die entsprechend der Resistenz des Bakterienstammes mit Antibiotika supplementiert wurden. Zur Reaktivierung der Stammkulturen wurden von der noch gefrorenen Oberfläche Zellen mit einer sterilen Impföse auf Nährböden mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen.

II.3.6 Transformation von Bakterien

II.3.6.1 Transformation von chemokompetenten *E.coli* Stämmen

a) Herstellung chemokompetenter *E.coli* Zellen

Die Transformation von Plasmid-DNA oder Ligationsansätzen erfolgte mittels kompetenter Zellen, die nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt wurden (Hanahan, 1983).

Ausgehend von einem auf einem Nährboden frisch ausgestrichenen *E.coli*-Stamm wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt und anschließend in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 4000 rpm 15 min lang sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 15 ml RF1-Puffer resuspendiert und mindestens 15 min im Eisbad inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 4000 rpm, 15 min) wurde das Zellpellet in 4 ml eiskaltem RF2-Puffer aufgenommen. Die Bakteriensuspension der kompetenten Zellen wurde in 100 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Puffer zur Herstellung von kompetenten *E.coli* Zellen

RF-1	Konzentration/ Menge	RF-2	Konzentration/ Menge
RbCl	12,0 g/l	MOPS	2,1 g/l
MnCl ₂	9,9 g/l	RbCl	1,2 g/l
CaCl ₂ × 2H ₂ O	1,5 g/l	CaCl ₂ × 2H ₂ O	11,0 g/l
Kaliumacetat	2,9 g/l	Glycerin (87%)	121 ml/l
Glycerin (87%)	121,0 ml/l		
pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt und sterilfiltriert.		pH 6,8 mit 1M NaOH eingestellt und sterilfiltriert.	

b) Transformation von *E.coli* Zellen durch Hitzeschock

Zur Transformation durch Hitzeschock wurden die kompetenten *E.coli* Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Pro Transformationsansatz (100 µl) wurden 1 µl bis 2 µl Plasmid-DNA oder Ligationsansatz (ca. 50-100 ng DNA) zu den kompetenten *E.coli* Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Ein anschließender Hitzeschock erfolgte für 90 s bei 42°C im Wasserbad, gefolgt von einer einminütigen Abkühlung im Eisbad. Nach Zugabe von 250 µl LB-Medium zu den kompetenten Zellen wurde der Transformationsansatz zur Ausprägung der plasmidkodierte Antibiotika-Resistenz 1 h bei 37°C geschüttelt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurde das Zellpellet in 50 µl bis 100 µl LB-Medium aufgenommen, auf Selektionsagarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

II.3.6.2 Transformation von elektrokompetenten *E.coli* Stämmen

Herstellung der elektrokompetenten *E.coli* Zellen variiert nach Dower *et al.* (Dower *et al.*, 1988).

Zur Herstellung von elektrokompetenten *E.coli* Stämmen wurden 50 ml LB-Medium mit 500 µl einer ÜNK angeimpft und bei 37°C und 160 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 inkubiert. Das Zellsediment wurde nach Zentrifugation (4 min, 8000 rpm, 4°C) zweimal mit 25 ml und einmal mit 10 ml einer eiskalten, 10%igen (v/v) Glycerinlösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl dieser

Lösung aufgenommen und in 40 µl Aliquots entweder direkt zur Elektroporation eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

Zur Transformation durch Elektroporation wurden elektrokompetente *E.coli* Zellen und 10 ng bis 100 ng entsalztes Plasmid-DNA bzw. entsalztes Ligationsansätze in eisgekühlte Elektroporationsküvetten (0,2 cm Elektrodenabstand, Typ 16 S 2086, Biorad, München) gegeben. Mit Hilfe des BIORAD GENE PULSER TM (Biorad, München) wurde die entsalzte DNA mit folgenden Einstellungen in die Bakterien eingebracht. Unmittelbar nach dem Puls wurden 1,0 ml LB-Medium zugesetzt und der Ansatz in einem 2 ml-Eppendorfgefäß bei 37°C für 90 min bis 120 min schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation und Aufnahme in etwa 50 µl LB-Medium konzentriert und in einem Verdünnungsausstrich auf entsprechenden Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

Tabelle 2-05: Übersicht über die Elektroporationsbedingungen

Kapazität:	25,0	µF
Spannung:	2,5	kV
Widerstand:	200	Ω
Messwert für $t_{1/2}$	4,3 - 4,5	ms

II.3.6.3 Transformation von *B.subtilis* Stämmen

Die Transformation von *B.subtilis* erfolgte über Ausnutzung der natürlichen Kompetenz von *B.subtilis* variiert nach der Methode von Sadaie und Kada (Sadaie und Kada, 1983). Sämtliche verwendete Gefäße wurden vor Gebrauch mit ddH₂O autoklaviert. In einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurden 10 ml 1x SP (B)-Medium, je nach chromosomal kodierter Antibiotika-Resistenz des verwendeten Stammes, mit Antibiotika versetzt und mit Zellen einer *B.subtilis* Übernachtskultur zu einer OD₆₀₀ von 0,1 beimpft. Die Zellen wurden bei 37°C und 140 rpm inkubiert. Nach ca. 3 h wurde die OD₆₀₀ halbstündig gemessen und halblogarithmisch aufgetragen. Bei Erreichen der spätexponentiellen bis stationären Wachstumsphase wurde 1 ml der Zellsuspension in einen 100 ml Erlenmeyerkolben ohne Schikanen übertragen, mit 10 µl EGTA (0,1 M) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen je nach Stamm mit 250 ng bis 10 µg Plasmid-DNA versetzt und für eine Stunde bei 37°C mit 100 rpm geschüttelt. Zur Ausprägung der plasmidkodierten Antibiotika-Resistenz wurden 3 ml LB-Medium zum Transformationsansatz gegeben und für 1,5 h bei 37°C mit 140 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 min mit 5000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 80 µl LB-Medium resuspendiert und auf Selektionsagarplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht.

Medien zur Transformation von *B.subtilis*

4x SP-Medium (A)	Konzentration/ Menge	1x SP-Lösung(B)	Konzentration/ Menge
(NH ₄) ₂ SO ₄	8,0 g/l	4xSP	250 ml/l
KH ₂ PO ₄	24,0 g/l	CaCl ₂	0,5 mM
K ₂ HPO ₄	56,0 g/l	MgCl ₂	2,5 mM
Na ₃ Citrat x 7H ₂ O	4,0 g/l	Tryptophan	50,0 µg/ml
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,8 g/l	Histidin	50,0 µg/ml
Hefeextrakt	4,0 g/l	Glukose	0,5 %
Casaminoacids	0,8 g/l		
pH 7,2 mit NaOH eingestellt		ad 1l ddH ₂ O sterilfiltriert	

II.3.6.4 Transformation von *C.glutamicum* Stämmen

Zur Transformation von *C.glutamicum* wurde die Methode der Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock angewandt (Tauch *et al.*, 2002).

a) Herstellung elektrokompetenter C.glutamicum Zellen

Zur Herstellung der elektrokompetenten *C.glutamicum* Stämme wurden 25 ml BHIS Medium mit einer Einzelkolonie von *C.glutamicum* angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml dieser Vorkultur in 250 ml BHIS-Medium überimpft (1-l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen) und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 bei 140 rpm und 30°C inkubiert. Nach Erreichen dieser Zelldichte wurden die Zellen in zwei JA-10 Zentrifugenbecher überführt und durch Zentrifugation geerntet (20 min, 6000 rpm, 4°C). Die Zellen wurden nachfolgend dreimal mit 15 ml eiskaltem TG-Puffer und weitere zweimal mit 15 ml eiskalter 10%iger (v/v) Glycerinlösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml eiskalter 10%iger (v/v) Glycerinlösung resuspendiert, in Aliquots von 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

Verwendeter Puffer:

- **TG-Puffer:** 1 mM Tris pH 7,5, 10% Glycerin

b) Elektroporation von C.glutamicum Zellen

Zur Elektroporation wurden 100 µl *C.glutamicum* Zellen mit der zu transformierenden DNA gemischt und in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (Typ 16 S 2086, Biorad, München) überführt. Der Ansatz wurde mit 0,8 ml eiskaltem 10%igen (v/v) Glycerin überschichtet. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF für 3,5 bis 4 ms in einem BIORAD GENE PULSER *TM* (Biorad, München). Sofort nach Beendigung des elektrischen Pulses wurde die Zellsuspension in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen mit 4 ml vorgewärmtem BHIS-Medium überführt und 6 min bei 46°C inkubiert. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen für 90 min bei 30°C unter Schütteln regeneriert. Danach wurde die Zellsuspension auf BHIS-Selektionsagarplatten ausplattiert. Durch den Hitzeschock wird vermutlich das Restriktionssystem von *C.glutamicum* inaktiviert, so dass bei Verwendung heterologer DNA eine höhere Transformationseffizienz erreicht werden konnte (Schafer *et al.*, 1994).

II.3.6.5 Transformation von *S.carnosus* Protoplasten nach Götz und Schuhmacher

a) Herstellung von *S.carnosus* Protoplasten (Gotz und Schumacher, 1987)

Der Transfer von Plasmid-DNA in *S.carnosus* erfolgte über eine Protoplastentransformation. Zur Herstellung der Protoplasten wurde der jeweilige Stamm in 500 ml PH-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (6700 rpm, 15 min, 4°C) geerntet. Das Pellet wurde in 30 ml SMMP-Lösung resuspendiert, in einen sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit 30 µl Lysostaphin-Lösung (1 mg/ml) versetzt und 16 h bis 18 h bei 30°C stehend inkubiert. Die hergestellten Protoplasten wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet (25 min, 7600 rpm, RT) und in 5 ml SMMP gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Protoplasten in 2,1 ml SMMP aufgenommen, in 300 µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Lösungen zur Herstellung von *S.carnosus* Protoplasten

PH-Medium	Konzentration/ Menge	2xSMM	Konzentration/ Menge
Bacto-Pepton	10,0 g/l	Sucrose (Saccharose)	1,0 M
Hefeextrakt	5,0 g/l	Maleat	0,04 M
NaCl	5,0 g/l	MgCl ₂ (pH 7,4)	0,04 M
Glucose	1,0 g/l	ad dH ₂ O	
K ₂ HPO ₄	1,0 g/l		
15 min autoklaviert		pH 6,5 mit 1M NaOH eingestellt, 15 min autoklaviert	
SMMP-Lösung (50 ml)	Konzentration / Menge	Fusogen	Konzentration / Menge
2x SMM	7,5 V-Teile	PEG 6000 gelöst in	40 g
4x PAB	2,0 V-Teile	2x SMM	50 ml
5% BSA	0,5 V-Teile	ad 100 ml dH ₂ O.	
		15 min autoklaviert	
4x PAB	Konzentration / Menge		
Difco Antibiotic Medium No4	7,0 %		
15 min autoklaviert			

b) Transformation der *S.carnosus* Protoplasten (Gotz und Schumacher, 1987)

Für die Transformation wurden die *S.carnosus* Protoplasten auf Eis aufgetaut und je Aliquot mit 0,250 µg bis 2 µg DNA versetzt. Nach Zugabe von 2 ml Fusogen und einer Inkubation von 2 min bei RT wurden 7 ml SMMP-Lösung zugesetzt, die Protoplastensuspension vorsichtig vermischt und anschließend zentrifugiert (15 min, 7600 rpm, RT). Dann wurden die geernteten Protoplasten in 250 µl SMMP resuspendiert, auf DM3-Platten ausplattiert und für 4 h bis 5 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die DM3-Platten mit 3 ml CY-Softagar (50°C) überschichtet und für 2 bis 4 Tage bei 37°C inkubiert.

CY3-Softagar zum Überschichten der Protoplasten

Teil 1:

CY3-Medium (ca. 400 ml)	Bestandteil	Konzentration/ Menge
	Hefeextrakt	2,5 %
	Caseinhydrolysat	2,5 %
	NaCl	1,5 %
	Agar	0,8 %
15 min autoklaviert		

Teil 2:

CY3-Softagar	Konzentration	Menge
CY3-Medium (frisch aufgeköcht und auf 50°C temperiert)		25 ml
Na-Succinat (pH 7,3 mit Bernsteinsäure eingestellt)	1 M	25 ml
Na-Glycerophosphat	1,50 M	2 ml
MgCl ₂ (x 6 H ₂ O)	1,00 M	1,0 ml
Glucose	50 %	0,5 ml
BSA	5,0 %	0,5 ml

- Diesem Softagar wurde die 10-fache Antibiotikakonzentration zugesetzt. Alle Bestandteile wurden steril zusammengefügt.

DM3-Nährböden zur Regeneration der Protoplasten

Die folgenden Lösungen wurden einzeln angesetzt und getrennt autoklaviert.

Bestandteil	Konzentration	Menge
1. Na-Succinat (pH7,3 mit Bernsteinsäure eingestellt)	1 M	500 ml
2. Bacto-Agar	5 %	200 ml
3. Phosphatpuffer:		100 ml
Na ₂ HPO ₄	3,5 %	
KH ₂ PO ₄	1,5 %	
4. Vollmedium:		150 ml
Casamino-Acids	3,3 %	
Hefeextrakt	3,3 %	

- Nach dem Autoklavieren ($T \leq 60^\circ\text{C}$) wurden die Lösungen steril zusammengeführt und mit 20 ml MgCl₂, 10 ml 50% (w/v) Glucose und 10 ml 5% (w/v) BSA steril versetzt. Ca. 30 ml DM3-Agar wurden pro Petrischale eingesetzt.

II.4 GENTECHNISCHE METHODEN

II.4.1 Präparation von DNA

II.4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde eine alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) durchgeführt und anschließend die Plasmid-DNA an eine Anionenaustauschermatrix gebunden. Hierzu wurde das „QIAprep Spin Miniprep“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Im Fall von *E.coli* Kulturen wurden 2 ml ÜNK bei 13000 rpm für 10 min abzentrifugiert und anschließend wurde das Zellpellet nach Protokoll des Herstellers aufgearbeitet.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Gram-positiven Bakterien erfolgte analog, doch wurden die Zellen nach dem Abzentrifugieren der ÜNK in 250 µl des von Qiagen mitgelieferten P1-Resuspendierungspuffers

entsprechend den Ansprüchen des jeweiligen Bakterienstammes (siehe Tabelle 2.16) mit Lysozym bzw. Lysostaphin für eine bestimmte Zeit bei 37°C lysiert. Danach wurde weiter nach Protokoll des Herstellers verfahren.

Tabelle 2-06: Enzymatischer Aufschluss von Gram-positiven Bakterien

Bakterienstamm	Enzym	Inkubationszeit
<i>C.glutanium</i>	15 mg/ml Lysozym	1 h -2 h
<i>B.subtilis</i>	10 mg/ml Lysozym	30 min
<i>S. carnosus</i>	10µl Lysostaphin (1mg/ml)	1 h

II.4.1.2 Plasmidisolierung im präparativen Maßstab (Midi- und Maxi-Präparation)

Eine Präparation von Plasmid-DNA über das „Midi Plasmid Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) erfolgte, wenn größere Mengen an DNA benötigt wurden oder wenn das Plasmid in einer sehr niedrigen Kopienzahl vorlag (,very low copy'-Vector). Hierzu wurden 25 ml bis 50 ml ÜNK für 15 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet nach Protokoll des Herstellers aufgearbeitet.

Zur Isolierung sehr großer Plasmid-DNA-Mengen aus 100 ml bis 150 ml ÜNK wurde das „Nucleobond AX Kit“ (Macherey und Nagel, Düren) mit AX 500 Säulen nach Protokoll des Herstellers verwendet.

II.4.1.3 Präparation chromosomaler DNA

Die Präparation chromosomaler DNA aus *E.coli* oder *C.glutamicum* erfolgte mit Hilfe des „DNeasy Tissue Kits“ (Qiagen, Hilden) und wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt (DNeasy® Tissue Handbook, Seite 28 bis 29 und Seite 17 bis 19).

II.4.2 Aufreinigung von DNA

Zur Aufreinigung von DNA z.B. nach Restriktionsverdau oder von PCR-Produkten wurde das „QIAquick-PCR-Purification-Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet.

II.4.3 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion diente der Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen. Dabei macht man sich zunutze, dass Phenol Proteine denaturiert, während es mit Nukleinsäuren nicht interagiert. Da sich Phenol besser in Chloroform löst als in Wasser, wurde durch eine gleichzeitige Extraktion mit Chloroform und Phenol verhindert, dass Phenolreste in der oberen, wässrigen Phase, die die DNA enthielt, zurückblieben und nachfolgende Reaktionen störten. In der Interphase ordneten sich die in der Lösung enthaltenen Proteine zwischen den beiden Phasen an.

Die von Proteinen zu befreiende DNA-Lösung wurde auf 200 µl mit ddH₂O aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen eines Phenol-Chloroform-Gemisches (1:1) versetzt und geschüttelt, bis eine Emulsion entstand. Nach Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) trennte sich die wässrige von der organischen Phase. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt. Um die Reinheit zu erhöhen, wurde diese Prozedur wiederholt. Abschließend wurden die Phenolreste durch einmaliges Waschen mit Chloroform entfernt und die DNA aus der oberen, wässrigen Phase durch Ethanolfällung isoliert.

Lösungen für die Phenol/Chloroform Extraktion

Lösungen	Bestandteil	Konzentration/ Menge
Phenol-Chloroform-Gemisch	Phenol-Lösung	50,0 % (v/v)
	wassergesättigtes Chloroform	50,0 % (v/v)
Chloroform	Chloroform/Isoamylalkohol	24:1

II.4.3.1 Entsalzung und Aufkonzentrierung von DNA-Lösungen durch Ethanolfällung

Zur Konzentration und Erhöhung der Reinheit von DNA (z.B. nach Restriktionsverdau) wurde diese mit dem 2,5-fachen Volumen an absolutem Ethanol und 0,25 M NaCl versetzt und für mindestens 15 min bei -20°C oder über Nacht bei -80°C gefällt. Anschließend wurde die DNA-Lösung 30 min zentrifugiert (15300 rpm, 4°C). Zuletzt wurde das Pellet zur Entfernung von Salzen mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge („Speed-vac“) für ca. 10 min getrocknet. Danach wurde das DNA-Pellet zur Analyse in kleinen Volumina TE-Puffer oder in sterilem ddH₂O aufgenommen.

II.4.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Charakterisierung von Plasmid-DNA wurde diese durch Restriktionsendonukleasen in spezifische Fragmente gespalten. Der Verdau der DNA erfolgte in den von den Enzymherstellern (Firmen MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot und Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) mitgelieferten Puffern nach Vorschrift des Herstellers.

Die Spaltung der DNA zur Kontrolle des korrekten Aufbaus der Plasmide erfolgte für 2 h bis 3 h bei der für die eingesetzten Enzyme optimalen Temperatur. Um einen vollständigen Verdau für anschließende Ligationsexperimente zu gewährleisten, wurden die entsprechenden Ansätze über Nacht inkubiert. Wurden die Fragmente in weiteren Reaktionen eingesetzt, erfolgte eine Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen durch 20 min Inkubation der Ansätze bei 65°C. War jedoch eine Inaktivierung durch Hitze nicht möglich, wurden die Enzyme mit dem „Qiaquick PCR-Purification-Kit“ (Qiagen, Hilden) entfernt.

II.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe im elektrischen Feld wurden je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente 0,8%ige bis 2,0%ige Agarosegele angefertigt. Hierzu wurde Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf 50°C bis 60°C auf Gelträger gegossen. Ein Kamm wurde eingesetzt, um Probestaschen für die DNA-Probe auszubilden. Die Volumina der Taschen wurden nach Bedarf zwischen etwa 16 µl und 160µl variiert. DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen 5x Gelladepuffer versetzt und die Elektrophorese wurde in 1X TAE-Puffer bei 80 V Gleichspannung durchgeführt. Als Vergleichsmaßstab für die DNA-Fragmentlänge dienten je nach Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente eine 100bp- oder eine 1kb-DNA-Leiter (MBI Fermentas). Nach erfolgter Elektrophorese wurden die DNA-Banden 5 min bis 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (ca. 1µg/ml Ethidiumbromid) gefärbt und 5 min bis 10 min in Wasser entfärbt. Zur Visualisierung der DNA-Banden wurde ein Transilluminator in einer Geldokumentationsanlage eingesetzt.

Puffer für die Agarosegelelektrophorese

Puffer für die Agarosegelelektrophorese	Bestandteil	Konzentration/ Menge
10x TAE-Puffer	TRIS-Base	0,04 M
	Essigsäure (96 %)	0,20 M
	EDTA/Na ₂ (pH 8,0)	10,00 mM
	Die Bestandteile wurden zunächst in ddH ₂ O gelöst, dann wurde mit HCl pH 7,6 bis 7,8 eingestellt und auf 1l mit ddH ₂ O aufgefüllt	
5x Gelladepuffer	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Xylenzyanol	0,25 % (w/v)
	Glycerin	30,00 % (w/v)
	ad dH ₂ O	

II.4.5.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die gewünschten mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden wurden unter UV-Bestrahlung aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte über das „QIAquick Gel Extraction Kit“ nach Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden).

II.4.6 Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Bei der Dephosphorylierung durch alkalische Phosphatase wurde die endständige 5'-Phosphatgruppe linearisierter DNA enzymatisch abgespalten. Um die Religierung linearisierter Vektoren mit glatten oder klebrigen Enden mit gleicher Überlappungssequenz zu vermeiden, wurden die 5'-Enden dieser Vektoren mit alkalischer Shrimp-Phosphatase (SAP) dephosphoryliert. Die SAP wurde dabei nach Angaben des Herstellers (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) verwendet. Um in nachfolgenden Applikationen die Degradation von freien Phosphatgruppen zu verhindern, wurde vor der Weiterverwendung die SAP durch Hitze (15 min, 70°C) oder durch DNA-Aufreinigung deaktiviert bzw. entfernt.

II.4.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die enzymatische Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der T4 DNA-Ligase (Weiss und Richardson, 1967) durchgeführt.

In einem Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von max. 20 µl wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 bis 1:4 eingestellt, wobei ca. 50 ng Vektor-DNA eingesetzt wurden. Die Ligationen wurden entweder mit dem „Rapid DNA Ligation Kit“ (MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers oder mit 1 Unit der T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot) und 1/10 Volumen des entsprechenden T4-Ligationspuffers (MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot) durchgeführt. Die Ligation erfolgte in diesem Fall bei 16°C über Nacht.

II.4.8 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988). Hierzu wurden zwei komplementäre, konvergierende Oligonukleotide (Primer) verwendet, die das zu amplifizierende Fragment flankieren. Die Reaktion wurde zunächst mit einer

Temperaturerhöhung auf 92°C gestartet. Dieser Schritt diente zur Denaturierung der DNA in Einzelstränge. Im zweiten Schritt der Reaktion erfolgte eine Anlagerung der Primer an die DNA-Matrize, das „Annealing“ der Primer. Dazu musste die Reaktion auf eine durch die Primer festgelegte Temperatur abgekühlt werden. Nach dem Annealing der Primer wurde die Temperatur auf 72°C erhöht. Diese Temperatur stellte das Aktivitätsoptimum der verwendeten DNA-Polymerase dar und gewährleistete eine schnelle Verlängerung (Elongation) der Primer. Während dieser Phase lagerte sich die DNA-Polymerase an freie 3'-DNA-Enden an und füllte in einer spezifischen Kettenreaktion in Richtung 5' nach 3' die Einzelstränge zu Doppelsträngen auf. Die vollständig verlängerten DNA-Stränge standen in den folgenden Reaktionszyklen, die erneut mit einer Denaturierung in Einzelstränge begannen, als neue Matrizen zur Verfügung. Für die meisten Anwendungen lag nach 30 bis 35 Zyklen genügend Produkt zur weiteren Verwendung vor. Für die beiden Schritte, Annealing und Elongation reichten in der Regel Zeiten von weniger als eine Minute aus. Nur bei großen PCR-Produkten (>1kb) wurde die Elongationszeit verlängert, so dass jeweils der komplette Strang synthetisiert werden konnte. Die PCR-Reaktion zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mit Modifizierungen, wie Einbau von Restriktionsschnittstellen oder Ribosomenbindungsstellen, wurde mit Hilfe der „HighFidelity“-DNA-Polymerase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die PCR-Reaktion wurde ein T3 Thermocycler von Biometra® eingesetzt. Dabei wurde der erste Programm-Zyklus 10-mal und der zweite 20-mal mit einer Verlängerung der Elongationszeit von 5 s je Zyklus wiederholt. Die erhaltenen PCR Produkte wurden entweder über das „QIAquick PCR-Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt oder über ein Agarosegel von Nebenprodukten getrennt und über das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

Für analytische PCRs wie die Kolonie-PCR wurde eine Taq-Polymerase ohne „proof reading“-Aktivität (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet.

Die Temperatur für das „Primer Annealing“ konnte in erster Näherung nach folgender Formel berechnet werden:

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

II.4.8.1 Durchführung der Kolonie-PCR

Zur Kontrolle von *C.glutamicum*-Transformanten auf Anwesenheit des gewünschten Plasmids wurden Zellen der zu untersuchenden Klone direkt von der Platte mit einer Pipettenspitze abgenommen und auf einer Agarplatte ausgestrichen. Anschließend wurden die restlichen an der Pipettenspitze haftenden Bakterien in 100µl Wasser resuspendiert, ausreichend geschüttelt und 10 min bei 95°C inkubiert. Durch das Erhitzen auf 95°C wurden die Zellen lysiert und die zu analysierende Plasmid-DNA freigesetzt. Nach erneutem Schütteln wurden 5 µl dieser Suspension in einem 50 µl PCR-Ansatz als Matrize eingesetzt.

II.4.8.2 Durchführung der „Crossover-PCR“

Um eine präzise Fusionierung von zwei DNA-Fragmenten zu erzielen, wurde die „Cross-over-PCR-Technik“ eingesetzt (Abbildung 7). Ausgangspunkt einer Crossover-PCR war die Amplifikation von zwei

PCR-Fragmenten mit komplementären Überhängen (Fragment 1 und 2). Bei der Konstruktion der Primer co2/3 und co3/2 wurde darauf geachtet, dass sie über einen 5'-Überhang in einem Bereich verfügten, der komplementär zum Ende des jeweilig anderen Fragments war. In der anschließenden Crossover-PCR-Reaktion wurden die beiden sich gegenseitig überlappenden Fragmente 1 und 2 gleichzeitig als „Template-DNA“ zusammen mit den beiden Primern co1 und co2 eingesetzt. Ein PCR-Produkt konnte in dieser PCR nur erhalten werden, wenn es zu einem „Annealing“ von Fragment 1 und 2 an den überlappenden Bereichen kam. Die „Annealing“ Temperatur dieser Bereiche wurde beim Design der Primer co2/3 und co3/2 so gewählt, dass sie mit der von Primer co1 und Primer co4 übereinstimmte. Nach der Crossover-PCR kam eine genaue Fusion des Fragments 1 an das Fragment 2 zustande.

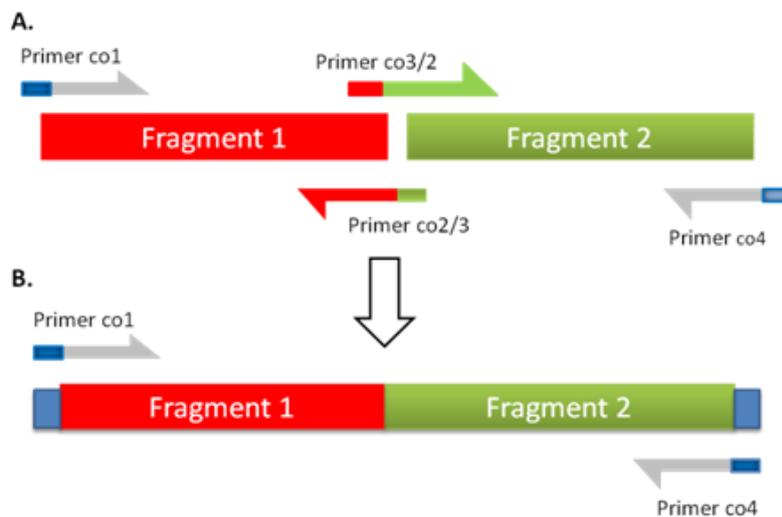


Abbildung 2-01: Schematische Darstellung der „Crossover“-PCR

(A): PCR-Amplifikation der beiden zu fusionierenden Nucleotidsequenzen. Hierbei enthalten Primer co2/3 und Primer co3/2 als 5'-Überhang einen Bereich, der komplementär zum jeweilig anderen Fragment ist (roter Überhang bzw. grüner Überhang.). Primer co1 und co4 enthalten Restriktionsschnittstellen für die spätere Klonierung (blaue Überhänge). (B): Crossover-PCR zur Amplifikation der Genfusion aus Fragment 1 und Fragment 2. Diese Fragmente werden gemeinsam als „Template“-DNA in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Eine Amplifikation erfolgt mit den Primern co1 und co4.

II.4.8.3 Ortspezifische Mutagenese

Zielgerichtete Basenaustausche in den jeweiligen PCR-Produkten wurden mit dem „Quickchange® Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene®, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Sofern keine Restriktionsanalyse zur Überprüfung der eingefügten Mutation durchgeführt werden konnte, wurden die entsprechenden Bereiche sequenziert.

II.4.8.4 Zufallsmutagenese durch epPCR

Um ungerichtete Basensubstitutionen einzufügen, wurde der Ansatz der fehlerhaften Polymerase-Kettenreaktion (epPCR = *error-prone polymerase chain reaction*) gewählt (Cadwell *et al.*, 2003).

Für unterschiedliche Mangan(II)-chloridkonzentrationen wurden Test-PCRs im T3-Thermocycler von Biometra® nach folgendem Protokoll durchgeführt: **1.:** 95°C 2 min, 30x [**2.:** 95°C 30s, **3.:** 50°C- 65°C (T_M des Primers) 30 s, **4.:** 72°C 40 s; gehe zu **2.**], **5.:** 95°C 30 s, **6.:** 72°C 3 min, **7.:** 4°C ∞.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit Restriktionsenzymen verdaut und in den Vektor pEK2-TorA^{SP}GTLhis ligiert. Nach Transformation des jeweiligen Ligationsansatzes in *E.coli* JM109-Zellen wurden anschließend jeweils 5 Klone sequenziert. Dabei ergab sich eine Fehlerrate von 1 bis 4 Nukleotidsubstitutionen pro 100 bp. Es wurden 10 Parallelansätze durchgeführt, die vor der Klonierung in den Expressionsvektor vereinigt wurden.

Tabelle 2-08: Pipettierschema für die error-prone-PCR

Zusatz	Endkonz. im 50µl PCR-Ansatz
PCR-Reaktionspuffer (NH ₄) ₂ SO ₄ (Fermentas)	1,0 X
dNTP's	jeweils 200 µM
MgCl ₂	6,0 mM
MnCl ₂	0,1- 0,3 mM
Primer 1	0,1 µM
Primer 2	0,1 µM
DNA-Template	1,0 ng
Taq-Polymerase (Fermentas)	0,05 U/µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

II.4.9 DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode

II.4.9.1 DNA-Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden (LI-COR-Apparatur)

Wie bei der klassischen, radioaktiven Sequenzieretechnik nach Sanger *et al.* (Sanger *et al.*, 1977) wurde auch bei dieser Methode der Abbruch der DNA-Polymerasekettenreaktion beim Einbau von Didesoxynukleotiden genutzt. Hierzu wurden Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide als Primer (MWG Biotech) und zirkuläre Plasmid-DNA als Matrize verwendet. Die Sequenzierung wurde mit der LI-COR-Apparatur der Firma MWG-Biotech nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Sequenzreaktion wurde das „Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech, England) verwendet. Die PCR-Reaktion wurde im T3-Thermocycler von Biometra® nach folgendem Protokoll durchgeführt: **1.:** 95°C 3 min; 30x [**2.:** 95°C 15s, **3.:** 50°C- 65°C (T_M des Primers) 30 s, **4.:** 70°C 40 s, gehe zu **2.**], 15x [**5.:** 95°C 20 s, **6.:** 70°C 30 s, gehe zu **5.**]. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 4 µl „Stop Solution“ des Kits und dreiminütigem Erhitzen bei 95°C gestoppt. Die DNA-Fragmente wurden in einem 4,6%igen, 66 cm langen und 0,25 mm dicken „Long-Ranger“ Polyacrylamidgel in 1x TBE Laufpuffer aufgetrennt. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Gel im Vorlauf für ca. 10 min auf 45°C vortemperiert. Es wurden jeweils 1,5 µl Proben auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte über Nacht bei 47 mA, 50 W, 2200 V und einer Temperatur von 45°C. Die Fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente wurden mit der Software „Base ImageIRTM“ (Begleitsoftware zur Apparatur LI-COR) erfasst und ausgewertet.

Puffer und Bestandteile des Sequenziergels

Sequenzgel (4,6 %)	Konzentration/ Menge	10x TBE-Puffer	Konzentration/ Menge
Acrylamid (Long Ranger)	4,6 ml	Tris-Base	162,0 g/l
Harnstoff	21,0 g	Borsäure	27,5 g/l
10x TBE-Puffer (Long Run)	5,0 ml	EDTA/Na ₂	9,3 g/l
Aqua dest.	32,0 ml		
TEMED	60,0 µl		
10% APS	350,0 µl		

II.4.9.2 DNA-Sequenzierung mit unmarkierten Oligonukleotiden (Kapillarsequencer „3100-Avant“)

Durch Einsatz des Kapillarsequencer „3100-Avant Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems) wurde die Sequenzierung von DNA-Proben erleichtert. Dabei wurde die Sequenzier-PCR-Reaktion unter Verwendung normaler, unmarkierter Oligonukleotide (OPERON Biotechnologies, Köln) mit dem „BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die vier verschiedenen Didesoxynukleotide waren mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Aufreinigung der Sequenzreaktionen erfolgte mit dem „DyeEx 2.0 Spin Kit“ (Qiagen, Hilden). Abweichend von den Angaben des Herstellers wurden die „BigDye-Säulchen“ vor Aufgabe der DNA-Probe einmal mit je 20 µl HPLC-Wasser gewaschen. Die Sequenzierung mit dem „3100-Avant Genetic Analyzer“ erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die dabei eingesetzten, mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) wurden beim Verlassen des Fluoreszenz-Kapillarelektrophoresearrays detektiert und als Sequenzsignal in Form von Chromatogrammen gespeichert. Die Sequenzierung wurde mit der zugehörigen „Data Collection Software 2.0“ ausgewertet.

Tabelle 2-09: Pipettierschema einer Sequenzierungs-PCR und verwendete PCR-Programme

PCR-Ansatz (10 µL)	PCR-Programm		
	<u>KAPSEQ 50</u> (für Reaktionen mit T _m < 60°C)		<u>KAPSEQ 60</u> (für Reaktionen mit T _m >60°C)
3µl Template-DNA (200ng)	96°C 1 min		96°C 1 min
1 µL Sequenzierprimer (2,5 µM)	96°C 10 s 50°C 30 s 60°C 3,5 min	} 25 Zyklen }	96°C 10 s 60°C 4 min
2 µL BIG-DYE-TERMINATOR Reaction-Mix 4 µl 5X Sequencing Buffer			

II.5 PLASMIDKONSTRUKTIONEN

II.5.1 Konstruktion der Genfusion *pproGTL* und *pproTSL*

Um die Gensequenz der Lipase *GTL* mit der Gensequenz des Prepro-Peptids der *S.hyicus* Lipase zu fusionieren, wurde das Plasmid *pXR-pproSHL* (*SnaB1*) eingesetzt (siehe Abbildung 2-02). Dieses Plasmid enthält die Gensequenz der Prepro-Lipase aus *S.hyicus* und besitzt zwischen der Sequenz des Propeptids und des reifen Teils der Lipase *SHL* eine singuläre *SnaB1*-Schnittstelle, die zur Genfusion von PCR-Fragmenten eingesetzt werden kann. Zur Genfusion der Lipase *TSL* wurde das PCR-Produkt „*TSL*“ mit dem Primerpaar 12V01 und 13V01 erstellt. Als Template diente die DNA des Vektors *pET-Blue-1-Lip2* (Dr. M. Royter, TU Hamburg-Harburg). Nachdem das PCR-Produkt „*TSL*“ mit *SnaB1* und *EcoR1* verdaut wurde, wurde es in den gleichermaßen geschnittenen Vektor *pXR-pproSHL* (*SnaB1*) ligiert. Es entstand die Genfusion *pproTSL*. Bei Herstellung der Genfusion *pproGTL* wurde analog verfahren. Das PCR-Produkt „*mGTL*“, das die Gensequenz der reifen Lipase *GTL* enthielt, wurde mit dem Primerpaar 03V01 und 02V02 amplifiziert. Als Template-DNA diente der Vektor *pEK-15b-GTL* (Dr. S. Markossian, TU Hamburg-Harburg). Nachdem dieses PCR-Produkt mit *Nae1* (stumpfes Ende) und *EcoR1* verdaut wurde, wurde es in den *SnaB1*(stumpfes Ende) und *EcoR1* geschnittenen Vektor *pXR-pproSHL-23* ligiert. Es entstand der Vektor *pXR-pproGTL* mit der Genfusion *pproGTL*. Nach Sequenzierung der Genfusionen *pproGTL* wurde mit den entsprechenden Plasmiden *pXR-pproGTL* der *S.carnosus* Wildtyp-Stamm TM300 transformiert. Die Expression der jeweiligen Genfusion auf dem *E.coli/S.carnosus* Shuttle-Vektor *pXR100* wurde durch die mit Xylose induzierbare und mit Glucose reprimierbare Promotor/Operator-Region des *xylA*-Gens (P_{xyl}) in *S.carnosus* reguliert (Wieland *et al.*, 1995).

II.5.2 Konstruktion der Genfusion *pGTL*

Für die Herstellung der Genfusion *pGTL* aus der Gensequenz des Prepeptids (Signalsequenz) der *S.hyicus* Lipase und dem Strukturgen der Lipase *GTL* stand der *E. coli* Vektor *pULS183K2* zur Verfügung, bei dem es sich um ein *pUC19*-Derivat handelt (siehe Abbildung 2-02). Auf diesem Vektor kann eine singuläre *Nae1* Schnittstelle, die zwischen Signalsequenz und der Sequenz des Propeptids der *S.hyicus* Lipase eingebaut wurde, dazu eingesetzt werden, ein Zielgen in frame hinter die *S.hyicus* Signalsequenz zu fusionieren. Das PCR-Produkt „*mGTL*“, das mit den Primern 02V01 und 03V01 und dem Template *pET-15b-GTL* gewonnen wurde, enthielt als Modifikation sowohl eine *EcoR1* als auch eine *Nde1* Schnittstelle an seinem 3'-Ende. Zunächst wurde für diese Klonierung das PCR-Produkt „*mGTL*“ ebenso wie der Vektor *pULS183K2* mit *Nae1* und *Nde1* geschnitten. Anschließend wurde das PCR-Fragment in den geschnittenen Vektor ligiert und es entstand das Plasmid *pK2-pGTL*, das die Genfusion *pGTL* unter Kontrolle eines *lac*-Promotors aufwies. Nach Sequenzierung dieser Genfusion wurde das Fragment „*pGTL*“ über die Schnittstellen *BamH1* und *EcoR1* in den *pXR100* Vektor subkloniert. Mit dem neu erstellten Plasmid *pXR-pGTL* wurde der *S.carnosus* Wildtyp-Stamm TM300 transformiert.

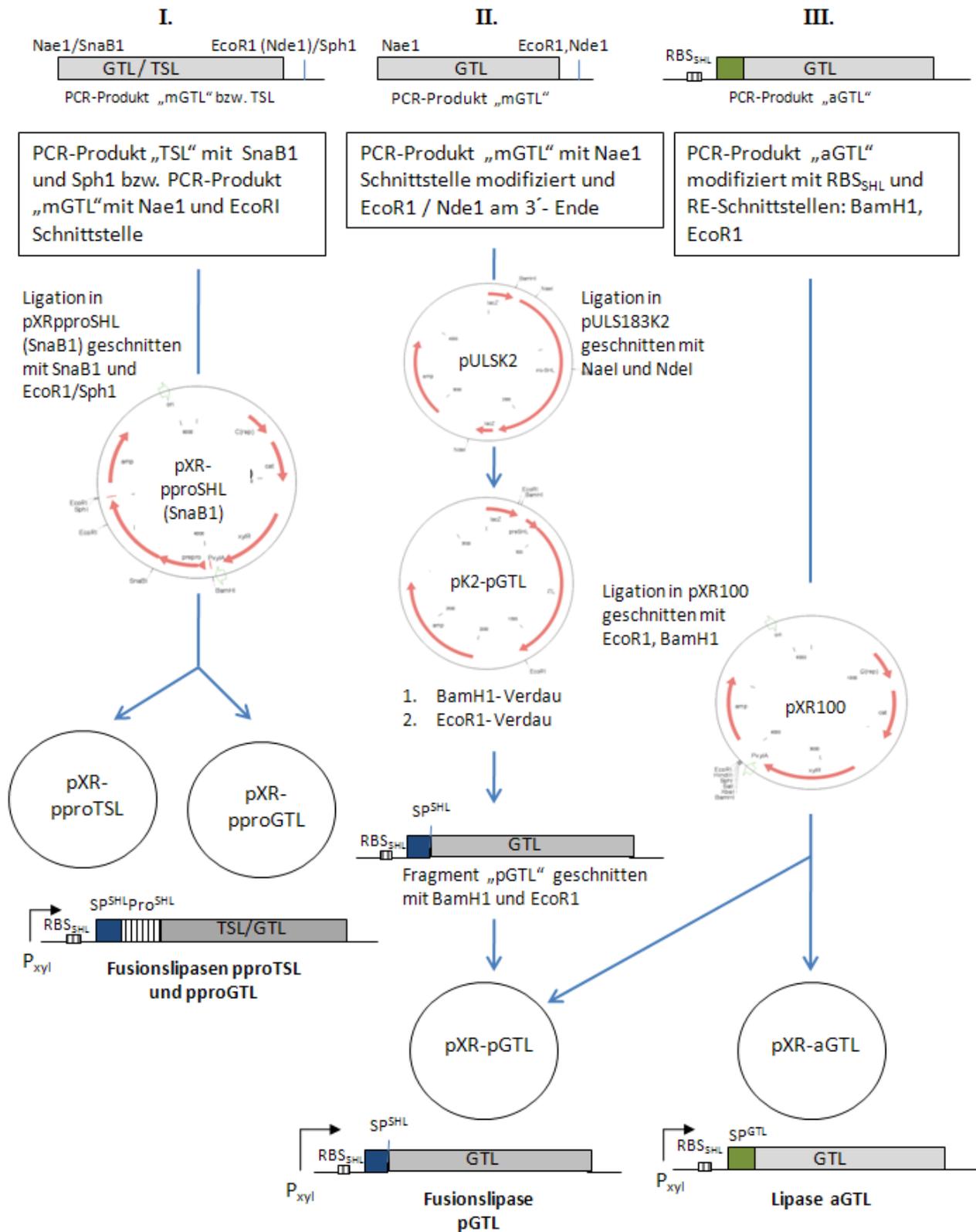


Abbildung 2-02: Klonierungsschemata für die Konstruktion der Genfusionen

Strategie I: Konstruktion der Genfusionen *pproTSL*, *pproGTL*,

Strategie II: Konstruktion der Genfusion *pGTL* und

Strategie III: Subklonierung des Lipase *GTL* Gens mit seiner authentischen Signalsequenz *aGTL*. Erläuterungen zur Genfusion der Hybridproteine der Lipasen *TSL* und *GTL* sowie zur Subklonierung der authentischen Lipase (siehe Kapitel II.5).

II.5.3 Subklonierung der Lipase GTL mit ihrem authentischen Signalpeptid aGTL

Zur Expression der Lipase GTL mit ihrem authentischen Signalpeptid (aGTL) in *S.carnosus* wurde für eine Adaption der Genexpression in *S.carnosus* die Ribosomenbindungsstelle der Lipase SHL (RBS_{SHL}: GAAGGGACTGGTTTA) *upstream* des Gens der Lipase GTL eingefügt (siehe Abbildung 2-02). Dazu wurde das Gen der Lipase GTL mit ihrer authentischen Signalsequenz mit der DNA des Vektors pET-15b-GTL als Template und den Primern 01V01 und 02V02 amplifiziert. Der Primer 01V01 enthielt die Sequenz der RBS_{SHL}. Das erhaltene PCR-Produkt „aGTL“ wurde mit EcoR1 und BamH1 geschnitten und in den gleichermaßen geschnittenen pXR100 Vektor ligiert. Nach Sequenzierung der Genfusion wurde der *S.carnosus* Wildtyp Stamm TM300 mit dem neu entstandenen Vektor pXR-aGTL transformiert.

II.5.4 Konstruktion der Genfusion TorA^{SP}GTL

Bei der Fusion des reifen Teils der Lipase GTL mit dem Signalpeptid der *E.coli* TMAO-Reduktase (TorA) wurde auf den Einsatz einer Linkerregion verzichtet, da diese Region eine positiv geladene Aminosäure im Bereich der ersten vier Aminosäuren des reifen Teils besitzt, die die Selektivität für eine Translokation über den Tat-Weg erhöhen kann (Tullmann-Ereck *et al.*, 2007). Die Fusionierung des reifen Teils der Lipase mit dem TorA-Signalpeptid wurde über eine Crossover-PCR vorgenommen. Dazu wurden zwei PCR-Produkte mit überlappenden Bereichen hergestellt (siehe Abbildung 2-01). Das erste PCR-Produkt, das den reifen Teil der Lipase GTL enthielt, wurde mit dem Primerpaar 07V01 und 08V01 und dem Vektor pET-15b-GTL amplifiziert. Das zweite PCR-Produkt, das die vollständige TorA-Signalsequenz inklusive der Ribosomenbindungsstelle der Lipase SHL enthielt, wurde mit dem Primerpaar 05V01 und 06V01 hergestellt. In der sich anschließenden Crossover-PCR wurden diese sich gegenseitig überlappenden PCR-Produkte gemeinsam als Template eingesetzt und die Primer 05V01 und 08V01 zur Amplifizierung verwendet. Das entstandene PCR-Produkt, das die Genfusion TorA^{SP}GTL ohne eine Linkerregion enthielt, wurde mit den Restriktionsenzymen EcoR1 und BamH1 geschnitten und in den gleichermaßen geschnittenen *E.coli/S.carnosus*-Shuttle-Vektor pXR100 kloniert. Es entstand der Vektor pXR-TorAGTL. Nach Sequenzierung wurde dieser in den *S.carnosus* WT-Stamm TM300 transformiert.

II.5.5 Konstruktion der Genfusion TorA^{SP}TSL

Um die Lipase TSL mit der TorA-Signalsequenz zu fusionieren, wurde sie mit einer Linkerregion versehen, die die ersten 12 AS des reifen Teils der TMAO-Reduktase kodiert. Dazu wurde das Strukturgen der Lipase TSL mit den Primern 09V01 und 11V02 so amplifiziert, dass es zwölf zusätzliche Nucleotide enthielt, die für vier Aminosäuren am Anfang des reifen Teils der TMAO-Reduktase kodieren. Aus dem Vektor pXR-TorACGT, der diese Linkerregion zwischen dem reifen Teil der CGTase und der TorA-Signalsequenz enthielt, wurde durch EcoR1 und AatII Verdau das Strukturgen der CGTase zusammen mit der Nucleotidsequenz, die die vier letzten Aminosäuren des Linkerbereichs kodiert, entfernt. Nach Ligation des PCR-Produkts in den geschnittenen Vektor wurde der Linkerbereich vervollständigt und es entstand der Vektor pXR-TorATSL. Zur Expression in *C.glutamicum* wurde diese Gensequenz mit den Primern 31V01 und 18V01 in den pEKex2 Vektor umgesetzt.

II.5.6 Konstruktion der Genfusionen TorA^{SP}SHL, TorA^{SP}proSHL und TorA^{SP}Cut

Um das Hybridprotein TorA^{SP}proSHL herzustellen, wurde eine Crossover-PCR Strategie verwendet (siehe Abbildung 2-01). Dazu wurden die Primer 31V01 und 32V01 als äußere Primer eingesetzt und als innere, überlappende Primer dienten die Primer 27V01 und 28V01. Um die Lipase SHL zusammen mit ihrem Propeptid zu amplifizieren, wurde der Vektor plipPS1 als Template für die PCR-Reaktion eingesetzt und zur Amplifikation des TorA-Signalpeptids wurde der Vektor pBluescript TorA verwendet. Nach Ligation des Crossover-PCR-Produktes entstand der Vektor pEK2-TorAproSHL. Die Herstellung der zweiten Variante der Lipase SHL erfolgte analog. Allerdings wurden in diesem Fall die Primern 24V01 und 25V01 als überlappendes Primerpaar eingesetzt. Nach Ligation des Crossover-PCR-Produktes aus TorA-Signalpeptid und dem reifen Teil der Lipase SHL entstand der Vektor pXR-TorASHL.

Das Hybridprotein TorA^{SP}Cut wurde ebenfalls über Crossover-PCR gewonnen. In diesem Fall wurden die Primer 41V01 und 42V01 als überlappende Primer verwendet und als äußere Primer dienten die Primer 43V01 und 31V01. Als Template zur Amplifizierung des TorA-Signalpeptids wurde der Vektor pBluescriptTorA und zur Amplifizierung des reifen Teils der Cutinase wurde der Vektor pBSMul3-Cut eingesetzt. Nach Ligation des Crossover-PCR-Produktes entstand der Vektor pEX2-TorACut.

Die Hybridlipasen standen im pEKex2-Vektorsystem unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren Promoters P_{tac}. Nachdem die entsprechenden Genkonstrukte sequenziert wurden, wurden sie in den *C. glutamicum* Wildtyp und in die entsprechende Δ tatAC-Mutante dieses Stammes transformiert.

II.5.7 Konstruktion der Plasmide pVW2-tatAC(C.g.), pVW2-tatABC(E.c.), pVW2-tatAC(E.c.), pVW2-tatC

Zur Klonierung des *tatAC*-Operons von *C. glutamicum* wurde genomische *C. glutamicum* DNA (ATCC 13032) eingesetzt und das Operon mit den Primern 70V01 und 71V01 amplifiziert und über die SdaI-Schnittstelle in den pVWex2 Vektor eingefügt. Das entstandene Plasmid pVW2-tatAC(C.g.) wurde nach Sequenzierung in *C. glutamicum* WT-Zellen und in die Δ tatAC-Mutante dieses Stammes transformiert.

Zur Klonierung des *E. coli* *tatABC* Operons in den pVWex2 Vektor wurden die Primer 74V01 und 69V01 eingesetzt und als Template in der PCR-Reaktion diente genomische DNA des *E. coli* Stammes MC4100. Als Schnittstellen zur Einfügung des PCR-Produktes in den Vektor wurden die Pst1 und BamH1 Schnittstellen des Vektors benutzt. Das entstandene Plasmid pVW2-tatABC(E.c.) wurde nach Sequenzierung in *C. glutamicum* WT-Zellen und in die Δ tatAC-Mutante dieses Stammes transformiert.

Das *E. coli* *tatC* Gen wurde analog zur Klonierung des *tatABC* Operons in den Vektor pVWex2 integriert.

Um das artifizielle *E. coli* *tatAC*-Operon in den pVWex2-Vektor zu klonieren, wurden die Primer 69V01 und 74V01 gewählt und als Template der Vektor pHSG575tatAC in die PCR-Reaktion eingesetzt. Auf diesem Vektor befanden sich bereits die *E. coli* *tatA* und *tatC* Gene in Tandem. Der entstandene Vektor pVW2-tatAC (E.c.) wurde sequenziert und zur Transformation von *C. glutamicum* WT und der Δ tatAC-Mutante dieses Stammes eingesetzt.

II.5.8 Konstruktion der Plasmide pVW2-TorD und pVW2-TorDhis

Zur Klonierung des TorD Chaperons wurde das *torD* Gen in einer PCR-Reaktion mit den Primern 51V01 und 52V01 amplifiziert. Um es auch über einen Western-Blot-Nachweis identifizieren zu können, wurde es in einer zweiten Variante mit Hilfe der Primer 51V01 und 61V01 mit einem 6x-His-Tag versehen.

Als Template zur Amplifikation von *torD* diente chromosomale *E.coli* DNA des Stammes MC4100. In diesem Stamm lag das *torD* Gen in der von Mejean *et al.* beschriebenen S46N-Variante vor (Mejean *et al.*, 1994). Nach Amplifikation wurden die PCR-Produkte mit den Restriktionsenzymen Pst1 und BamH1 geschnitten und in die gleichermaßen geschnittenen pVWex2-Vektoren ligiert. Die entstandenen Plasmide pVW2-TorD und pVW2-TorDhis wurden nach Sequenzierung in *C.glutamicum* WT-Zellen transfomiert und durch eine weitere Transformation mit einem der pEKex2-Vektoren kombiniert, die die Gensequenz für ein TorA^{SP}-Hybridprotein enthalten.

II.5.9 Konstruktion der Plasmide pEK2-TorAGFP/TorDhis und pEK2-TorAGFP/TorDINV

Um das *torD* Gen in Tandem hinter die Sequenz des Modellsubstrates TorA^{SP}GFP zu klonieren, wurde über eine PCR-Reaktion die Gensequenz des TorDhis Chaperons ausgehend vom Vektor pVW2-TorDhis mit den Primern 66V01 und 65V01 amplifiziert und über eine EcoR1-Schnittstelle sowohl *in frame* als auch in invertierter Richtung in den EcoR1 geschnittenen Vektor pEK2-TorAGFP ligiert. Auf diese Weise entstanden der Vektor und der Kontrollvektor pEK2-TorAGFP/TorDINV.

Auf dem Kontrollvektor pEK2-TorAGFP/TorDINV liegt die Gensequenz von TorDhis invertiert zur Richtung der Gensequenz von TorA^{SP}GFP vor. Daher kann das auf diesem Vektor befindliche *torD* Gen nicht exprimiert werden. Nach Sequenzierung wurden mit diesen Plasmiden *C.glutamicum* WT-Zellen und *C.glutamicum* Δ tatAC-Zellen transformiert.

II.6 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

II.6.1 Isolierung von Proteinen aus Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen

II.6.1.1 Induktion der Genexpression

Um die Genexpression der heterologen Modellproteine zu induzieren, wurden 2 ml Zellen einer ÜNK 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und anschließend zweimal mit dem Medium, in dem die Zellen induziert werden sollten, gewaschen. Mit der gewaschenen Kultur wurden 5 ml des Induktionsmediums, das entsprechend der Resistenz des Bakterienstammes mit Antibiotika versetzt wurde, angeimpft und 4 h bis 5 h bei der experimentell erforderlichen Temperatur inkubiert. Wenn sich die zu exprimierenden Gene unter der Kontrolle eines induzierbaren Promoters befanden, wurde die Expression durch Zugabe des entsprechenden Induktors gezielt induziert. Während der Xylose-Promotor P_{xy1} von pXR100 mit 0,5% Xylose in *S.carnosus* und *B.subtilis* induziert wurde, wurde der *tac*-Promoter P_{tac} von pEKex2 und pVWex2 in *C.glutamicum* mit 0,5 mM IPTG induziert.

II.6.1.2 Herstellung von *E.coli* Gesamtzellextrakten

Für den Zellaufschluss wurden 2 ml Induktionskultur für 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl 30 mM Tris/HCl, pH 8,0 resuspendiert. Das Zellpellet wurde mit Glaskugeln in der Schwingkugelmühle von Retsch für 10 min bei maximaler Schüttelfrequenz aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (10 min, 13.000 rpm, 4°C) und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Um die Proteine zu denaturieren, wurde der Überstand 1:1 mit 2× SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt.

Probenpuffer für die SDS-PAGE (2-fach konzentriert)

2x SDS-PAGE-Probenpuffer (50 ml)	Bestandteil	Konzentration/ Menge
	Tris/HCl pH 6,5	5,0 ml
	SDS	2,0 g
	Glycerin (87%)	11,4 ml
	DTT	1,6 g
	Bromphenolblau ad 50 ml ddH ₂ O	0,25 %

- **Glaskugeln:** Ø 0,1- 0,25 mm (Fa. Clauss, Nidderau)

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

2 ml der Induktionskultur wurden 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl Lysispuffer resuspendiert. Dem Lysispuffer wurde für den Aufschluss von *B.subtilis* 5 mg/ml Lysozym zugefügt und für den Aufschluss von *S.carnosus* 15µl einer Lysostaphin-Lösung (1mg/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bis 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend 1:1 mit 2× SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt.

Verwendeter Puffer:

- **Lysispuffer:** 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 25 mM MgCl₂, 200 mM NaCl

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

a) Zellaufschluss durch Ultraschall

Von einer *C.glutamicum* Kultur wurden 2 ml abgenommen und für 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Lysispuffer resuspendiert. Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C und 250 rpm inkubiert und anschließend durch Ultraschall (Branson Sonifier 250: Stufe 2, 20 % Amplitude) komplett aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (15300 rpm, 30 min) aus dem Ansatz entfernt, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 100 µl 2x SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C erhitzt.

b) Zellaufschluss durch Schwingkugelmühle von Retsch

Eine alternative und deutlich schnellere Aufschlussmethode ist der Zellaufschluss durch die Schwingkugelmühle von Retsch. Hierzu wurden die abzentrifugierten Zellen in 100 µl 30 mM Tris/HCl (pH 8,0) resuspendiert, Glaskugeln zugegeben und für 20 min bei maximaler Schüttelfrequenz in der Schwingmühle aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4°C), der

Überstand abgenommen, 1:5 mit 5x SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und zur Denaturierung der Proteine 5 min bei 95°C erhitzt.

Probenpuffer für die SDS-PAGE (5-fach konzentriert):

5x SDS-PAGE-Probenpuffer	Bestandteil	Konzentration/ Menge
	Tris/HCl pH 6,8	0,312 M
	SDS	10 %
	Glycerin (87%)	50 %
	DTT	3 %
	Bromphenolblau	0,25 %
		ad ddH ₂ O

- **Lysepuffer:** 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 25 mM MgCl₂; 200 mM NaCl
- **Glaskugeln:** Ø 0,1-0,25 mm (Fa. Clauss, Nidderau)

II.6.2 Aufarbeitung von Kulturüberständen

Zellen aus 2 ml Induktionskultur wurden 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die Proteine aus 1,8 ml des Überstandes mit 200 µl TCA (100%) über Nacht bei 4°C gefällt. Die Proteine wurden 30 min bei 13000 rpm (Eppendorf, 4°C) abzentrifugiert, und das Pellet wurde jeweils einmal mit 100% Aceton und einmal mit 80% Aceton gewaschen. Danach wurde das Pellet getrocknet, in 80 µl Tris 2× Laemmli-Puffer aufgenommen und die Proteine wurden bei 95°C für 10 min denaturiert.

II.6.3 Osmotischer Schock von *E.coli* Zellen

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

Die Zellen wurden in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C angezogen. Mit 700 µl dieser Kultur wurden 50 ml LB-Medium im 500 ml Schüttelkolben angeimpft und bei 37°C für 3 bis 4 Stunden bei 140 rpm inkubiert. Sobald die Kultur eine OD₆₀₀ von 1,1 bis 2 erreicht hatte, wurde ein Kulturvolumen, das einer Gesamt-OD₆₀₀ von 55 entspricht, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 5000 rpm) und in 2,5 ml 30 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 5000 rpm) wurde der Überstand sorgfältig abpipettiert, das Pellet in 40 µl Sucroselösung resuspendiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden 20 µl Lysozym-Lösung dazugegeben, kurz geschüttelt und sofort für 4 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4°C) wurde der Überstand (Periplasmafraktion) in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Pelletfraktion (Spheroplasten) wurde vorsichtig mit 80 µl Sucroselösung abgespült und in 1 ml 30 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert. Nach Zugabe von Glaskugeln wurde die Pelletfraktion 10 min bei maximaler Schüttelfrequenz in der Kugelmühle von Retsch aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 13000 rpm). Der Überstand, bei dem es sich um die Cytoplasma-/Membranfraktion handelte, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration

wurde nach der Methode von (Bradford, 1976) (siehe Kapitel II.6.4) bestimmt. Die Cytoplasma-/Membran- sowie die Periplasmafraktion wurden in 2x SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen.

Lösungen zur Durchführung des osmotischen Schocks in E.coli :

Sucroselösung	Konzentration/ Menge	Lysozym-Lösung	Konzentration/ Menge
Sucrose	20 %	Lysozym	1,0 mg/ml
Tris-HCl	30 mM	EDTA (pH 8,0)	0,1 mM

- **Glaskugeln:** Ø 0,1-0,25mm (Fa. Clauss, Nidderau)

II.6.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde spektrophotometrisch bei $\lambda=595$ nm nach Methode von (Bradford, 1976) bestimmt. Als Standard wurde Rinder-Serum-Albumin (BSA) verwendet.

Verwendete Lösung:

- **Bradford-Lösung:** 100 mg Coomassie Blue G 250 wurden in 50 ml 95% (v/v) Ethanol und in 100 ml 85% (w/v) H₃PO₄ gelöst. Mit ddH₂O wurde diese Lösung auf 1000 ml aufgefüllt, filtriert und in einer lichtundurchlässigen Flasche bei 4°C aufbewahrt.

II.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die Proteine wurden nach ihrer Größe durch eine diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (SDS-PAGE). Um eine höhere Auflösung zu erzielen, wurden bei diesem Verfahren die Proteinproben zunächst in einer Sammelgelschicht konzentriert. Von dort wanderten sie in das eigentliche Trenngel, wo sie dann entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt wurden. Durch das SDS entfalten sich die Proteine und dissoziieren in ihre Untereinheiten, gleichzeitig lagert sich das SDS an die Proteine an und kompensiert alle positiven Oberflächenladungen. Dadurch erhielten die denaturierten Proteine eine annähernd größenproportionale, negative Ladung und wanderten entsprechend ihrer Molekülgröße im elektrischen Feld des Gels. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels lag, wenn nicht anders vermerkt, bei 12,5%. Das Trenngel wurde mit einem 5%igen Sammelgel überschichtet. Die Proben wurden vor dem Auftragen in 2x SDS-Probenpuffer oder 5x-SDS-Probenpuffer aufgenommen und zur Denaturierung 5 min bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in Elektrophorese-Laufpuffer bei einer Feldstärke von 14V/cm für das Sammelgel (ca. 30 min) und bei 20V/cm für das Trenngel (ca. 1,5 h).

Tabelle 2-10: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele:

Trenngel (12,5%) 30 ml	Konzentration/ Menge	Sammelgel (5%) 15 ml	Konzentration/ Menge
Acrylamid: Bisacrylamid (30:0,8)	12,5 ml	Acrylamid: Bisacrylamid (30: 0,8)	2,5 ml
1,5M Tris/HCl (pH 8,8)	7,5 g	1M Tris/HCl (pH 6,8)	1,9 ml
Glycerin (30 %)	9,4 ml	dH ₂ O	10,4 ml
SDS (10%)	300 µl	SDS (10%)	150 µl
APS (10%)	300 µl	APS (10%)	150 µl
TEMED	20 µl	TEMED	10 µl

- **Elektrophorese-Laufpuffer:** 6,08 g/l Tris/HCl (pH 8,8), 28,86 g/l Glycin, 15 ml SDS (10%), ad 1l dH₂O
- **Protein Marker:** Broad Range P7702S (MBI Fermentas, St.Leon-Rot)

II.6.5.1 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Das zu färbende Polyacrylamidgel wurde 1 h in Coomassie-Brilliant-Blue-Lösung geschwenkt und der überschüssige Farbstoff mit Entfärbelösung entfernt. Anschließend wurde das Gel nach mindestens zweistündiger Equilibration in Geltrocknungspuffer nach Anleitung des Herstellers (Gel Drying Frames; Diversified Biotech) im Geltrocknungsrahmen getrocknet.

Verwendete Lösungen:

- **Coomassie-Brilliant-Blue-Lösung:** 1,75 g/l Serva Blau R, 50% Ethanol, 7,5% Eisessig, ad dH₂O
- **Entfärbelösung:** 30% Ethanol, 10% Eisessig
- **Geltrocknungs-Puffer:** 20% Ethanol, 20% Glycerin

II.6.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern (Western Blot)

Die zu untersuchenden Proteine wurden vor der Übertragung auf Nitrozellulosemembranen oder PVDF Membranen im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. PVDF-Membranen wurden zuerst mit 70% Ethanol aktiviert und dann mit Blotting-Puffer equilibriert. Alle verwendeten Filterpapiere (Whatmann 3MM) sowie die Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll, Dassel) wurden vor Gebrauch kurz in Blotting-Puffer getränkt. Das Acrylamidgel wurde ebenfalls für 10 min mit Blotting-Puffer equilibriert.

Die anschließende Übertragung der Proteine auf die PVDF- oder die Nitrozellulosemembran erfolgte für 35 min bei 100 V und 350 mA. Hierfür wurde die Trans-Blot TM Kammer (Biorad) verwendet und der Aufbau nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen 30 min bei 37°C in Blocking-Puffer geschwenkt und einmal mit Wasch-Lösung gewaschen. Danach wurde die Membran für 1 h in Wasch-Lösung, in die ein primärer Antikörper gegen das Zielprotein gegeben wurde, geschwenkt. Zum Entfernen überschüssiger Antikörper wurde die Membran zweimal für 15 min mit der Wasch-Lösung gewaschen. Für den Nachweis der primären Antikörper wurde die Membran mit sekundären Antikörpern, an die alkalische Phosphatase gekoppelt war, inkubiert. Hierzu wurden entweder Anti-Rabbit IgG 1:15000, Anti-Mouse IgG 1:15000 oder Anti-Guinea Pig 1:30000 in der Wasch-Lösung verdünnt. Die Membran wurde 1 h bei 37°C in dieser Lösung inkubiert. Durch zweimaliges Waschen wurden überschüssige, sekundäre Antikörper entfernt. Anschließend wurde die Membran in Entwicklungspuffer 10 min equilibriert. Zum Starten der Phosphatasefarbreaktion wurde die Membran mit 10 ml Entwicklungslösung, die mit 66 µl NBT und 66 µl BCIP versetzt wurde, überschichtet. Sobald die Proteinbanden ausreichend sichtbar waren, wurde die Reaktion durch Waschen der Membran mit 3%iger TCA-Lösung gestoppt.

Als alternative Methode wurde das „ECL Western Blotting Kit“ von Amersham Biosciences (Freiburg) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der sekundäre Antikörper war hierbei an eine „Horseradish Peroxidase“ (HRP) konjugiert. Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz. Mit Hilfe einer CCD-Kamera wurden die Ergebnisse dokumentiert und die Bilder mit Hilfe des Programmes AIDA (Raytest) analysiert. Dadurch wurde eine Quantifizierung der Chemilumineszenz-Signale ermöglicht.

Tabelle 2-11: Übersicht über die im Western Blot verwendeten Antikörper

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Referenz
α -SecA(S.c.)	<i>S.carnosus</i>	1:1000	Dr. K.-L. Schimz
α -SecA (B.s.)	<i>B.subtilis</i>	1:1000	Dr. K.-L. Schimz
α -Cutinase	<i>Fusarium solani</i>	1:1000	diese Arbeit
α -SHL	<i>S.hyicus</i>	1:1000	Dr. K. L. Schimz
α -TalB	<i>E.coli</i>	1:1000	Prof. Dr. G.A. Sprenger, Jülich
α - MtrA	<i>C.glutamicum</i>	1:1000	BioGenes
α -Penta-His		1:1000	(Qiagen, Hilden)
α -TatC (E.c)	<i>E.coli</i>	1:1000	Prof. Dr. M. Müller, Freiburg
α -TSL	<i>Thermyhydrosulfuricus</i>	1:1000	(diese Arbeit)
α -GFP	<i>Aquorea victoria</i>	1:2000	JL-8, BD Biosciences Clontech

Lösungen und Reagenzien für die Western Blot Analyse:

- **Blotting-Puffer:** 6,08 g/l Tris/HCl pH8,8, 28,86 g/l Glycin, ad dH₂O
- **Blocking-Puffer:** 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 0,9% NaCl, 5% Magermilchpulver, ad dH₂O
- **Wasch-Lösung:** 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 0,9% NaCl, 0,5% Magermilchpulver, 0,1% Tween 20, ad dH₂O
- **Entwicklungspuffer:** 100 mM Tris/HCl pH 9,0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂
- **NBT:** 50 mg/ml NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) in 70% Dimethylformamid (DMF)
- **BCIP:** 50 mg/ml BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat) als Toluidin-Salz in 100% DMF

II.6.7 Herstellung polyklonaler Antikörper

Für die Herstellung polyklonaler Antikörper wurde aufgereinigtes Protein (mindestens 700 μ g) verwendet oder das Zielprotein über ein präparatives SDS-Polacrylamidgel isoliert. Für die Isolierung über ein präparatives SDS-Polyacrylamidgel wurde nach Abschätzung der Konzentration über einen BSA-Standard das benötigte Volumen, das mindestens 700 μ g Protein entsprach, auf ein 3 mm dickes SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Coomassie-Färbung des Gels wurde die Bande des gewünschten Zielproteins aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und in 50 ml Falcon-Gefäße gegeben. Nun wurden die Fragmente zweimal vorsichtig mit 20 ml bis 40 ml ddH₂O für je 5 min auf dem Wippschüttler gewaschen, danach zweimal mit 25 ml Triethanolaminacetat Puffer (TEA-Puffer) für je 10 min inkubiert und anschließend jeweils zweimal 10 min mit 25 ml TEA-Puffer mit Harnstoff gewaschen. Nach zweimaligem 10 minütigen Waschen mit TEA-Puffer ohne Harnstoff wurden die intakten Gelfragmente in eine kleine X-Press-Zelle gegeben und für 2 bis 3 Tage bei -25°C gelagert. Dann wurden die Gelfragmente in der X-Press zerkleinert, bis eine einheitliche, breiähnliche Masse entstand. Der Gelbrei wurde anschließend 1:1 mit Freund's Adjuvanz (7 Teile „Incomplete“ und 1 Teil „Complete“, Fa. Sigma) vermengt. Ein Teil dieser Mischung, die mindestens 250 μ g des Zielproteins enthielt, wurde mit einer sterilen Spritze einem Kaninchen injiziert. 5 bis 6 Wochen später erfolgte eine Nachimmunisierung mit mindestens 150 μ g des Zielproteins. Das Serum wurde anschließend auf seine Reaktivität getestet. Bei zu geringer Reaktivität wurde zwei Wochen später erneut mit 150 μ g Protein nachimmunisiert. Bei guter Reaktivität des Serums wurde das Kaninchen ausgeblutet und das Serum lyophilisiert.

Lösungen für die Probenaufarbeitung:

- **Triethanolaminacetat Puffer:** 100 mM Triethanolaminacetat, pH 7,5 mit Acetat eingestellt
- **Triethanolaminacetat Puffer mit Harnstoff:** 100 mM Triethanolaminacetat und 6M Harnstoff, pH 7,5 mit Acetat eingestellt

II.6.8 Zymogramm-Techniken

II.6.8.1 Lipase-Aktivitätsfärbung mit α -Naphthylacetat

Um die Lipase-Aktivität in einem SDS-Proteingel nachzuweisen, wurden die im Gel befindlichen Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet und renaturiert, indem der Blot für eine Stunde in 100 ml Renaturierungspuffer inkubiert wurde. Anschließend wurden die auf der Membran befindlichen Proteine einer Lipase-Aktivitätsfärbung, die auf der Hydrolyse von Naphthylacetat zu α -Naphthol und Essigsäure basierte, unterzogen. Dazu wurden die Proteine zwischen 2 und 15 Minuten in einer Mischung, die aus gleichen Volumina einer α -Naphthylacetat-Lösung und einer Fast Red Lösung bestand, inkubiert. Mit dem Diazoniumsalz (Fast Red TR) bildete das in der Hydrolyse-Reaktion entstandene α -Naphthol einen unlöslichen, roten Azofarbstoff (Higerd und Spizizen, 1973).

Lösungen und Puffer für die Lipase-Aktivitätsfärbung:

- **Renaturierungspuffer:** 100 mM Tris/HCl, 0,5% (v/v) TritonX 100, pH 7,5
- **α -Naphthylacetat-Lösung:** 20 mg α -Naphthylacetat in 5 ml Aceton vermennt mit 45 ml 100 mM Na-Phosphat-Puffer
- **Fast Red-Lösung:** 50 mg FAST RED TR, 50 mL 100 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,5

II.6.8.2 Lipase-Aktivitätsfärbung mit MUF-Palmitat

Um die Lipase-Aktivität direkt in einem SDS-Proteingel nachzuweisen, wurde der UV-Farbstoff 4-Methylumbelliferyl-Palmitat (MUF-Palmitat) eingesetzt (Prim *et al.*, 2003). Bei Hydrolyse dieses Substrates wird Fluoreszenz-Licht emittiert, dass unter einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden kann. Um störendes SDS aus dem Polyacrylamidgel zu entfernen, wurde das Gel bei 30 °C für 30 min mit Renaturierungspuffer inkubiert und danach 3x mal mit Renaturierungspuffer gewaschen. Um die Aktivitätsfärbung der im Gel befindlichen Lipase vorzunehmen, wurde das SDS-Gel für 20 min bei optimaler Reaktionstemperatur mit der MUF-Palmitat-Lösung inkubiert und die Farbreaktion unter einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

Lösungen und Puffer für die Lipase-Aktivitätsfärbung:

- **Renaturierungspuffer:** 100 mM Tris/HCl, 0,5% (v/v) TritonX 100, pH 7,5
- **MUF-Palmitat-Lösung:** 5 mM 4-Methylumbelliferyl-Palmitat in 50mM TRIS-HCl, pH 8,0 und 10% Propanol

II.6.9 Photometrische Lipase-Aktivitätsbestimmung mit *para*-Nitrophenyl-Estern

Die Aktivität der Lipasen wurde mit *para*-Nitrophenyl-Palmitat (pNPP) nach der Methode von (Winkler und Stuckmann, 1979) bestimmt. Dazu wurden zwei Stammlösungen (Lösung A und Lösung B) hergestellt, die kurz vor der Aktivitätsbestimmung vereinigt wurden (Lösung C). Der Aktivitätstest wurde bei einer Reaktionstemperatur von $T_R = 60^\circ\text{C}$ bzw. $T_R = 25^\circ\text{C}$ durchgeführt und durch Zugabe der Enzymlösung (Kulturüberstand) gestartet. Durch Kühlung auf Eis und Zugabe von 100 μl 25%igen Na_2CO_3 wurde die Reaktion gestoppt. Dann wurden die Proben für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und anschließend die Absorption der Probe bei $\lambda = 410$ nm gemessen (Ultrospec 3100 pro, Amersham Pharmacia). Die Inkubationszeit war variabel (von 5 min bis 1h) und wurde der Enzymaktivität angepasst. Die Enzymaktivität wurde mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $e = 12750 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (vgl. Royter, 2006) berechnet. 1 Unit Enzymaktivität wurde als die Enzymmenge definiert, die 1 μmol *para*-Nitrophenol pro Minute freisetzt.

Lösungen für den pNPP-Lipasetest:

Lösung A: 30 mg *pNPP* in 10 ml Isopropanol bei 60°C lösen.

Lösung B: 100 mg Gum Arabicum in 90 ml Tris-HCl-Puffer, (50 mM pH 8,0) bei 60°C lösen

Lösung C: Kurz vor der Lipasezugabe wurden 1 Teil Lösung A und 9 Teile Lösung B zusammengemischt und die Mischung solange geschüttelt, bis sich eine weißliche Emulsion bildete

$$\text{Enzymaktivität (U/ml)} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{1}{d \cdot e} \cdot \frac{V_k}{V_p} \cdot F \quad (\text{Formel zur Berechnung der Aktivität von Lipasen})$$

ΔE	Differenz der Absorption;
Δt	Differenz der Zeit
d	Breite der Küvette (hier: 1 cm)
e	molare Extinktionskoeffizient (cm ² /mol) <u>hier:</u> $e = 12\,750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei pH 8.0
V_K	Volumen der Küvette (hier: 1 ml)
V_P	Probenvolumen in ml
F	Verdünnungsfaktor der Probe

II.6.10 Hochdurchsatz-Screening mit dem Tecan-Pipettierroboter

Um *C. glutamicum* Transformanten mittels eines Hochdurchsatz-Screening-Verfahrens zu identifizieren, die im Kulturüberstand eine erhöhte Lipaseaktivität der Lipase GTL aufwiesen (HTS: High Throughput Screening), wurde ein neues Protokoll entwickelt, um *C. glutamicum* WT-Zellen in 96er Deep-Well-Platten anzuziehen und die Expression der Lipase GTL zu induzieren.

A. Neuentwickeltes Verfahren zur Kultivierung und Induktion von *C. glutamicum* Zellen in Deep-Well-Platten

Zunächst wurden *C. glutamicum* WT-Zellen mit dem Vektor pEK2-TorAGTLhis (mutierte bzw. unmutierte Formen des Vektors) transformiert und auf Tributyrin-Indikatorplatten, die 100 µM IPTG und BHIS als Medium enthielten, ausplattiert.

48h nach Transformation war auf diesen Indikatorplatten die Aktivität der sekretierten Hybridlipase TorA^{SP}GTLhis anhand der Bildung von Höfen um die Transformanten nachweisbar. *C. glutamicum* Zellen, bei denen die Mutagenese zu einem Exportblock geführt hatte, konnten mit Hilfe dieser Indikatorplatten frühzeitig aus dem Screening-Prozess entfernt werden. Im nächsten Arbeitsgang wurden jeweils 88 Zellen, die einen Hof ausgebildet hatten, von den Tributyrin-Indikatorplatten gepickt und in eine sterile 96er-Deep-Well-Platte (DWP) überführt, die pro Well mit 1ml BHIS befüllt war. Der Rest der Deep-Well-Platte wurde für Blindwerte sowie Positiv- und Negativkontrollen reserviert.

In den Deep-Well-Platten wurden die Zellen bei 30°C und 325 rpm über Nacht für 16 h inkubiert. Zur Induktion der Genexpression wurde das Medium der ÜN-Kultur entfernt und durch 1 ml frisches BHIS-Medium, das 0,5 mM IPTG enthielt, ersetzt. Hierzu wurden die Deep-Well-Platten für 20 min bei 2700 rpm in einem Schwenkrotor zentrifugiert. Um die *C. glutamicum* Zellen in dem neuen Medium zu

resuspendieren, wurde das Zellpellet vorsichtig gelöst, indem mehrmals mit einer Mehrkanalpipette das Medium auf- und abgezogen wurde. Nun wurden die Zellen für 4,5h bei 30°C und 325 rpm inkubiert.

Um da Zellwachstum zu bestimmen, wurden ca. 20 µl der Kultur abgenommen, 1:10 in einer 96er Mikrotiterplatte mit Medium verdünnt und anschließend wurde die OD₆₀₀ mit einem Mikrotiterplattenleser bestimmt.

Zur Bestimmung der Menge der sekretierten Enzymspezies wurden die *C.glutamicum* Zellen in den Deep-Well-Platten nach der Induktion erneut bei 2700 rpm für 30 min abzentrifugiert und vom Kulturüberstand wurden jeweils 150 µl abgenommen und in 96er Mikrotiterplatten überführt. Um Unregelmäßigkeiten, die durch das Pipettieren oder Resuspendieren verursacht werden könnten, auszuschließen, wurden die Deep-Well-Platten jedesmal, nachdem sie mit Medium befüllt worden waren, vor und nach Mediumwechsel und nach dem Resuspendieren gewogen. Für eine längerfristige Lagerung der *C.glutamicum* Zellen in den Deep-Well-Platten wurden die Zellen jeweils in 20% Glycerin resuspendiert und bei -20°C gelagert.

B. Bestimmung der photometerischen Aktivität mit dem TECAN-Pipettierroboter nach der Methode von Brockmeier (Brockmeier, 2006)

Um die lipolytische Aktivität des Kulturüberstandes eines jeden Klons zu bestimmen, wurde ein automatisiertes Verfahren mit einem Pipettierroboter (TECAN Workstation Genesis 200 Freedom, Tecan, Crailsheim, Deutschland) eingesetzt. Das Script, nachdem der Pipettierroboter arbeitete, beruhte auf einem Programm, das zur Bestimmung der lipolytischen Aktivität von *B.subtilis* Zellen entwickelt wurde, die die Cutinase von *Fusarium solani pisi* sekretierten. Um die Aktivität der thermostabilen Lipase GTL zu bestimmen, wurde allerdings die Photometertemperatur auf den maximalen Wert des Gerätes von 50°C erhöht. Im ersten Programmteil (Gemini-Script zur Steuerung des Pipettierroboters) wurden 20 µl jedes einzelnen Kulturüberstandes von der Ausgangs-Mikrotiterplatte mit dem entsprechenden Medium (BHIS) 10-fach in einer zweiten Mikrotiterplatte (Tochter-Mikrotiterplatte) verdünnt. Die Zusammenstellung des pNPP-Lipasetests wurde im zweiten Programmteil definiert. Für den Aktivitätstest wurden 20 µl des verdünnten Überstandes mit 180 µl des pNPP-Substrats, das in einem 200 ml Trog bereitgestellt wurde, auf eine dritte Mikrotiterplatte (Assay-Mikrotiterplatte) aufgetragen. In weiteren Verlauf wurde der pNPP-Lipase Assay automatisch mit Hilfe des „Process Manager“ Programms ausgewertet. Dazu transportierte der Roboterarm (ROMA) die Assay-Platte direkt in das auf 50°C für die Aktivitätsbestimmung der Lipase GTL vorgewärmte „Genios“ Spektrophotometer (Tecan, Crailsheim, Deutschland). Die Veränderung der Absorption wurde bei $\lambda = 410$ nm 15 min lang jede Minute bestimmt und dokumentiert.

Verwendete Programme zur Steuerung des Pipettierroboters und zur automatisierten Bestimmung der Enzymaktivität:

- **Gemini Script:** Ulf pNPP1_10 tiptouch_bis_10 Pl.gem
- **Process Manager Programm:** Ulf_PNPP1_10V_Trog200

III. ERGEBNISSE

III.1 ETABLIERUNG VON SEKRETIONSSYSTEMEN ZUR GEWINNUNG VON THERMOSTABILEN LIPASEN AUS EXTREMOPHILEN BAKTERIEN

Thermostabile Lipasen wie die Lipase GTL aus *Geobacillus thermoleovorans* sind biotechnologisch relevante Enzyme, die in der Feinchemie anstelle von chemischen Katalysatoren zur Umsetzung von langkettigen Fettsäuren unter hohen Temperaturen eingesetzt werden können (De Greyt, 2004).

Um diese Proteine mit einer hohen Ausbeute und Qualität zu gewinnen, müssen mesophile Produktionssysteme etabliert werden. Denn eine Produktion von thermostabilen Enzymen in ihren extremophilen Ursprungsorganismen kommt aufgrund der besonderen Kultivierungsbedingungen, die einen großen finanziellen und technischen Aufwand erfordern, häufig nicht in Frage.

Eine Möglichkeit, diese biotechnologisch relevanten Proteine mit vergleichsweise niedrigen Aufarbeitungskosten zu gewinnen, ist die sekretorische Proteingewinnung in Gram-positiven Bakterien wie *B.subtilis* oder *S.carnosus*. Gram-positive Bakterien verfügen über eine Cytoplasmamembran, die von einer kompakten, 20 nm bis 80 nm dicken Peptidoglykan-Zellwand umgeben ist, durch die extrazelluläre Proteine nach erfolgter Translokation und Prozessierung wie durch ein molekulares Sieb hindurch diffundieren können. Auf diese Weise können rekombinante Proteine selektiv in einer potentiell löslichen Form im Kulturüberstand angereichert werden. Aufarbeitungsschritte, die bei einer intrazellulären Proteingewinnung anfallen, wie ein mechanischer oder chemischer Zellaufschluss oder eine Produktreaktivierung aus Einschlusskörpern, entfallen hierdurch.

In Gram-positiven Bakterien können prinzipiell zwei Hauptsekretionswege für eine sekretorische Proteingewinnung eingesetzt werden. Über den Sec-Weg werden Proteine unter ATP-Verbrauch in einer ungefalteten Konformation durch einen wenige Å breiten Translokationskanal hindurch geschleust, so dass die Faltung in eine aktive Konformation erst nach Translokation erfolgt. Dieser Sekretionsweg wird bereits seit vielen Jahrzehnten für eine biotechnologische Gewinnung von industriellen, zumeist homologen Enzymen erfolgreich eingesetzt. Bei Proteinen, die sich nach der Translokation nur schlecht oder falsch falten, führt eine Sekretion über diesen Weg jedoch häufig zu geringen Produktausbeuten.

Eine neuartige Option für die Gewinnung dieser Proteine stellt die Sekretion über den Tat-Weg dar. Bei diesem Sekretionsweg handelt es sich um einen zweiten, nicht essentiellen Sekretionsweg, der vor circa einem Jahrzehnt in Chloroplasten identifiziert wurde und über den auch zahlreiche Gram-positive Bakterien verfügen. Die Besonderheit dieses Sekretionsweges ist, dass über ihn Proteine in einem gefalteten Zustand über die Cytoplasmamembran transloziert werden. In Abhängigkeit eines Protonengradienten passieren Proteine, die sich bereits im Cytoplasma vollständig gefaltet und assembliert haben, einen Translokationskanal mit variablem Durchmesser von ca. 30Å bis 70Å. Dieser Sekretionsweg wird im Gegensatz zur Sekretion über den Sec-Weg bisher nicht kommerziell zur Proteingewinnung eingesetzt. Eine Ursache hierfür ist, dass die Sekretion von rekombinanten Proteinen über diesen Weg kaum optimiert worden ist.

Da thermostabile Lipasen bisher nicht sekretorisch in Gram-positiven Bakterien gewonnen worden sind, ist ein Ziel dieser Arbeit, die Sec- und die Tat-abhängige Sekretion dieser Lipasen in Gram-positiven Bakterien zu evaluieren und ein Tat-abhängiges Sekretionssystem zu identifizieren, das für eine Optimierung der Tat-abhängigen Sekretion eines thermostabilen Modellenzym eingesetzt werden kann. Um ein geeignetes Wirtssystem und einen geeigneten Sekretionsweg für die Sekretion ausfindig zu machen, wurden nach dem "Tool-Box-Prinzip" verschiedene Hybridproteine und Sekretionssysteme untersucht (siehe Abbildung 3-01).

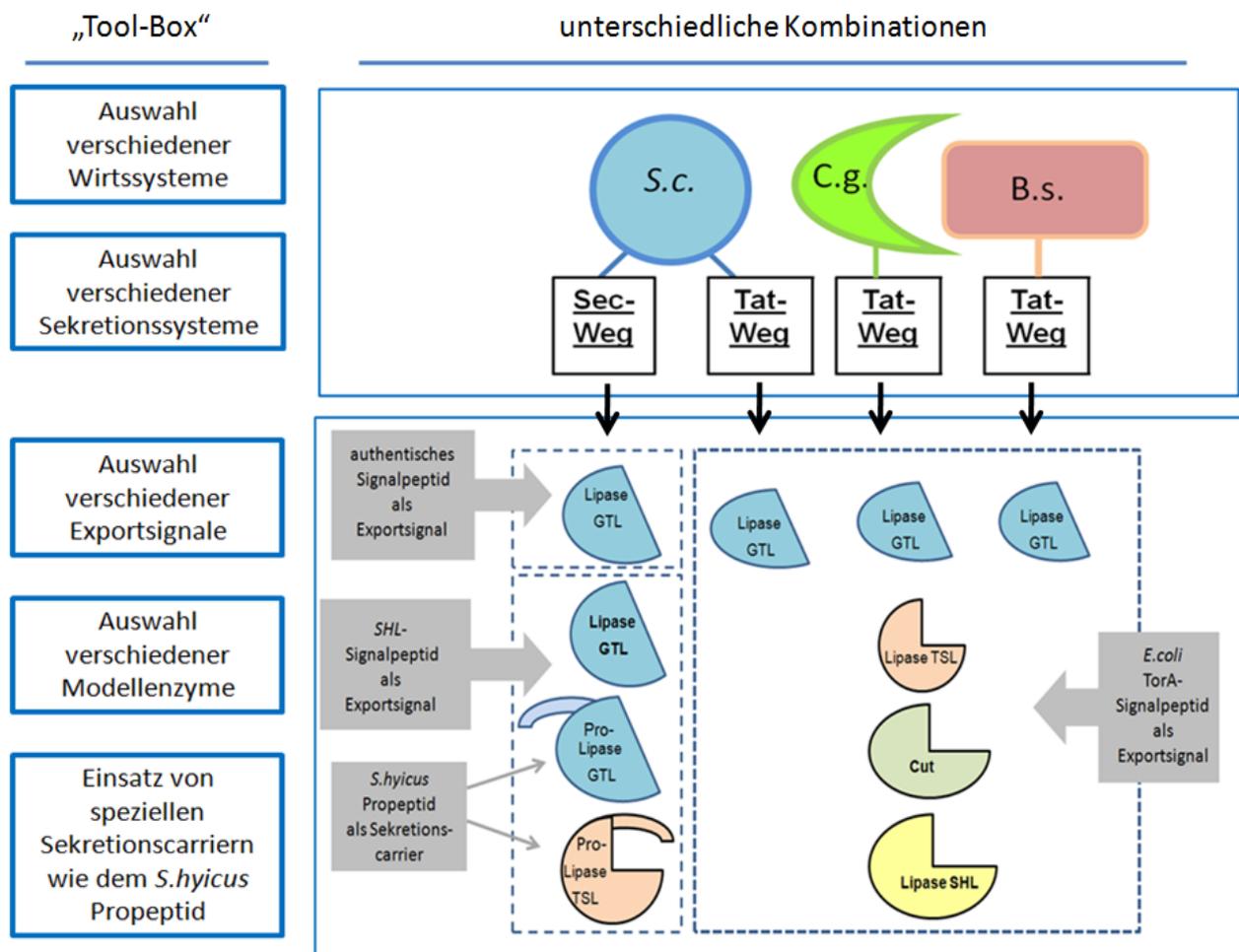


Abbildung 3-01: Schematische Darstellung des Tool-Box-Prinzips, das zur Etablierung der sekretorischen Gewinnung von verschiedenen Modelllipasen eingesetzt worden ist

Um die beste Kombination aus Wirtssystem, Sekretionsweg, Signalpeptid und rekombinantem Modellenzym zu finden, werden aus einer Tool-Box unterschiedliche Wirtssysteme, Sekretionswege, Exportsignale, Modellenzyme oder Sekretionscarrier miteinander kombiniert. In diesem Fall wurden die extrazelluläre Lipase GTL und die intrazelluläre Lipase TSL als Modellenzyme ausgewählt, als Sekretionscarrier diente das Propeptid der *S.hyicus* Lipase (SHL). Als Signalsequenz für den Sec-Weg wurde das Signalpeptid der *S.hyicus* Lipase ausgewählt und im Fall der extrazellulären Lipase GTL auch das authentische Signalpeptid eingesetzt. Um einen Tat-abhängigen Export in verschiedenen Wirtssystemen zu etablieren, wurde das Signalpeptid der *E.coli* TMAO Reduktase (TorA) eingesetzt. Dieses Signalpeptid wurde auch mit der Cutinase Cut und der Lipase SHL kombiniert. Als Wirtssysteme wurden die Gram-positiven GRAS-Organismen *B.subtilis* (*B.s.*), *C.glutamicum* (*C.g.*) und *S.carnosus* (*S.c.*) eingesetzt.

Als thermostabile Modellenzyme wurden die extrazelluläre Lipase GTL aus *Geobacillus thermoleovorans* IHI-91 und die intrazelluläre Lipase TSL aus *Thermoanaerobacter tengcongensis* eingesetzt. In Tabelle 3-01 sind charakteristische Eigenschaften dieser thermostabilen Enzyme zusammengefasst, die als rekombinante Enzyme in *E.coli* von Dr. S. Markossian (TU Hamburg-Harburg) und Dr. M. Royter (TU Hamburg-Harburg) kloniert und charakterisiert wurden.

Tabelle 3-01: Eigenschaften der thermostabilen Modelllipasen TSL und GTL

LIPASE	zelluläre Lokalisation	MG [kDa]	max. Aktivität			Spezifische Aktivität des aufgereinigten Proteins in <i>E.coli</i>
			T _{opt.}	pH	Substrat (TAGs)	
Lipase GTL	extrazellulär [Signalpeptid: 28 AS, SignalP 3.0]	ca. 46	60°C	8,5	C16-C18	42 U/mg (pNPL, 65°C) [*] Nach Aufreinigung konnte dieses Protein nicht als Monomer durch eine SDS-PAGE visualisiert werden.]
Lipase TSL	intrazellulär	ca. 29	75°C	7,5	C8	10,91 U/mg (pNPP; pH 8,0; 70°C)

Zu *) Anmerkungen: Da die Lipase GTL wie die nahe verwandte Lipase aus *Geobacillus thermocantenuatus*, mit der sie 97% identisch ist (NCBI BLAST 2 SEQUENCES), eine starke Agglomerationsneigung besitzt, konnte sie als rekombinantes Enzym in *E.coli* nicht als Monomer aufgereinigt werden (persönliche Mitteilung Dr. S. Markossian, TU Hamburg-Harburg). Außerdem konnte in Experimenten, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, beobachtet werden, dass dieses Enzym nicht durch 8 M Harnstoff denaturierbar ist und wie viele thermostabile Lipasen eine hohe Langzeitstabilität besitzt (vgl. Turner *et al.*, 2007).

III.1.1 Etablierung der Sec-abhängigen Sekretion von thermostabilen Lipasen

Zur Etablierung der Sekretion über den Sec-Weg wurde *S.carnosus* als heterologes Wirtssystem ausgewählt. Dieses Bakterium besitzt GRAS-Status und ist frei von extrazellulären Proteasen, so dass es gut für eine sekretorische Gewinnung von Proteinen geeignet ist (De Kathen und Pickardt, 2005; Freudl, 2005).

Die Zellwandpassage von rekombinanten Proteinen stellt jedoch einen bekannten Engpass in diesem Bakterium dar (Meens *et al.*, 1997). Die Anwesenheit zellwandassoziiierter Proteasen führt dazu, dass heterologe Proteine nach erfolgter Translokation in der Zellwand abgebaut werden und nur in geringen Mengen in den Kulturüberstand gelangen. Ist jedoch das Propeptid der *S.hyicus* Lipase (Lipase SHL) als Sekretionscarrier im heterologen Zielprotein anwesend, kommt es nach der Sec-abhängigen Translokation zu einer beschleunigten Zellwandpassage. Dies führt dazu, dass das Zeitfenster zur Interaktion mit den Zellwand assoziierten Proteasen verringert ist, so dass das sekretierte Protein in erhöhten Mengen im Kulturüberstand angereichert werden kann (Meens *et al.*, 1997). Das Propeptid der Lipase SHL ist in zahlreichen Hybridproteinen bereits erfolgreich als Sekretionscarrier eingesetzt worden (Dilsen *et al.*, 2000; Meens *et al.*, 1997; Samuelson *et al.*, 1999).

Daher wurde zunächst untersucht, ob diese Strategie auch für die Sec-abhängige Sekretion der Lipasen TSL und GTL eingesetzt werden kann. Zu diesem Zweck wurden Genfusionen mit der Sequenz des Prepro-Peptids der Lipase SHL und der Sequenz des reifen Teils der Lipase GTL bzw. der Sequenz der

Lipase TSL vorgenommen, so dass die Genfusionen *pproTSL* und *pproGTL* entstanden. Die Klonierungsstrategien, die zur Fusionierung dieser Hybridproteine eingesetzt wurden, sind in Abbildung 2-02 dargestellt und in Kapitel II.5 beschrieben. Die Genfusionen wurden in *S.carnosus* plasmidkodiert unter Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promotors gestellt (siehe Abbildung 3-02).

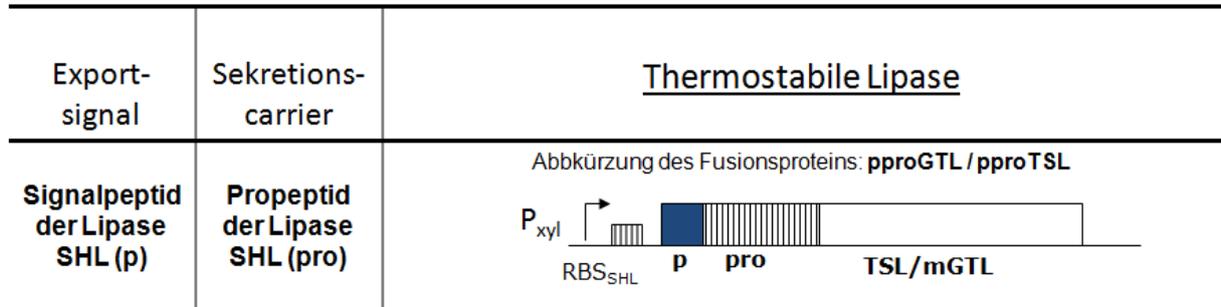


Abbildung 3-02: Schematische Darstellung der Genfusionen der Lipase GTL bzw. TSL mit der Gensequenz des Prepro-Peptids der *S.hyicus* Lipase (Lipase SHL)

Dargestellt ist der Promoter P_{xyl} , der in *S.carnosus* die Xylose-induzierbare Genexpression erlaubt, gefolgt von der Ribosomenbindungsstelle der Lipase SHL (RBS_{SHL});
 Abk.: p (= Signalsequenz der Lipase SHL), ppro (= Prepropeptid der Lipase SHL), pro (=Propeptid der Lipase SHL), mGTL (= reifer Teil der Lipase GTL), TSL (= Lipase TSL)

III.1.1.1 Die Fusionslipase pproTSL ist instabil und wird sowohl intra- als auch extrazellulär stark proteolytisch abgebaut

Um zu untersuchen, ob die Fusionslipase *pproTSL* in *S.carnosus* exprimiert und Sec-abhängig sekretiert wurde, wurden Western-Blot-Assays durchgeführt und eine Fraktionierung in Kulturüberstandsfraction (Ü) und Gesamtzellextrakt (GZ) vorgenommen. Zur Lokalisierung des Fusionsproteins wurden zwei Antikörper eingesetzt. Der Antikörper α -proSHL erkennt das Propeptid im Fusionsprotein und der in dieser Arbeit hergestellte Antikörper α -TSL reagierte spezifisch mit der Lipase TSL im Fusionsprotein (Abbildung 3-03).

In Abbildung 3-04 sind die Western-Blot-Assays dargestellt, die zur Detektion des Fusionsproteins mit diesen Antikörpern durchgeführt wurden. Spezifische Banden, die durch den α -TSL Antikörper und den α -proSHL Antikörper detektiert wurden, zeigen, dass das Fusionsprotein *pproTSL* in *S.carnosus* exprimiert wurde (Abbildung 3-04 B und C). Eine Größenbestimmung dieser Banden deutete allerdings darauf hin, dass es sich bei den detektierten Fragmenten um Abbauprodukte des Fusionsproteins handeln musste. Denn aufgrund des stark hydrophilen Charakters des *S.hyicus* Propeptids ($GRAVY > -1$) besitzt das Vorläuferprotein, das eine theoretische Größe von 55 kDa besitzt, ein abnormales Laufverhalten im SDS-Gel. Daher war wie im Fall der *S.hyicus* Lipase damit zu rechnen, dass das Vorläuferprotein eine apparente Größe besitzen würde, die um ca. 20 kDa größer sein würde, als die theoretisch berechnete. In der Fraktion des Gesamtzellextrakts konnte jedoch weder mit dem α -TSL noch mit dem α -proSHL Antikörper ein Vorläuferprotein mit der geforderten Größe festgestellt werden. Stattdessen wurden cytosolische Abbauprodukte nachgewiesen, die sowohl spezifisch für die Lipase TSL als auch für das Propeptid waren (Abbildung 3-04 B und C).

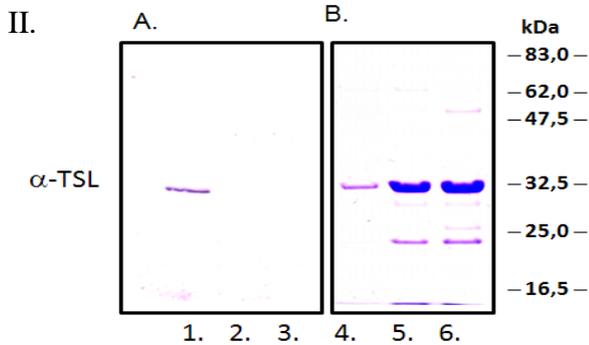
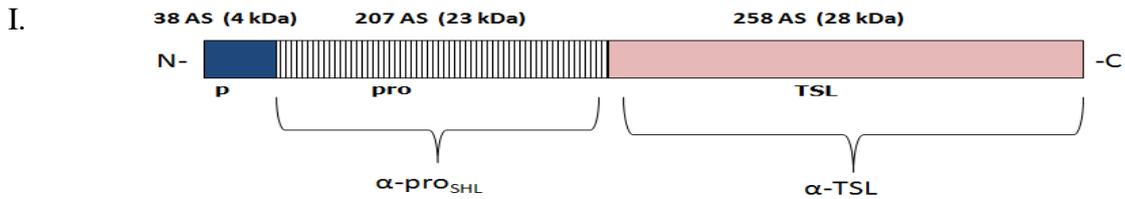


Abbildung 3-03 I: Schematische Darstellung des Hybridproteins pproTSL
Gezeigt ist der Bereich (in Klammern), an den jeweils die polyklonalen α-proSHL Antikörper und die in dieser Arbeit hergestellten, polyklonalen α-TSL Antikörper binden können.

Abbildung 3-03 II A.: Western-Blot zum Nachweis der Reaktivität des in dieser Arbeit hergestellten α-TSL Antikörpers

Spur 1: aufgereinigtes TSL-Protein, identisch mit der in Spur 4 aufgetragenen Probe; Spur 2: *S.carnosus* pXR100 (Gesamtzellextrakt); Spur 3: *S.carnosus* pXR100 (Überstand)

B.: SDS-PAGE der Proteinaufreinigung der Lipase TSL

Spur4-6: Fraktionen der Proteinaufreinigung der rekombinanten *E.coli* Lipase TSL. Die Fraktionen in Spur 5 und 6 zeigen neben der 32,5 kDa großen Lipase TSL auch verschiedene Abbauprodukte dieser Lipase

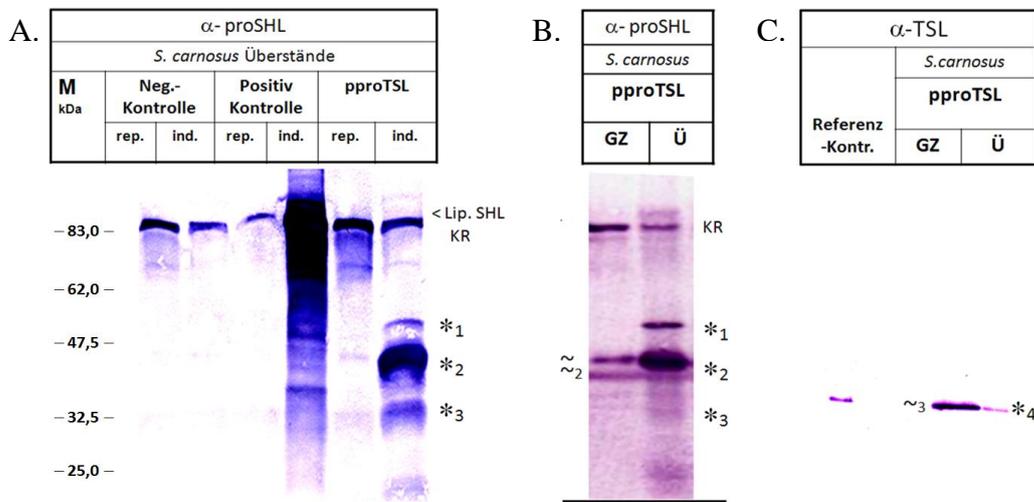


Abbildung 3-04: Untersuchung von Abbauprodukten des pproTSL Hybridproteins im *S.carnosus* WT Stamm pXR-pproTSL (pproTSL) durch Western-Blot-Analyse

Die Trennung und Aufarbeitung der Proteinproben erfolgte wie im Kapitel 2.6.1 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion (GZ) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD600 von 0,8 und die im Überstand (Ü) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD600 von 1,6. Als Negativkontrolle diente der Stamm *S.carnosus* pXR100 und als Positivkontrolle der Stamm *S.carnosus* pXR-pproSHL-23.

A.-C.: Untersuchung von Abbauprodukten der Hybridlipase pproTSL

A. Untersuchung der Überstandsfraktion der Hybridlipase pproTSL in *S.carnosus* nach Induktion (ind.) und Repression (rep.) mit dem α-proSHL,

B. Untersuchung des Gesamtzellextraktes und der Überstandsfraktion nach Induktion mit dem Antikörper α-proSHL,

C. Untersuchung des Gesamtzellextraktes und der Überstandsfraktion mit dem Antikörper α-TSL

Repression der Genexpression (rep.) durch 0,5% Glucose, Induktion der Genexpression (ind.) durch 0,5% Xylose.

Auch in der Überstandsfraction wurde kein Fragment detektiert, das der theoretischen Größe des Hybridproteins nach Abspaltung des Signalpeptids entsprach. Nach Sekretion verbleibt das Propeptid der *S.hyicus* Lipase im heterologen Fusionsprotein und wird nicht abgespalten, da in *S.carnosus* die entsprechende Protease fehlt, die hierfür in *S.hyicus* verantwortlich ist.

Daher war im Kulturüberstand bei erfolgreicher Sekretion des Fusionsproteins pproTSL mit einer Bande zu rechnen, die ein apparentes Molekulargewicht von weit über 52 kDa besitzt. Banden dieser Größe wurden nicht in der *S.carnosus* Überstandsfraction nachgewiesen. Stattdessen wurden verschiedene, extrazelluläre Abbaubanden detektiert. Eine Bande von ca. 40 kDa, die mit dem α -proSHL Antikörper nachgewiesen wurde, stellte das Hauptabbauprodukt des Hybridproteins in der Überstandsfraction dar (Abbildung 3-04 A und B).

Auffällig war dabei, dass mit dem α -proSHL Antikörper neben dieser Bande auch eine Abbaubande nachgewiesen wurde, die eine Größe von 46 kDa besaß (Abbildung 3-04 A und B, Markierung:*¹). Diese Bande war größer als alle Abbaubanden, die in der Gesamtzellfraction detektiert wurden. Daher war dies ein Indiz dafür, dass die Fusionslipase pproTSL in *S.carnosus* zwar sekretiert wurde, jedoch in ihrer Proteinstruktur nach Translokation nicht stabilisiert werden konnte und extrazellulär abgebaut wurde. Demnach wurde die Lipase TSL als Fusionsprotein zwar sekretiert, unterlag aber sowohl einem starken cytosolischen als auch extrazellulären Abbau. Die quantitative Bestimmung der Lipaseaktivität mit *para*-Nitrophenylpalmitat (pNPP) unterstützte dieses Ergebnis (siehe Abbildung 3-05). Das Hybridprotein aus *S.hyicus* Prepro-Peptid und der Lipase TSL (pproTSL) zeigte weder im Kulturüberstand noch in der Gesamtzellfraction eine signifikante Aktivität an. Dies belegte, dass keine aktiven Enzymspezies vorlagen und somit keine aktive Konformation des Hybridproteins, das das *S.hyicus* Propeptid enthielt, ausgebildet werden konnte. Die Anwesenheit des Propeptids am N-Terminus des Fusionsproteins interferierte offenbar mit einer korrekten Faltung.

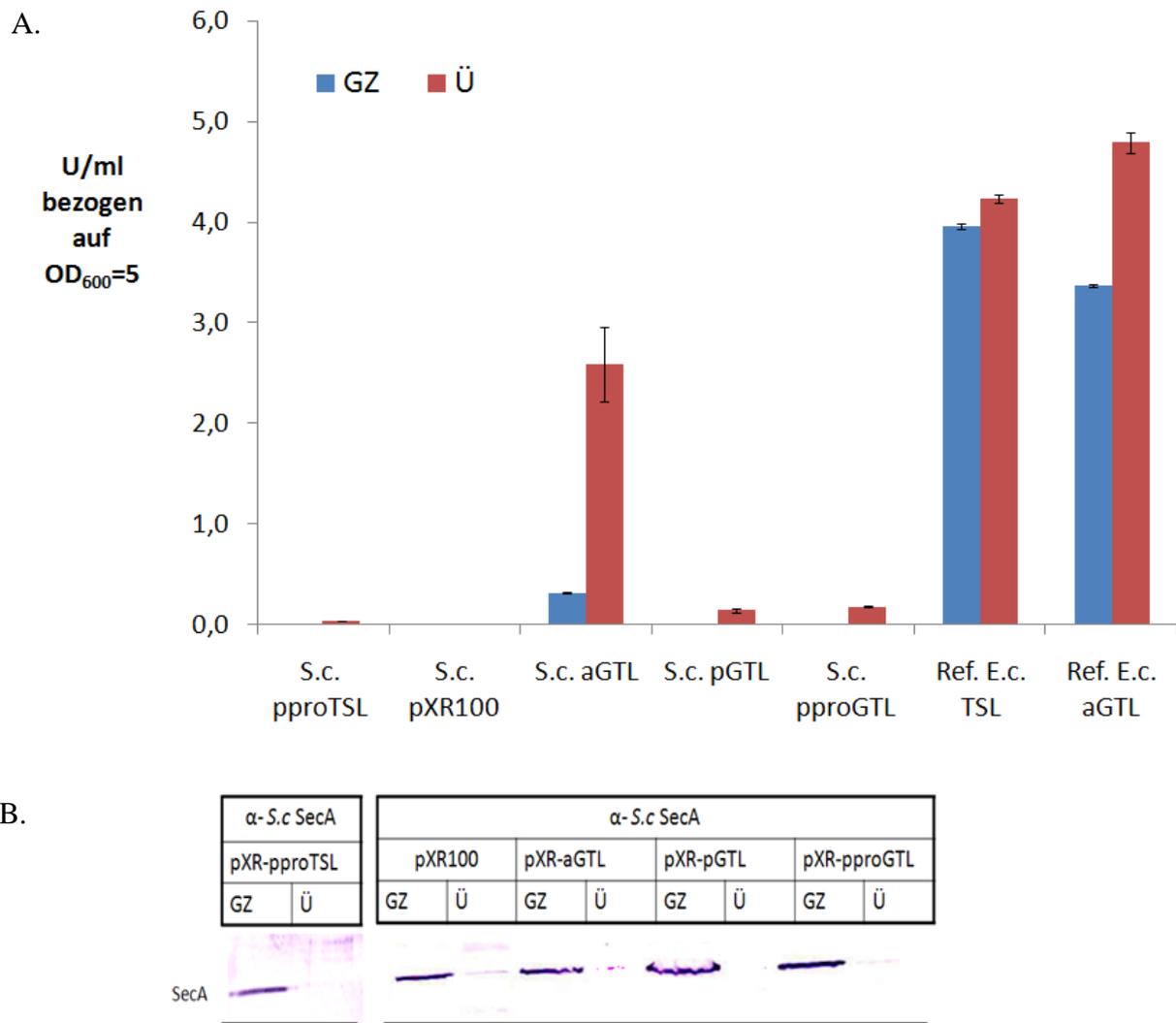


Abbildung 3-05: A. Bestimmung der hydrolytischen Aktivität von *S.carnosus* WT Stämmen, die Genfusionen der Lipase GTL und TSL sowie die plasmidkodierte Lipase aGTL exprimierten

Als Standardsubstrat wurde *para*-Nitrophenylpalmitat (pNPP) eingesetzt und als Standard für die Reaktionsbedingungen wurde pH 8,0 und T= 60°C gewählt (vgl. Tabelle 3-01 und Abbildung 3-19). Der Aufschluss der *S.carnosus* Zellen zum Gesamtzellextrakt (GZ) erfolgte mit Lystostaphin wie unter Kapitel II.6.1 beschrieben. Die hydrolytischen Aktivitäten, die für den Gesamtzellextrakt (GZ) und den Kulturüberstand (Ü) bestimmt wurden, wurden auf eine optische Dichte $OD_{600} = 5$ bezogen. Bei den Proben Ref. *E.c.* TSL und Ref. *E.c.* aGTL handelte es sich um Referenzproben, d.h. *E.coli* (JM109) Stämme, die die Lipasen GTL und TSL exprimierten. Die Induktion der Genexpression erfolgte in diesen Stämmen mit 1 mM IPTG. Die Induktion der Genexpression in den *S.carnosus* Stämmen erfolgte mit 0,5% Xylose. Die Bestimmungen der photometrischen Aktivität wurde in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt und die Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben.

Abk.: pproTSL (= *S.carnosus* pXR-pproTSL), pproGTL (= *S.carnosus* pXR-pproGTL), pGTL (= *S.carnosus* pXR-pGTL), aGTL (= *S.carnosus* pXR-aTSL). Anmerk.: Die Proben zeigen aufgrund der Überexpression der Lipasen, dass aktive Lipase aus dem Zellinnern wie im Fall der cytosolischen Lipase TSL oder aus dem Periplasma in den Kulturüberstand gelangt war.

B.:Überprüfung des Vorliegens von Zellyse mittels Western-Blot-Nachweis

Als Kontrollprotein wurde das cytoplasmatische und membranständige SecA-Protein eingesetzt und eine Fraktionierung der *S.carnosus* Stämme in Kulturüberstand (Ü) und Gesamtzellfraktion (GZ) vorgenommen. Die Trennung und Aufarbeitung erfolgte wie im Kapitel II.6.1 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD_{600} von 0,5. Die im Kulturüberstand aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD_{600} von 1. Als Kontrolle diente der Stamm *S.carnosus* pXR100.

III.1.1.2 Die Fusionslipase proGTL wird zwar effizient sekretiert, ist aber kaum aktiv

Wie im Fall des Fusionsproteins proTSL wurde im quantitativen Aktivitätstest für das Fusionsprotein proGTL weder eine signifikante Enzymaktivität im Kulturüberstand noch im Gesamtzellextrakt nachgewiesen (siehe Abbildung 3-05), so dass auch in diesem Fall keine Enzymspezies mit einer enzymatisch aktiven Konformation vorlag. Um Ursachen hierfür zu finden, wurde eine Lokalisation dieses Fusionsproteins mittels Western-Blot-Nachweis vorgenommen. Da das Propeptid der *S.hyicus* Lipase in *S.carnosus* nicht abgespalten wird, kann es in der Überstandsfraction durch den α -proSHL Antikörper detektiert werden. Die prozessierte Form dieses Fusionsproteins besitzt aufgrund des stark hydrophilen Charakters des Propeptids eine apparente Größe von ca. 90 kDa. Wie in Abbildung 3-06 zu erkennen, konnte in der Überstandsfraction eine Bande mit der Größe des prozessierten Vorläuferproteins nachgewiesen werden. In der Gesamtzellfraktion konnte zudem weder die Akkumulation von Vorläuferproteinen noch von Abbauprodukten festgestellt werden (siehe Abbildung 3-06 II). Dies lässt auf eine sehr effiziente Translokation des Fusionsproteins proGTL schließen. Jedoch war der Anteil der Bande, der mit der Größe der prozessierten Form der Lipase proGTL übereinstimmte, im Vergleich zur Gesamtmenge der detektierten Banden nur gering. Der Hauptteil der Fragmente wurde von Abbauprodukten mit einer Größe von ca. 65 kDa gebildet (Abbildung 3-06 II). Dies erklärt, warum die Fusionslipase proGTL im quantitativen Assay nur eine geringfügig erhöhte Aktivität aufwies. Demnach wurde die Fusionslipase proGTL in *S.carnosus* effizient transloziert, konnte sich aber nach erfolgter Translokation nur schlecht in eine aktive Konformation falten und wurde als falsch gefaltetes Protein abgebaut. Möglicherweise störte das im Fusionsprotein verbliebene Propeptid der *S.hyicus* Lipase bei der Faltung in eine aktive Konformation.

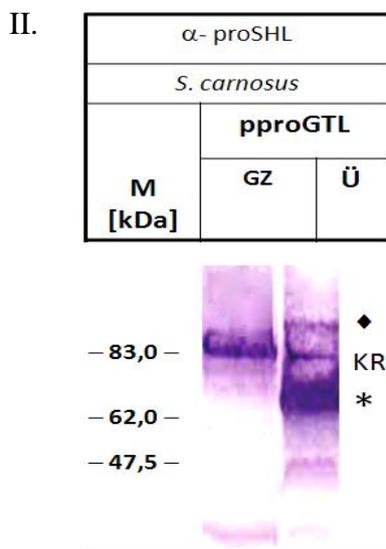
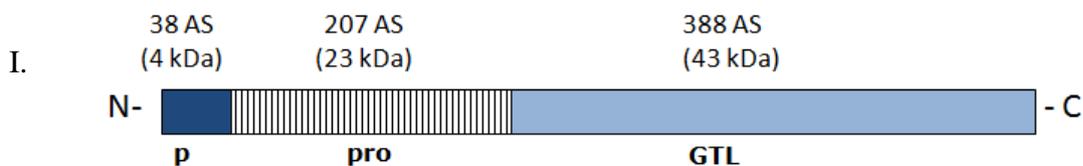


Abbildung 3-06:

I. Schematische Darstellung des Hybridproteins proGTL

An das 38 Aminosäuren (AS) umfassende Signalpeptid der Lipase SHL (p) schließt sich ein 207 AS langes, stark hydrophiles Propeptid dieser Lipase an (pro). Die Lipase GTL besitzt eine Größe von 388 AS und schließt *in frame* an das Prepro-Peptid der Lipase SHL an.

II: Untersuchung der Sekretion der Hybridlipase proGTL mittels Western-Blot-Nachweis

Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen erfolgte wie in den Kapiteln 2.6.1 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion (GZ) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,8 und die im Überstand (Ü) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1,6.

Abk.: KR (= unspezifische Kreuzreaktion), ♦ (= prozessiertes Hybridprotein), * (= extrazelluläres Abbauprodukt)

III.1.2 Die Fusionslipase pGTL besitzt nur eine geringfügig erhöhte Aktivität in *S.carnosus*

Da im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde, dass durch Anwesenheit des Propeptids im Fusionsprotein der Lipase GTL zwar eine effektive Sekretion erzielt werden konnte, jedoch keine Faltung in eine enzymatisch aktive Konformation stattfand, wurde als Nächstes untersucht, ob die Signalsequenz der Lipase SHL bereits ausreichend ist, eine effektive Sekretion in *S.carnosus* zu vermitteln. Denn durch Experimente von Samuelson *et al.* 1999 konnte gezeigt werden, dass Proteine, die effizient als *S.hyicus* Prepro-Peptidfusion transloziert werden, auch mit dem Signalpeptid der *S.hyicus* Lipase alleine in *S.carnosus* transloziert werden können.

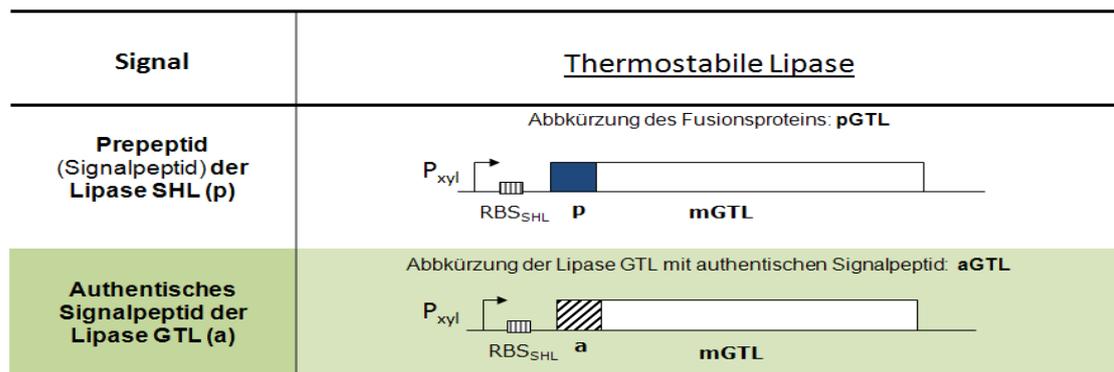


Abbildung 3-07: schematische Darstellung der Genfusion aus Signalsequenz der Lipase SHL und dem reifen Teil der Lipase GTL (pGTL) und der Lipase GTL mit ihrem authentischen Signalpeptid (aGTL)

Dargestellt ist der Promoter P_{xyl} , der in *S.carnosus* die Xylose-induzierbare Genexpression erlaubt, gefolgt von der Ribosomenbindungsstelle der Lipase SHL (RBS_{SHL}); Abk.: p (= Signalsequenz der Lipase SHL), a (= Signalsequenz der Lipase SHL), mGTL (= reifer Teil der Lipase GTL)

Zu diesem Zweck wurde wie in Abbildung 3-07 dargestellt das Hybridprotein pGTL hergestellt (Beschreibung der Klonierungsstrategie siehe Kapitel II. 5). Diese Genfusion bestand aus dem *S.hyicus* Signalpeptid und der Gensequenz des reifen Teils der Lipase GTL. In *S.carnosus* wurde dieses Genkonstrukt unter Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promoters exprimiert. Die Sekretion dieser Lipase wurde aufgrund des Fehlens eines Antikörpers indirekt mittels Agardiffusionsassay überprüft (siehe Abbildung 3-08). Anhand der Bildung eines Hofes rund um eine Bakteriensuspension, die auf eine Indikatorplatte mit Tributyrin oder Tween80 als Lipasesubstrat aufgetropft wird, kann bei diesem Nachweisverfahren auf die Anwesenheit sekretierter Enzymformen geschlossen werden. Sowohl auf Tributyrin als auch auf Tween80 als Lipasesubstrat war die Bildung von Höfen rund um die aufgetropften Bakterienzellen sichtbar. Es kann daraus geschlossen werden, dass das Hybridprotein pGTL in *S.carnosus* exprimiert und auch sekretiert wurde (siehe Abbildung 3-08). Der quantitative Aktivitätstest mit pNPP als Substrat zeigte nur eine geringfügige Erhöhung der hydrolytischen Aktivität gegenüber der Leervektorkontrolle (*S.c.* pXR100) (siehe Abbildung 3-05). Möglicherweise ist es hier wie im Fall der pproGTL Fusion zu einem verstärkten Abbau durch zellassoziierte Proteasen gekommen.

I.

Stamm	Tween80 Xyl	Tributyryn Xyl
<i>S.c.</i> pXR-pGTL (pGTL)	A. (+)	B. (+)
<i>S.c.</i> pXR-aGTL (aGTL)	C. (+)	D. (+++)

II.

Abbildung 3-08: Untersuchung der Sekretion der Lipase pGTL und aGTL durch Agardiffusionsassays

Um die unterschiedlichen Substratspezifitäten der Lipasen TSL und GTL abzudecken, wurden zwei unterschiedliche Substrate eingesetzt: Tributyrin als Substrat für Lipasen, die langkettige Triacylglycerole bevorzugen, und das Detergent Tween 80 als Substrat für Enzyme mit einer Stellung zwischen Esterase und Lipase (Plou *et al.*, 1998). Bei der hydrolytischen Spaltung von Tributyrin, das im Agar als Emulsion vorliegen muss, entsteht ein klarer Hof um die aufgetropfte Bakteriensuspension, wenn eine Lipase exprimiert wird, während bei der hydrolytischen Spaltung von Tween 80 ein weißliches Präzipitat, das aus Oleaten besteht, entsteht, wenn eine Esterase oder eine Lipase exprimiert wird. Die Genexpression wurde in *S.carnosus* Zellen, die mit Derivaten des pXR100-Vektors transformiert wurden, mit 0,5% Xylose im LB-Nährboden induziert. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Ausbildung von hydrolytischen Höfen nach Auftropfen von *S.carnosus* Übernachtskulturen gleicher OD₆₀₀ und nach 24h Inkubation bei 37°C.

(I. Tabellarische Ergebnisse, drei Versuche, II. Abbildung von Agardiffusionsassays)

Bezeichnung der Proben: A. (= *S.carnosus* WT transformiert mit pXR-pGTL, Tween 80 als Substrat), B. (= *S.carnosus* WT transformiert mit pXR-pGTL, Tributyrin als Substrat), C. (= *S.carnosus* WT transformiert mit pXR-aGTL, Tween 80 als Substrat), D. (= *S.carnosus* WT transformiert mit pXR-aGTL, Tributyrin als Substrat)

Abk.: + (=Ausbildung eines kleinen Hofes, um die aufgetropfte Bakteriensuspension nach 24 h),

+++ (= Ausbildung eines sehr großen Hofes, um die Bakteriensuspension nach 24 h).

III.1.3 Die Lipase aGTL wird zu einem signifikanten Anteil in den Kulturüberstand von *S.carnosus* sekretiert

Da die Lipase GTL nicht als Hybridprotein mit dem Signalpeptid oder dem Prepro-Peptid der *S.hyicus* Lipase in einer aktiven Konformation gewonnen werden konnte, wurde als weitere Option untersucht, ob das authentische, 28 AS lange Signalpeptid der Lipase GTL eine signifikante Sekretion dieser Lipase in *S.carnosus* vermitteln kann. Zu diesem Zweck wurde die Lipase GTL mit ihrem authentischen Signalpeptid in den pXR100 Vektor umkloniert und mit der Ribosomenbindestelle der Lipase SHL versehen (siehe Abbildung 3-07, 2-02 und Kapitel II.5).

Nach Vorhersage mit dem SignalP3.0 Programm handelte es sich bei dem Signalpeptid der Lipase GTL um eine typische Sec-abhängige Signalsequenz (siehe Abbildung 3-09). Diese Signalsequenz ist ca. 10 Aminosäuren kürzer als das Signalpeptid der *S.hyicus* Lipase. Im Vergleich zum *S.hyicus* Signalpeptid weist sie eine verkürzte N- und C-Region auf, während die H-Region etwa gleich lang ist (siehe Abbildung 3-09). Der hydrophobe Bereich besitzt mit einem GRAVY-Wert* von +2,2 eine höhere Hydrophobizität als der hydrophobe Bereich der *S.hyicus*-Lipase (GRAVY-Wert +1,8).

* GRAVY-Wert: Der GRAVY-Wert eines Peptids oder eines Proteins berechnet sich aus der Summe aller Hydrophobizitäts-Werte einer Aminosäure nach Kyte und Doolittle, 1982, geteilt durch die Anzahl der Aminosäuren. Positive GRAVY-Werte kennzeichnen hydrophobe Peptide oder Proteine, negative Werte sind Merkmale hydrophiler Aminosäuresequenzen.

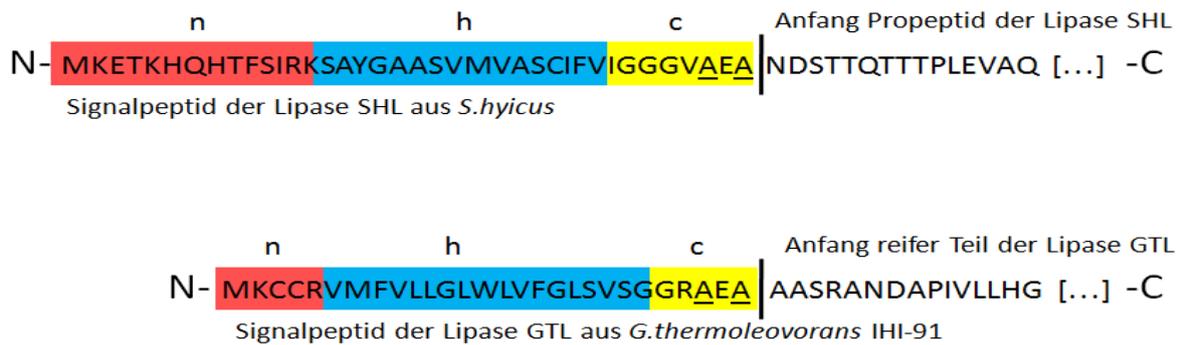


Abbildung 3-09: Schematische Darstellung der Signalsequenz und des Übergangsbereichs zum Propeptid der Lipase SHL (oben) und der Signalsequenz sowie der Anfang des reifen Teils der Lipase GTL (unten)

Die Schnittstelle der Signalpeptidase (schwarzer Strich) sowie die Lage der N-Region (n), H-Region (h) und der C-Region (c) wurden mit Hilfe der Software SignalP3.0 bestimmt. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Die Aminosäuren an den Positionen -1 und -3 relativ zur Signalpeptidase-Spaltstelle der beiden Signalsequenzen sind unterstrichen dargestellt. Für die Lipase SHL sind die ersten 15 Aminosäuren (AS) des Propeptids nach der Signalpeptidaseschnittstelle abgebildet und für die Lipase GTL sind die ersten 15 AS des reifen Teils aufgeführt.

Unterschiede in den Signalsequenzen führen dazu, dass die Effizienz des Translokase-Targetings, die Interaktion mit der Sec-Translokase und die Signalpeptid Abspaltung stark von Signalpeptid zu Signalpeptid variieren (Hedge, 2006). Da die Signalpeptide des Sec-Weges jedoch einen universellen, dreigliedrigen Aufbau aufweisen, sind sie zumeist über Artengrenzen hinweg gegenseitig austauschbar (Gierasch, 1989). Jedoch ist aufgrund der Unterschiede in den Signalsequenzen nicht prognostizierbar, inwieweit ein Signalpeptid wie das der Lipase GTL geeignet ist, eine Sekretion in einem heterologen Wirtssystem wie *S.carnosus* zu vermitteln.

Die Untersuchung der Sekretion dieser Lipase mit Agardiffusionsassays und mit dem quantitativen Aktivitätstest zeigte, dass die Lipase GTL in Gegenwart ihres authentischen Signalpeptids in *S.carnosus* in signifikanten Mengen sekretiert werden konnte (siehe Abbildung 3-05 und Abbildung 3-08). Wie Abbildung 3-08 zeigt, bildete die Lipase aGTL auf Tributyrin als Substrat besonders große Höfe aus. Im quantitativen Lipasetest betrug die Aktivität der Lipase in der Überstandsfraction ca. 2,6 U/ml und war damit annähernd so hoch wie die Aktivität, die für die *E.coli* Referenzprobe bestimmt wurde (siehe Abbildung 3-05). Eine Lysiskontrolle mit dem membrangebundenen und cytosolischen *S.carnosus* SecA-Protein zeigte, dass es sich bei den im Aktivitätstest bestimmten Aktivitäten um sekretierte Enzymspezies im Überstand handelte. Denn bei einem Western-Blot-Nachweis, bei dem die Lokalisation des SecA-Proteins im Gesamtzellextrakt und im Überstand untersucht wurde, konnte nur in der Gesamtzellfraction, nicht aber in der Überstandsfraction das SecA-Protein nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3-05 B). Diese Ergebnisse zeigten also, dass die Lipase GTL in *S.carnosus* in Gegenwart ihres eigenen

Signalpeptids Sec-abhängig gewonnen werden konnte und somit ein guter Kandidat für eine weitergehende Optimierung der sekretorische Gewinnung über den Sec-Weg ist.

Neben der hohen Aktivität von 2,6 U/ml, die in der Überstandsfraktion für diese Lipase gemessen wurde, fiel auf, dass auch im Gesamtzellextrakt eine geringfügig erhöhte enzymatische Aktivität von ca. 0,3 U/ml gegenüber der Leervektorkontrolle festgestellt werden konnte. Dies war ein Indiz dafür, dass sich ein Teil der Enzympopulation der Lipase GTL in Gegenwart des authentischen Signalpeptids bereits im Cytosol in eine aktive Konformation gefaltet hatte. In der gefalteten Konformation konnten diese Proteine nicht mehr über den Sec-Weg transloziert werden und akkumulierten in der Zelle.

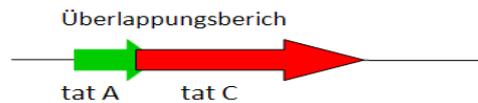
Die Sec-abhängige Translokation der Lipase GTL mit ihrem authentischen Signalpeptid in *S.carnosus* zeigte also drei Dinge: Erstens entscheidet die spezifische Kombination von Sec-Signalpeptid und Fusionsprotein, ob eine Sekretion möglich ist. Zweitens ist eine Sec-abhängige Translokation dieser Lipase GTL mit ihrem eigenen Signalpeptid möglich, so dass sie in *S.carnosus* biotechnologisch gewonnen werden kann. Und drittens besitzt die Lipase GTL die Fähigkeit, sich bereits intrazellulär zu falten. Daher ist dies ein Indiz dafür, dass die Lipase GTL eine hohe intrinsische Faltungstendenz besitzt und möglicherweise als gefaltetes Protein über den Tat-Weg gewonnen werden kann.

III.1.4 Etablierung der TAT-abhängigen Sekretion der Modelllipase GTL in verschiedenen Wirtssystemen

Grundvoraussetzung für eine Tat-abhängige Sekretion eines Zielproteins ist seine intrazelluläre Faltung. Besitzt ein Protein eine unvollständig oder falsch gefaltete Konformation, kann es nicht über den Tat-Weg exportiert werden, da dies durch eine Inkompatibilität mit der Tat-Translokase oder durch eine intrinsische Qualitätskontrolle der Tat-Translokase verhindert wird (Bruser und Sanders, 2003; DeLisa *et al.*, 2003; Richter *et al.*, 2007).

Die vorangegangenen Experimente mit der Lipase GTL und ihrem authentischen Signalpeptid hatten gezeigt, dass die Lipase GTL eine starke intrinsische Faltungstendenz besitzt, die dazu führte, dass sich bereits ein Teil der Enzympopulation der Lipase GTL intrazellulär in eine aktive Konformation faltete. Da die Lipase GTL somit ein wichtiges Kriterium des Tat-abhängigen Exportes erfüllte, wurde als Nächstes untersucht, ob die intrinsische Faltungstendenz dieser Lipase für einen Tat-abhängigen Transport ausgenutzt werden kann. Zu diesem Zweck wurde sie mit dem *E.coli* TorA-Signalpeptid als Exportsignal versehen und der Tat-abhängige Export der Lipase GTL in verschiedenen Gram-positiven Wirtssystemen untersucht. Als Wirtssysteme wurden *S.carnosus*, *C.glutamicum* und *B.subtilis* gewählt. Die Tat-Systeme in diesen Gram-positiven Bakterien unterscheiden sich immens, wie in Abbildung 3-10 zu sehen ist. Während die Tat-Translokasesysteme von *B.subtilis* und *S.carnosus* dem TatAC-Typus angehören, zählt das Tat-Translokasesystem von *C.glutamicum*, wie das Tat-Translokasesystem von *S.lividans* und *E.coli*, zum TatABC-Typus (siehe Abbildung 3-10).

I: *S. carnosus* TatAC- System



II: *B. subtilis* doppeltes TatAC-System



III: *C. glutamicum* Tat ABC-System



IV: *E. coli* Tat ABC-System



Abbildung 3-10: Schematische Darstellung der Genloci von Tat-Systemen in den Gram-positiven Bakterien *S. carnosus* (I), *B. subtilis* (II) und *C. glutamicum* (III) im Vergleich zum Gram-negativen Modellorganismus *E. coli* (IV)

Dargestellt sind die *tat*-Gene des *tatAC*-Operons in *S. carnosus*. Der Translationsstartpunkt des *tatC* Gens überlappt in einem Bereich von 52 bp mit dem *tatA* Gen. In *B. subtilis* befinden sich die *tat(AC)_D* und die *tat(AC)_Y* Gene jeweils in einem Operon und bilden zwei unabhängige Minimal-Tat-Translokasen. Zusätzlich existiert noch ein *tatA_C* Gen auf einem weiteren Genort. In *C. glutamicum* besteht das Tat-System ähnlich wie in *E. coli* aus TatA/E, TatB und TatC Membranproteinen. Jedoch bilden in *C. glutamicum* die *tatA* und *tatC* Gene ein Operon. Die *tatB* und *tatE* Gene befinden sich auf unabhängigen Genorten [vgl. EBI-Datenbank: Integr8(<http://www.ebi.ac.uk/integr8/EBI-Integr8-HomePage.do>)].

Ein weiterer Punkt, in dem sich die verschiedenen Wirtssysteme voneinander unterscheiden, ist die Ausstattung mit intrazellulären Chaperon- und Qualitätskontrollsystemen und deren Regulation. Die Interaktion mit diesen Systemen beeinflusst die Sekretionseffizienz des rekombinanten Zielproteins ebenso wie die Interaktion mit dem Tat-System des Wirtssystems.

Ein weiterer Faktor, der die Translokation beeinflussen kann, ist der Zellwandaufbau. Einer Abschätzung zufolge sind in *B. subtilis* globuläre, hydrophile Proteine mit einer Größe von 25 bis 50 kDa in der Lage, die Zellwand durch Diffusion zu passieren, vorausgesetzt die Zellwand enthält Poren mit einem Durchmesser von 4 nm (Demchick und Koch, 1996). Merkmal der Zellwand von Staphylokokken ist ihr hoher Vernetzungsgrad. Die Zellwand von *C. glutamicum* ist hingegen besonders komplex aufgebaut und wird von einem Zellwandpolymerkomplex gebildet, der aus Peptidoglykan, Arabinogalaktan und Mykolsäuren besteht. Wie extrazelluläre Proteine diese Schicht durchdringen, ist bisher nicht geklärt (Bayan *et al.*, 2003).

Als Exportsignal wurde das Signalpeptid der *E.coli* TMAO-Reduktase gewählt. Dieses Signalpeptid ist in der Lage über Artengrenzen hinweg in verschiedensten Gram-positiven Bakterien einen Tat-abhängigen Transport zu vermitteln (Meissner *et al.*, 2007; Schaerlaekens *et al.*, 2001; Thiemann *et al.*, 2006). So konnte durch das *E.coli* TorA-Signalpeptid sowohl in *S.lividans* als auch in *S.carnosus*, *B.subtilis* und *C.glutamicum* ein Tat-abhängiger Transport von rekombinanten Proteinen erzielt werden.

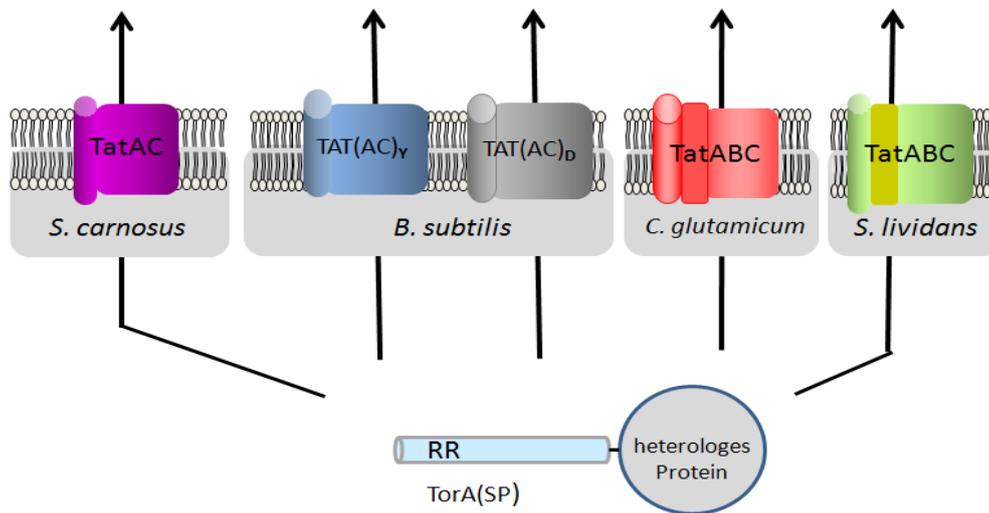


Abbildung 3-11: Das Signalpeptid der *E.coli* TMAO-Reduktase ist kompatibel mit verschiedenen Gram-positiven Wirtssystemen

Dargestellt sind die Tat-Translokasesysteme von *S.carnosus*, *B.subtilis*, *C.glutamicum* und *S.lividans* sowie ein Hybridprotein mit einer TorA-Signalsequenz. Aufgrund der Fusion mit dem TorA-Signalpeptid kann dieses Hybridprotein über den Tat-Weg von verschiedenen Gram-positiven Bakterien sekretiert werden.

III.1.4.1 In *S.carnosus* als Wirtssystem wird die thermostabile Lipase GTL Tat-abhängig sekretiert

Wie *Staphylococcus aureus* verfügt *S.carnosus* über eine TatAC-Minimaltranslokase. Bisher ist die physiologische Bedeutung des Tat-Weges in Staphylokokken nicht geklärt und authentische Tat-Substrate wurden nicht identifiziert. Heterologe Tat-Substrate wie Fusionen aus *E.coli* TorA-Signalpeptid und Enzymen aus *Anaerobranca gottschalkii* (Branching Enzyme BE, Cyclodextrin-Glycosyltransferase CGTase) konnten jedoch Tat-abhängig in *S.carnosus* transloziert werden, wenn auch die Sekretionseffizienz für die in den Überstand gelangten Proteine aufgrund eines Engpasses in der Zellwandpassage äußerst gering war (Meissner, 2005; Vollstedt, 2004).

Um die Tat-abhängige Sekretion der Lipase TorA^{SP}GTL zu untersuchen, wurde zunächst wie im Kapitel II.5. beschrieben eine Genfusion, die für das *E.coli* TorA-Signalpeptid und den reifen Teil der Lipase kodiert, vorgenommen. Anschließend wurden *S.carnosus* WT-Zellen sowie eine *S.carnosus* *AtatC*-Mutante mit dem Plasmid pXR-TorAGTL transformiert, das diese Genfusion trug. Bei der *AtatC*-Mutante von *S.carnosus* wurde durch Deletion ein 400 bp großer Genbereich des *tatC* Gens aus dem *S.carnosus* Bakteriengenom deletiert, so dass der essentielle TatC-Rezeptor der *S.carnosus* Tat-Translokase inaktiviert wurde (Meissner, 2005).

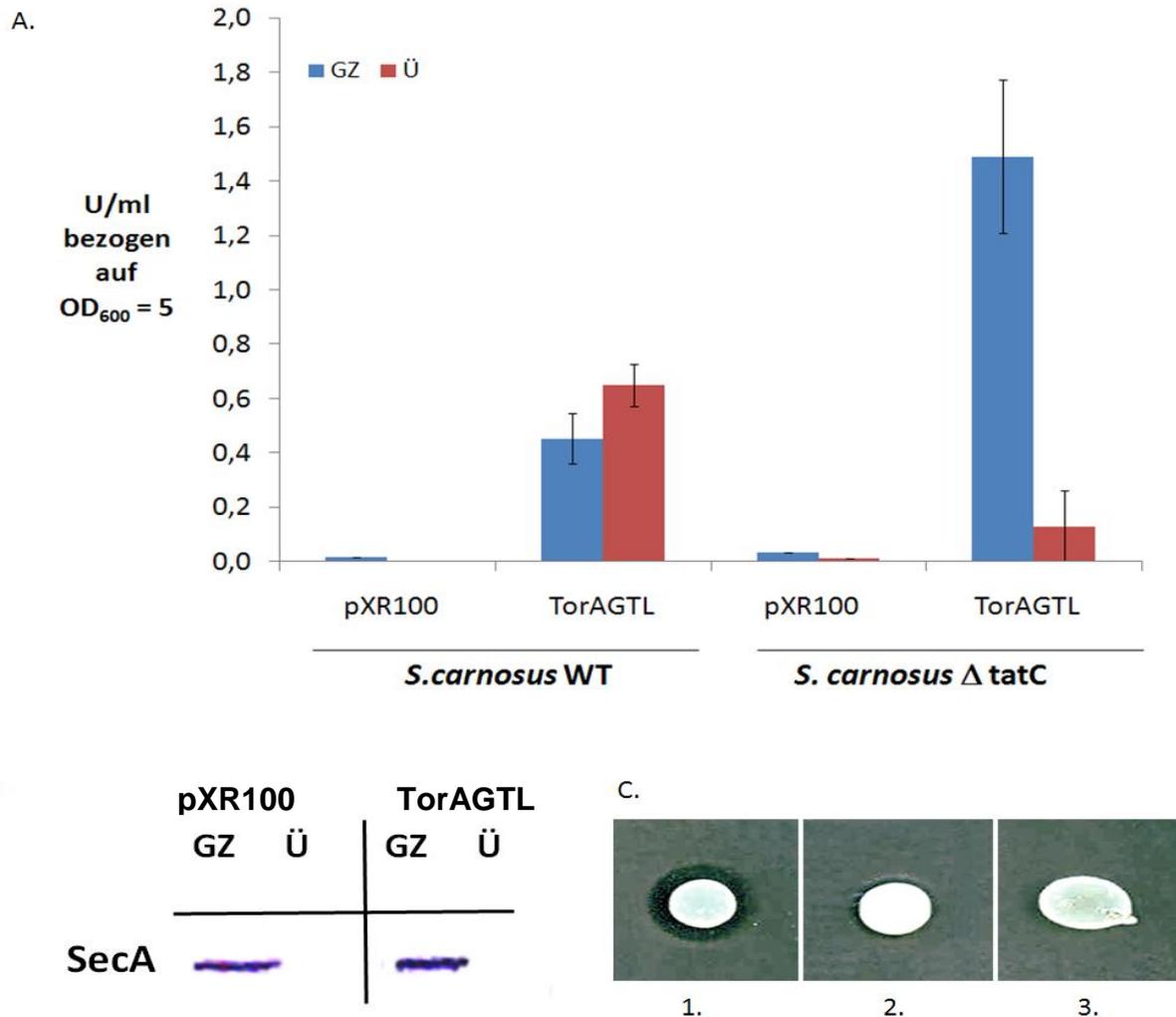


Abbildung 3-12: A. Bestimmung der hydrolytischen Aktivität von *S. carnosus* WT und *S. carnosus* Δ tatC-Mutante, die die Lipase GTL als Hybridprotein mit dem *E. coli* TorA-Signalpeptid exprimieren

Fraktionierung in Gesamtzellextrakt (GZ) und Überstand (Ü). Die hydrolytische Aktivität wurde mit pNPP als Substrat bestimmt (T= 60°C, pH 8,0). Der Aufschluss der *S. carnosus* Zellen zum Gesamtzellextrakt (GZ) erfolgte mit Lysostaphin wie unter Kapitel II.6.1 beschrieben. Die hydrolytischen Aktivitäten, die für den Gesamtzellextrakt (GZ) und den Zellüberstand bestimmt wurden, wurden auf eine OD₆₀₀= 5 bezogen. Die Induktion der Genexpression in den *S. carnosus* Stämmen erfolgte mit 0,5% Xylose.

Kultivierung nach Induktion: 4h, 130 rpm, 37°C. Die Bestimmung der hydrolytischen Aktivität erfolgte in drei unabhängigen Versuchen. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

B.: Überprüfung des Vorliegens von Zellyse mittels Western Blot

Als Kontrollprotein wurde das cytoplasmatische und membranständige SecA-Protein eingesetzt und eine Fraktionierung der *S. carnosus* WT Stämme in Kulturüberstand (Ü) und in Gesamtzellfraktion (GZ) vorgenommen. Die Trennung und Aufarbeitung erfolgte, wie im Kapitel II.6.1 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5 und die im Überstand aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1. Als Kontrolle diente der Stamm *S. carnosus* WT pXR100.

C.: Nachweis der Tat-abhängigen Sekretion der Hybridlipase TorA^{SP}GTL in *S. carnosus* WT durch einen Agardiffusionsassay mit Tributyrin als Substrat

Hierbei erfolgte die Induktion der Genexpression durch 0,5% Xylose im LB-Nährboden. Gezeigt sind die Ergebnisse nach Auftropfen von *S. carnosus* Übernachtskulturen gleicher OD₆₀₀ und nach 24 h Inkubation bei 37°C. Abk.: 1. (= *S. carnosus* WT pXR-TorAGTL), 2. (= *S. carnosus* Δ tatC pXR-TorAGTL), 3. (= *S. carnosus* WT pXR100)

Die Aktivität der sekretierten, thermostabilen Lipase GTL wurde mit einem Agardiffusionsassay, der Tributyrin als Substrat enthielt, bestimmt. Wie in Abbildung 3-12C zu sehen, war die Ausbildung eines klaren Hofes im Stamm *S.carnosus* WT pXR-TorAGTL erkennbar. Dies war ein Indiz dafür, dass die Lipase GTL von den *S.carnosus* WT-Zellen exprimiert und sekretiert wurde.

Bei der Expression der TorA^{SP}GTL Fusion in der *AtatC*-Mutante war hingegen keine signifikante Hofbildung nachweisbar. Dies zeigte, dass die Lipase GTL Tat-abhängig in *S.carnosus* sekretiert wurde. Durch einen quantitativen Aktivitätstest mit pNPP als Substrat wurde dieses Ergebnis bestätigt (siehe Abbildung 3-12 A). Während im *S.carnosus* WT eine signifikant erhöhte Lipaseaktivität in der Überstandsfraction von ca. 0,7 U/ml nachweisbar war, war in der Deletionsmutante, bei der das TatC-Protein inaktiv war, die lipolytische Aktivität in der Überstandsfraction stark vermindert (> 0,05 U/ml). Gleichzeitig wurde in dieser Mutante eine stark erhöhte Aktivität im Gesamtzellextrakt festgestellt (ca. 0,4 U/ml). Offenbar kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation der Lipase GTL, da sie in der Deletionsmutante über den Tat-Weg nicht mehr effektiv sekretiert werden kann.

Ein Austritt der Lipase durch Zellyse konnte ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 3-12 B). Denn ein Western-Blot-Assay, bei dem das cytosolische als auch membrangebundene SecA-Protein als Kontrollprotein eingesetzt wurde, zeigte, dass das SecA-Protein nur im Gesamtzellextrakt lokalisiert wurde, nicht aber in der Überstandsfraction. Damit wurde gezeigt, dass die Lipase TorA^{SP}GTL Tat-abhängig in *S.carnosus* sekretiert wird und mit einer signifikanten Aktivität von ca. 0,7 U/ml im Kulturüberstand nachgewiesen werden kann. Die Aktivität der über den Tat-Weg sekretierten Lipase betrug ca. ein Viertel der Aktivität, die für die Sekretion dieser Lipase über den Sec-Weg bestimmt wurde (2,6 U/ml). Demnach handelt es sich bei der Lipase GTL um ein rekombinantes Protein, das in signifikanten Mengen auch über den Tat-Weg dieses Bakteriums gewonnen werden kann.

III.1.4.2 *In B.subtilis als Wirtssystem verursacht die Expression der thermostabilen Lipase TorA^{SP}GTL eine Zellyse*

Wie viele Bacillus-Arten verfügt *B.subtilis* über sehr wenige Tat-Substrate. Bisher sind nur das PhoD-Protein und das YwbN Protein experimentell als Tat-Substrate belegt. Diese Tat-Substrate werden spezifisch von zwei unabhängigen Tat-Minimaltranslokasen transloziert. Über die TatA_DC_D-Minimaltranslokase wird die alkalische Phosphatase PhoD sekretiert und über die TatA_YC_Y-Minimaltranslokase wird der putative Peroxidase-Vorläufer YwbN transloziert (Jongbloed *et al.*, 2004). Die Expression dieser Tat-Systeme und Tat-Substrate ist in *B.subtilis* stark reguliert. Das *phoD* Gen sowie die *downstream* gelegenen Gene der TatA_DC_D-Minimaltranslokase werden nur unter Phosphatmangel translatiert, während das YwbN Protein in der späten exponentiellen Phase exprimiert wird. Im Gegensatz zu diesen homologen Substraten konnte das rekombinante TorA^{SP}GFP Hybridprotein ohne Spezifität für eines der beiden Tat-Translokase-Systeme in *B.subtilis* exportiert werden (Meissner, 2005).

Daher wurde im Folgenden untersucht, ob auch die TorA^{SP}-Hybridlipase TorA^{SP}GTL in *B.subtilis* Tat-abhängig sekretiert werden kann. Zu diesem Zweck wurde dieses Hybridprotein in den *B.subtilis* Stämmen Teb1030, bei dem die beiden *B.subtilis* Lipasen LipA und LipB deletiert sind, im *B.subtilis* WT-Stamm 168 sowie im Tat-Deletionsstamm *B.subtilis* 168 $\Delta\text{tat}(AC)_D(AC)_Y$ exprimiert. Bei der Expression dieser Lipase unter Kontrolle des auf dem pXR-Vektor befindlichen P_{xyI}-Promotors in *B.subtilis* zeigte sich jedoch, dass zwar sehr hohe Enzymaktivitäten in den Kulturüberständen festgestellt wurde, diese aber auf einer Lyse der Zellen beruhten (siehe Abbildung 3-13 A und B). Denn die Western-Blot-Nachweise, die zur Kontrolle durchgeführt wurden, zeigten, dass das normalerweise im Gesamtzellextrakt lokalisierte SecA-Protein auch im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 3-13 B). Bei einer alternativ durchgeführten Klonierung in ein Vektorsystem, das den konstitutiven P_{HpaII} Promotor enthielt, wurden keine Transformanten erhalten. Dies war ein weiteres Indiz dafür, dass die Anwesenheit der enzymatisch, aktiven Lipase GTL die Integrität der *B.subtilis* Zellen störte.

Ein ähnlicher Effekt ist bereits in der Literatur belegt. Bei der Expression der Lipase aus *Geobacillus stearothermophilus*, die auf Aminosäureebene zu 95% mit der Lipase GTL identisch ist (NCBI BLAST), wurde eine Lyse von *E.coli* Zellen festgestellt (Bell *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002).

Aus diesen Versuchsergebnissen konnte geschlossen werden, dass sich *B.subtilis* als Produktionssystem für eine Tat-abhängige Produktion der thermostabilen Lipasen GTL nicht eignet.

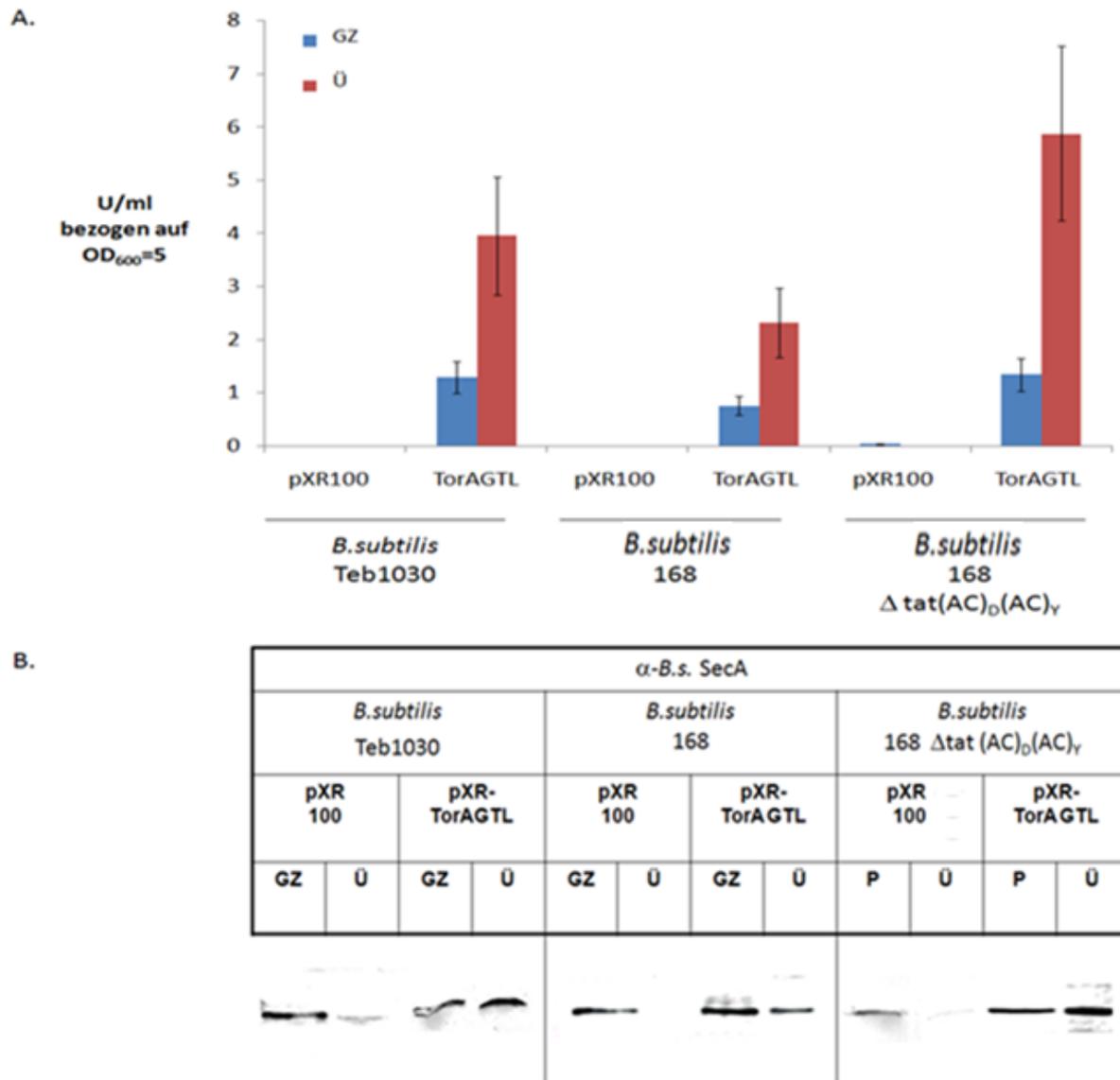


Abbildung 3-13: A. Bestimmung der hydrolytischen Aktivität von *B. subtilis* WT und *B. subtilis* Δ tat(AC)_D Δ tat(AC)_Y-Mutante, die die Lipase TorA^{SP}GTL vom Vektor pXR-TorAGTL exprimieren
 Die hydrolytische Aktivität wurde mit pNPP als Substrat bestimmt (T= 60°C, pH 8,0). Der Aufschluss der *B. subtilis* Zellen zum Gesamtzellextrakt (GZ) erfolgte mit Lysozym wie unter Kapitel II.6.1 beschrieben. Die hydrolytischen Aktivitäten, die für den Gesamtzellextrakt (GZ) und den Zellüberstand bestimmt wurden, wurden auf eine OD₆₀₀= 5 bezogen. Die Induktion der Genexpression in den *B. subtilis* Stämmen Teb1030, *B. subtilis* 168 und *B. subtilis* Δ tat(AC)_D Δ tat(AC)_Y erfolgte mit 0,5% Xylose (Kultivierung nach Induktion: 4h, 130 rpm, 37°C). Die Bestimmung der hydrolytischen Aktivität erfolgte in drei unabhängigen Versuchen. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

B.: Überprüfung des Vorliegens von Zellyse mittels Western Blot

Als Kontrollprotein wurde das cytoplasmatische und membranständige *B. subtilis* SecA-Protein eingesetzt und eine Fraktionierung der *B. subtilis* Stämme in Kulturüberstand (Ü) und in Gesamtzellfraktion (GZ) vorgenommen. Die Trennung und Aufarbeitung erfolgte wie im Kapitel II.6.1 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5 und die im Überstand aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1.

III.1.4.3 In *C.glutamicum* als Wirtssystem wird die Lipase $TorA^{SP}GTL$ Tat-abhängig sekretiert, jedoch akkumuliert ein signifikanter Anteil intrazellulär

Seit vielen Jahrzehnten wird *C.glutamicum* für die Produktion von Aminosäuren und anderen Metaboliten eingesetzt (Wendisch, 2007). Als industrielles Modellsystem ist es Mittelpunkt von systembiologischen Ansätzen zu seiner weiteren Optimierung. Daher wurden bereits zwei Genomprojekte zur Sequenzierung und Annotierung dieses Bakteriums abgeschlossen und Datenbanken über Genexpressionsprofile sind vorhanden (Ikeda und Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al.*, 2003).

Als Produktionssystem für die sekretorische Gewinnung heterologer Proteine ist *C.glutamicum* eher unbekannt. Erst vor Kurzem wurde in Untersuchungen festgestellt, dass *C.glutamicum* über ein funktionelles Tat-System verfügt, über das effizient heterologe Proteine sekretiert werden können (Kikuchi *et al.*, 2006; Meissner *et al.*, 2007). So konnte das Modellprotein $TorA^{SP}GFP$ sowie das heterologe Tat-Substrat Isomaltodextranase (IMD) aus *Arthrobacter globiformis* effizient in diesem Wirtssystem über den Tat-Weg exportiert werden. Daher wurde *C.glutamicum* als drittes Wirtssystem für die Tat-abhängige Sekretion der thermostabilen Hybridlipase $TorA^{SP}GTL$ ausgewählt.

Um die Expression dieser Lipase mittels Western-Blot-Assay nachweisen zu können, wurde das $TorA^{SP}GTL$ Hybridprotein mit einem 6x-His-Tag versehen und in den *E.coli/C.glutamicum* Shuttlevektor pEKex2 umgesetzt. Der Nachweis der Expression dieses Hybridproteins in *E.coli* wurde über einen Western-Blot-Nachweis mit einem α -Penta-His Antikörper erbracht (siehe Abbildung 3-14 C). Zum Vergleich ist der Nachweis dieses Fusionsproteins durch Aktivitätsfärbung mit MUF-Palmitat und durch Coomassie-Färbung in *E.coli* Gesamtzellextrakten dargestellt (siehe Abbildung 3-14 A und B).

In *C.glutamicum* wurde nach Transformation die Expression und Sekretion dieser Hybridlipase mittels Western-Blot-Analyse, Agardiffusionsassay und photometrischer Aktivitätsbestimmung mit pNPP als Substrat untersucht (vgl. Abbildung 3-15). Zur Vereinfachung wird im Folgenden $TorA^{SP}GTLhis$ mit $TorA^{SP}GLT$ bezeichnet.

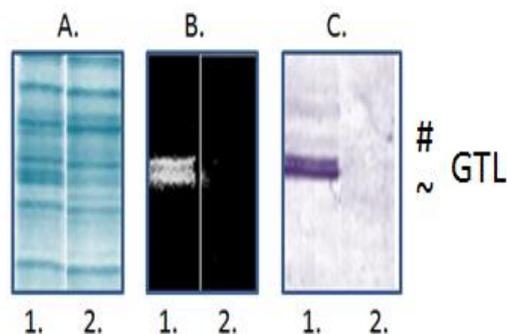


Abbildung 3-14: Nachweis des $TorA^{SP}GTLhis$ Fusionsproteins in *E.coli* Gesamtzellextrakten

- A. Coomassie-gefärbtes SDS-Gel, Spur 1: *E.coli* pEK2- $TorA^{SP}GTL$, Spur 2: *E.coli* pEKex2,
 B. Zymogramm mit MUF-Palmitat als Substrat, Spur 1: *E.coli* pEK2- $TorA^{SP}GTL$, Spur 2: *E.coli* pEKex2
 C. Western-Blot-Assay mit α -Penta-His Antikörper, Spur 1: *E.coli* pEK2- $TorA^{SP}GTLhis$, Spur 2: *E.coli* pEKex2

Abk.: # (= Vorläuferprotein der Hybridlipase), ~ (= cytosolische Abbauprodukte)

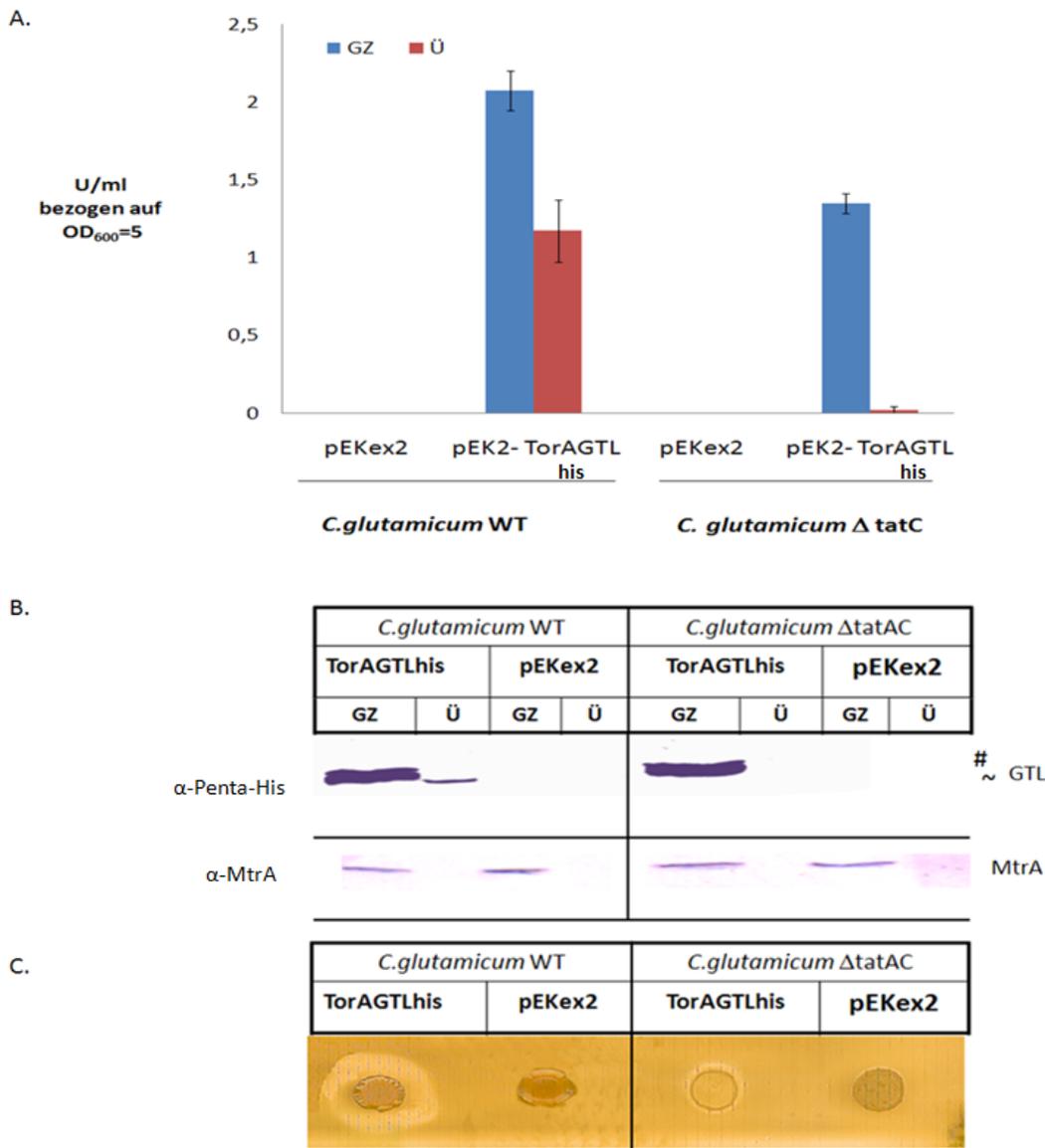


Abbildung 3-15: Untersuchung der Expression und der Sekretion der TorA^{SP}GTLhis Hybridproteine in *C. glutamicum*

A. Bestimmung der hydrolytischen Aktivität der Lipase GTL in *C. glutamicum* WT und *C. glutamicum* Δ tatAC-Mutante fraktioniert in Gesamtzellextrakt (GZ) und Kulturüberstand (Ü)

Die hydrolytische Aktivität wurde mit pNPP als Substrat bestimmt (T= 60°C, pH 8,0). Der Aufschluss der *C. glutamicum* Zellen zum Gesamtzellextrakt (GZ) erfolgte mit Hilfe der Retschkugelmühle wie unter Kapitel II.6.1 beschrieben. Die hydrolytischen Aktivitäten, die für den Gesamtzellextrakt und den Kulturüberstand bestimmt wurden, wurden auf eine OD₆₀₀= 5 bezogen. Die Induktion der Genexpression in den *S. carnosus* Stämmen erfolgte mit 0,5 mM IPTG. Kultivierung nach Induktion: 4h, 130 rpm, 30°C. Die Bestimmung der hydrolytischen Aktivität erfolgte in drei unabhängigen Versuchen.

B. Untersuchung der Sekretion der Hybridlipase TorA^{SP}GTLhis mittels Western-Blot-Nachweis mit einem α -Penta-His Antikörper

Die Trennung und Aufarbeitung in Gesamtzellfraktion (GZ) und Überstand (Ü) erfolgte wie im Kapitel II.6.1 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5 und die im Überstand aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1. Überprüfung des Vorliegens von Zellyse durch Lokalisation des cytoplasmatisch lokalisierten MtrA-Proteins mit einem α -MtrA-Antikörper; Abk.: # (= Vorläuferprotein), ~ (= intrazelluläres Abbauprodukt), ♦ (= prozessierte Form des Hybridproteins)

C. Agardiffusionsassay des TorA^{SP}GTLhis-Hybridproteins in *C. glutamicum* WT und der *C. glutamicum* Δ tatAC-Mutante (Tributyryn als Substrat)

Induktion der Genexpression durch 0,5 mM IPTG im BHIS-Nährboden; Ergebnisse nach Auftropfen von Übernachtkulturen gleicher OD₆₀₀ und nach 24h Inkubation bei 30°C.

Dabei zeigte sich, dass die Hybridlipase TorA^{SP}GTL nicht nur in *S.carnosus* Tat-abhängig sekretiert wurde, sondern auch in *C.glutamicum*.

Im Western-Blot-Assay (Abbildung 3-15 B) konnte in der Überstandsfraktion die prozessierte Form dieses Fusionsproteins nachgewiesen werden, während in der Gesamtzellfraktion das Vorläuferprotein zusammen mit einem cytosolischen Abbauprodukt sichtbar war (siehe Abbildung 3-15 B). Wurde dieses Fusionsprotein in der Δ *tatAC*-Mutante dieses Stammes, bei der das *tatAC*-Operon deletiert war, exprimiert, trat ein Exportblock auf (siehe Abbildung 3-15 B). Dies zeigte eindeutig, dass die Hybridlipase TorA^{SP}GTL Tat-abhängig in *C.glutamicum* sekretiert wurde. Der Nachweis des cytosolischen Kontrollproteins MtrA mit einem spezifischen Antikörper ausschließlich im Gesamtzellextrakt und nicht im Kulturüberstand zeigte, dass keine Zellyse vorlag und somit das Tat-Substrat TorA^{SP}GTL durch Translokation in den Überstand gelangt war. Wie im Agardiffusionsassay an der Hofbildung des Stammes *C.glutamicum* WT pEK2-TorAGTLhis erkennbar ist, handelte es sich hierbei um aktive Enzymspezies (siehe Abbildung 3-15 C). Die *tatAC*-Mutante zeigte, wie bei einer Tat-abhängigen Sekretion zu erwarten, keine signifikante Ausbildung eines Hydrolysehofes (siehe Abbildung 3-15 B). Der quantitative Aktivitätstest mit pNPP als Substrat bestätigte die Ergebnisse der Agardiffusionsassays (siehe Abbildung 3-15 A). Im Kulturüberstand wurde eine signifikante Anreicherung der Lipase GTL festgestellt, während im Kulturüberstand der *tatAC*-Mutante keine hydrolytische Aktivität detektierbar war. Die Ausbeuten für die Lipase, die mit dem *C.glutamicum* WT als Wirtssystem erzielt wurden, waren mit ca. 1,25 U/ml im Kulturüberstand um den Faktor 2 höher als die Ausbeuten, die mit dem *S.carnosus* WT erzielt wurden. Jedoch zeigte die starke Akkumulation von aktiven Enzymspezies im Gesamtzellextrakt, dass eine Limitation der Sekretion der Lipase GTL vorlag. Strategien, die zur Aufhebung dieser Limitation eingesetzt werden können, werden im Kapitel IV.2 näher erläutert.

III.1.4.4 Tat-abhängige Sekretion von TorA^{SP}-Hybridvorläuferlipasen in *C.glutamicum* als Wirtssystem

Weil sich *C.glutamicum* als Wirtssystem zur Tat-abhängigen Sekretion der thermostabilen Lipase GTL bewährt hatte, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob dieses Wirtssystem für die Tat-abhängige Sekretion weiterer Fusionslipasen geeignet ist. Als Modellenzyme wurden die prokaryotischen Lipasen TSL und SHL und die eukaryotische Cutinase gewählt (siehe Tabelle 3-02).

Im Gegensatz zur Lipase TSL und der eukaryotischen Cutinase besitzt die Lipase SHL ein zusätzliches, stark hydrophiles, 23 kDa großes Propeptid, das in *S.hyicus* nach Translokation vom 44 kDa großen, reifen Teil abgespalten wird. Bei der Sec-abhängigen Translokation von Fusionsproteinen in *S.carnosus* wurden Fusionen mit dem *S.hyicus* Propeptid dazu eingesetzt, die Zellwandpassage in *S.carnosus* zeitlich zu verkürzen. Daher wurde im Fall der Lipase SHL die Tat-abhängige Sekretion zweier Varianten dieses Enzyms untersucht. Eine Variante enthielt nur den reifen Teil des Enzyms (TorA^{SP}SHL) und eine zweite neben dem reifen Teil auch das Propeptid (TorA^{SP}proSHL).

Um einen Tat-abhängigen Export in *C.glutamicum* zu gewährleisten, wurden die Lipase TSL, die eukaryotische Cutinase sowie beide Varianten der Lipase SHL mit dem Tat-abhängigen Exportsignal der *E.coli* TMAO-Reduktase (TorA) ausgestattet (siehe Abbildung 3-16). Um die Expression dieser

Hybridproteine in *C.glutamicum* zu gewährleisten, wurde die Gensequenz der Hybridgene mit einer *C.glutamicum* spezifischen Ribosomenbindungsstelle versehen (RBS_{C.G.}). In *C.glutamicum* wurden diese rekombinanten TorA^{SP}-Hybridvorläuferproteine unter Kontrolle des IPTG induzierbaren P_{tac} Promotors exprimiert. Die Klonierungsstrategien für die einzelnen TorA^{SP}-Fusionen werden in Kapitel II.5 beschrieben. Um die Sekretion dieser TorA^{SP}-Fusionen in *C.glutamicum* zu untersuchen, wurde die hydrolytische Aktivität photometrisch mit *para*-Nitrophenylpalmitat (pNPP) als Substrat bestimmt (Tabelle 3-03) und Western-Blot-Nachweise wurden mit spezifischen Antikörpern durchgeführt (siehe Abbildung 3-17).

Tabelle 3-02: Eigenschaften der prokaryotischen Lipasen SHL und TSL sowie der eukaryotischen Cutinase CUT

Lipase	Wärme-stabilität	Herkunft		Lokali-sation	Expression in heterologen Wirtssystemen
TSL (29 kDa)	thermo-stabil	pro-karyo-tisch	<i>Thermo- anerobacter tengcongensis</i>	intra-zellulär	<i>E.coli</i> (1)
SHL (23 kDa Propeptid und 44 kDa reife Lipase)	wärme-empfind-lich		<i>Staphylococcus hyicus</i>	extra-zellulär	<i>E.coli</i> (2), <i>Lactococcus lactis</i> (3), <i>Bacillus subtilis</i> (4), <i>Staphylococcus carnosus</i> (5)
CUT (22 kDa)		eu-karyo-tisch	<i>Fusarium solani pisi</i>		<i>E.coli</i> (6), <i>Bacillus subtilis</i> (7), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (8), <i>Aspergillus awamori</i> (9)

Referenzen: 1. (Royter, 2006); 2. (van Kampen *et al.*, 1998); 3. (Drouault *et al.*, 2000); 4. (Caspers, 2006); 5. (Demleitner und Gotz, 1994); 6. (Martinez *et al.*, 1992); 7. (Brockmeier *et al.*, 2006); 8. (Calado *et al.*, 2003); 9. (van Gemeren *et al.*, 1996)

A. Die TorA^{SP}-Hybridlipase der thermostabilen Lipase TSL (TorA^{SP}TSL) wird zwar exprimiert, aber nicht sekretiert

Wie in Abbildung 3-17 A zu erkennen, wurde der Hybrid-Vorläufer der Lipase TorA^{SP}TSL zwar in *C.glutamicum* exprimiert, aber nicht sekretiert. Der Aktivitätstest mit pNPP zeigte, dass die Lipase nicht aktiv war (siehe Tabelle 3-03). Möglicherweise störte in diesem Fall die Anwesenheit des TorA-Signalpeptids die Faltung in eine aktive Konformation. Die thermostabile Lipase TSL ist daher nicht für eine Tat-abhängige Sekretion in *C.glutamicum* geeignet.

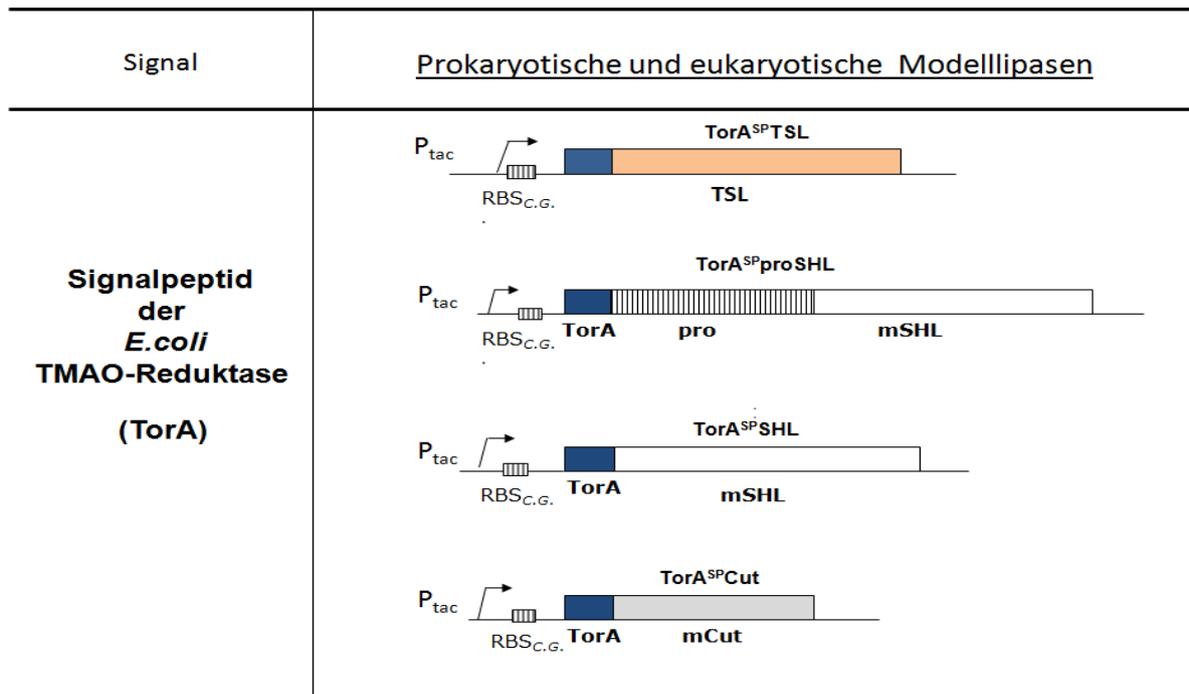


Abbildung 3-16: Schematische Darstellung der *torA*-Genfusionen der Lipase TSL, der Lipase SHL und der Cutinase Cut

Dargestellt ist der Promoter P_{tac}, der in *C. glutamicum* eine IPTG-induzierbare Genexpression erlaubt, gefolgt von einer *C. glutamicum* typischen Ribosomenbindungsstelle (RBS_{C.G.});
 Abk.: TorA (= Signalsequenz der TMAO-Reduktase aus *E. coli*), pro (= Gensequenz des Propeptids der Lipase SHL), TSL (= Gensequenz der Lipase TSL), mSHL (= Gensequenz des reifen Teils der Lipase SHL), mCut (= Gensequenz des reifen Teils der Cutinase)

B. Die beiden TorASP-Hybridvorläuferlipasen der *S. hyicus* Lipase (TorASPSHL und TorASPproSHL) werden nicht sekretiert

Von den TorA^{SP}-Hybridvorläuferlipasen der *S. hyicus* Lipase (SHL) wies keine der getesteten Varianten (TorA^{SP}SHL und TorA^{SP}proSHL) eine signifikante Akkumulation von aktivem Enzym im Kulturüberstand oder in der Gesamtzellfraktion auf (siehe Tabelle 3-03), wie anhand des photometrischen Aktivitätstests erkennbar war. Der Western-Blot-Nachweis zur Lokalisierung dieser Hybridproteine im Gesamtzellextrakt und im Kulturüberstand bestätigt dieses Ergebnis (siehe Abbildung 3-17 C und D). In der Gesamtzellfraktion wurde sowohl im Fall des TorA^{SP}proSHL Hybridvorläuferproteins als auch im Fall des TorA^{SP}SHL Hybridvorläuferproteins die Akkumulation eines Vorläuferproteins beobachtet. Sekretierte Formen konnten jedoch in der Fraktion des Kulturüberstandes nicht festgestellt werden. Demzufolge wurden die TorA^{SP}-Hybridlipasen der Lipase SHL zwar exprimiert, nicht aber sekretiert. Offenbar waren die Hybridvorläuferproteine der Lipase SHL nicht in der Lage, eine gefaltete Konformation im Cytosol einzunehmen, so dass es zu einem Exportblock dieser Proteine kam, der zu einer Akkumulation von ungefalteten, inaktiven Vorläuferproteinen im Zellinneren führte. Während es sich bei der Lipase TSL um ein cytosolisches Protein handelte, stellt die Lipase SHL ein typisches Sec-Substrat dar, das sich normalerweise erst nach erfolgter Translokation in der Zellwandgrenzschicht faltet.

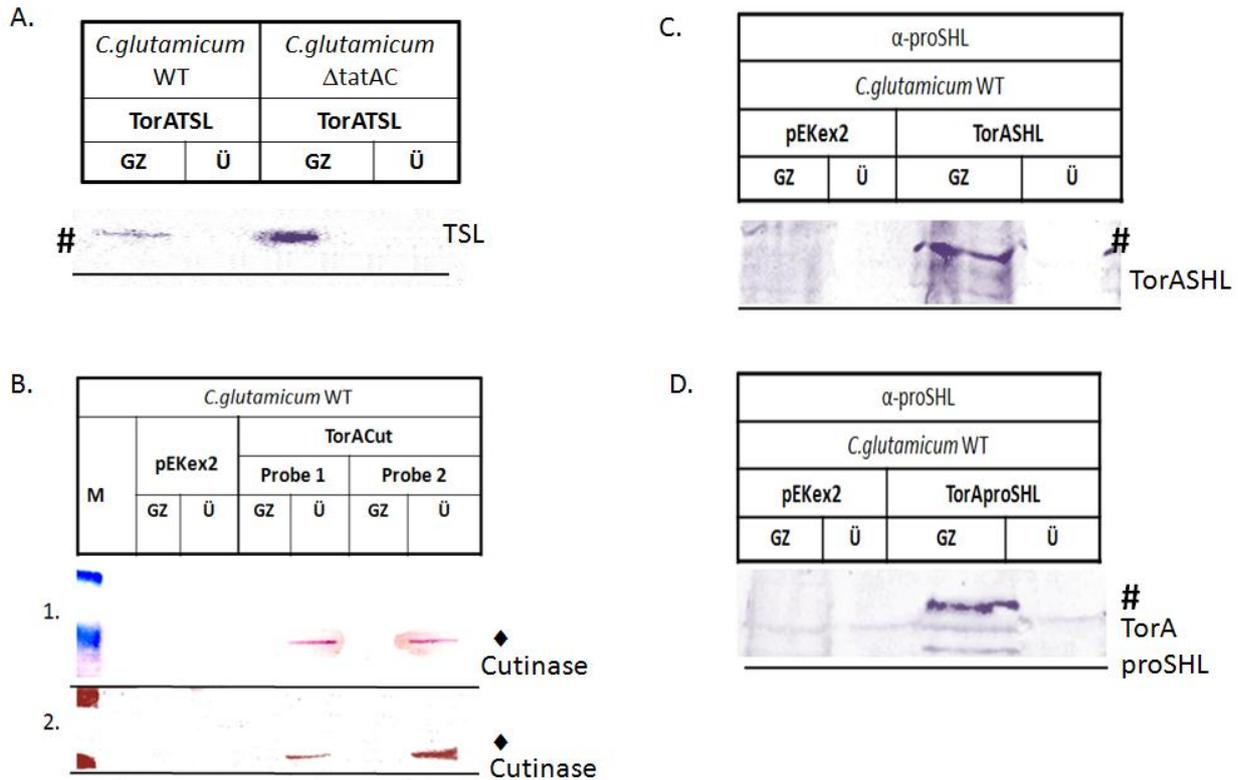


Abbildung 3-17: Untersuchung der Expression und der Sekretion von TorA-Hybridlipasen in *C. glutamicum* Zellen

A. Untersuchung der Sekretion der Hybridlipase TorA^{SP}TSL in *C. glutamicum* WT-Zellen und in der Δ tatAC-Mutante mittels Western-Blot-Nachweis nach Fraktionierung in Gesamtzellextrakt (GZ) und Überstand (Ü), verwendeter Antikörper: α -TSL

B. Untersuchung der Sekretion der Hybridlipase TorA^{SP}Cut mittels (1.) Aktivitätsfärbung durch α -Naphthylacetat und (2.) Western-Blot-Assay im Anschluss nach der Aktivitätsfärbung mit α -Cutinase Antikörper

C. und D. Untersuchung der Sekretion der Hybridlipase TorA^{SP}SHL und TorA^{SP}proSHL in *C. glutamicum* WT-Zellen mittels Western-Blot-Nachweis nach Fraktionierung in Gesamtzellextrakt (GZ) und Überstand (Ü), verwendeter Antikörper: α -SHL

Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen erfolgte wie im Kapitel II.6.1 beschrieben.

Abk.: ♦ (= prozessierte bzw. reife Form des Hybridproteins), # (= Vorläuferformen der TorA^{SP}-Hybridproteine)

C. Die TorASP-Hybridlipase der eukaryontischen Cutinase (TorASPCUT) wird in aktiver Form in den C. glutamicum Kulturüberstand sekretiert

Im Fall des Hybridproteins TorA^{SP}Cut konnten durch Aktivitätsfärbung mit α -Naphthylacetat Banden mit geringer, hydrolytischer Aktivität im Kulturüberstand von *C. glutamicum* nachgewiesen werden, die im Western-Blot-Assay als Banden der Cutinase identifiziert werden konnten (siehe Abbildung 3-17 C, 1. Aktivitätsfärbung und 2. Western-Blot-Assay). In *C. glutamicum* wurde demnach die Cutinase mithilfe des *E. coli* TorA-Signalpeptids in den Kulturüberstand sekretiert. Da weder Vorläuferproteine noch Abbauprodukte der Cutinase festgestellt wurden, wurde die Cutinase entweder sehr effektiv in *C. glutamicum* transloziert oder äußerst schnell intrazellulär abgebaut. Im quantitativen Lipasetest zeigte

III. Ergebnisse

eine geringe Aktivität der Cutinase an, dass sie in einer aktiven Konformation in der Überstandsfraction vorlag (siehe Tabelle 3-03). Jedoch war die Aktivität dieser Lipase bei 25°C mit 0,45 U/ml gering.

Die Versuche mit den unterschiedlichen TorA^{SP}-Hybridlipasen in *C. glutamicum* zeigten also, dass nicht nur die Interaktion von Tat-Translokase und Signalpeptid entscheidend für eine Tat-abhängige Sekretion in *C. glutamicum* ist, sondern dass die Sekretion zu einem wesentlichen Teil von Eigenschaften des rekombinanten Proteins wie z.B. seiner Faltung abhängt. Diese Eigenschaften sind von Protein zu Protein stark unterschiedlich und bisher nicht prognostizierbar.

Tabelle 3-03: Hydrolytische Aktivitäten von TorA^{SP}-Hybridproteinen, die in *C. glutamicum* als TorASP-Hybridproteine exprimiert wurden: TorA^{SP}proSHL, TorA^{SP}SHL, TorA^{SP}Cut sowie TorA^{SP}TSL

Signal-sequenz für	Wirtssystem	Plasmid (rekombinante Lipase)	GZ [U/ml] bezogen auf OD ₆₀₀ = 5	Überstand [U/ml] bezogen auf OD ₆₀₀ =5	Bemerkung
Tat-Weg	<i>C.g.</i>	pEK2-TorATSL (TorA ^{SP} TSL)	> 0,1	>0,1	nicht signifikant
		pEK2-TorA proSHL (TorA ^{SP} proSHL)	> 0,01	> 0,01	nicht signifikant
		pEK2-TorASHL (TorA ^{SP} SHL)	> 0,01	0,02	nicht signifikant
		pEK2-TorACut (TorA ^{SP} Cut)	> 0,02	0,45	geringe Aktivität im Überstand
Sec-Weg	<i>B.s.</i>	pBSmul3Cut (Cutinase mit heterologer LipA Signalsequenz aus <i>B.s.</i>)	k.A.	2,8)*	Vergleichswerte für die hydrolytische Aktivität im Überstand
	<i>S.c.</i>	plipPS1 (Lipase SHL)	> 0,01	1,5	

Die hydrolytische Aktivität wurde mit pNPP als Substrat bestimmt, T= 25°C, pH 7,5 im Fall der Cutinase und der Lipase SHL. Im Fall der Lipase TSL wurden die Reaktion bei T= 60°C und pH 8,0 durchgeführt. Der Aufschluss der *C. glutamicum* Zellen zum Gesamtzellextrakt (GZ) erfolgte mit der Kugelmühle wie unter Kapitel II.6.1 beschrieben. Die hydrolytischen Aktivitäten, die für den Gesamtzellextrakt (GZ) und den Kulturüberstand (Ü) bestimmt wurden, wurden auf eine OD₆₀₀ von 5 bezogen. Abk.: k.A. (= keine Angaben);)* Referenzwert (Brockmeier, 2006).

III.2 OPTIMIERUNG DER SEKRETION REKOMBINANTER PROTEINE ÜBER DEN TAT-WEG IN GRAM-POSITIVEN MIKROORGANISMEN

Eine biotechnologische Nutzung von Tat-Systemen zur sekretorischen Proteingewinnung steht zurzeit noch aus. Denn während bereits zahlreiche, spezifische Lösungsansätze zur Behebung von Engpässen der Sec-abhängigen Sekretion entwickelt und erfolgreich eingesetzt wurden, gibt es bisher kaum Lösungsansätze für die Optimierung der Tat-abhängige Sekretion rekombinanter Proteine in Gram-positiven Bakterien. Grundlegende Fragestellungen wie die Wahl eines geeigneten Wirtssystems oder die Auswahl eines geeigneten Signalpeptids sind Mittelpunkt von Untersuchungen zum biotechnologischen Einsatz von Tat-Systemen in Gram-positiven Bakterien (vgl. Brüser, 2007).

Darüber hinausreichende Ansätze zur Optimierung der sekretorischen Proteingewinnung rekombinanter Proteine fehlen, einmal abgesehen von Standardlösungsansätzen, die zur Optimierung jeglicher Proteingewinnung in Prokaryoten eingesetzt werden können wie z.B. die Optimierung der Fermentationsbedingungen, die Feinanpassung der Promotorstärke oder die Optimierung des Codon-Gebrauchs („Codon Usage“).

Daher ist Ziel dieses Teils der Arbeit, spezifische Strategien für die Tat-abhängige Proteinsekretion zu entwickeln und zu evaluieren, mit denen die Sekretion rekombinanter Proteine verbessert werden kann.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse dreier, unterschiedlicher Strategien, die spezifisch auf mögliche Engpässe der Tat-abhängigen Proteinsekretion eingehen, vorgestellt und nach ihrer Verwendbarkeit beurteilt werden:

1. Optimierung der Tat-abhängigen Sekretion durch eine verbesserte Anpassung eines Tat-abhängigen Signalpeptids an das Tat-System des Wirtsorganismus,
2. Aufhebung der Substratsättigung von Tat-Translokasen, die durch eine Überexpression rekombinanter Tat-Substrate hervorgerufen wird, durch Coexpression heterologer und homologer Tat-Translokasekomponenten,
3. Ausnutzung des Tat-Proofreadings für eine verbesserte Sekretion rekombinanter Proteine durch Coexpression eines Signalpeptid-spezifischen Chaperons.

Als Modellsystem für diesen Arbeitsteil wurde *C.glutamicum* ausgewählt, da es im Vergleich zu *S.carnosus* als Produktionssystem viele Vorteile für die Optimierung einer Tat-abhängigen Sekretion bietet: 1. *C.glutamicum* ist als industrielles Modellsystem für die Produktion von Metaboliten Mittelpunkt systembiologischer Ansätze, zudem wurde sein Genom bereits zweimal sequenziert und annotiert (Ikeda und Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al.*, 2003; Wendisch, 2007). 2. *C.glutamicum* ist einfach genetisch manipulierbar und besitzt sehr hohe Transformationsraten (Eggeling, 2005). 3. In *C.glutamicum* konnten im Gegensatz zu *S.carnosus* Tat-abhängige Substrate wie z.B. das Modellsubstrat TorA^{SP}GFP und IMD aus *Arthrobacter globiformis* mit guten Ausbeuten Tat-abhängig sekretiert werden (Kikuchi *et al.*, 2006; Meissner *et al.*, 2007).

III.2.1 Strategie 1: Optimierung der Tat-abhängigen Sekretion durch eine verbesserte Anpassung eines Tat-abhängigen Signalpeptids an die Tat-Translokase von *C.glutamicum*

Ein Engpass der Tat-abhängigen Sekretion stellt die Interaktion von Tat-Signalpeptid und Tat-Translokase dar. Denn neben Tat-abhängigen Signalpeptiden, die mit einer Vielzahl verschiedener Tat-Systeme interagieren können, wie z.B. das Signalpeptid der *E.coli* TMAO-Reduktase, gibt es Tat-abhängige Signalpeptide wie das der Glukose-Fruktose-Oxidoreduktase (GFOR) aus *Zymomonas mobilis* oder das Signalpeptid der alkalischen Phosphatase (PhoD) aus *B.subtilis*, die nur zu ihrem eigenen Tat-System kompatibel sind, nicht aber zu einem artfremden wie dem *E.coli* Tat-System [siehe Kapitel I.4.1.1 und (Blaudeck *et al.*, 2001; Pop *et al.*, 2002)]. Werden Tat-Substrate mit diesen Signalpeptiden in *E.coli* exprimiert, kommt es zu einem Exportblock dieser Substrate. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass aufgrund einer fehlerhaften Passgenauigkeit von Tat-Translokase und heterologem Signalpeptid diese nicht funktionell miteinander interagieren können.

Die Determinanten, die für eine optimale Passgenauigkeit von Signalpeptid und Tat-Translokase verantwortlich sind, sind zurzeit noch unbekannt. Daher war eine Überlegung, um die Sekretionseffizienz von rekombinanten Proteinen in *C.glutamicum* über den TAT-Weg zu verbessern, dies über eine Optimierung der Passgenauigkeit von Tat-Translokase und Tat-Signalpeptid vorzunehmen. Da die Determinanten, die hierbei eine Rolle spielen, völlig unbekannt sind, kann für die Erfüllung dieser Zielvorgabe das Verfahren der „gerichteten Evolution“ eingesetzt werden.

Als Ausgangspunkt für die gerichtete Evolution wurde die bestehende Tat-abhängige Interaktion des TorA-Signalpeptids mit der *C.glutamicum* Tat-Translokase ausgewählt, denn als heterologes Signalpeptid ist das *E.coli* TorA-Signalpeptid als Teil eines Hybridproteins nicht an die Tat-Translokase von *C.glutamicum* angepasst, so dass möglicherweise über eine gerichtete Evolution eine verbesserte Anpassung vorgenommen werden kann, falls es sich wirklich bei der Interaktion von Tat-Translokase und TorA-Signalpeptid um einen limitierenden Schritt der Sekretion handelt (siehe Abbildung 3-18). Eine gerichtete Evolution lässt sich als iteratives Verfahren verstehen, bei dem sich Zufallsmutagenese und Screening gegenseitig ablösen (siehe Abbildung 3-19). Häufig wird bereits die Kombination von Zufallsmutagenese und einem Selektions- bzw. Screening- Verfahren als gerichtete Evolution bezeichnet (Schmid, 2002).

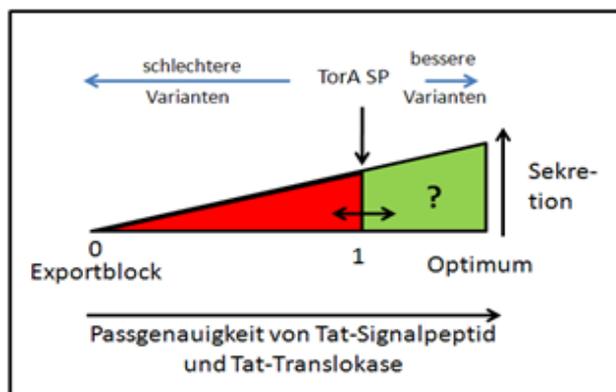


Abbildung 3-18: Verbesserung der Sekretionseffizienz über eine Optimierung der Passgenauigkeit von TorA-Signalpeptid und Tat-Translokase von *C.glutamicum*.

Hierbei wird angenommen, dass eine nicht-optimale Passgenauigkeit des TorA-Signalpeptids auf die Sekretion limitierend wirkt und durch Mutation des TorA-Signalpeptids positiv beeinflusst werden kann.

Für dieses Verfahrens ist sowohl die Entwicklung eines geeigneten Screeningverfahrens, bei dem es sich zumeist um ein Hochdurchsatz-Verfahren (HTS-Verfahren: **H**igh **T**hroughput **S**creening) handelt, als auch die Entwicklung eines geeigneten Mutageneseverfahrens erforderlich, mit dessen Hilfe eine ausreichend hohe Zahl von Varianten des TorA-Signalpeptids erzeugt und durchmustert werden kann (siehe Abbildung 3-19). Möglicherweise können anhand dieses Verfahrens Determinanten innerhalb eines Signalpeptids identifiziert werden, die wichtig für die Kompatibilität von Signalpeptid und Tat-Translokase sind.

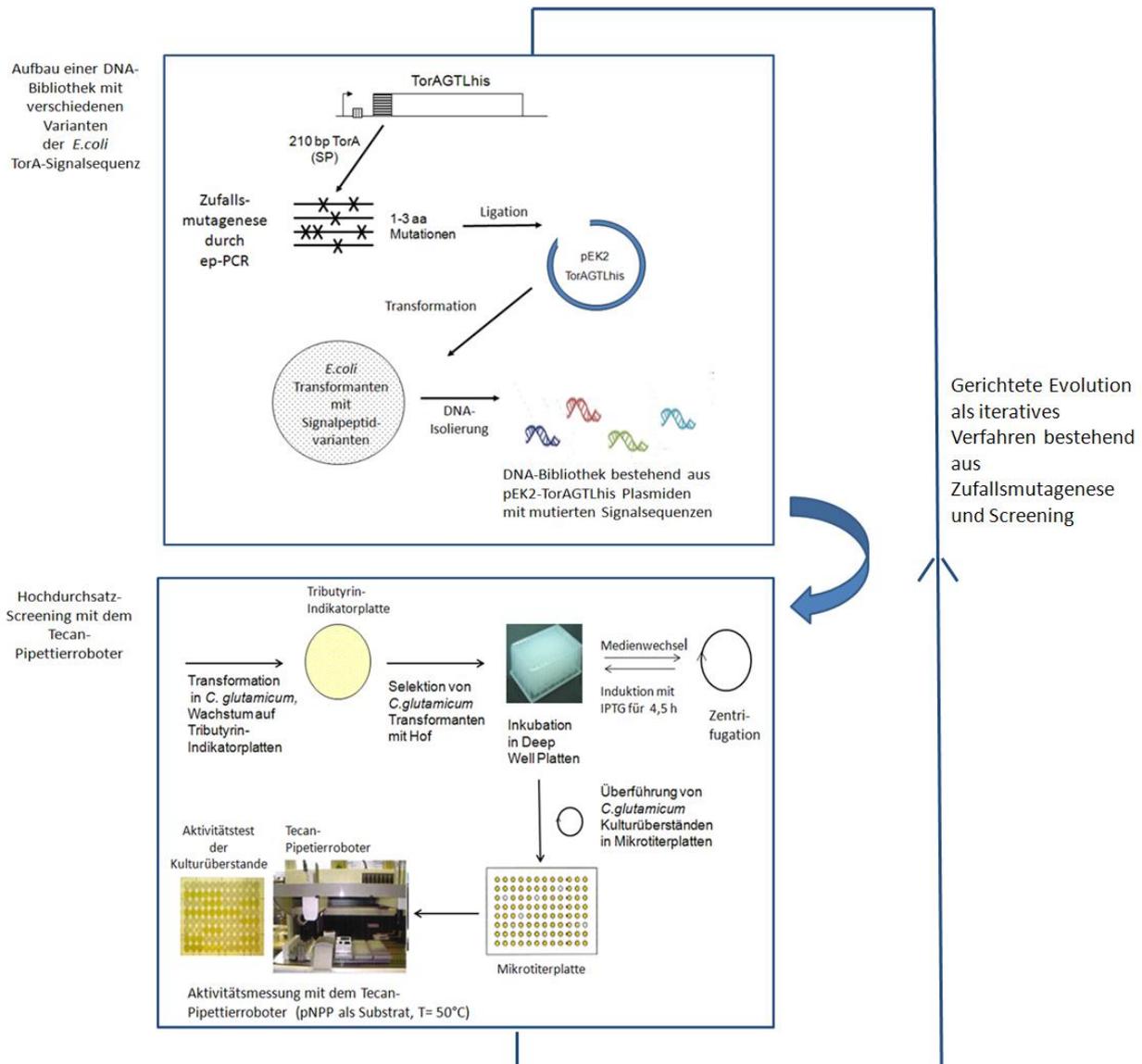


Abbildung 3-19: Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Verfahrens zur gerichteten Evolution des TorA Signalpeptids, das zur Verbesserung der Tat-abhängigen Sekretion der Lipase GTL in *C. glutamicum* entwickelt wurde

Das hier verwendete Verfahren besteht aus zwei Teilprozessen, die miteinander verknüpft sind. An eine Zufallsmutagenese durch ep-PCR, die zur Erzeugung von TorA-Signalpeptidvarianten dient, schließt sich ein Hochdurchsatz-Screening (HTS) von *C. glutamicum*-Transformanten an, mit dem Ziel Transformanten zu identifizieren, die eine verbesserte Sekretion aufweisen.

III.2.1.1 Auswahl und Anpassung eines geeigneten Modellenzym und Vektorsystems für das HTS-Verfahren

Ein wichtiger Teilaspekt bei der Entwicklung und Anpassung des Hochdurchsatz-Verfahrens war die Auswahl eines geeigneten Modellenzym. Um erfolgreich eingesetzt werden zu können, musste seine Aktivität als Maß für die sekretierte Enzymmenge einfach und valide quantifizierbar sein und das Enzym eine hohe Langzeitstabilität besitzen.

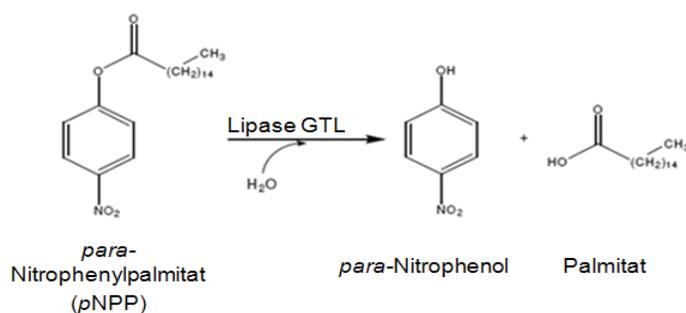


Abbildung 3-20: Reaktionsschema der hydrolytischen Reaktion mit *para*-Nitrophenylpalmitat (pNPP)

Die Bildung von *para*-Nitrophenol führt zu einer Gelbfärbung der Reaktionslösung. Die Zunahme der Intensität der Farbreaktion ist ein Maß für hydrolytische Aktivität der Lipase. Die Adsorption wurde bei T = 50°C und $\lambda = 410$ nm bestimmt. 15 min lang wurde jede Minute ein Messwert aufgenommen.

Als thermostabiles Enzym mit einer hohen Stabilität war das TorA^{SP}-Hybridvorläuferprotein der Lipase GTL (TorA^{SP}GTL), das in *C.glutamicum* Tat-abhängig sekretiert wurde, ein geeigneter Kandidat (siehe Kapitel III.1.4.3). Denn seine Aktivität konnte einfach und genau mit *para*-Nitrophenylpalmitat (pNPP) als Substrat photometrisch bestimmt (Abbildung 3-20) und seine Sekretionseffizienz qualitativ mit einem Diffusionsagarplattenassay mit Tributyrin als Substrat nachgewiesen werden.

Der His-Tag, mit dem dieses Hybridprotein zum Nachweis der Expression und Sekretion in *C.glutamicum* ausgestattet wurde, erlaubte es sowohl Vorläuferformen als auch prozessierte Formen dieses Proteins zu identifizieren (siehe Abbildung 3-14 C und Abbildung 3-15). Als Vektorsystem zur Expression des Hybridproteins wurde der *E.coli/C.glutamicum* Shuttlevektor pEKex2 ausgewählt. Denn dieser Vektor enthielt das Gen des LacIQ- Repressors, durch den in Abwesenheit von IPTG die über den P_{tac}-Promotor gesteuerte Expression des Vektors in *E.coli* auf ein basales Niveau reprimiert werden konnte. Auf den Einsatz eines konstitutiven Vektorsystems wurde verzichtet, da eine Akkumulation der Lipase in einer aktiven Form zu einer Störung der Zellintegrität führen könnte (vgl. Kapitel III.1.4.2).

Um eine einfache Entfernung und erneute Einführung des Signalpeptids aus dem Hybridprotein zu ermöglichen, wurde eine künstliche NotI-Restriktionsschnittstelle in die Signalpeptidase-Schnittstelle des TorA^{SP}GTL_{his} Hybridproteins über eine gerichtete Mutation eingefügt, so dass sich die Aminosäuresequenz der Schnittstelle von ATA zu AAA veränderte. Da dieser Aminosäureaustausch an der veränderlichen, zweiten Position der Schnittstelle vorgenommen wurde, hatte dies keinen Einfluss auf die Sekretion (vgl. Abbildung 3-31). Auf diese Weise konnte auf den Einsatz einer Linkerregion und den damit artifiziell hervorgerufenen Veränderungen der Sekretionseffizienz verzichtet werden.

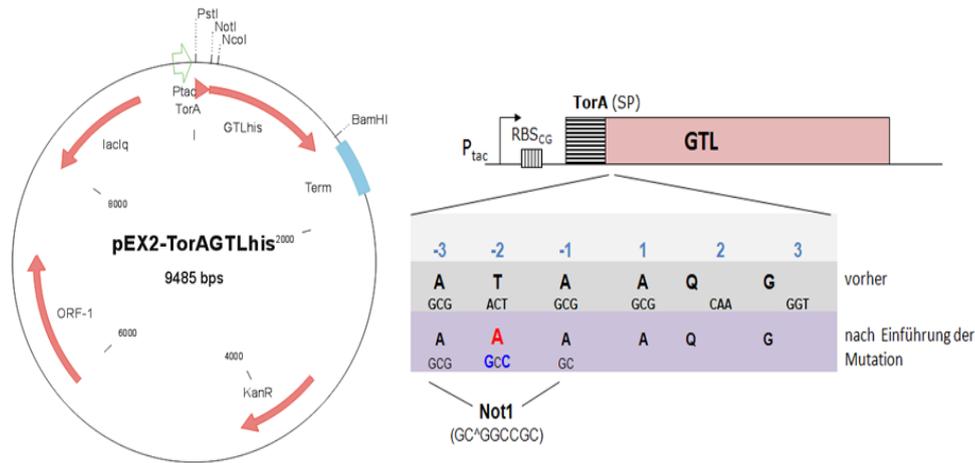


Abbildung 3-21: Modellprotein und Vektorsystem zum HTS-Screening

Dargestellt ist der pEK2-TorAGTLhis Vektor, der mit einer künstlichen Not1-Schnittstelle modifiziert wurde. Die neue Schnittstelle befindet sich in der Erkennungsstelle der Signalpeptidase, so dass es zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz von ATA zu AAA in der Erkennungsstelle kommt.

III.2.1.2 Entwicklung eines Hochdurchsatz-Screening-Verfahrens zur Identifizierung von TorA-Signalpeptid-Varianten mit einer veränderten Sekretion in *C. glutamicum* WT-Zellen

Da für das Screening-Verfahren eine große Anzahl von Signalpeptid-Varianten erzeugt und durchmustert werden mussten, wurde ein Hochdurchsatz-Screening-Verfahren entwickelt, bei dem die quantitative Aktivitätsbestimmung des Modellenzym durch Einsatz eines Pipettierroboters automatisiert werden konnte. Der Pipettierroboter „TECAN Workstation Genesis 200 Freedom“ arbeitete dabei nach einem Skript, das ursprünglich für die Bestimmung der Sekretionseffizienz von *B. subtilis* Zellen entworfen wurde, die die eukaryontische Cutinase aus *Fusarium solani pisi* Sec-abhängig sekretierten (siehe Kapitel II.6.10 B und Brockmeier, 2006).

III.2.1.2.1 Entwicklung eines Kultivierungs- und Induktionsverfahrens für das HTS-Screening

Für den Einsatz des Tecan-Pipettierroboters zur Aktivitätsbestimmung war es erforderlich, die *C. glutamicum*-Zellen in einem „96-Deep-Well“-Format anzuziehen.

Da für die Kultivierung und Selektion von *C. glutamicum* Zellen in diesem Format kein geeignetes Protokoll vorlag, mit dem sekretierte Proteine in Kulturüberständen im Rahmen eines HTS-Verfahrens überprüft werden konnten, wurde in dieser Arbeit ein neues Kultivierungsverfahren für die *C. glutamicum*-Zellen, die die Lipase TorA^{SP}GTLhis exprimierten, entwickelt (siehe Kapitel II.6.10 A). Hierbei wurde eine Vorselektionierung von *C. glutamicum* Zellen mittels Tributyrin-Indikatorplatten vorgenommen und mit einer Anzucht ausgewählter Transformanten im 96-Deep-Well-Format und anschließender Geninduktion verknüpft.

Das dazu entwickelte Verfahren wurde sowohl zur Bestimmung der Schwankungsbreite des Systems als auch zum Screening erprobt und eingesetzt.

III.2.1.2.2 Bestimmung der systemimmanenten Messungenauigkeit des HTS-Verfahrens

Bevor das HTS-Verfahren sinnvoll zur Identifizierung von *C.glutamicum* Klonen mit einer erhöhten Sekretionseffizienz eingesetzt werden konnte, mussten die systemimmanenten Fluktuationen bestimmt werden, die sich als Messungenauigkeit auf die Bestimmung der Aktivität auswirkten. Ein Großteil dieser Schwankungen wurde durch das unterschiedliche Zellwachstum und eine unterschiedliche Induktion der Genexpression verursacht. Daher wurde zunächst die Messungenauigkeit bestimmt, die nach Kultivierung und Induktion vorlag. Zu diesem Zweck wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen *C.glutamicum* Zellen mit dem pEK2TorAGTLhis Vektor transformiert und wie unter Kapitel II.6.10 A beschrieben in Deep-Well-Platten über Nacht angezogen und die Genexpression der Hybridvorläuferlipase TorA^{SP}GTLhis mit IPTG induziert und die *C.glutamicum* WT-Zellen für 4,5 h bei 30°C und 325 rpm inkubiert. Um das Zellwachstum zu bestimmen, wurde wie im Kapitel II.6.10 beschrieben vorgegangen. Dazu wurde eine Probe des Kulturüberstandes 1:10 verdünnt und in 96er Mikrotiterplatten überführt. Danach wurde die OD₆₀₀ jedes Transformanten mit einem Mikrotiterplattenleser bestimmt. Nach Induktion besaßen die *C.glutamicum* Zellen eine durchschnittliche OD₆₀₀ von 3,55 und die Standardabweichung (σ) betrug 13% (siehe Abbildung 3-22).

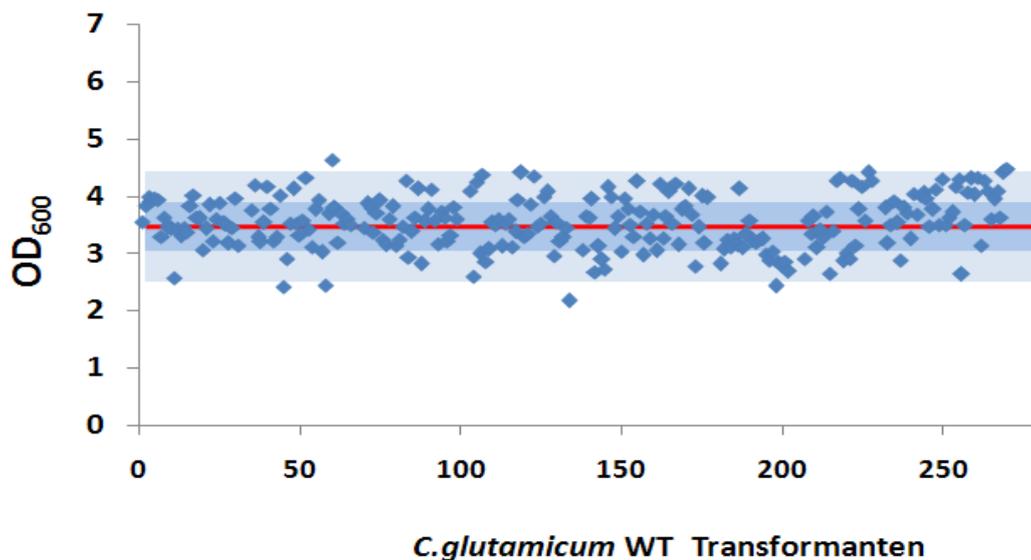


Abbildung 3-22: Zellwachstum von *C.glutamicum* Transformanten nach Kultivierung und Induktion in 96er Deep-Well-Platten.

Die *C. glutamicum* WT-Zellen wurden mit dem Vektor pEK2-TorAGTLhis transformiert. Die Kultivierung und Induktion erfolgte wie unter Kapitel II.6.10 A beschrieben. Die Messung der OD₆₀₀ erfolgte mit einem Mikrotiterplattenleser. Als rote Linie eingezeichnet ist die mittlere OD₆₀₀ der Transformanten; der dunkelblaue Bereich zeigt das Intervall der einfachen Standardabweichung (σ) und der hellblaue Bereich umfasst das Intervall der zweifachen Standardabweichung ($\pm 2\sigma$).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde wieder in drei unabhängigen Versuchen die Schwankungsbreite der Aktivitäten nach Induktion der Genexpression in den *C. glutamicum* Zellen mithilfe des Tecan Pipettierroboters bestimmt. Bezogen auf den Mittelwert, der gleich 1 gesetzt wurde, betrug die Standardabweichung $\sigma = 23\%$ (siehe Abbildung 3-23).

Geht man davon aus, dass die Messungenauigkeit der Aktivitätsbestimmung annähernd normal verteilt ist, so fallen bei dem HTS-Screening erst Signalpeptidvarianten als „Ausreißer“ ins Gewicht, deren Aktivität mehr als zwei- bis dreimal so groß ist wie die einfache Standardabweichung. Denn 95% aller Abweichungen befinden sich bei normalverteilten Werten im Intervall $\pm 2\sigma$.

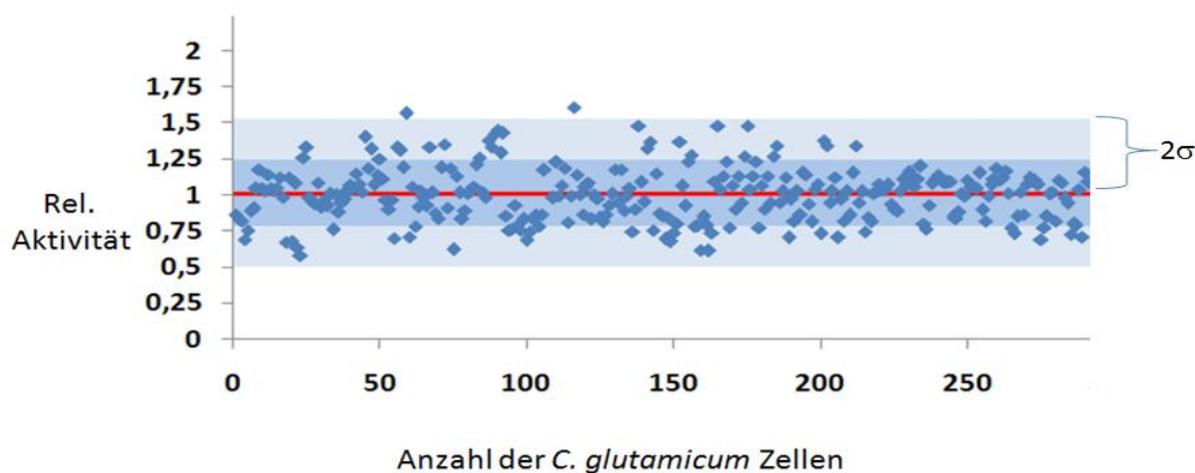


Abbildung 3-23: Relative hydrolytische Aktivität der Hybridlipase TorA^{SP}GTL bezogen auf den Mittelwert der *C. glutamicum* Transformanten, die mit dem pEK2-TorAGTLhis-Vektor transformiert wurden

Die *C. glutamicum* WT-Zellen wurden mit dem Vektor pEK2-TorAGTLhis transformiert. Die Kultivierung und Induktion erfolgte wie unter Kapitel II.6.10 beschrieben. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte mit dem Tecan-Pipettierroboter. Eingezeichnet ist die mittlere Aktivität der Transformanten als rote Linie; der blaue Bereich zeigt das Intervall der einfachen Standardabweichung (σ), während der hellblaue Bereich den Bereich der zweifachen Standardabweichung ($\pm 2\sigma$) darstellt.

III.2.1.3 Zufallsmutagenese des TorA-Signalpeptids

Um Signalpeptidvarianten der TorA-Signalsequenz zu erzeugen, wurde eine Error-prone-PCR-Technik (ep-PCR) eingesetzt, bei der die $MnCl_2$ -Konzentration von 0,1 mM bis 0,3 mM variiert wurde. Für die PCR-Reaktion wurde der Vektor pEK2-TorAGTLhis als Template verwendet und die Primer 59V01 und 60V01 wurden eingesetzt. Die unter error-prone Bedingungen erzeugten PCR-Produkte wurden aus einem Gel eluiert und danach zu Pools bestehend aus 10 PCR-Ansätzen vereinigt, mit PstI und NcoI geschnitten und in den identisch geschnittenen Vektor pEK2-TorAGTLhis ligiert.

Nach Restriktionsverdau besaßen die PCR-Fragmente eine Größe von 210 bp und umfassten neben der vollständigen TorA-Signalsequenz auch einen Teil der Sequenz der reifen Lipase GTL. Denn neben Determinanten, die sich innerhalb der Signalsequenz befinden, könnten auch Determinanten, die am Übergang von der Signalsequenz zum reifen Teil der Lipase auftreten, bedeutsam für die Höhe der

Sekretionseffizienz sein. Durch die eingebaute NotI-Restriktionsschnittstelle könnten diese Mutationen gegebenenfalls voneinander getrennt werden (siehe Abbildung 3-21).

Nach Transformation der Ligationsansätze der verschiedenen ep-PCR-Pools in *E.coli* JM109 wurden 10 Klone zur Überprüfung der Mutationsrate sequenziert. Dabei ergab sich eine durchschnittliche Mutationsrate von $\varepsilon = 0,016$, d. h., 16 bp Veränderungen auf 1000 bp. Die Wahrscheinlichkeit eine nicht-synonyme Aminosäuremutation in der mutierten Sequenz anzutreffen, lag damit bei 27% berechnet nach Bosley und Ostermeier (Bosley und Ostermeier, 2005).

III.2.1.3.1 Abschätzung einer Mindestbibliotheksgröße für das TorA-Signalpeptid

Der Bereich, der zur Erstellung der Proteinbibliothek für das TorA-Signalpeptid mutiert wurde, besaß eine Größe von 59 Aminosäuren. Geht man im einfachsten Fall von einer Proteinbibliothek aus, bei der alle Mitglieder nur eine Aminosäuremutation pro Sequenz aufweisen, so ergeben sich 1121 Varianten dieser Sequenz [Formel 3.1, (Bosley und Ostermeier, 2005)]. Bei 372 Varianten handelt es sich dabei um distinkte nicht synonyme Varianten [Formel 3.2, (Bosley und Ostermeier, 2005)].

$$V_H = 19^H \left[\frac{L!}{(L-H)! H!} \right]$$

(Formel 3.1)

$$D_{\max} = \left(\frac{L!}{(L-k_m)! k_m!} \right) \cdot 6 \cdot 3^{k_m}$$

(Formel 3.2)

V_H	Anzahl möglicher Varianten, die H Mutationen besitzen (Ergebnis in diesem Beispiel 1121)
H	Hamming Abstand: hier Anzahl der Veränderungen, durch die sich die Signalpeptidvarianten unterscheiden (hier: H = 1, da sich die Varianten nur durch eine Veränderung voneinander unterscheiden sollen)
L	Länge der Proteinsequenz (hier: L = 59 Aminosäuren)
D_{max}	max. Anzahl verschiedener Sequenzen (Ergebnis in diesem Beispiel 372)
k_m	Anzahl von Aminosäuremutationen in einer Proteinsequenz (hier: k _m = 1)

Wendet man zur Berechnung der Transformantenzahl eine Faustformel an, bei der man die Anzahl der notwendigen Transformanten aus dem 10- bis 25-fachen der distinkten Sequenzen berechnet, so gelangt man zu einer Zahl von 9300 Transformanten bei Annahme eines 25-fachen Werts (Bosley und Ostermeier, 2004).

Allerdings geht man bei dieser Abschätzung von einer idealen Bibliothek aus, bei der alle Varianten häufig vorkommen. In der Realität ist dies für eine ep-PCR jedoch nicht der Fall, da A (Adenin)- und T (Thymidin)-Austausche auf DNA-Ebene bevorzugt werden (Eggert, 2003).

Eine Bibliothek, die auch alle Varianten mit zwei Aminosäuremutationen (k_m = 2) abdeckt, würde nach der Faustformel berechnet bereits eine Größe von ca. 1,7 mio Transformanten aufweisen. Unter normalen Laborbedingungen ist dies jedoch kaum realisierbar.

Daher wurde der Aufbau einer Protein-Bibliothek mit einer Aminosäuremutation pro mutiertem Sequenzbereich angestrebt, die eine Mindestgröße von 9000 *E.coli* Transformanten besitzen sollte.

III.2.1.3.2 *Aufbau und Weiterführung der TorA-Signalpeptidbibliothek*

Beim Aufbau der TorA-Signalpeptidbibliothek stellte die niedrige Ligationseffizienz des mutierten Signalsequenzbereiches, der mit dem geschnittenen Vektor pEK2-TorAGLThis ligiert werden sollte, von durchschnittlich 150 Transformanten pro Ligationsansatz einen limitierenden Schritt dar, der auch durch diverse Optimierungsversuche der Ligation und Transformation nicht aufgehoben werden konnte. Daher wurde die DNA der *E.coli* Transformanten in kleinen Untergruppen (50-150 Transformanten) aufgearbeitet, bis eine Gesamtzahl von ca. 11.000 *E.coli* Transformanten erreicht wurde. Die aufgereinigte Plasmid-DNA dieser Transformanten wurde durch Elektroporation in *C.glutamicum* Zellen überführt.

Da mit durchschnittlich 1000 Transformanten pro 100 ng *E.coli* DNA die Transformationseffizienz in *C.glutamicum* für ein Gram-positives Wirtssystem relativ hoch war, stellte die Fortführung der Protein-Bibliothek in *C.glutamicum* keinen limitierenden Schritt dar.

Durch Einsatz von Tributyrin-Indikatorplatten, auf denen die Expression der Hybridvorläuferlipase TorA^{SP}GTLhis durch Bildung eines Hofes erkennbar war, wurden mehr als 30.000 Transformanten auf die Bildung von Höfen überprüft.

III.2.1.4 *Beim Hochdurchsatz-Screening konnten keine C.glutamicum Zellen mit einer signifikant erhöhten Enzymaktivität im Kulturüberstand identifiziert werden*

Für eine Bestimmung der Sekretionseffizienz der *C.glutamicum* Transformanten mit mutierten TorA-Signalsequenzen wurden ca. 3000 Transformanten, die Höfe auf den Tributyrin-Indikatorplatten bildeten, ausgewählt. Diese Transformanten wurden, wie unter Kapitel II.6.10 beschrieben, angezogen, induziert und die hydrolytische Aktivität mit dem Tecan-Pipettierroboter bestimmt.

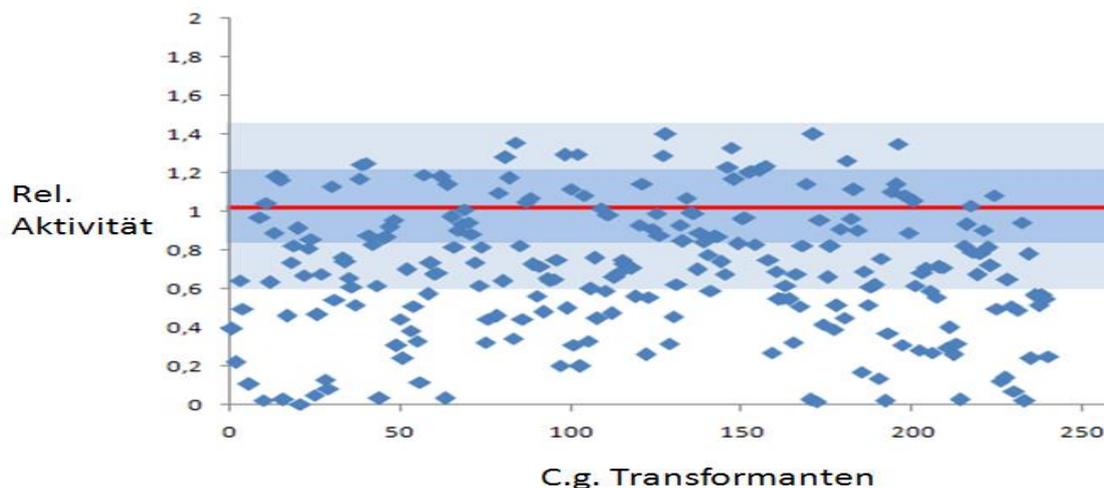


Abbildung 3-24: Relative Aktivitäten gemessen in Kulturüberständen von *C.glutamicum* Transformanten, die die Hybridlipase TorA^{SP}GTLhis mit zufällig mutierter TorA-Signalsequenz sekretierten

Die *C.glutamicum* Zellen wurden mit dem Vektor pEK2-TorAGTLhis, der durch ep-PCR zufällig mutierte TorA-Signalsequenzen im Hybridprotein enthielt, transformiert. Die Kultivierung und Induktion erfolgte, wie unter Kapite III.6.10 beschrieben. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte mit dem Tecan-Pipettierroboter. Eingezeichnet ist die mittlere Aktivität der Transformanten als rote Linie; der blaue Bereich zeigt das Intervall der einfachen Standardabweichung, während der hellblaue Bereich den Bereich der zweifachen Standardabweichung ($\pm 2\sigma$) darstellt.

Wie in Abbildung 3-24 zu erkennen ist, zeigten die meisten Transformanten eine Aktivität an, die unterhalb der mittleren Aktivität des *C.glutamicum* WT lag, der die Lipase GTL mit nicht mutierter *E.coli* TorA-Signalsequenz exprimierte. Nur 5% dieser Transformanten zeigten eine hydrolytische Aktivität an, die außerhalb des Intervalls der einfachen Standardabweichung lag. Eine größere Aktivität als die zweifache Standardabweichung ($+2\sigma$) wies keiner der Transformanten auf, so dass die detektierten Abweichungen im Bereich normalverteilter Werte lagen. Einige dieser Transformanten, die eine höhere Aktivität als die einfache Standardabweichung besaßen, wurden für eine DNA-Sequenzierung ausgewählt. Bei der Sequenzierung wurde festgestellt, dass diese Transformanten entweder keine Mutationen aufwiesen, stille Mutationen wie L-22L, A-24A oder L25L trugen, oder Mutationen in einem Bereich aufwiesen, der die Aktivität nicht wesentlich zu beeinflussen schien (d.h., diese Transformanten besaßen eine geringere Aktivität als $+2\sigma$), wie die Austausch an den Stellen P-11Q, D-10V.

Möglicherweise wurden Transformanten mit einer stark verbesserten Sekretion ($> 2\sigma$) deshalb nicht detektiert, weil noch nicht genügend Transformanten einem Screening unterzogen worden waren oder weil die bereits bestehende Interaktion von TorA Signalpeptid und der Tat-Translokase von *C.glutamicum* nicht mehr signifikant verbessert werden kann (siehe Abbildung 3-24).

Wie Abbildung 3-24 zeigt, besitzen viele Transformanten eine verringerte Sekretionseffizienz. Diese Transformanten können dazu eingesetzt werden, Determinanten zu identifizieren, die innerhalb des TorA-Signalpeptids eine Rolle bei der Sekretion spielen. Daher wurden auch einige Plasmide mit mutierten TorA-Signalsequenzen sequenziert, die aus *C.glutamicum* Transformanten isoliert wurden, bei denen die Sekretion der Lipase GTL verringert war. So führten Mutationen, die die H-Region veränderten, wie die Mutationen in der TorA-Signalsequenz der Plasmide Q oder U, zu einer verringerten Sekretion (siehe Abbildung 3-25). Eine Mutation in der N-Region des TorA-Signalpeptids, wie die D-35G Mutation im Plasmid AB, hatte sogar einen völligen Exportblock zur Folge. Auch Mutationen, durch die ein Stop-Codon zu Beginn des reifen Teils eingefügt wurde, führten zu einer Akkumulation der Lipase GTL im Zellinneren und verhinderten ihre Sekretion. Im Plasmid Z wurden fünf Mutationen im Bereich der mutierten TorA-Signalsequenz festgestellt. In diesem Fall kann nicht beurteilt werden, welche der Mutationen zu einer verringerten Sekretion führte, oder ob das Zusammenspiel der verschiedenen Mutationen den beobachteten Exportblock verursachte (siehe Abbildung 3-25).

Mit Hilfe der Zufallsmutagenese des TorA-Signalpeptids konnten somit Determinanten identifiziert werden, die zu einer verringerten Sekretion führten.

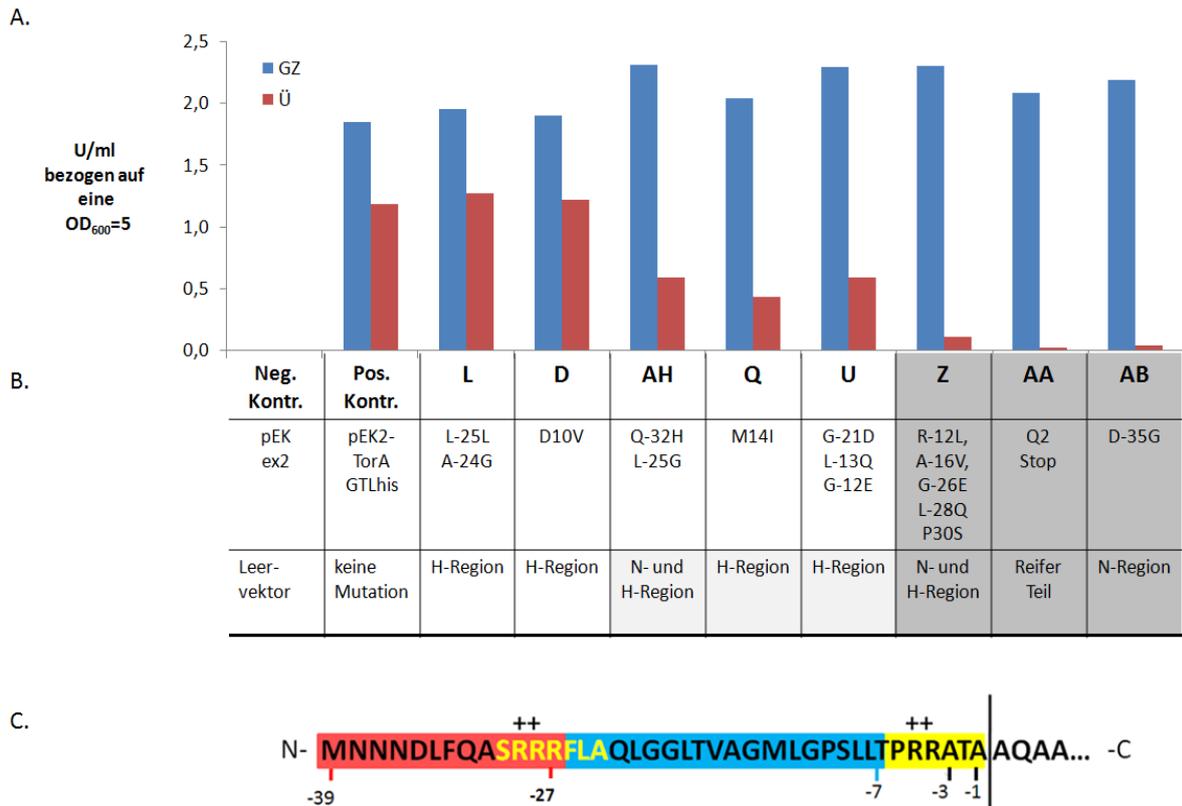


Abbildung 3-25:

A. Bestimmung der hydrolytischen Aktivität der Lipase GTL in *C. glutamicum* WT Transformanten, die mit Plasmiden transformiert wurden, die eine mutierte TorA-Signalsequenz enthielten

Der Aufschluss der *C. glutamicum* Zellen zum Gesamtzellextrakt (GZ) erfolgte mit Hilfe der Retschkugelmühle wie unter Kapitel II.6.1 beschrieben. Die hydrolytischen Aktivitäten, die für den Gesamtzellextrakt und den Kulturüberstand bestimmt wurden, wurden auf eine $OD_{600} = 5$ bezogen. Die Induktion der Genexpression in den *C. glutamicum* Stämmen erfolgte mit 0,5 mM IPTG. Kultivierung nach Induktion: 4h, 130 rpm, 30°C. Eingezeichnet ist die mittlere Aktivität der Transformanten als rote Linie; der blaue Bereich zeigt das Intervall der einfachen Standardabweichung, während der hellblaue Bereich den Bereich der zweifachen Standardabweichung ($\pm 2\sigma$) darstellt.

B. Tabellarische Darstellung der Aminosäuremutationen der TorA-Signalsequenz, die auf verschiedenen pEK2-TorAGTLhis- Plasmiden identifiziert wurden

Exemplarisch wurde die TorA-Signalsequenz von *C. glutamicum* Transformanten sequenziert, die eine verringerte Aktivität der Lipase GTL im Kulturüberstand aufwiesen. Während die Transformanten, aus denen die Plasmide L und D isoliert wurden, eine Aktivität der Lipase im Kulturüberstand aufwiesen, die mit der des unmutierten Wildtyps (Positivkontrolle) übereinstimmte, zeigten die Transformanten, aus denen die Plasmide AH, Q und U isoliert wurden, eine verringerte Aktivität der Lipase GTL im Überstand an, die etwa der Hälfte der Aktivität der Positivkontrolle entsprach. Bei den Transformanten, aus denen die Plasmide Z, AA und AB isoliert wurden, war die Sekretion der Lipase GTL fast vollständig blockiert. Die Mutationen in der TorA-Signalsequenz bzw. der Sequenz zu Beginn des reifen Teils führten demnach zu einer Blockade der Sekretion, während gleichzeitig die Lipase GTL intrazellulär geringfügig akkumulierte.

C. Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz des TorA-Signalpeptids

N-Region (Rot), H-Region (Blau), C-Region (Gelb), Lage der Erkennungssequenz für die Signalpeptidase des TypI (schwarzer Strich)

III.2.2 Strategie 2: Coexpression heterologer und homologer Komponenten der Tat-Translokase

Unter Überexpressionsbedingungen von homologen oder heterologen Tat-Substraten stellt die Substrat-Sättigung der Tat-Translokase einen Engpass dar, der zur Folge hat, dass Tat-Substrate nicht mehr effektiv transloziert werden können und es demnach zu einer intrazellulären Akkumulation des Substrates kommt, die von einem proteolytischen Abbau des Tat-Substrates im Cytosol begleitet sein kann [vgl. (De Keersmaecker *et al.*, 2006; Yahr und Wickner, 2001)]. Im Fall der Sekretion der Lipase GTL in *C.glutamicum* wurde eine starke intrazelluläre Akkumulation dieses Enzyms festgestellt (siehe Abbildung 3-15). Dies war ein Indiz dafür, dass möglicherweise eine Substratsättigung der Tat-Translokase vorlag. Eine Ursache für diesen Engpass kann ein Mangel von verfügbaren Tat-Translokase-Komponenten sein. Zur Aufhebung dieser quantitativen Limitierung bietet sich eine Coexpression von homologen Tat-Komponenten in *C.glutamicum* an. Durch Überexpression von vollständigen TatABC-Translokase-Systemen konnte bereits in *E.coli* und *S.lividans* eine verbesserte Sekretion erzielt werden (Barrett *et al.*, 2003; De Keersmaecker *et al.*, 2006). Daher könnte dies in Analogie dazu auch eine Strategie für die Aufhebung der in *C.glutamicum* festgestellten Limitierung sein.

Tabelle 3-04: *C.glutamicum* Translokasekomponenten (Schwarz) im Vergleich zu *E.coli* Tat-Translokasekomponenten (Grau)

	Locus Tag*)		kDa	bp	AS	Übereinstimmung mit C.g. Protein
Tat B	cg 1273	<i>C.glutamicum</i> Tat B	17	471	156	
		<i>E. coli</i> Tat B	18	516	171	(24%)
Tat C	cg 1684	<i>C.glutamicum</i> Tat C	35	945	314	
		<i>E. coli</i> Tat C	29	777	257	(25%)
Tat A	cg 1685	<i>C.glutamicum</i> Tat A	12	318	105	
		<i>E. coli</i> Tat A	10	270	89	(23%)
Tat E	cg 3381	<i>C.glutamicum</i> Tat E	7	183	60	
		<i>E. coli</i> Tat E	7	204	67	(30%)

*) Logus Tag im *C.glutamicum* Kalinowski Chromosom (Kalinowski *et al.*, 2003)(vgl. Integr8-Datenbank: <http://www.ebi.ac.uk/integr8/EBI-Integr8-HomePage.do>); Alignment mit *Emboss Pairwise Alignment – Algorithms*: <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>

Eine andere Ursache für die Substratsättigung der Tat-Translokase in *C.glutamicum* kann sein, dass durch eine fehlende oder mangelnde Spezifität von rekombinantem Tat-Substrat und der Tat-Translokase des Wirtssystems ein qualitativer Engpass vorliegt, der eine effektive Sekretion der Lipase GTL in *C.glutamicum* verhindert. Durch Expression von heterologen *E.coli* Tat-Translokase-Komponenten könnte in *C.glutamicum* die Qualität der Interaktion von *E.coli* TorA-Signalpeptid und der Tat-Translokase verbessert werden. Untersuchungen in *E.coli* hatten gezeigt, dass funktionelle Tat-Translokasen sowohl aus *E.coli* eigenen als auch aus heterologen Tat-Komponenten aufgebaut werden können (Hicks *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2007). Bisher wurde noch nicht untersucht, ob *E.coli* Tat-Komponenten die Abwesenheit von Tat-Komponenten in Gram-positiven Wirtssystemen wie *C.glutamicum* kompensieren können. Zudem war nicht bekannt, ob *E.coli* Tat-Komponenten in einem Gram-positiven Wirtssystem

funktionell mit den Tat-Komponenten des Wirtssystems interagieren können. Wie in Tabelle 3-04 zu erkennen ist, weisen die Tat-Komponenten von *C.glutamicum* nur eine sehr geringe Ähnlichkeit mit den *E.coli* Tat-Komponenten auf. Einer Abschätzung zufolge entwickelten sich *C.glutamicum* und *E.coli* seit ca. 3,2 Mrd. Jahren divergent (Battistuzzi *et al.*, 2004).

Im Folgenden soll untersucht werden, ob und inwieweit durch Expression heterologer *E.coli* Tat-Komponenten die Sekretion eines Tat-abhängigen Modellenzym in *C.glutamicum* beeinflusst wird.

III.2.2.1 Zweivektorensystem zur Coexpression homologer und heterologer Tat-Translokasekomponenten

Um heterologe und homologe Tat-Komponenten im *C.glutamicum* WT und in der Δ tatAC-Mutante mit dem Substrat-Protein cozuexprimieren, wurde ein Zweivektorensystem für die Genexpression entwickelt. Da die Vektoren pEKex2 (pBL-1 Replicon) und pVWex2 (pHM1519 Replicon) unterschiedliche Replikationsursprünge besitzen, sind sie zueinander kompatibel, so dass sie unabhängig voneinander in *C.glutamicum* replizieren können. Zur Expression der heterologen Tat-Substrate TorA^{SP}GFP und TorA^{SP}GTLhis wurde der pEKex2-Vektor ausgewählt und zur Coexpression der homologen und heterologen Tat-Komponenten wurde der pVWex2-Vektor eingesetzt. Die Klonierung der heterologen und homologen Tat-Translokase-Komponenten in den pVWex2 Vektor ist im Kapitel II.5 beschrieben.

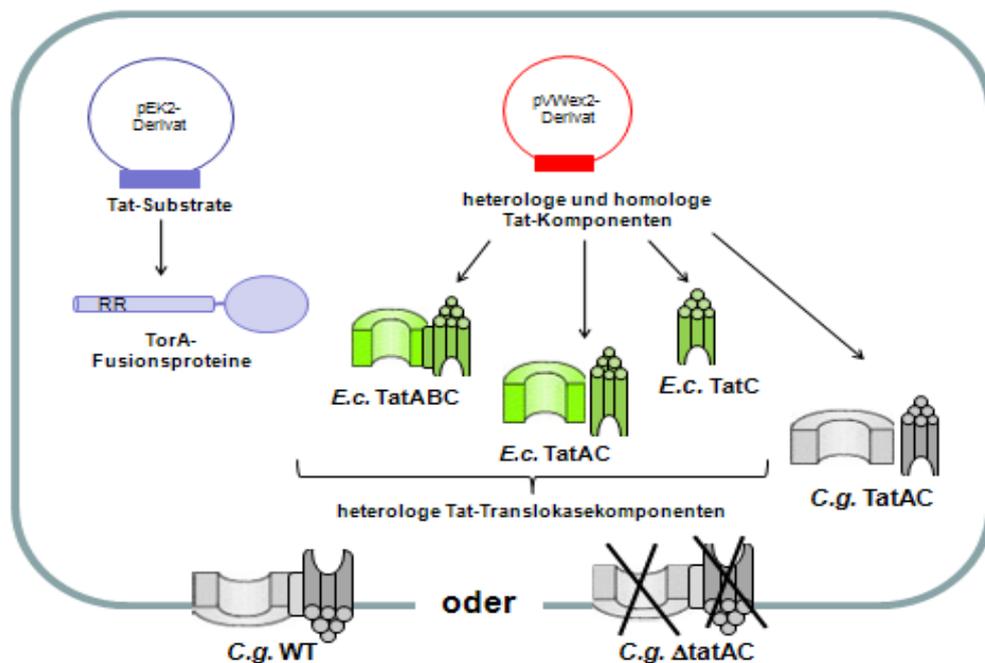


Abbildung 3-26: Zweivektorensystem zur Coexpression von Tat-Substraten sowie heterologer und homologer Tat-Komponenten im *C.glutamicum* WT oder der *C.glutamicum* Δ tatAC-Mutante

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Replikationsursprünge sind die Vektoren pEKex2 (pBL-1 Replicon) und pVWex2 (pHM1519 Replicon) zueinander kompatibel, so dass sie unabhängig voneinander in *C.glutamicum* replizieren können. Beide Vektorsysteme sind IPTG induzierbar.

III.2.2.2 Coexpression heterologer Tat-Komponenten

III.2.2.2.1 Untersuchung der Komplementation der *C.glutamicum* Δ tatAC-Mutante durch *E.coli* Tat-Translokasekomponenten

Um zu untersuchen, ob *E.coli* Tat-Translokase-Komponenten funktionell in *C.glutamicum* exprimiert werden können, wurde eine Komplementation der *C.glutamicum* *tatAC*-Mutante durchgeführt. In dieser Mutante ist das *tatAC*-Operon deletiert (Meissner, 2005).

Ein phänotypisches Merkmal dieser Mutante ist, dass sie im komplexen BHIS-Medium wesentlich langsamer als der *C.glutamicum* WT wächst und bereits bei einer $OD_{600} = 6$ die stationäre Phase erreicht (siehe Abbildung 3-27, Wachstumskurve 2). Der Wildtyp gelangt in die stationäre Phase erst ab einer $OD_{600}=11$ (siehe Abbildung 3-27, Wachstumskurve 1). Kommt es zu einer Komplementation des Wachstumsdefektes, werden funktionelle Tat-Translokasen in der Deletionsmutante ausgebildet und authentische Tat-Substrate, die für ein normales Wachstum in BHIS verantwortlich sind, können sekretiert werden.

III.2.2.2.2 Durch Expression von *E.coli* *TatA* und *TatC* Komponenten wird die Δ tatAC-Mutante nicht komplementiert

Wie in Abbildung 3-27 B, Wachstumskurve 7 zu erkennen ist, konnte durch Expression des künstlichen *E.coli* *tatAC*-Operons keine Aufhebung des Wachstumsdefektes erzielt werden. Das Wachstum dieses mit dem Vektor pVW2-*tatAC* (*E.c.*) transformierten Deletionsstammes war sogar geringer als das Wachstum der Δ *tatAC*-Mutante, die mit dem Leervektor pVWex2 transformiert wurde. Die Untersuchung der Sekretion des Modellsubstrates TorA^{SP}GFP durch einen Western-Blot-Assay bestätigte, dass die *E.coli* *Tat A* und *Tat C* Komponenten die Deletionsmutante nicht kreuzkomplementieren konnten (siehe Abbildung 3-27 B). Das TorA^{SP}GFP Protein wurde in der Δ *tatAC*-Mutante, die das Plasmid pVW2-*tatAC*(*E.c.*) enthielt, zwar exprimiert, wird aber nicht in den Überstand sekretiert. Diese Ergebnisse zeigten, dass durch die *E.coli* *TatA* und *TatC* Komponenten keine funktionellen Tat-Translokasen in *C.glutamicum* aufgebaut werden konnten.

III.2.2.2.3 Durch Expression des *E.coli* *TatABC*-Systems wird die Δ tatAC-Mutante ebenfalls nicht komplementiert

Eine mögliche Ursache für die ausbleibende Kreuzkomplementation könnte sein, dass für die Ausbildung einer funktionellen *E.coli* Tat-Translokase in *C.glutamicum* die Anwesenheit des *E.coli* *TatB* Proteins erforderlich ist. In *E.coli* liegt dieses Protein im Komplex mit dem *TatC* Protein vor. Daher wurde in weiteren Experimenten untersucht, ob durch Expression des vollständigen *E.coli* *tatABC* Operons der Wachstumsdefekt aufgehoben werden kann und das Modellsubstrat TorA^{SP}GFP sekretiert wird.

Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Δ *tatAC*-Mutante, die mit dem Plasmid pVW2-*tatABC* (*E.c.*) transformiert wurde, zeigte nicht nur, dass der Wachstumsdefekt nicht aufgehoben werden konnte, sondern auch dass diese Mutante äußerst schlecht wuchs (siehe Abbildung 3-27, Wachstumskurve 4). Nach 24 h Wachstum hatte die Mutante, die mit dem *E.coli* *tatABC* Operon transformiert wurde, eine $OD_{600} = 2$ erreicht, während die Deletionsmutante ohne Plasmid eine $OD_{600} = 6$ und die Deletionsmutante mit pVWex2 Leervektor eine $OD_{600} = 4$ aufwies (Abbildung 3-27 Wachstumskurve 6).

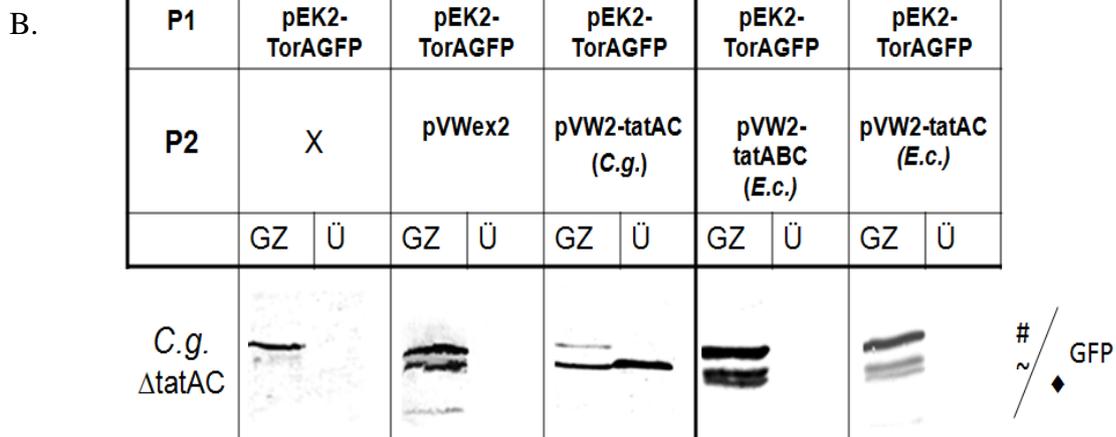
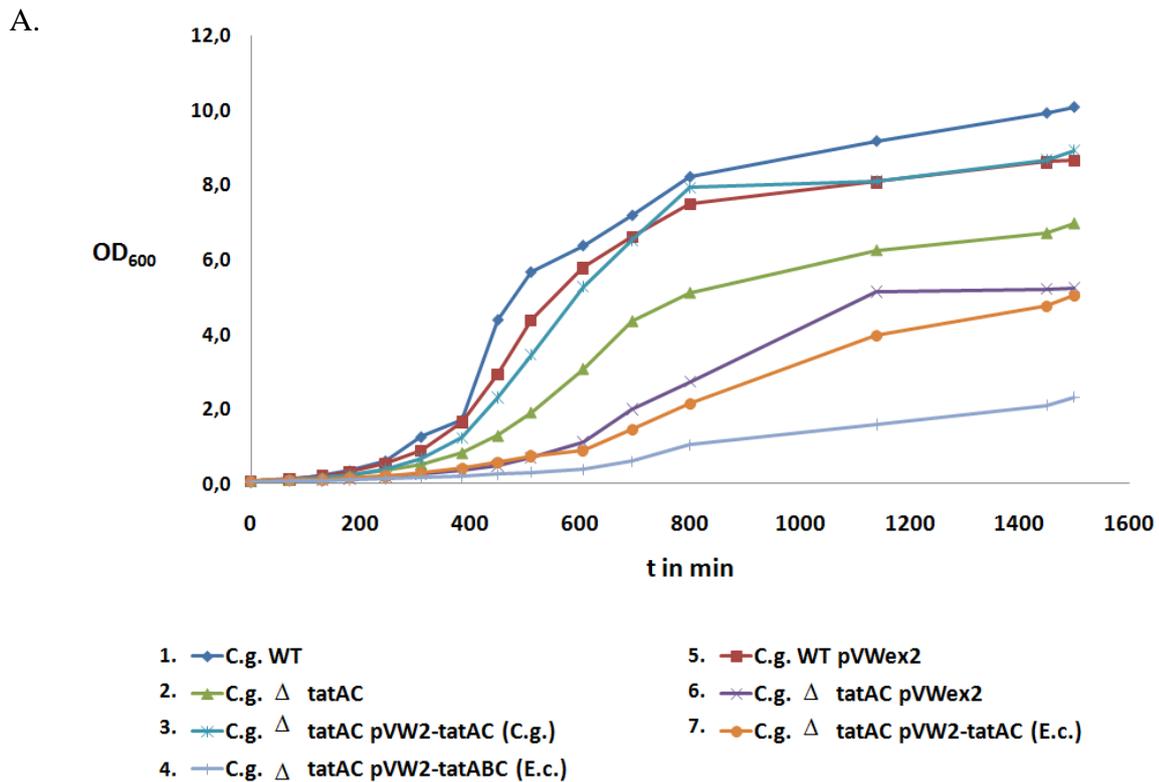


Abbildung 3-27: A. Wachstumsvergleich von *C. glutamicum* WT-Zellen und mit homolog bzw. heterolog komplementierten Δ tatAC-Mutanten

C. glutamicum WT und *C. glutamicum* Δ tatAC-Mutante wurden in BHIS-Medium angezogen. Die Aufnahme der Wachstumskurven erfolgte wie unter Kapitel II.3.4 beschrieben. Die *C. glutamicum* Stämme wurden als Übernachtskultur bei 30°C angezogen, gewaschen und auf eine Ausgangs-OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft.

B. Untersuchung der Sekretion des Modellproteins TorAGFP mittels Western-Blot-Nachweis in *C. glutamicum* Δ tatAC-Mutanten, die verschiedene Tat-Translokase Komponenten coexprimieren

Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen erfolgte mit der Kugelmühle wie im Kapitel II.6.1 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion (GZ) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5 und die im Überstand (Ü) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1.

Abk.: # (= Vorläuferprotein), ~ (= intrazelluläres Abbauprodukt), ◆ (= prozessierte Form des Hybridproteins), P1 (= pEKex2-Derivate), P2 (= pVWex2-Derivate)

Der Western-Blot-Nachweis des TorA^{SP}GFP Modellproteins im Überstand und im Gesamtzellextrakt der mit dem *tatABC* Operon transformierten Deletionsmutante zeigte, dass das TorA^{SP}GFP Protein in der Mutante nicht sekretiert wurde (siehe Abbildung 3-27 B). Diese Ergebnisse belegen, dass es zu keiner Ausbildung einer funktionellen Tat-Translokase kam. Das schlechte Wachstum dieser Mutante wurde möglicherweise dadurch verursacht, dass die Expression des *E.coli* TatABC-Systems die Funktion der Cytoplasmamembran als Permeabilitätsschranke in *C.glutamicum* störte.

III.2.2.2.4 Durch Coexpression von *E.coli* Tat-Komponenten im *C.glutamicum* WT wird die Translokation von TorA^{SP}GFP blockiert

Bei einer Coexpression von *E.coli* Tat-Komponenten wie TatA und TatC Proteinen und dem Modellsubstrat TorA^{SP}GFP im *C.glutamicum* WT wurde ein Exportblock festgestellt. Die Coexpression des TatC-Proteins wurde durch Western-Blot-Nachweis bestätigt (siehe Abbildung 3-28). Wie in Abbildung 3-28 zu erkennen ist, kam es bei der gemeinsamen Expression von TorA^{SP}GFP und den *E.coli* TatA und TatC Proteinen zu einer Interferenz zwischen den *E.coli* Tat-Komponenten und den Tat-Komponenten von *C.glutamicum*. Folge war, dass Vorläuferproteine im Gesamtzellextrakt akkumulierten, während im Kulturüberstand keine sekretierten Proteine nachweisbar waren. Bei der Coexpression von TatC und TorA^{SP}GFP im *C.glutamicum* WT wurde im Western-Blot-Assay eine besonders starke Akkumulation von Vorläuferproteinen beobachtet (siehe Abbildung 3-28). Die Expression von *E.coli* TatC konnte durch Western-Blot-Nachweis erbracht werden (siehe Abbildung 3-28). Im Kulturüberstand wurde hingegen kein GFP nachgewiesen. Das bedeutet, dass die Anwesenheit von *E.coli* TatC einen totalen Exportblock im *C.glutamicum* WT verursachte. Bei dem gegenwärtigen Arbeitsmodell der Tat-Translokation in *E.coli* geht man davon aus, dass das TatC Protein als Bestandteil des TatBC-Rezeptorkomplexes eine initiale Bindung mit dem Signalpeptid eines Tat-Substrates eingeht und dann erst über das TatB Protein als Vermittler in Kontakt mit dem aus TatA Proteinen gebildeten Translokationskanal tritt (Alami *et al.*, 2003; Berks *et al.*, 2005). Daher könnte es sein, dass auch in *C.glutamicum* coexprimierte TatC Proteine zunächst initiale Bindungen mit TorA^{SP}GFP-Vorläuferproteinen eingehen. Dies würde zu einer Stabilisierung des TorA^{SP}-Vorläuferproteins in *C.glutamicum* führen. Kommt es zu keiner funktionellen Interaktion mit weiteren Tat-Komponenten, wäre, wie im Western Blot Abbildung 3-28 beobachtet, eine Akkumulation von Vorläuferproteinen zusammen mit einem Exportblock die Folge.

III.2.2.2.5 Wird das *E.coli* TatABC System vollständig im *C.glutamicum* WT exprimiert, tritt kein Exportblock auf

Da sowohl durch Coexpression von TatC alleine sowie von TatA zusammen mit TatC ein Exportblock des TorA^{SP}GFP Hybridproteins in *C.glutamicum* WT auftrat, wurde als dritte Variante untersucht, ob auch die vollständige Expression des *E.coli* TatABC Systems mit der Sekretion von GFP in *C.glutamicum* interferiert. Als Teil des *E.coli* TatABC-Systems wurde die Expression von *E.coli* TatC über Western-Blot-Assay nachgewiesen. Wie im Western Blot Abbildung 3-28 zu erkennen ist, konnte bei vollständiger Expression des *E.coli* *tatABC* Operons die prozessierte Form des TorA^{SP}GFP Modellproteins im Kulturüberstand identifiziert werden. Durch Coexpression des *E.coli* *tatABC*-Operons war es also im

Gegensatz zur Coexpression des *E.coli* *tatC* Gens alleine zu keinem Exportblock gekommen. Die Anwesenheit der vollständigen *E.coli* TatABC-Translokase interferierte demnach sehr viel weniger mit der Tat-abhängigen Sekretion von TorA^{SP}GFP im *C.glutamicum* WT als TatC alleine.

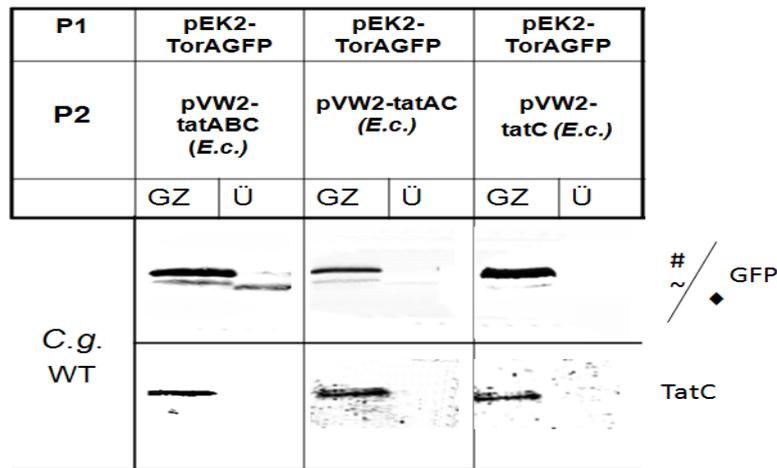


Abbildung 3-28: Untersuchung der Sekretion des Modellproteins TorAGFP mittels Western-Blot-Nachweis in *C.glutamicum* WT-Zellen, die verschiedene Tat-Translokase Komponenten coexprimieren

Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen erfolgte mit der Kugelmühle wie im Kapitel II.6.1 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion (GZ) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5 und die im Überstand (Ü) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1. Die Expression von *E.coli* TatC im *C.glutamicum* WT wurde im Gesamtzellextrakt über einen Western-Blot mit einem α -TatC Antikörper überprüft.

Abk.: # (= Vorläuferprotein), ~ (= intrazelluläres Abbauprodukt), ♦ (= prozessierte Form des Hybridproteins), P1 (= pEKex2-Derivate), P2 (= pVWex2-Derivate)

III.2.2.3 Coexpression homologer Tat-Komponenten

III.2.2.3.1 Durch Coexpression homologer Tat-Komponenten wird die Δ tatAC-Mutante komplementiert

Wie in Abbildung 3-27 Wachstumskurve 3 zu erkennen ist, konnte durch Expression von *C.glutamicum* TatA und TatC Proteinen der Wachstumsdefekt der Δ tatAC-Mutante aufgehoben werden. Dabei zeigte, die mit den homologen Tat-Komponenten komplementierte Deletionsmutante das gleiche Wachstumsverhalten wie der *C.glutamicum* WT, der den pVWex2 Leervektor exprimierte. Wurde das TorA^{SP}GFP Modellsubstrat in der Deletionsmutante zusammen mit den *C.glutamicum* Tat-Komponenten coexprimiert, wurde GFP effizient in den Kulturüberstand sekretiert (siehe Abbildung 3-27 B).

Dies zeigte, dass die plasmidkodierte *C.glutamicum* Tat-Komponenten funktionelle Tat-Translokasen ausbildeten und dass die stöchiometrisch erhöhte Anzahl der plasmidkodierte Tat-Komponenten keinen negativen Einfluss auf die Sekretion hatte. Denn Untersuchungen in *E.coli* hatten gezeigt, dass eine effiziente Translokation vom richtigen Mengenverhältnis der Tat-Translokase-Komponenten abhängig ist. Auffällig war bei der Expression der *C.glutamicum* eigenen Tat-Komponenten in der Deletionsmutante, dass die Vorläuferbande nicht im Gesamtzellextrakt akkumulierte (siehe Abbildung 3-27 B). Wahrscheinlich wurde durch Coexpression von *C.glutamicum* Tat-Komponenten die Sekretion von TorA^{SP}GFP-Vorläuferproteinen positiv beeinflusst.

III.2.2.4 Die Überexpression des *C.glutamicum* tatAC-Operons führt zu einer verbesserten Sekretion der Hybridlipase TorA^{SP}GTLhis und TorA^{SP}GFP

Um zu überprüfen, ob durch Coexpression von *C.glutamicum*-eigenen Tat-Komponenten die Tat-abhängige Sekretion in *C.glutamicum* WT positiv beeinflusst werden kann, wurde die Sekretion der Modellsubstrate TorA^{SP}GFP und TorA^{SP}GTLhis in An- und Abwesenheit von coexprimierten Tat-Translokase-Komponenten untersucht. Wie im Western-Blot-Nachweis (Abbildung 3-29 und 3-30) zu erkennen ist, führte die Coexpression der homologen Tat-Komponenten, *C.glutamicum* TatA und TatC, zu einer verbesserten Sekretion im *C.glutamicum* WT. Sowohl im Fall der Lipase TorA^{SP}GTLhis als auch im Fall des TorA^{SP}GFP Hybridproteins akkumulierten reife Formen der Lipase GTL bzw. von GFP stark im Kulturüberstand. Die Menge an Vorläuferformen nahm hingegen in beiden Fällen ab. Somit hatte sich bei diesen Tat-Substraten das Verhältnis von Vorläuferprotein zu prozessierter Form und somit die Translokationseffizienz stark verbessert. Im Fall der Lipase GTLhis wurde allerdings eine Zunahme einer intrazellulären Abbaubande beobachtet (siehe Abbildung 3-30). Bei der Quantifizierung der hydrolytischen Aktivität der Lipase GTL im *C.glutamicum* Kulturüberstand wurde ein viermal so hoher Wert festgestellt wie in dem *C.glutamicum* Stamm, der den pVWex2 Leervektor enthielt oder das *E.coli* tatABC Operon coexprimierte (siehe Abbildung 3-31).

Dies zeigt, dass durch Coexpression von homologen Tat-Komponenten die Sekretionseffizienz von TorA^{SP}-Hybridproteinen im *C.glutamicum* WT verbessert werden kann.

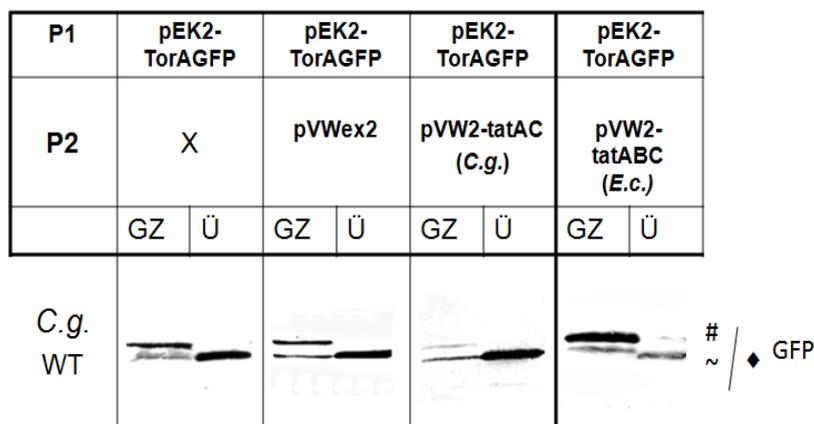


Abbildung 3-29: Untersuchung der Sekretion des Modellproteins TorAGFP mittels Western-Blot-Nachweis in *C.glutamicum* WT-Zellen, die verschiedene Tat-Translokase Komponenten überexprimieren

Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen erfolgte mit der Kugelmühle wie in den Kapiteln 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion (GZ) aufgetragene Proteinmenge entspricht ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5 und die im Überstand (Ü) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1

Abk.: # (= Vorläuferprotein), ~ (= intrazelluläres Abbauprodukt), ♦ (= prozessierte Form des Hybridproteins)

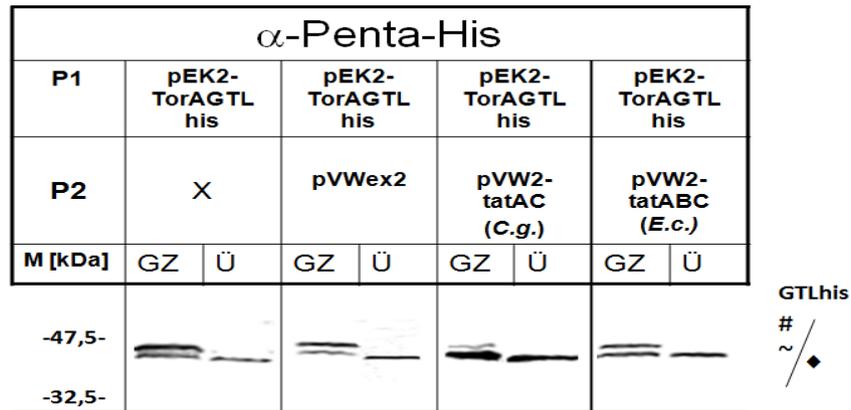


Abbildung 3-30: Untersuchung der Sekretion der Hybridlipase TorAGTLhis mittels Western-Blot-Nachweis in *C.glutamicum* WT- Zellen bei Coexpression verschiedener Tat-Translokase Komponenten

Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen erfolgte mit der Kugelmühle wie in den Kapiteln 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion (GZ) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5 und die im Überstand (Ü) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1.

Abk.: # (= Vorläuferprotein), ~ (= intrazelluläres Abbauprodukt), ◆ (= prozessierte Form des Hybridproteins)

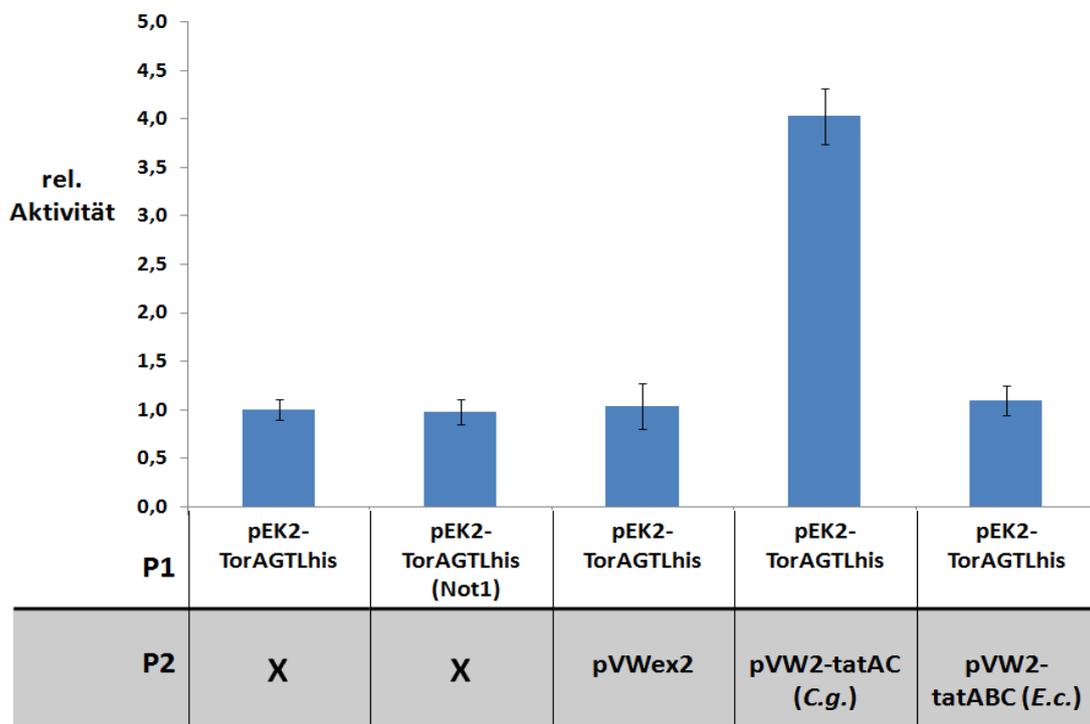


Abbildung 3-31: Photometrische Bestimmung der Aktivität von *C.glutamicum* WT Kulturüberständen, die die Hybridlipase TorAGTLhis zusammen mit heterologen oder homologen Tat-Komponenten coexpressieren

Die hydrolytischen Aktivitäten, die für den Kulturüberstand bestimmt wurden, wurden auf eine OD₆₀₀= 5 bezogen. Die Induktion der Genexpression in den *C.glutamicum* Stämmen erfolgte mit 0,5 mM IPTG. Kultivierung nach Induktion: 4 h, 130 rpm, 30°C .

Zweivektorensystem: P1 (= pEKex2-Derivate), P2 (= pVWex2-Derivate)

III.2.3 Strategie 3: Ausnutzung des Tat-Proofreadings für eine verbesserte Sekretion rekombinanter Proteine durch Coexpression des Signalpeptid-spezifischen Chaperons TorD

Eine dritte Möglichkeit, die Sekretion von rekombinanten Proteinen in Gram-positiven Bakterien zu verbessern, ist die Coexpression von cytosolischen Chaperonen.

Da für den Tat-abhängigen Transport die Annahme einer gefalteten Konformation eine Grundvoraussetzung für die Translokation ist, ist es naheliegend, Engpässe rekombinanter Proteine, die auf Ebene der cytosolischen Faltung liegen, durch Eingriffe in die cytosolische Reifungs- und Faltungskaskade zu beheben. Dies ist durch Coexpression von cytosolischen Chaperonen möglich.

Während Chaperone wie GroEL oder DanK unspezifisch an hydrophobe Bereiche ungefalteter Proteine binden, erkennen Chaperone wie TorD oder DmsD selektiv bestimmte Tat-abhängige Signalpeptide (Jack *et al.*, 2004). Das *E.coli* Chaperon TorD bindet selektiv das Signalpeptid der TMAO-Reduktase (TorA) und unterstützt das TorA-Protein bei der Aufnahme seines komplexen Molybdän-Cofaktors (Ilbert *et al.*, 2003; Hatzixanthis *et al.* 2005; Genest *et al.*, 2006a). Gleichzeitig koordiniert es die Reifung des Enzyms mit dem Export des vollständig gefalteten Enzyms über den Tat-Weg. Dabei schirmt es durch Bindung an das TorA-Signalpeptid das TMAO-Apoenzym von einer zu frühzeitigen Einschleusung in den Tat-Weg ab. Dieser Vorgang wird als Tat-Proofreading durch das TorD Chaperon bezeichnet (Jack *et al.*, 2004, Jack *et al.*, 2005). Faktoren, die während dieses Proofreading-Prozesses dafür verantwortlich sind, dass sich das TorD Chaperon wieder vom TorA-Signalpeptid ablöst und es für eine Translokation freigeben, sind gegenwärtig unbekannt (vgl. Kapitel I.4.8 und Abbildung 1-06).

Wie Untersuchungen mit heterologen TorA^{SP}-Hybridproteinen gezeigt haben, ist die durch TorD ausgeübte Qualitätskontrolle nicht nur auf die TMAO-Reduktase beschränkt, sondern kann in *E.coli* auf heterologe Hybridproteine wie TorA^{SP}GFP oder TorA^{SP}HybO (TorA^{SP}-Hybridprotein der [NiFe]-Hydrogensase) übertragen werden (Jack *et al.*, 2004; Li *et al.* 2006). Durch Coexpression von TorD war es in *E.coli* möglich, die Sekretion des TorA^{SP}GFP Hybridvorläuferproteins um den Faktor 3 zu steigern (Li *et al.* 2006).

Daher wurde als weitere Strategie zur Verbesserung der Tat-abhängigen Sekretion rekombinanter Proteine eine Coexpression von TorA^{SP}-Hybridproteinen und des TorD Chaperons in *C.glutamicum* als Gram-positiven Wirtssystem evaluiert.

III.2.4 Zweivektorensystem zur Coexpression des Chaperons TorD

Um das TorD Chaperon in *C.glutamicum* WT gemeinsam mit TorA^{SP}-Hybridproteinen zu exprimieren, wurde das Zweivektorensystem bestehend aus den pEKex2 und den pVWex2 Vektoren, wie im Kapitel II.5. beschrieben, modifiziert. Während auf dem pVWex2-Vektor das Gen des TorD Chaperons integriert wurde, wurden auf den pEKex2 Vektoren folgende TorA^{SP}-Hybridvorläuferproteine als Tat-Substrate angeboten: TorA^{SP}GFP, TorA^{SP}GTLhis und TorA^{SP}Cut. Die Expression des TorD Proteins konnte in *C.glutamicum* sowohl über SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung als auch über einen Western-Blot-Assay nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3-33 A und B).

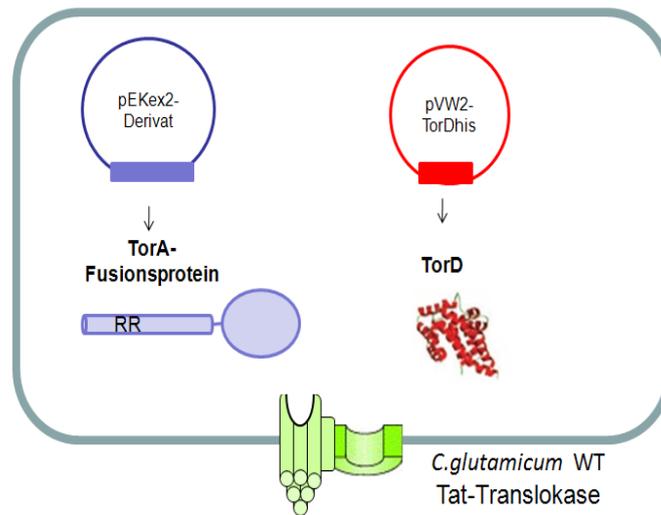


Abbildung 3-32: Zweivektorensystem zur Coexpression des TorD Chaperons in *C. glutamicum* WT-Zellen

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Replikationsursprünge sind die Vektoren pEKex2 (pBL-1 Replicon) und pVWex2 (pHM1519 Replicon) zueinander kompatibel, so dass sie unabhängig voneinander in *C. glutamicum* replizieren können. Beide Vektorsysteme sind IPTG induzierbar. Während sich das TorD Chaperon auf einem pVWex2-Derivat befand, wurden verschiedene TorA-Hybridproteine von dem pEKex2 Vektorsystem coexprimiert.

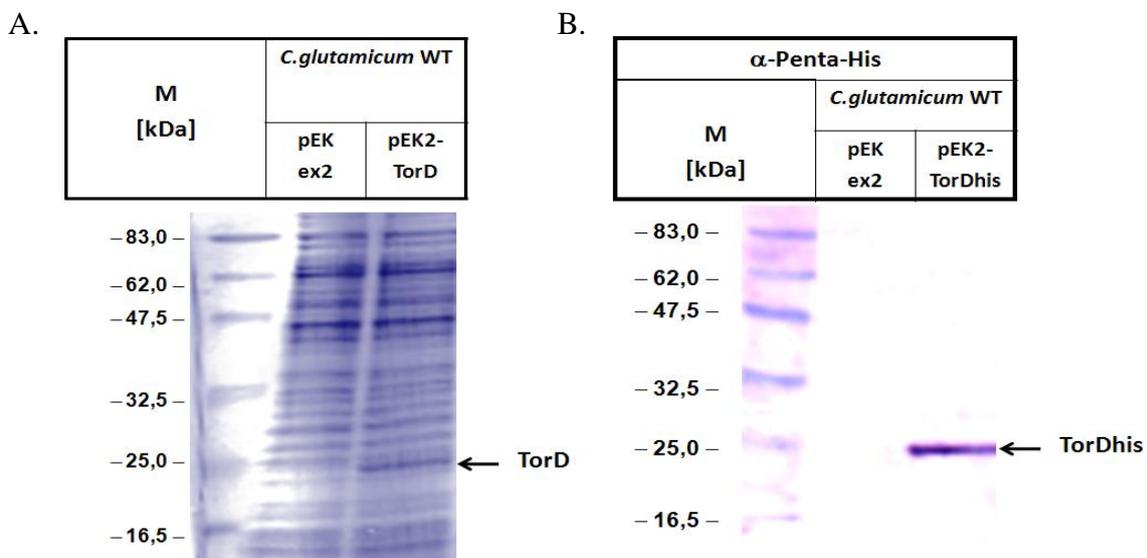


Abbildung 3-33: Nachweis der TorD Expression in *C. glutamicum* WT

A. SDS-PAGE zum Nachweis der Expression des cytosolischen *E. coli* Chaperons TorD in *C. glutamicum* WT Gesamtzellextrakten.

B. Western-Blot-Nachweis der Expression von TorDhis in *C. glutamicum*

Die Aufarbeitung des Gesamtzellextraktes erfolgte mit der Kugelmühle wie im Kapitel II.6.1 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion (GZ) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD_{600} von 0,5. Das TorD Protein wurde zu seinem Nachweis mit einem His-Tag versehen und im Western-Blot mit einem α -Penta-His Antikörper nachgewiesen.

III.2.5 Die Coexpression von TorD führt in *C.glutamicum* zu einem Exportblock des Hybridproteins TorA^{SP}GFP

Da in *E.coli* die Coexpression von TorD zu einer Steigerung der Sekretionseffizienz des Modellproteins TorA^{SP}GFP geführt hatte (Li *et al.*, 2006), wurde zunächst untersucht, ob auch durch die Kombination von TorA^{SP}GFP und TorD in *C.glutamicum* eine verbesserte Sekretion erzielt werden kann. Zu diesem Zweck wurde das Chaperon TorD zusammen mit dem Hybridprotein TorA^{SP}GFP mithilfe des in Kapitel III.2.4 beschriebenen Zweivektorensystems in *C.glutamicum* exprimiert (siehe Abbildung 3-32). Anschließend wurde eine Fraktionierung in Gesamtzellextrakt und Kulturüberstand vorgenommen und das TorA^{SP}GFP-Hybridprotein mit einem α -GFP Antikörper in den beiden Fraktionen lokalisiert.

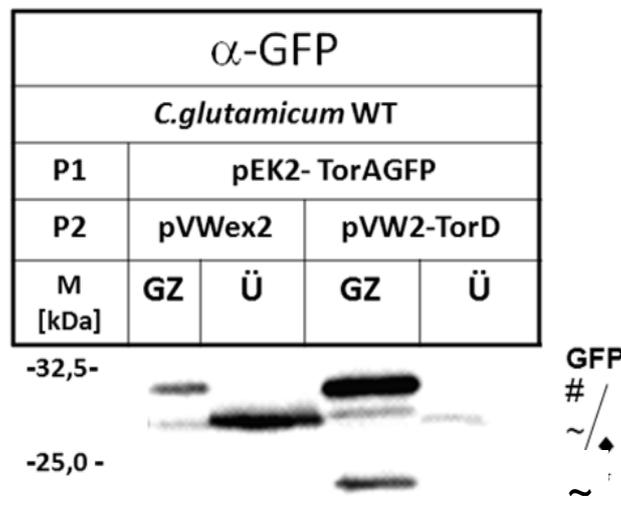


Abbildung 3-34: Lokalisierung von TorAGFP Hybridproteinen bei Coexpression von TorD in *C.glutamicum* WT fraktioniert in Gesamtzellextrakt (GZ) und Kulturüberstand (Ü)

Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen erfolgte mit der Kugelmühle wie im Kapitel II.6.1 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion (GZ) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,75 und die im Überstand (Ü) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1,5. Als Antikörper wurde α -GFP eingesetzt. Zweivektorensystem: P1 (= pEKex2-Derivate), P2 (= pVWex2-Derivate)

Abk.: # (= Vorläuferprotein), ~ (= intrazelluläres Abbauprodukt), ♦ (= prozessierte Form des Hybridproteins).

Wie der Western-Blot-Assay in Abbildung 3-34 zeigt, wurde das 31 kDa große TorA^{SP}GFP Hybridprotein in *C.glutamicum* WT-Zellen effektiv in den Kulturüberstand sekretiert, wenn der pVWex2 Leervektor anwesend war. Wurde das TorA^{SP}GFP Hybridprotein jedoch gemeinsam mit dem Chaperon TorD in *C.glutamicum* WT-Zellen exprimiert, kam der Export des TorA^{SP}GFP Proteins fast vollständig zum Erliegen (siehe Abbildung 3-34). Auffällig war dabei, dass das Vorläuferprotein des Hybridproteins stark in der Gesamtzellfraktion akkumulierte. Gleichzeitig mit dem akkumulierten Vorläuferprotein wurde eine Abbaubande des Hybridproteins in der Gesamtzellfraktion sichtbar, die eine Größe von ca. 20 kDa besaß. Im Gegensatz zu den in *E.coli* durchgeführten Experimenten führte also die Coexpression von TorD in *C.glutamicum* nicht zu einer Steigerung der Sekretion, sondern interessanterweise zu einem Exportblock

des TorA^{SP}GFP Hybridproteins. Wahrscheinlich wurde die Akkumulation des Vorläuferproteins dadurch verursacht, dass das TorD Chaperon als Teilprozess des Tat-Proofreadings eine Bindung mit dem TorA-Signalpeptid im Hybridprotein einging, die nicht aufgelöst werden konnte. Dadurch wurde möglicherweise das TorA^{SP}GFP Hybridprotein von einer Interaktion mit der Tat-Translokase abgeschirmt, so dass es zu einer Blockade der Sekretion des TorA^{SP}GFP Hybridproteins kam. Aufgrund der starken Akkumulation des Vorläuferproteins stieg die intrazelluläre Konzentration von TorA^{SP}GFP in der Gesamtzellfraktion wahrscheinlich so stark an, dass es schließlich auch zu einem proteolytischen Abbau eines Teils des TorA^{SP}GFP Hybridproteins kam.

III.2.6 Die Coexpression von TorD verursacht nicht nur einen Exportblock von TorA^{SP}GFP, sondern auch einen Exportblock weiterer TorA^{SP}-Hybridproteine

Um zu überprüfen, ob dieser Effekt nur auf die Sekretion des TorA^{SP}GFP Hybridproteins in *C.glutamicum* beschränkt ist oder ob auch die Sekretion anderer TorA-Hybridproteine durch die Anwesenheit von TorD in *C.glutamicum* negativ beeinflusst wird, wurde die Sekretion von TorA^{SP}GTLhis und TorA^{SP}Cut bei Coexpression von TorD durch Western-Blot-Analyse untersucht (siehe Abbildung 3-35).

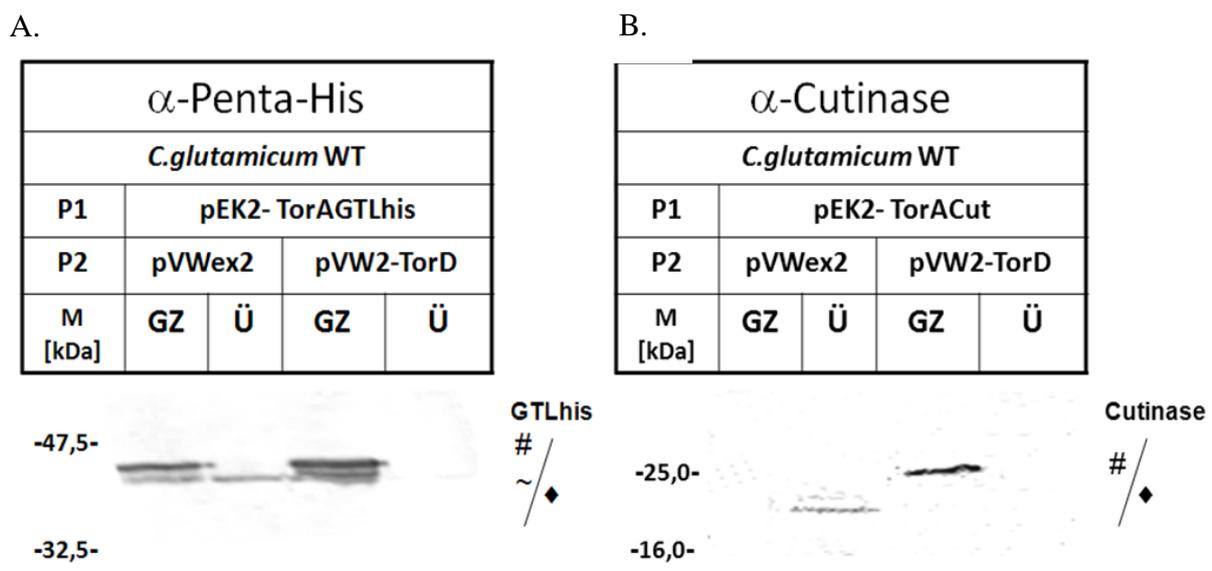


Abbildung 3-35: A. Lokalisierung von TorAGTLhis bei Coexpression von TorD in *C.glutamicum* WT fraktioniert in Gesamtzellextrakt (GZ) und Kulturüberstand (Ü)

B. Lokalisierung von TorACut bei Coexpression von TorD in *C.glutamicum* WT fraktioniert in Gesamtzellextrakt (GZ) und Kulturüberstand (Ü)

Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen erfolgte mit der Kugelmühle wie im Kapitel II.6.1 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion (GZ) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5 und die im Überstand (Ü) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1. Der Antikörper α-Penta-His wurde zum Nachweis von TorA^{SP}GTLhis und der α-Cutinase-Antikörper wurde zum Nachweis der Cutinase eingesetzt. Abk.: # (= Vorläuferprotein), ~ (= intrazelluläres Abbauprodukt), ♦ (= prozessierte Form des Hybridproteins), Zweivektorensystem bestehend aus P1 (= pEKex2-Derivate) und P2 (= pVWex2-Derivate)

Ähnlich wie im Fall der Coexpression von TorD und TorA^{SP}GFP kam es bei der Coexpression von TorD und des Hybridproteins TorA^{SP}GTLhis zu einer Blockade der Sekretion (siehe Abbildung 3-35 A.). Gleichzeitig nahm der prozentuale Anteil der Vorläuferform dieses Hybridproteins bezogen auf die Proteingesamtmenge stark zu.

Im Fall der Coexpression von TorD und des Hybridproteins TorA^{SP}Cut wurde dieser Effekt besonders deutlich (siehe Abbildung 3-35 B). Hier ist die Akkumulation des Vorläuferproteins ein klares Indiz für eine durch TorD ausgelöste Retention der Vorläuferform. Denn, wenn dieses Hybridprotein alleine oder in Gegenwart des pVWex2 Leervektors in *C.glutamicum* exprimiert wurde, war die Vorläuferform des TorA^{SP}Cut Hybridproteins entweder aufgrund eines schnellen cytosolischen Abbaus oder einer besonders effizienten Translokation nicht im Gesamtzellextrakt durch Western-Blot-Analyse nachweisbar (siehe Abbildung 3-17 und Abbildung 3-35 B). Bei Coexpression von TorD kam es jedoch zu einer deutlichen Akkumulation dieses Hybridproteins im Gesamtzellextrakt. Gleichzeitig war seine Sekretion in den Kulturüberstand blockiert. Die Akkumulation des TorA^{SP}Cut Vorläuferproteins in der Cytoplasmafraktion ist daher ein Indiz dafür, dass die Bindung von TorD das TorA-Signalpeptid wie im Fall des Exportes der TMAO-Reduktase in *E.coli* vor einem proteolytischen Abbau schützt, so dass es im Cytoplasma akkumuliert (vgl. Genest, 2005). In *E.coli* verhindert die Bindung von TorD an das TorA-Signalpeptid dessen proteolytischen Abbau, solange es noch nicht transloziert ist. Ein noch unbekannter Faktor löst in *E.coli* eine Ablösung des TorD Chaperons vom Signalpeptid aus, so dass eine Translokation möglich ist (Sargent 2007). In *C.glutamicum* fehlt dieser Faktor oder dieses Ablösesignal. Folge ist, dass das TorA-Vorläuferprotein im Gesamtzellextrakt von *C.glutamicum* akkumuliert und nicht mehr sekretiert wird.

Fazit: Die Coexpression von TorD ist keine geeignete Strategie zur Verbesserung der Sekretionseffizienz in *C.glutamicum*

Unabhängig vom Modellprotein, mit dem das TorA-Signalpeptid fusioniert worden war, hatte die Coexpression von TorD in *C.glutamicum* also zu einer Akkumulation der Vorläuferproteine im Gesamtzellextrakt geführt und ihre Sekretion in den Kulturüberstand weitestgehend verhindert. Statt zu einer verbesserten Sekretion wie in *E.coli* kam es zu einer Blockade der Sekretion in *C.glutamicum*. Die Strategie der Coexpression des TorD Chaperons war demnach im Gegensatz zur Coexpression in *E.coli* nicht dazu geeignet, die Sekretion rekombinanter Proteine über den Tat-Weg in *C.glutamicum* zu verbessern (vgl. Li *et al.*, 2006).

Allerdings könnte die Coexpression von TorD in *C.glutamicum* dazu eingesetzt werden, einen kritischen Schritt während des Tat-Proofreadings im heterologen Umfeld von *C.glutamicum* genauer zu untersuchen. In *E.coli* schirmt das TorD Chaperon durch Bindung an das TorA-Signalpeptid die TMAO-Reduktase oder TorA^{SP}-Hybridproteine vor einer zu frühzeitigen Translokation ab und schützt sie vor einem proteolytischen Abbau, so dass im Fall der TMAO-Reduktase die Cofaktoraufnahme oder wie im Fall des TorA^{SP}HybO Hybridproteins eine Assemblierung mit Untereinheiten in *E.coli* verbessert ist (Genest *et al.*, 2006a; Genest *et al.*, 2006b; Jack *et al.*, 2005). Bei diesem als Tat-Proofreading bezeichneten Prozess ist jedoch unbekannt, durch welchen Faktor eine Ablösung des TorD Chaperons vom TorA-Signalpeptid in *E.coli* verursacht wird, so dass die Translokation durch die Tat-Translokase möglich wird. Der Faktor, der

in *E.coli* diesen Ablöseprozess verursacht, fehlt in *C.glutamicum*. Folge ist, dass die Anwesenheit von TorD in *C.glutamicum* eine Akkumulation von Vorläuferproteinen im Gesamtzellextrakt verursacht und eine Sekretion von TorA^{SP}-Hybridvorläuferproteinen in den Kulturüberstand verhindert. Daher könnte die Coexpression von TorD in *C.glutamicum* dazu eingesetzt werden, die Ablösung des TorD Chaperons vom TorA-Signalpeptid zu untersuchen.

III.3 UNTERSUCHUNG DES TORD-ABLÖSEPROZESSES ALS KRITISCHER SCHRITT WÄHREND DES TAT-PROOFREADINGS IN EINEM HETEROLOGEN MODELLSYSTEM

In *E.coli* stellt die Ablösung des TorD Chaperons von seinem Partnerenzym der TMAO-Reduktase einen kritischen Schritt während des Tat-Proofreadings dar, der bisher nicht verstanden ist (Genest *et al.*, 2006, Sargent, 2007). Da in *C.glutamicum* bei der Coexpression von TorD und TorA-Hybridproteinen gerade in diesem Schritt eine Blockierung auftrat, ergab sich erstmalig die Möglichkeit, diesen Schritt während des Tat-Proofreadings in einem heterologen Umfeld zu studieren. Denn in *C.glutamicum* fehlen ein Faktor bzw. mehrere Faktoren, die die Ablösung des TorD Chaperons vom TorA-Signalpeptid auslösen. Folge ist, dass Vorläuferproteine stark in der Gesamtzellfraktion von *C.glutamicum* akkumulieren. Durch Einbringen von Faktoren aus *E.coli* in *C.glutamicum*, die für diesen Ablöseprozess von Bedeutung sein können, können nun Faktoren im heterologen Umfeld von *C.glutamicum* identifiziert werden, die beim diesem Ablöseprozess eine Rolle spielen.

III.3.1 Modifikation des Zweivektorensystems zur Untersuchung des Ablöseprozesses von TorD während des Tat-Proofreadings im heterologen Umfeld von *C.glutamicum*

Zur Identifikation dieser „Ablösefaktoren“ wurde das Zweivektorensystem so modifiziert, dass das TorD Chaperon im Tandem mit dem Modellsubstrat TorA^{SP}GFP von dem pEKex2-Derivat: pEK2TorAGFP/TorDhis exprimiert wurde (siehe Kapitel II.5). Auf diese Weise können potentielle Faktoren, die beim Ablöseprozess von TorD von Bedeutung sind, von pVWex2-Derivaten gemeinsam mit dem Modellsubstrat TorA^{SP}GFP und dem Chaperon TorD exprimiert werden (siehe Abbildung 3-36).

Um die Sekretion des Modellsubstrates TorA^{SP}GFP in *C.glutamicum* in An- und Abwesenheit von TorD zu untersuchen, wurde als weitere Variante das *torDhis* Gen mit invertierter Gensequenz hinter das Gen des Modellsubstrates TorAGFP eingefügt, so dass der Vektor pEK2-TorAGFP/TorDINV entstand. Die Inversion der *torD* Gensequenz führt dazu, dass das *torD* Gen nicht mehr transkribiert werden kann. Die Größe des Plasmids und der Nukleotidgebrauch bleiben dabei unverändert. Wird das TorA^{SP}GFP Modellsubstrat also vom Vektor pEK2-TorAGFP/TorDINV exprimiert, spiegelt dies die Sekretion des Modellsubstrates in Abwesenheit von TorD wieder. Bei dem verwendeten pEKex2 Vektor handelt es sich um ein LacIQ reprimierbares und IPTG induzierbares High-Copy-Vektorsystem, das sowohl für eine Expression in *E.coli* als auch für eine Expression in *C.glutamicum* geeignet ist.

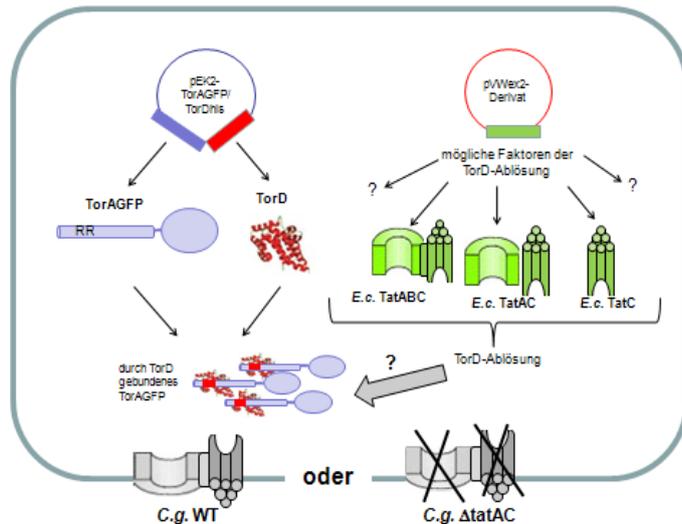


Abbildung 3-36: Zweivektorsystem zur Untersuchung des Ablöseprozesses von TorD

Zur Identifizierung potentieller Kandidatenproteine, die für den Ablöseprozess von TorD in *E.coli* eine Rolle spielen, wurde das Zweivektorsystem so modifiziert, dass mögliche Kandidaten wie Komponenten der *E.coli* Tat-Translokase ausgehend von pWex2-Derivaten exprimiert werden konnten, während das Modells substrat TorA^{SP}GFP in Tandem mit dem Chaperon TorD von einem pEKex2-Derivat exprimiert werden konnte.

III.3.2 Validierung des modifizierten Zweivektorsystems zur Untersuchung des TorD-Ablöseprozesses im heterologen Modellsystem *C.glutamicum*

Um zu überprüfen, ob das Zweivektorsystem für eine Untersuchung des TorD-Ablöseprozesses geeignet ist, wurde zunächst untersucht, ob mit dem verwendeten pEKex2-Derivat, bei dem TorD und das Tat-Substrat im Tandem vorlagen, die in der Literatur gemachten Angaben reproduziert werden konnten, nach denen die Coexpression von TorD zu einer verstärkten Translokation von TorA^{SP}GFP ins Periplasma von *E.coli* führt (Li *et al.*, 2006).

III.3.2.1 Die Coexpression von TorD verbessert die Translokation von TorA^{SP}GFP ins Periplasma von *E.coli*

In Abbildung 3-37 ist eine Fraktionierung von *E.coli* Zellen (MC4100) in Cytoplasmafraktion und Periplasmafraktion nach der Osmoschock-Methode dargestellt. Eine Lyse der *E.coli* Zellen wurde durch Kontrolle mit dem cytosolischen Protein TalB überprüft. Im Fall der Coexpression von TorD war eine geringfügige Lyse erkennbar. Allerdings zeigte, die starke Akkumulation der prozessierten Form in der Periplasmafraktion an, dass der Hauptteil des GFP Proteins durch Translokation in diese Fraktion gelangt war (siehe Abbildung 3-37).

Im Gegensatz zur Literaturquelle Li *et al.*, 2006 wurde nicht ein Arabinose induzierbares pBAD-Vektorsystem zur Expression des TorA^{SP}GFP Hybridproteins eingesetzt und das TorD Chaperon von einem separaten Vektor coexprimiert, sondern das TorA^{SP}GFP Modellprotein wurde gemeinsam mit dem Chaperon TorD vom IPTG-induzierbaren Vektor pEK2-TorAGFP/TorDhis exprimiert (siehe Abbildung 3-36). Um die Sekretion des Modells substrates TorA^{SP}GFP in An- und Abwesenheit von TorD zu vergleichen, wurde als weitere Variante der Vektor pEK2-TorAGFP/TorDINV eingesetzt, bei dem die *torDhis* Gensequenz invertiert war, so dass sie nicht transkribiert werden konnte.

III.3.3 Untersuchung möglicher Faktoren, die bei dem Ablöseprozess des TorD Chaperons eine Rolle spielen können

Um eine mögliche Ursache für die fehlende Ablösung des TorD Chaperons in *C.glutamicum* zu untersuchen, wurde von der Arbeitshypothese ausgegangen, dass in *E.coli* ein Faktor vorliegen muss, der spezifisch in dem Tat-Proofreading-Prozess durch TorD in *E.coli* involviert ist, aber in *C.glutamicum* fehlt. Bei diesem Faktor könnte es sich demnach um ein Protein oder einen Proteinkomplex handeln, der in enger Verbindung mit der Ablösung von TorD vom TorA-Signalpeptid und der Freigabe des Tat-Substrates zur Translokation steht. Daher liegt es nahe, mit dem Zweivektorensystem *E.coli* Tat-Translokasekomponenten daraufhin zu überprüfen, ob sie bei der Ablösung des TorD Chaperons vom Signalpeptid von Bedeutung sind. Eine ähnliche Hypothese wurde bereits 2006 von Genest *et al.*, geäußert, aber nicht überprüft (Genest *et al.*, 2006a).

Zu diesem Zweck wurden verschiedene *E.coli* und *C.glutamicum* Tat-Translokase-Komponenten sowohl in *C.glutamicum* WT-Zellen als auch der *tatAC*-Mutante überexprimiert und mit dem pEK2-TorAGFP/TorDhis Vektor oder dem Kontrollvektor pEK2-TorAGFP/TorDINV kombiniert. Im Kontrollvektor pEK2-TorAGFP/TorDINV ist die Gensequenz von *torD* invertiert und kann daher nicht transkribiert werden.

III.3.3.1 Durch Coexpression von *C.glutamicum* *TatA* und *TatC* Komponenten kann die Blockade der Sekretion durch TorD in *C.glutamicum* nicht aufgehoben werden

Um zu überprüfen, inwieweit eine Ablösung des TorD Chaperons vom TorA-Signalpeptid durch Überexpression von *C.glutamicum* *TatA* und *TatC* Translokasekomponenten möglich ist, wurde das *C.glutamicum* *tatAC*-Operon von einem pVWex2-Derivat gemeinsam mit dem TorA^{SP}GFP Modellsubstrat und dem TorDhis Chaperon sowohl in *C.glutamicum* WT-Zellen als auch in der *C.glutamicum* Δ *tatAC*-Mutante exprimiert.

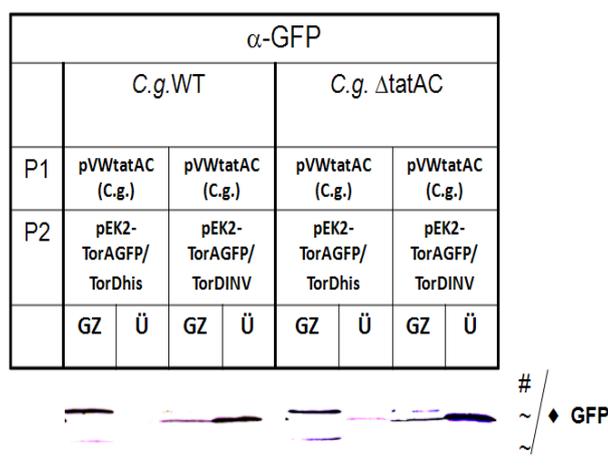


Abbildung 3-38: Nachweis der durch TorD verursachten Blockade des TorAGFP Modellproteins bei Coexpression homologer Tat-Translokasekomponenten in *C.glutamicum*.

Die in der Gesamtzellfraktion (GZ) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5 und die im Überstand (Ü) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1.

Abk.: ~ (= intrazelluläres Abbauprodukt), ♦ (= prozessierte Form des Hybridproteins). Als Antikörper wurde α -GFP eingesetzt. Zweivektorensystem: P1 (= pVWex2-Derivate), P2 (= pEKex2-Derivate)

Wie in Abbildung 3-38 zu erkennen, zeigte die Western-Blot-Analyse, dass durch Überexpression des *C. glutamicum* *tatAC*-Operons die durch das TorD Protein verursachte Blockade weder im *C. glutamicum* WT noch in der komplementierten *tatAC*-Mutante dieses Stammes aufgehoben wird. Dies ist insofern ein interessantes Ergebnis, als dass durch die Überexpression dieser Corynebakterium-eigenen Tat-Translokasekomponenten die Sekretion des TorA^{SP}GTLhis Proteins signifikant verbessert wurde und sowohl im Fall der Sekretion der Hybridlipase TorA^{SP}GTLhis als auch im Fall des Modellproteins TorA^{SP}GFP eine Abnahme der Vorläuferproteine beobachtet werden konnte (siehe Kapitel III.2.6). Die durch Expression von TorD ausgelöste Exportblockade lässt sich also nicht durch ein vermehrtes Angebot von *C. glutamicum*-eigenen TatA und TatC Komponenten aufheben. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass es in *E. coli* spezifische Faktoren bzw. Mechanismen geben muss, die eine Ablösung des TorD Chaperons vom TorA Signalpeptid ermöglichen.

III.3.3.2 Die Anwesenheit von TorD verhindert nicht die Sekretion von TorA^{SP}GFP im *C. glutamicum* WT, wenn das *E. coli* *tatABC* Operon anwesend ist

Obwohl das *E. coli* TatABC-System in *C. glutamicum* nicht funktionell ist und das Wachstum der Δ *tatAC*-Mutante stark verringert, störte seine Anwesenheit nicht die Sekretion von TorA^{SP}GFP im *C. glutamicum* WT (siehe Abbildung 3-29 und 3-39). Wie im Western-Blot-Assay zu erkennen ist, kam es bei der Coexpression des *E. coli* *tatABC* Operons zu einer Sekretion dieses Modellproteins in den Kulturüberstand in Abwesenheit von TorD, d.h., wenn das *torD* Gen im Plasmid invertiert vorlag.

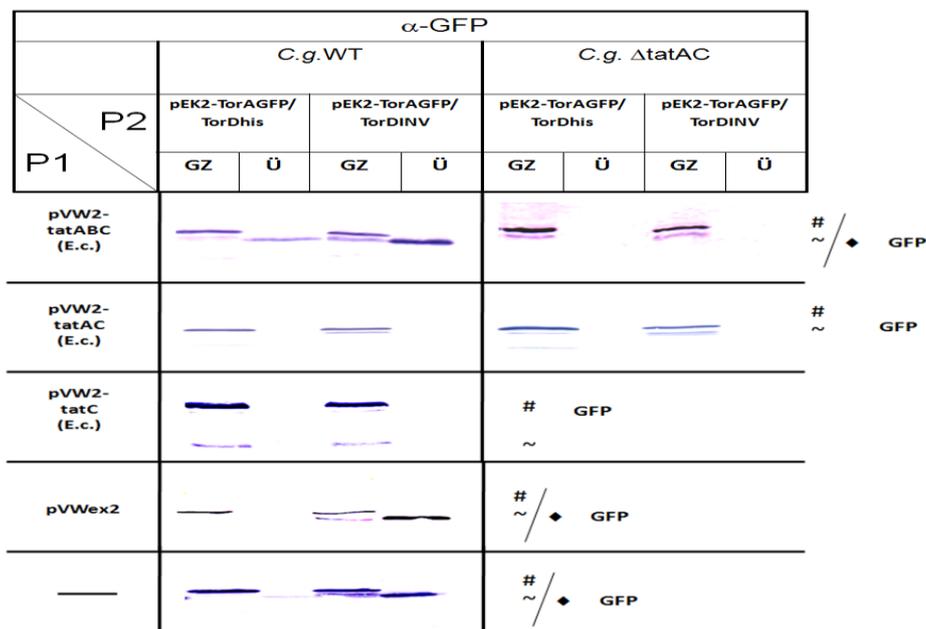


Abbildung 3-39: Western-Blot-Nachweis zur Identifizierung von Faktoren, die beim Ablöse-Prozess von TorD eine Rolle spielen könnten

Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen erfolgte mit der Kugelmühle wie im Kapitel II.6.1 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion (GZ) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5 und die im Überstand (Ü) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1.

Abk.: # (= Vorläuferprotein), ~ (= intrazelluläres Abbauprodukt), ♦ (= prozessierte Form des Hybridproteins) Als Antikörper wurde α -GFP eingesetzt. Zweivektorensystem: P1(= pVWex2-Derivate), P2 (= pEKex2-Derivate)

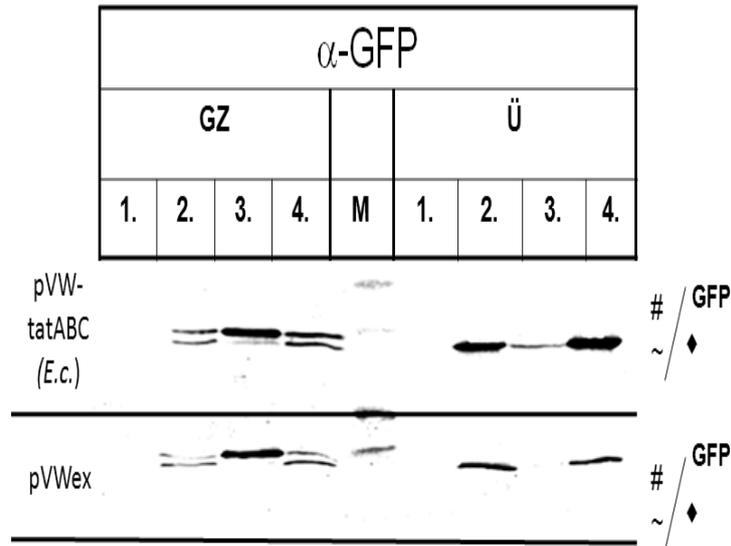


Abbildung 3-40: Western-Blot-Nachweis zur Identifizierung von Faktoren, die beim Ablöse-Prozess von TorD eine Rolle spielen können

Die in der Gesamtzellfraktion (GZ) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD_{600} von 0,5 und die im Kulturüberstand (Ü) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD_{600} von 1.

Abk.: M (=Marker) # (= Vorläuferprotein), ~ (= intrazelluläres Abbauprodukt), ♦ (= prozessierte Form des Hybridproteins), Proben-Nr.1.: pEKex2, 2. pEK2-TorAGFP, 3. pEK2-TorAGFP/ TorDhis, 4. pEK2-TorAGFP/ TorDINV. Als Antikörper wurde α-GFP eingesetzt.

Wurden hingegen das *E.coli* *tatC* Gen oder das künstliche *E.coli* *tatAC*-Operon in *C.glutamicum* mit TorA^{SP}GFP coexprimiert, lag ein vollständiger Exportblock des Modellsubstrates vor. Das heißt, im Western-Blot-Assay konnte kein TorA^{SP}GFP in der Überstandsfraction des *C.glutamicum* WT nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3-39).

Durch gleichzeitige Coexpression des TorD Chaperons konnte dieser Effekt nicht aufgehoben werden. Nur wenn das *E.coli* TatABC-System vollständig in *C.glutamicum* coexprimiert wurde, konnte eine Sekretion, wenn auch vermindert, festgestellt werden. In diesem Fall verhinderte die Anwesenheit des TorD Chaperons nicht die Sekretion des TorA^{SP}GFP Modellsubstrates. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass die Expression des *E.coli* *tatABC* Operons in *C.glutamicum* zur Ablösung von TorD direkt beigetragen haben muss.

In einem unabhängigen Fraktionierungsexperiment konnte dieses Ergebnis wiederholt werden. Bei diesem Experiment wurde die Sekretion des TorA^{SP}GFP Modellsubstrates in *C.glutamicum* bei An- und Abwesenheit von TorDhis und in An- und Abwesenheit des *E.coli* *tatABC*-Operons untersucht (siehe Abbildung 3-40). Wie der Western-Blot-Assay in Abbildung 3-40 zeigt, kam es bei Coexpression von TorDhis zu einer starken Akkumulation des Vorläuferproteins in der Gesamtzellfraktion.

Wurde das *E.coli* *tatABC*-Operon nicht coexprimiert, kam es zu einem vollständigen Exportblock der Sekretion, so dass im Fall der Anwesenheit des Leervektors kein GFP im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnte (siehe

Abbildung 3-40, Überstandsprobe 3 unten). Wurde hingegen das *E.coli* *tatABC*-Operon gemeinsam mit dem *E.coli* *torD* Gen coexprimiert, konnte sekretiertes GFP im Kulturüberstand nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3-40, Überstandsprobe 3 oben). Die Anwesenheit der *E.coli* *TatABC*-Translokasekomponenten hatte also eine Ablösung des TorD Chaperons bewirkt und eine Translokation des GFP Modellsubstrates über das *C.glutamicum* eigene *Tat*-System ermöglicht.

Denn, wenn das *E.coli* *TatABC*-System in der *C.glutamicum* *tatAC*-Mutante exprimiert wird, ist es nicht funktionell und beeinträchtigt das Zellwachstum (siehe Abbildung 3-39 und Abbildung 3-27 Wachstumskurve 4). Daher kann geschlossen werden, dass auch im *C.glutamicum* WT das *E.coli* *TatABC*-System nicht funktionell ist. Die Ablösung des TorD Chaperons vom TorA-Signalpeptid durch die *E.coli* *Tat*-Translokasekomponenten ist demnach ein von der Translokation unabhängiger Prozess und stellt eine spezifische Eigenschaft der *E.coli* *TatABC*-Translokase dar.

Im gegenwärtigen Arbeitsmodell zur Interaktion von TorD mit dem *E.coli* TorA-Signalpeptid geht man davon aus, dass das TorD Chaperon eine Bindung mit dem TorA-Signalpeptid eingeht und sich aufgrund einer Konformationsänderung, bei der GTP verbraucht wird, vom TorA-Signalpeptid ablöst (Sargent, 2007; vgl. Abbildung 1-06).

Daher legen die hier durchgeführten Experimente die Vermutung nahe, dass eine Interaktion mit Komponenten der *E.coli* *Tat*-Translokase diese Konformationsänderung des TorD Chaperons auslöst, so dass sich das TorD Chaperon aus dem Komplex mit dem TorA-Signalpeptid ablöst und schließlich das TorA^{SP}GFP Modellsubstrat von einer *C.glutamicum* *Tat*-Translokase transloziert wird.

IV. DISKUSSION

Innerhalb der "Weißen Biotechnologie" spielen Wertschöpfungsprozesse, die auf dem Einsatz und der Produktion von industriellen Enzymen beruhen, eine wichtige Rolle (siehe Kapitel I.1). Thermostabile Enzyme wie die hier eingesetzten Modellenzyme, Lipase GTL aus *Geobacillus thermoleovorans* und Lipase TSL aus *Thermoanaerobacter tengcongensis*, stellen interessante Kandidaten für eine biotechnologische Gewinnung dar (Genest *et al.*, 2006a; Markossian, 2003; Royter, 2006). Denn sie sind aufgrund ihrer Herkunft aus extremophilen Bakterien an hohe Prozesstemperaturen angepasst, wie sie für bestimmte Anwendungen notwendig sind. Neue Anwendungsfelder für thermostabile Lipasen, die wie die Lipase GTL langkettige Triacylglycerole als Substrat ($C \geq 16$) bevorzugen, sind die Veresterung und die Interesterifikation von hochviskosen Fettsäuren in der Nahrungsmittel- und der Kosmetikindustrie (De Greyt, 2004; Thum, 2006; Veit, 2005). In diesen Anwendungsbereichen treten sie in Wettbewerb mit chemischen Katalysatoren, die bisher für diese Zwecke eingesetzt worden sind (De Greyt, 2004; Kellens, 2000). Um gegenüber diesen konkurrenzfähig zu sein, müssen technische Enzyme kostengünstig in ausreichender Menge und Qualität hergestellt werden. Eine Möglichkeit, technische Enzyme mit relativ geringen Aufarbeitungskosten zu gewinnen, die bis zu 90% der Herstellungskosten ausmachen können (Blanch und Clark, 1997), ist die sekretorische Proteingewinnung in Gram-positiven GRAS-Bakterien wie *S.carnosus* oder *B.subtilis*. In diesen Bakterien trennt eine Cytoplasmamembran zusammen mit einer 20 nm bis 80 nm dicken Zellwand, deren Hauptbestandteil Peptidoglykan ist, das Cytoplasma vom Kulturüberstand ab.

Um in den Kulturüberstand sekretiert zu werden, müssen rekombinante Proteine in Abhängigkeit vom Signalpeptid einen der beiden Hauptsekretionswege einschlagen. Über den Sec-Weg werden Proteine ATP-abhängig in einer weitestgehend ungefalteten Konformation über die Cytoplasmamembran transloziert, während über den Tat-Weg Proteine, erst nachdem sie sich im Cytosol gefaltet haben, über die Membran in Abhängigkeit eines Protonengradienten exportiert werden. Nach der Translokation müssen rekombinante Proteine die Zellwand, die als molekulares Sieb verstanden werden kann, passieren. Im Kulturüberstand akkumulieren die rekombinanten Proteine dann in einer potentiell löslichen Form. Zusätzliche Aufarbeitungsschritte wie ein mechanischer oder chemischer Zellaufschluss oder eine Produktreaktivierung aus Einschlussköpern entfallen hierdurch.

Für die sekretorische Gewinnung von thermostabilen Lipasen wie der Lipase GTL fehlen geeignete Gram-positive Wirtssysteme. Daher war ein Ziel dieser Arbeit, die sekretorische Gewinnung dieser biotechnologisch relevanten Lipasen in mesophilen Gram-positiven Wirtssystemen zu etablieren.

Bisher wird die Sekretion über den Tat-Weg kaum zur Gewinnung rekombinanter Proteine eingesetzt, da sie im Gegensatz zur Sec-abhängigen Sekretion in Gram-positiven Bakterien bisher kaum optimiert wurde. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, neue Strategien zu entwickeln und zu evaluieren, mit denen die Tat-abhängige Sekretion rekombinanter Modellproteine verbessert werden kann.

IV.1 ETABLIERUNG DER SEKRETORISCHEN GEWINNUNG VON THERMOSTABILEN LIPASEN IN GRAM-POSITIVEN BAKTERIEN

Um eine sekretorische Gewinnung von Enzymen wie den Lipasen GTL oder TSL zu etablieren, wurde nach dem sogenannten Tool-Box-Prinzip vorgegangen (siehe Abbildung 3-01). Das heißt, durch unterschiedliche Kombinationen von Signalpeptiden, Sekretionswegen und Gram-positiven Wirtssystemen mit der thermostabilen Lipase GTL bzw. TSL wurde geprüft, inwiefern das betreffende Zielprotein sekretorisch gewonnen werden kann (siehe Abbildung 3-01). Als Wirtssysteme für einen Tat-abhängigen Export wurden *S.carnosus*, *C.glutamicum* und *B.subtilis* ausgewählt. Um eine Sec-abhängige Sekretion zu etablieren, wurde *S.carnosus* eingesetzt und das Propeptid der *S.hyicus* Lipase als Sekretionscarrier genutzt.

Während bei der Sekretion homologer Exoproteine wie Amylasen, Proteasen oder Lipasen in Gram-positiven Bakterien häufig hohe Produktausbeuten von bis zu 25 g/l über den Sec-Weg erzielt werden können (Schallmey *et al.*, 2004), führen Engpässe bei der Proteinsekretion rekombinanter Proteine oft dazu, dass sie entweder gar nicht oder nur mit sehr geringen Produktausbeuten gewonnen werden können (Bolhuis *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004; Vitikainen *et al.*, 2005). Störungen bei der Sekretion rekombinanter Proteine können bei einer Vielzahl von Teilprozessen vorliegen wie bei der Transkription, der Translation, dem Translokase-Targeting, der Translokation selbst, der Signalpeptid-Prozessierung, der cytosolischen oder extracytosolischen Faltung und der Zellwandpassage. Daher empfiehlt es sich, zu Beginn eines Etablierungsverfahrens verschiedene Gram-positive Wirtssysteme, Sekretionswege und Signalpeptide zu untersuchen und anschließend die Sekretion eines Zielproteins weiter zu optimieren (Brockmeier *et al.*, 2006; Bruser, 2007; Meissner *et al.*, 2007).

IV.1.1 Das *S.hyicus* Propeptid als Sekretionscarrier für die Sec-abhängige Sekretion in *S.carnosus*

Da *S.carnosus* nur eine geringe extrazelluläre proteolytische Aktivität besitzt und in der Lage ist rekombinante Proteine, wie z.B. das humane Peptidhormon Calcitonin in großen Mengen über den Sec-Weg in den Kulturüberstand zu sekretieren, wurde es als Wirtssystem für eine Sec-abhängige Sekretion der thermostabilen Lipasen gewählt (Dilsen *et al.*, 2000; Gotz, 1990; Gunneriusson *et al.*, 1999; Lehtio *et al.*, 2001; Liljeqvist *et al.*, 1999; Sturmfels *et al.*, 2001; Wernerus und Stahl, 2004). Ein bekannter Engpass der Sec-abhängigen Sekretion ist allerdings der proteolytische Abbau rekombinanter Proteine durch Zellwand assoziierte Proteasen nach der Translokation über die Sec-Translokase. Durch Einsatz des *S.hyicus* Propeptids als Sekretionscarrier kommt es jedoch zu einer beschleunigten Zellwandpassage des Hybridproteins, so dass das Zeitfenster zur Interaktion mit den Zellwand assoziierten Proteasen verringert ist (Meens *et al.*, 1997). Daher wurde diese Strategie auch für die Sekretion der thermostabilen Lipasen TSL und GTL eingesetzt und die Genfusionen *pproGTL* und *pproTSL* mit dem Prepro-Peptid der *S.hyicus* Lipase erstellt, die das stark hydrophile 207 AS lange Propeptid zwischen Signalpeptid und reifer Lipase enthielten.

IV.1.1.1 Sec-abhängigen Sekretion der Fusionslipase pproTSL

Bei der Expression des Hybridproteins pproTSL bestehend aus Lipase TSL und *S.hyicus* Prepro-Peptid zeigte sich im Western-Blot-Nachweis, dass dieses Protein sowohl in der Fraktion des Gesamtzellextraktes als auch im Kulturüberstand als Abbauprodukt vorlag. Ein Vorläuferprotein wurde nicht nachgewiesen. Möglicherweise interferierte die Anwesenheit des Propeptids am N-Terminus der Lipase TSL mit ihrer intrinsischen Faltungstendenz und verursachte eine Aggregation von falsch gefalteten Formen, die schließlich einem proteolytischen Abbau im Cytosol unterlagen. Auch die Proteine, die durch Translokation in den Kulturüberstand gelangt waren, wurden vermutlich proteolytisch abgebaut, da das Propeptid sehr wahrscheinlich bei einer Faltung in eine aktive Konformation störte. Ein Nachteil des Einsatzes des *S.hyicus* Propeptids als Sekretionscarrier bei *S.carnosus* ist, dass das Propeptid nach erfolgter Translokation und Zellwandpassage in *S.carnosus* nicht abgespalten wird, sondern im heterologen Protein verbleibt und daher bei einer Faltung in eine aktive Konformation stören kann. In *S.carnosus* fehlen extrazelluläre Proteasen, die im Ursprungsorganismus *S.hyicus* das Propeptid vom reifen Teil des Proteins abspalten (Rosenstein und Gotz, 2000).

IV.1.1.2 Sec-abhängige Sekretion der Fusionslipase pproGTL

Im Gegensatz zum Fusionsprotein pproTSL wurde das Hybridprotein pproGTL bestehend aus Lipase GTL und dem Prepro-Peptid der *S.hyicus* Lipase effektiv in *S.carnosus* sekretiert. Der Hauptteil dieses Hybridproteins lag jedoch im *S.carnosus* Überstand als 65 kDa großes Abbauprodukt vor. Demnach kam die stabilisierende Wirkung des *S.hyicus* Propeptids bei der Zellwandpassage in *S.carnosus* nicht zum Tragen. Thermostabile Proteine wie die Lipase GTL nehmen als Anpassung auf hohe Temperaturen häufig eine äußerst kompakte und starre Konformation ein (Li *et al.*, 2004); siehe Abbildung 1-01), die wahrscheinlich die Anwesenheit eines heterologen Propeptids nicht zulässt. Dieses könnte zu einer Falschfaltung und einer Aggregation des Hybridproteins geführt haben und ein Auslöser für die Aktivierung von Zellwand gebundenen oder Membran gebundenen Proteasen sein, die im Rahmen einer extracytosolischen Qualitätskontrolle falsch gefaltete Proteine abbauen (Kim und Kim, 2005). Proteasen der HtrA-Familie werden in Bakterien wie *E.coli*, oder *B.subtilis* durch ein Zweikomponentensystem (CssRS in *B.subtilis*) aktiviert, wenn es nach der Translokation zu einer Akkumulation von falsch gefalteten oder aggregierten Proteinen im Periplasma bzw. im Zwischenraum von Zellwand und Cytoplasmamembran kommt (Dorel *et al.*, 2006; Hyrylainen *et al.*, 2001; Westers *et al.*, 2004). Dies könnte auch auf die Sekretion der Lipase pproGTL in *S.carnosus* zutreffen, zumal auch Staphylokokken Proteasen der HtrA-Familie aufweisen (Utaida *et al.*, 2003).

IV.1.2 Sec-abhängige Sekretion der Lipase GTL mit dem *S.hyicus* Signalpeptid in *S.carnosus* (pGTL)

Da durch Untersuchungen von Samuelson *et al.* 1999 gezeigt werden konnte, dass Hybridproteine, die als Fusionen mit dem Prepro-Peptid in *S.carnosus* effizient transloziert werden, prinzipiell auch ohne Propeptid als Fusionen mit dem Signalpeptid der *S.hyicus* Lipase sekretiert werden können, wurde als Nächstes untersucht, ob dies auch für die Lipase GTL zutrifft. Der Agardiffusionsassay mit Tributyrin als

Substrat zeigte, dass die Lipase GTL, wenn ihr reifer Teil mit dem Signalpeptid der *S.hyicus* Lipase versehen wurde, in *S.carnosus* exprimiert und in einem geringen Maße auch sekretiert wurde (siehe Abbildung 3-08). Die Aktivitäten, die für dieses Protein im Kulturüberstand gemessen wurden, waren sehr gering. Dies sprach dafür, dass die Lipase pGTL in *S.carnosus* aufgrund eines proteolytischen Abbaus nicht in signifikanten Mengen im Kulturüberstand akkumulierte. Möglicherweise verhinderte in diesem Fall die fehlende Anpassung von heterologem Signalpeptid an den reifen Teil der Lipase eine effiziente Sekretion dieses Proteins. Denn nach Untersuchungen von (Brockmeier *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2002; Sturmfels *et al.*, 2001) ist für eine effiziente Sekretion die individuelle Kombination von Signalpeptid und reifem Teil eines Proteins entscheidend.

IV.1.3 Sec-abhängige Sekretion der Lipase GTL mit ihrem eigenen Signalpeptid in *S.carnosus* (aGTL)

Da in Abhängigkeit vom Zielprotein Sec-Signalpeptide eine Sekretion unterschiedlich gut vermitteln, wurde als weitere Option auch die Sekretion der Lipase GTL mit ihrem authentischen Signalpeptid in *S.carnosus* untersucht (vgl. Brockmeier, 2006). Im Gegensatz zu dem Signalpeptid der *S.hyicus* Lipase ist das authentische, 28AS lange Signalpeptid der Lipase GTL evolutionär optimal an den reifen Teil dieses Proteins angepaßt. Unterschiede in den Signalsequenzen, wie z.B. in den Ladungseigenschaften, der Hydrophobizität, oder der Erkennungssequenz für die Signalpeptidase Schnittstelle können dazu führen, dass die Effizienz des Translokase-Targetings, die Interaktion mit der Sec-Translokase und die Signalpeptid Abspaltung stark variiert (Hegde und Bernstein, 2006; Kim *et al.*, 2002; Ouzzine *et al.*, 1994).

Bei der Untersuchung der Sekretion der Lipase GTL durch einen quantitativen Aktivitätstest zeigte sich, dass die Lipase GTL in *S.carnosus* Sec-abhängig sekretiert wurde. Denn bei der Bestimmung der hydrolytischen Aktivität der Lipase GTL konnte eine signifikant erhöhte Aktivität von 2,6 U/ml im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Wie die Lysiskontrolle mit dem cytosolischen und membranständigen *S.carnosus* SecA-Protein als Kontrolle bestätigte, handelte es sich hierbei um die sekretierte Form der Lipase GTL. Diese Experimente zeigten demnach, dass das authentische Signalpeptid der Lipase GTL in der Lage war, funktionell mit der *S.carnosus* Sec-Translokase zu interagieren, so dass sich die Lipase GTL stark in der Überstandsfraction anreicherte.

Aber nicht nur im Kulturüberstand war es zu einer Akkumulation von aktiven Enzymen gekommen, auch im Gesamtzellextrakt wurden im quantitativen Aktivitätstest aktive Enzymspezies festgestellt. Dies war ein Hinweis dafür, dass sich bereits im Cytosol ein Teil der Enzympopulation in eine aktive Konformation gefaltet hatte und daher nicht mehr einer Sekretion über den Sec-Weg zugänglich war. In der Literatur wird dieser Effekt mit dem Model des „Kinetic partitioning“ erklärt (Diamond und Randall, 1997). Nach diesem Modell besteht eine Konkurrenz zwischen der Faltung in eine aktive Konformation aufgrund der intrinsischen Faltungstendenz des Vorläuferproteins und der Aufrechterhaltung einer ungefalteten, translokationskompetenten Konformation mit Hilfe der Chaperonsysteme der Zelle.

Aus der Sec-abhängigen Translokation der Lipase GTL konnten demnach drei Schlussfolgerungen gezogen werden: Erstens ist die spezifische Kombination von reifem Teil und Sec-Signalpeptid

entscheidend für die Sekretion. Zweitens kann mit Hilfe der authentischen Signalsequenz eine Sec-abhängige Sekretion der Lipase GTL erzielt werden, so dass dies als Ausgangspunkt für eine weitere Optimierung der Sec-abhängigen Sekretion in *S.carnosus* gewählt werden kann. Drittens besitzt die Lipase GTL die Fähigkeit, sich intrazellulär in eine aktive Konformation zu falten, wenn sie mit einem Signalpeptid fusioniert ist. Dies ist eine Grundvoraussetzung für eine Sekretion über den Tat-Weg, bei dem Proteine nur dann transloziert werden, wenn sie sich intrazellulär in Gegenwart eines Signalpeptids in eine aktive Konformation gefaltet haben.

IV.1.4 Auswahl eines Wirtssystems für die Tat-abhängige Sekretion der Lipase GTL

Da bei einer Tat-abhängigen Sekretion eines rekombinanten Proteins die Sekretionseffizienz stark von Wirtssystem zu Wirtssystem variieren kann, wurde als Nächstes untersucht, ob in den Gram-positiven GRAS-Bakterien *S.carnosus*, *B.subtilis* und *C.glutamicum* ein Tat-abhängiger Transport der thermostabilen Lipase GTL möglich ist. Diese Bakterien besitzen funktionelle Tat-Systeme und sind prinzipiell für eine Tat-abhängige Sekretion rekombinanter Proteine geeignet (Kikuchi *et al.*, 2006; Meissner *et al.*, 2007; Vollstedt, 2004). Jedoch unterscheiden sich die Tat-Translokasesysteme in diesen Bakterien beträchtlich. Während die Translokase-Systeme von Staphylokokken und Bacillen zum TatAC-Typ zählen, gehört die Tat-Translokase von *C.glutamicum*, wie die Tat-Translokase von *E.coli* und *S.lividans*, dem Tat-ABC-Typ an (siehe Abbildung 3-10). Weitere Unterschiede, die die Sekretion über den Tat-Weg beeinflussen können, bestehen bei der Zellwandzusammensetzung, der Ausstattung und Regulation der Chaperon- und Qualitätskontrollsysteme.

IV.1.4.1 *S.carnosus* als Wirtssystem

In *S.carnosus* konnten durch Arbeiten unserer Arbeitsgruppe die Gene für ein tatAC-Operon identifiziert werden. Wie im pathogenen Bakterium *S.aureus* wurde bisher kein *tatB* Homolog nachgewiesen. Die physiologische Bedeutung des Tat-Systems in Staphylokokken ist bisher noch nicht verstanden. In einer Arbeit von Yamada *et al.* konnten weder eine physiologische Bedeutung noch Veränderungen von Expressionsprofilen festgestellt werden (Yamada *et al.*, 2007), wenn das *tatC* Gen in *S.aureus* ausgeschaltet wurde. Ähnliches gilt auch für *S.carnosus*. Auch hier konnte keine Veränderung des Expressionsprofils festgestellt werden, wenn das *tatC* Gen genomisch deletiert und *S.carnosus* unter Standardbedingungen angezogen wurde (Meissner, 2005). Die Funktionalität des Tat-Systems in *S.carnosus* konnte durch den Tat-abhängigen Transport von Fusionen aus dem *E.coli* TorA-Signalpeptid und Enzymen aus *Anaerobranca gottschalkii* belegt werden (Vollstedt, 2003; Meissner *et al.*, 2007). Jedoch hatte die Akkumulation dieser rekombinanten Proteine in der Zellwandfraktion zur Folge, dass nur sehr geringe Mengen im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnten. Wahrscheinlich gelangten Proteine, wie die CGTase aus *Anaerobranca gottschalkii*, nach einer Tat-abhängigen Translokation nur durch einen sogenannten Turnover der Zellwand, bei dem durch Autolyse Zellwandmaterial freigesetzt wird, in den Kulturüberstand von *S.carnosus* (Doyle *et al.*, 1996).

Da *S.carnosus* bisher noch nicht vollständig sequenziert worden ist und weder theoretisch noch experimentell Tat-Substrate in *S.carnosus* identifiziert worden sind, wurde das *E.coli* TorA-Signalpeptid als heterologes Exportsignal eingesetzt. Während Signalpeptide, wie das Signalpeptid der Glukose-Fruktose-Oxidoreduktase (GFOR) aus *Zymomonas mobilis* oder das PhoD-Signalpeptid aus *B.subtilis*, nur in der Lage sind, in ihrem Herkunftsorganismus einen Tat-abhängigen Transport zu vermitteln, nicht aber in anderen Spezies wie *E.coli* (Blaudeck *et al.*, 2001; Pop *et al.*, 2002), besitzt das Signalpeptid der *E.coli* TMAO-Reduktase die besondere Eigenschaft, auch in Gram-positiven Bakterien wie *Streptomyces lividans*, *B.subtilis* und *C.glutamicum* einen effektiven Transport zu vermitteln (Schaerleakens *et al.*, 2001, Meissner *et al.*, 2007, Vollstedt 2003; vgl. Abbildung 3-11). Daher kann es als eine Art „Standard-Signalsequenz“ zur Etablierung der Tat-abhängigen Translokation in nicht verwandten Bakterienstämmen eingesetzt werden (Brüser, 2007).

Nach Fusion des *E.coli* TorA-Signalpeptids mit der Lipase GTL wurde der Tat-abhängige Transport dieser Lipase im *S.carnosus* WT und der Δ *tatC*-Mutante dieses Stammes untersucht. Dabei zeigte sich eindeutig, dass die Lipase GTL Tat-abhängig in *S.carnosus* gewonnen werden konnte. Im quantitativen Lipasetest wurde im Kulturüberstand des *S.carnosus* WT eine signifikante Aktivität von circa 0,7 U/ml nachgewiesen, während es in der Δ *tatC*-Mutante zu einer starken Verminderung der Aktivität im Kulturüberstand kam, wenn die Lipase TorA^{SP}GTL dort exprimiert wurde. Im Gegensatz zu den bisher in *S.carnosus* Tat-abhängig translozierten Proteinen, wie GFP aus *Aequorea victoria*, CGTase und Branching Enzyme (BE) aus *Anaerobranca gottschalkii*, konnte die Lipase GTL mit einer signifikanten Aktivität im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Möglicherweise verhinderte die kompakte und robuste Konformation, die selbst durch 9 M Harnstoff nicht zerstört werden kann, einen proteolytischen Abbau dieses Proteins durch zellassoziierte Proteasen und sorgte für eine bessere Zellwandpassage (vgl. Abbildung 1-01 und Li *et al.*, 2005).

IV.1.4.2 *B.subtilis* als Wirtssystem

Im Vergleich zu anderen Gram-positiven Bakterien besitzt *B.subtilis* als Besonderheit zwei voneinander unabhängige funktionelle Tat-Translokasen, die starken Regulationsmechanismen unterliegen. Die alkalische Phosphatase PhoD ist das einzige homologe Tat-Substrat, das unter Phosphatmangel durch das Tat(AC)_D Translokon in *B.subtilis* transloziert wird (Jongbloed *et al.*, 2004; Pop *et al.*, 2002). Durch das zweite Tat(AC)_Y-Minimaltranslokon wird in der späten exponentiellen Phase exklusiv der putative Peroxidase-Vorläufer YwbN exportiert (Jongbloed *et al.*, 2004). Weitere homologe Tat-Substrate sind nicht bekannt. In *B.subtilis* konnten bereits heterologe Proteine wie eine *E.coli* Phytase als Fusion mit dem PhoD Signalpeptid spezifisch über das Tat(AC)_D-Translokon (Gerlach *et al.*, 2004) und das grün fluoreszierende Protein GFP als Fusion mit dem *E.coli* TorA-Signalpeptid unspezifisch über beide Tat-Translokasen gewonnen werden (Meissner, 2005).

Daher wurde untersucht, ob auch die Lipase GTL als *E.coli* TorA^{SP}-Hybridprotein in *B.subtilis* Tat-abhängig sekretiert werden konnte. Zu diesem Zweck wurde das TorA^{SP}-Hybridprotein der Lipase GTL in *B.subtilis* 168, dem Stamm Teb1030, in dem die Gene der beiden *B.subtilis* Lipasen LipA und LipB

deletiert waren, und der Tat-Deletionsmutante $\Delta\text{tat}(\text{AC})_{\text{C}}(\text{AC})_{\text{Y}}$, in der beide Tat-Systeme deletiert waren, exprimiert. Dabei ergab sich, dass aufgrund einer Lyse der *B.subtilis* Zellen sehr hohe Lipaseaktivitäten in den Kulturüberständen gemessen wurden. Dies war sowohl in der Deletionsmutante als auch in den Wildtyp-Stämmen *B.subtilis* 168 und Teb1030 der Fall. Gleichzeitig mit der hohen extrazellulären Lipaseaktivität konnte auch eine hohe Lipaseaktivität in den Gesamtzellextrakten nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass sich die Lipase GTL in *B.subtilis* in eine aktive Konformation gefaltet hatte. Wahrscheinlich verursachte die intrazelluläre Akkumulation dieser hydrolytisch aktiven Lipase eine Störung der Zellintegrität, so dass eine Lyse der *B.subtilis* Zellen die Folge war. Ob die intrazelluläre Akkumulation der Lipase GTL auf eine Substratsättigung der Tat-Translokase zurückzuführen war, konnte allerdings aufgrund der Zellyse nicht nachvollzogen werden. Aufgrund der Neigung zur Zellyse bei Expression der Lipase GTL war *B.subtilis* daher nicht für eine Optimierung der Tat-abhängigen Sekretion der Lipase GTL geeignet.

IV.1.4.3 *C.glutamicum* als Wirtssystem

C.glutamicum ist als Sekretionssystem zur Gewinnung von rekombinanten Proteinen eher unbekannt. In der Industrie wird es hauptsächlich zur Produktion von Aminosäuren oder anderen Metaboliten eingesetzt. Wie *B.subtilis* gehört es zu den besonders gut erforschten Gram-positiven Bakterien und ist Mittelpunkt von systembiologischen Ansätzen zur Optimierung seiner Stoffwechselwege (Wendisch, 2007). Im Vergleich zu anderen Gram-positiven Bakterien besitzt *C.glutamicum* einen besonders komplexen Zellwandaufbau, dessen spezifisches Merkmal eine Mycolsäureschicht ist, die zu einer stark eingeschränkten Permeabilität der Zellwand führt. In *C.glutamicum* schließt die 7-8 nm dicke Mycolsäureschicht an eine 15-20 nm dicke Peptidoglykan- und Arabinogalaktanschicht an. Eine Oberflächenschicht, die vom PS2-Protein gebildet wird, stellt normalerweise die letzte Schicht dar. Bei dem *C.glutamicum* Stamm ATCC 13032, mit dem in dieser Studie gearbeitet wurde, fehlt allerdings diese Oberflächenschicht (Hansmeier *et al.*, 2006). Wie Proteine in *C.glutamicum* die Mycolsäureschicht passieren, ist unbekannt. Wie Untersuchungen zeigen, stellt die Passage der Mycolsäureschicht jedoch keinen limitierenden Schritt während der Sekretion des homologen PS2 Proteins in *C.glutamicum* dar (Houssin *et al.*, 2002). Vermutet wird, dass entweder bestimmte Poreneine Diffusion von Proteinen erlauben oder dass ein Translokationsmechanismus in der Mykolsäureschicht vorhanden ist, durch den Exproteine exportiert werden können (Houssin *et al.*, 2002).

Erst vor kurzem wurde in Untersuchungen festgestellt, dass *C.glutamicum* über ein funktionelles Tat-System verfügt, das auch zur Gewinnung rekombinanter Proteine geeignet ist (Kikuchi *et al.*, 2006; Meissner *et al.*, 2007). Wie das *E.coli* TatABC-System besteht das Tat-System von *C.glutamicum* aus TatA, TatB, TatC und TatE Proteinen. Heterologe Proteine wie das Tat-Substrat Isomaltodextranase (IMD) aus *Arthrobacter globiformis* und das Modellsubstrat TorA^{SP}GFP konnten effizient in diesem Wirtssystem über den Tat-Weg gewonnen werden. Daher wurde *C.glutamicum* als drittes Wirtssystem ausgewählt und die Lipase GTL als TorA^{SP}-Hybridprotein im *C.glutamicum* WT und in der ΔtatC -Mutante dieses Stammes exprimiert.

Die Untersuchung der Sekretion der Lipase TorA^{SP}GTL erfolgte durch Western-Blot-Nachweis, Agardiffusionsassays und einen photometrischen Lipasetest mit pNPP. Dabei zeigte sich im Western-Blot-Nachweis, dass die Lipase TorA^{SP}GTL Tat-abhängig in *C.glutamicum* transloziert und prozessiert wurde. Die qualitativen und quantitativen Lipasetests demonstrierten, dass die Lipase in einer aktiven Konformation vorlag. Im quantitativen Lipasetest wurde eine Aktivität von 1,25 U/ml im Kulturüberstand und von ca. 2,2 U/ml im Gesamtzellextrakt gemessen. Dieses Ergebnis sowie der Western-Blot-Assay der Sekretion der Lipase zeigten, dass in *C.glutamicum* die Lipase GTL nicht nur Tat-abhängig sekretiert wurde, sondern gleichzeitig stark im Gesamtzellextrakt akkumulierte.

Dieses Ergebnis verdeutlichte, dass bei der Tat-abhängigen Translokation der Lipase GTL ein Engpass vorlag. Wahrscheinlich war es in *C.glutamicum* zu einer Substratsättigung der Tat-Translokase gekommen (auch als Backlogging von Tat-Substraten bezeichnet). Hierbei akkumulieren Vorläuferproteine im Cytosol, da in Relation zu den translozierbaren Tat-Substraten zu wenige Tat-Substrate durch Tat-Translokase abtransportiert werden. Bei der Substratsättigung der Tat-Translokase bzw. dem Backlogging von Tat-Substraten handelt es sich um einen typischen Engpass der Tat-abhängigen Translokation, der auch bei der Tat-abhängigen Translokation in *E.coli* und *S.lividans* beobachtet wurde (Barrett *et al.*, 2003; De Keersmaecker *et al.*, 2006).

Daher wurde dieser Engpass der Tat-abhängigen Sekretion der Lipase GTL in *C.glutamicum* als Modellfall für eine Optimierung der Sekretion in Gram-positiven Bakterien gewählt (siehe Kapitel IV.2). Denn im Gegensatz zur Entwicklung von Strategien zur Sec-abhängigen Sekretion in Gram-positiven Bakterien gibt es bislang kaum Ansätze zur Verbesserung der Sekretion rekombinanter Proteine über den Tat-Weg.

IV.1.4.4 Tat-abhängige Sekretion weiterer Lipasen über den Tat-Weg in *C.glutamicum*

Um zu untersuchen, ob *C.glutamicum* als Wirtssystem auch für die Tat-abhängige Sekretion weiterer rekombinanter Lipasen eingesetzt werden kann, wurden in einem einfachen „Try-and-Error-Ansatz“ verschiedene heterologe Hybridlipasen mit dem TorA-Signalpeptid ausgestattet und ihre Sekretion in *C.glutamicum* untersucht. Als Modelllipasen dienten eine relativ kleine, eukaryontische Lipase aus *Fusarium solani pisi* (= Cutinase, Cut: 22 kDa), die typisch Sec-abhängig translozierte *S.hyicus* Lipase (Lipase SHL: 44 kDa) und die cytosolische, thermostabile Lipase TSL (32 kDa). Wie die Western-Blot-Untersuchung der Expression dieser Lipasen zeigte, wurden alle rekombinanten Lipasen in *C.glutamicum* exprimiert. Jedoch konnte nur im Fall der Cutinase eine Sekretion über den Tat-Weg nachgewiesen werden.

Nach Perez-Rodriguez *et al.* können drei Gründe maßgeblich dafür sein, warum Proteine nicht Tat-abhängig sekretiert werden und einem schnellen proteolytischen Abbau unterliegen (Perez-Rodriguez *et al.*, 2007): 1. Das Signal-Peptid ist nicht funktionell. 2. Eine falsche oder unvollständige Faltung des Tat-Substrates verursacht eine Inkompatibilität mit dem Tat-Translokase-System der Zelle. 3. Ein Fehlen oder ein Mangel an funktionellen Tat-Translokasen liegt vor. Die erste und die dritte Ursache treffen auf den Fall der rekombinanten Lipasen SHL und TSL nicht zu. Vielmehr ist die Ursache für eine fehlende

Translokation dieser Lipasen ihre cytosolische Falschfaltung. Denn es konnten weder aktive Formen der Lipase SHL oder TSL im Gesamtzellextrakt noch prozessierte aktive Formen dieser Proteine im Überstand nachgewiesen werden.

Da es sich bei der Lipase TSL um ein cytosolisches Protein handelte, wäre es möglich, dass in diesem Fall die Anwesenheit des heterologen Signalpeptids grundsätzlich mit einer Faltung interferiert. Folge wäre, dass sich diese Lipase nicht sekretorisch gewinnen ließe, da die Anwesenheit eines Signalpeptids am N-Terminus sie proteolytisch leicht angreifbar macht.

Im Gegensatz zu den rekombinanten Lipasen TSL und SHL wurde die eukaryontische Cutinase als Fusion mit dem *E.coli* TorA-Signalpeptid in *C.glutamicum* sekretiert, wie durch Aktivitätsfärbung und Western-Blot-Nachweis einer spezifischen Bande in der Überstandsfraction festgestellt werden konnte. In der Fraktion des Gesamtzellextraktes wurden weder Abbauprodukte noch Vorläuferformen dieser Lipase nachgewiesen. Daher wurde die Cutinase entweder äußerst effektiv in *C.glutamicum* sekretiert oder die Vorläuferproteine unterlagen einem starken, proteolytischen Abbau.

Aufgrund der charakteristischen Eigenschaften des reifen Proteins lassen sich Tat-Substrate in drei Gruppen kategorisieren (Bruser, 2007): 1. Tat-Substrate, die eine komplexe Struktur besitzen, komplexe Cofaktoren oder Untereinheiten aufnehmen und auf Anwesenheit von spezifischen Chaperonen bei der Reifung angewiesen sind, wie z.B. die TMAO-Reduktase oder Hydrogenasen; 2. Tat-Substrate, die sich schnell falten und daher nicht Sec-abhängig sekretiert werden können, wie z.B. HiPIP aus *Chromatium vinosum*; 3. Tat-Substrate, die je nach cytosolischem Faltungsstatus sowohl über den Tat- als auch über den Sec-Weg transloziert werden können, wie z.B. die Amidase AmiC in *E.coli*.

Da es sich bei der Cutinase wie bei der Lipase GTL um ein Enzym handelt, das ursprünglich Sec-abhängig transloziert wird, kann es zu einer Gruppe von rekombinanten Substraten gezählt werden, die je nach Faltungszustand und Signalpeptid sowohl über den Tat- oder den Sec-Weg transloziert werden können. Wie am Vergleich mit den Hybridproteinen der Lipase SHL oder TSL erkennbar ist, besitzen nur bestimmte Proteine die Eigenschaft, sowohl über den Tat-Weg als auch über den Sec-Weg transloziert werden zu können.

In *S.carnosus* war die Sec-abhängige Sekretion der Lipase GTL mit ihrem authentischen Signalpeptid etwa 3- bis 4- mal so hoch wie die Tat-abhängige Sekretion dieser Lipase. Ähnliche Unterschiede zwischen Sec- und Tat-abhängigem Transport wurden auch in *S.lividans* bei der Sekretion der homologen Xylanase B festgestellt, die einmal mit ihrem eigenen Sec-abhängigen Signalpeptid und einmal mit einem Tat-abhängigen Signalpeptid der Xylanase C sekretiert wurde (Gauthier *et al.*, 2005). Diese Eigenschaft der Xylanase B, je nach verwendetem Signalpeptid, sowohl über den Sec- als auch über den Tat-Weg sekretiert werden zu können, wurde in der erwähnten Arbeit auch dazu eingesetzt, die Ausbeute dieses Proteins im Kulturüberstand zu verbessern. Dies könnte eine Strategie zur Verbesserung der Sekretion der Lipase GTL in *S.carnosus* oder in *C.glutamicum* darstellen.

IV.2 STRATEGIEN FÜR DIE OPTIMIERUNG DER SEKRETION ÜBER DEN TAT-WEG IN GRAM-POSITIVEN BAKTERIEN

Während bereits zahlreiche, spezifische Lösungsansätze zur Behebung von Engpässen des Sec-Weges entwickelt und erfolgreich eingesetzt worden sind (vgl. Kapitel I.3.6 Tabelle 1-02), wurden bisher kaum Lösungsansätze zur Verbesserung der Tat-abhängigen Sekretion in Gram-positiven Bakterien entwickelt und evaluiert. Daher war ein Ziel dieser Arbeit spezielle Lösungsansätze zu entwickeln, mit denen Engpässe der Tat-abhängigen Sekretion in Gram-positiven Bakterien behoben werden können. Im Fall der Tat-abhängigen Sekretion der Lipase GTL kam es zu einer starken intrazellulären Akkumulation dieses Enzyms in *C.glutamicum*. Ursache war wahrscheinlich ein Engpass während der Tat-Translokation, wie eine Substratsättigung der Tat-Translokase (treffender als „Backlogging“ bezeichnet). Bei diesem Engpass handelt es sich um einen Hauptengpass der Tat-abhängigen Translokation rekombinanter Proteine sowie von homologen Tat-Substraten unter Überexpressionsbedingungen (Barrett *et al.*, 2003; Bruser, 2007; Chanal *et al.*, 2003; De Keersmaeker *et al.*, 2006; DeLisa *et al.*, 2004; Graubner *et al.*, 2007; Perez-Rodriguez *et al.*, 2007; Yahr und Wickner, 2001). Aufgrund hoher Expressionsraten eines rekombinanten Proteins kommt es zu einer cytosolischen Akkumulation des Vorläuferproteins (= Backlogging), gleichzeitig ist die Tat-abhängige Sekretion aufgrund der Substratsättigung der Tat-Translokase stark vermindert.

Um über den Tat-Weg exportiert werden zu können, muss der reife Teil des Tat-Substrates gefaltet sein, das Signalpeptid jedoch nicht, so dass generelle Chaperone wie DnaK oder spezifische Chaperone wie TorD an das Signalpeptid binden können und es vor einem proteolytischen Abbau schützen, bis es transloziert wird (Graubner *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2006; Perez-Rodriguez *et al.*, 2007). Kommt es allerdings aufgrund hoher Expressionsraten des rekombinanten Proteins zu einer Limitation von cytosolischen Chaperonen, werden die unstrukturierten Signalpeptide anfällig für einen Abbau durch Proteasen. Folge ist, dass das Tat-Substrat bis zur Größe des reifen Teils oder, falls es sensitiv gegenüber einer Proteolyse ist, vollständig abgebaut wird (Bruser, 2007; Genest *et al.*, 2006a). Dies führt zu einer ineffizienten Tat-abhängigen Translokation mit geringen Produktausbeuten. Dabei kann in Abhängigkeit vom überexprimierten Tat-Substrat, ausschließlich das überexprimierte Tat-Substrat von der Substratsättigung betroffen sein, wie im Fall der Überexpression von SufI in *E.coli*, oder die Substratsättigung kann auch auf die Translokation anderer Tat-Substrate übergreifen wie im Fall der Überexpression einer verkürzten TMAO-Reduktase in *E.coli*, bei der die Sekretion der DMSO-Reduktase und einer Hydrolase vermindert war (Chanal *et al.*, 2003).

Gründe für das Backlogging von rekombinanten Tat-Substraten bzw. die ineffiziente Translokation über die Tat-Translokase können sein: a) eine fehlende Anpassung des heterologen Signalpeptids an den Tat-Weg des Wirtssystems, b) ein Mangel an Tat-Translokasekomponenten oder c) ein Mangel an spezifischen Chaperonen, die die Tat-Substrate vor einem proteolytischen Abbau schützen und die Translokation mit der Reifung des Vorläuferproteins koordinieren.

Auf der Grundlage dieser Arbeitshypothesen wurden drei Strategien zur Aufhebung der Substratsättigung der Hybridlipase TorA^{SP}GTL in *C. glutamicum* entwickelt:

1. Verbesserung der Tat-abhängigen Sekretion durch eine Anpassung des *E. coli* TorA-Signalpeptids an das Tat-System von *C. glutamicum* durch gerichtete Evolution,
2. Aufhebung der Substratsättigung der Tat-Translokase durch Coexpression von Tat-Translokasekomponenten,
3. Ausnutzung des Tat-Proofreadings für eine verbesserte Sekretion rekombinanter Proteine durch Coexpression des Signalpeptid-spezifischen Chaperons TorD (vgl. Abbildung 4-01).

Diese Strategien und die erzielten Ergebnisse sollen im Folgenden genauer betrachtet werden.

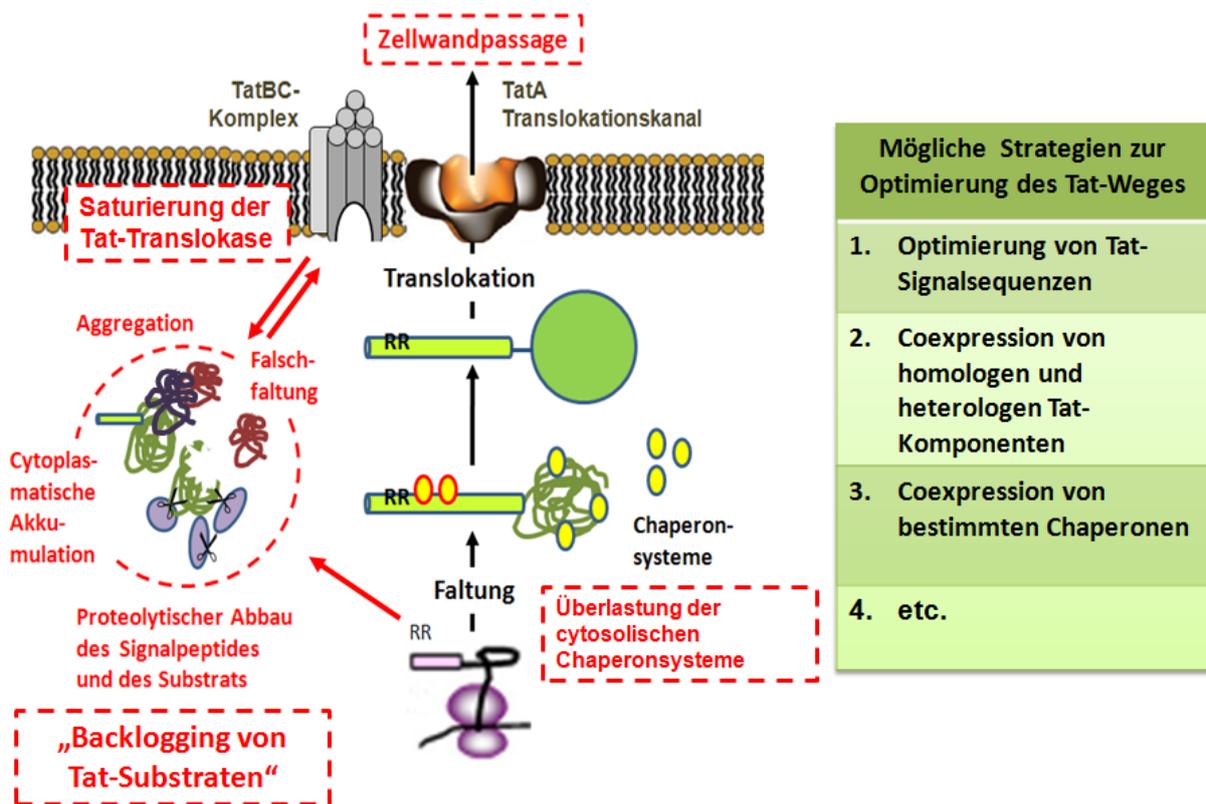


Abbildung 4-01: Mögliche Engpässe der Tat-abhängigen Sekretion von rekombinanten Proteinen in Gram-positiven Bakterien und mögliche Strategien zu ihrer Behebung

IV.2.1 Strategie 1: Optimierung der Tat-abhängigen Sekretion durch gerichtete Evolution des *E.coli* TorA-Signalpeptids

Das „Backlogging“ stellt einen Hauptengpass der Tat-abhängigen Sekretion der Lipase TorA^{SP}GTL dar. Da die Ursache dieses Engpasses möglicherweise eine nicht ausreichende Anpassung des heterologen *E.coli* TorA-Signalpeptids an den Tat-Weg von *C.glutamicum* ist, war eine Überlegung, durch eine gerichtete Evolution das *E.coli* TorA-Signalpeptid so an den Tat-Weg von *C.glutamicum* anzupassen, dass die Lipase GTL mit einer erhöhten hydrolytischen Aktivität in den Kulturüberstand sekretiert wird.

Bei einer gerichteten Evolution zur Verbesserung der Sekretion von Proteinen wird eine Zufallsmutagenese eines Signalpeptids iterativ mit einem Screening- bzw. Selektionsverfahren verknüpft, so dass theoretisch von Runde zu Runde Mutanten mit verbesserten Sekretionsraten, identifiziert werden können. Vorteil dieses nicht rationalen Verfahrens ist, dass die zugrunde liegenden molekularbiologischen Zusammenhänge nicht bekannt sein müssen, um eine verbesserte Sekretion des Zielproteins zu erzielen. Dies wird auch an den drei in der Literatur beschriebenen Ansätzen deutlich, bei denen dieses Verfahren erfolgreich zur Verbesserung der Sekretionseffizienz eingesetzt wurde. Im ersten Fallbeispiel konnte durch gerichtete Evolution des N-Terminus des homologen Sec-Signalpeptids von AmyE die Sekretion der eukaryontischen Cutinase um den Faktor 3 in *B.subtilis* verbessert werden (Brockmeier, 2006). Im zweiten Fall wurde die Sec-abhängige Sekretion des Cytochroms b5 um den Faktor 3 bis 4 gesteigert, indem der Übergangsbereich der Gensequenz des Signalpeptids zum reifen Teil einer Sättigungsmutagenese unterzogen wurde (Kaderbhai *et al.*, 2004). Im dritten Fall wurde die Sekretion der *E.coli* Penicillin Acylase, die eine ungewöhnlich aufgebaute Tat-Signalsequenz aufweist, durch Sättigungsmutagenese der C-Region dieser Signalsequenz um den Faktor 4 gesteigert (Monroy-Lagos *et al.*, 2006). Die Ursachen, warum bestimmte Mutationen zu einer Verbesserung der Sekretion führten, sind in diesen Fallbeispielen weitestgehend unverstanden. So ist z.B. ungeklärt, ob die im Signalpeptid gefundenen Mutationen Einfluss auf die mRNA-Stabilität, die Transkriptionsrate oder direkt auf die Translokationsrate der sekretierten Proteine nehmen. Gemeinsam ist diesen drei Strategien, die sich erheblich durch die verwendeten Screening- bzw. Selektionsverfahren unterscheiden, dass nur ein bestimmter Bereich des Signalpeptids bzw. des Übergangsbereichs zum reifen Teil einer Sättigungsmutagenese unterzogen wurde.

Im Unterschied dazu wurde im Fall der gerichteten Evolution der *E.coli* TorA-Signalsequenz, die Zufallsmutagenese auf die gesamte Länge der Signalsequenz inklusive des Übergangsbereichs zum reifen Teil ausgedehnt. Vorteil dieses Ansatzes ist, dass Mutationen über den ganzen Bereich des Signalpeptids streuen können und nicht auf einen bestimmten Bereich beschränkt sind. Ein Nachteil der Zufallsmutagenese durch ep-PCR ist allerdings, dass nicht alle Aminosäureaustausche gleich wahrscheinlich sind (Eggert, 2003).

Mit Hilfe der ep-PCR des *E.coli* TorA-Signalpeptids wurde eine Bibliothek aus mutierten *E.coli*-Plasmiden erstellt, die aus ca. 11.000 Varianten des Signalpeptids bestand. Um die Sekretionseigenschaften der mutierten TorA-Signalsequenzen in *C.glutamicum* zu untersuchen, wurden *C.glutamicum* WT-Zellen mit diesen Plasmiden transformiert. Bei einem qualitativen Vorscreening mit

Tributylin-Indikatorplatten wurden ca. 30.000 Transformanten danach durchmustert, ob sie die Lipase GTL sekretierten. Ca. 3000 von diesen Transformanten wurden einer genauen Bestimmung der Sekretionseffizienz mit dem TECAN- Pipettierroboter unterzogen. Zu diesem Zweck wurde ein HTS-Verfahren (HTS: High Throughput Screening), das ursprünglich zur Durchmusterung von *B.subtilis* Transformanten entwickelt wurde (Brockmeier, 2006), zum Screening der *C.glutamicum* Transformanten, die die Lipase GTL Tat-abhängig sekretierten, adaptiert und validiert. Die durchschnittliche OD₆₀₀ der *C.glutamicum* Zellen betrug 3,55 und die Standardabweichung (σ) des Wachstums 13%. Die Standardabweichung der hydrolytischen Aktivität der *C.glutamicum* Wildtyp-Zellen, die unmutierte TorA^{SP}GTL Hybridproteine exprimierten, lag bei 23%. Um in diesem HTS-System identifiziert werden zu können, müssen Transformanten, die die Lipase GTL besser sekretieren, demnach eine um 46% höhere Aktivität im Kulturüberstand aufweisen als die WT-Transformanten. Dies entspricht einer zweifachen Standardabweichung (2σ). Mit einer Schwankungsbreite von 23% besitzt das an *C.glutamicum* WT-Zellen angepasste HTS-System eine Standardabweichung, wie sie für diese Systeme üblich ist, und war daher für die Identifizierung von Transformanten mit einer verbesserten Sekretionseffizienz geeignet (vgl. Brockmeier, 2006).

IV.2.1.1 Zufallsmutagenese und Hochdurchsatz-Screening zur Untersuchung von *C.glutamicum* Transformanten mit einer veränderten Enzymaktivität im Kulturüberstand

Unter den 3000 *C.glutamicum* Transformanten, deren Aktivität mit dem TECAN-Pipettierroboter bestimmt wurde, wurden keine Transformanten mit einer verbesserten Sekretion gefunden (siehe Abbildung 3-23). Die meisten Transformanten zeigten eine Aktivität an, die unterhalb der mittleren Aktivität der *C.glutamicum* WT-Zellen lag, die die Lipase GTL mit nicht mutierter Signalsequenz exprimierten.

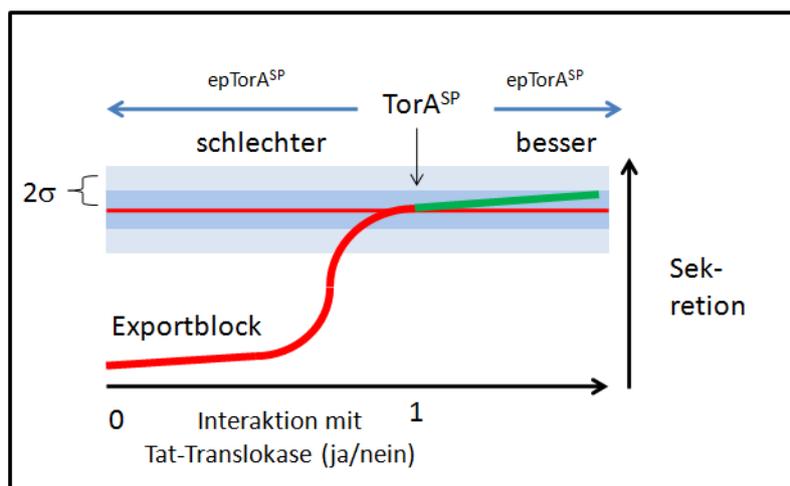


Abbildung 4-02 : Modell zur Verbesserung der Sekretionseffizienz in *C.glutamicum* über eine Mutagenese des TorA-Signalsequenz im TorA^{SP}GTL Hybridprotein

In diesem Fall wird angenommen, dass die Interaktion von TorA^{SP}GTL und *C.glutamicum* Tat-Translokase bereits hinreichend gut ist und nicht mehr signifikant verbessert werden kann. Signifikante Veränderungen der Sekretion können nur durch eine Verschlechterung erhalten werden. Eingezeichnet ist die mittlere Aktivität der Transformanten als rote Linie; der blaue Bereich zeigt das Intervall der einfachen Standardabweichung, während der hellblaue Bereich den Bereich der zweifachen Standardabweichung ($\pm 2\sigma$) darstellt.

Möglicherweise wurden Transformanten mit einer stark verbesserten Sekretion einfach deshalb nicht identifiziert, weil die Zahl, der mit dem Pipettierroboter durchmusterten Transformanten nicht hoch genug war.

Eine andere, wahrscheinlichere Erklärung ist, dass die Interaktion von *E.coli* TorA^{SP}-Hybridprotein und Tat-Translokase nicht mehr signifikant durch Mutation des Signalpeptids verbessert werden kann, da sie bereits hinreichend gut ist und das HTS-Verfahren nicht sensitiv genug ist, geringfügige Verbesserungen zu detektieren (siehe Abbildung 4-02).

Eine Folge ist, dass hauptsächlich Transformanten mit einer verschlechterten Sekretion identifiziert werden, wie dies hier der Fall war. Möglich ist allerdings auch, dass erst durch eine bestimmte Konstellation von mehrfachen Mutationen eine Verbesserung der Sekretion erzielt werden kann. Einen solchen Transformanten zu identifizieren, wäre dann ein extrem seltenes Ereignis.

Das vorgestellte Hochdurchsatzverfahren kann jedoch nicht nur zur Identifizierung von Mutanten mit einer verbesserten Sekretion eingesetzt werden, sondern kann auch dazu dienen, Determinanten des *E.coli* TorA-Signalpeptids zu identifizieren, die wichtig für seine Funktionalität in *C.glutamicum* sind (siehe Abbildung 3-24). Eine genaue Analyse dieser „loss-of-function“-Mutationen kann helfen zu verstehen, welche Mindestanforderung ein rekombinantes Signalpeptid erfüllen muss, um effizient über den Tat-Weg in *C.glutamicum* transloziert zu werden. So führten Mehrfach-Mutationen in der H-Region oder Mutationen wie der M-14I-Austausch in der H-Region zu einer stark verminderten Sekretion der Lipase GTL in den Kulturüberstand. Auch der Austausch D-35G in der N-Region des Signalpeptids verursachte eine starke Abnahme der Sekretion des Signalpeptids in den Kulturüberstand.

IV.2.2 Strategie 2: Coexpression heterologer und homologer Komponenten der Tat-Translokase

Eine weitere Ursache für eine Substratsättigung der Tat-Translokase kann eine fehlende Verfügbarkeit von Tat-Translokasekomponenten sein. Zur Aufhebung dieser quantitativen Limitierung bietet sich eine Coexpression von homologen Tat-Komponenten in *C.glutamicum* an. Durch Überexpression von vollständigen TatABC-Translokase-Systemen konnte bereits in *E.coli* und *S.lividans* eine verbesserte Sekretion erzielt werden (Barrett *et al.*, 2003, DeKeersmaecker *et al.*, 2006). Daher könnte dies in Analogie auch für die Tat-abhängige Sekretion von rekombinanten Proteinen in *C. glutamicum* gelten.

Eine mangelnde Spezifität auf Seiten der *C.glutamicum* Tat-Translokase für das rekombinante Tat-Substrat könnte ebenso Ursache für die beobachtete Substratsättigung sein, so dass möglicherweise nicht eine quantitative Limitierung vorliegt, die durch Coexpression von homologen Tat-Komponenten aufgehoben werden kann, sondern eine qualitative Limitierung bei der Interaktion von heterologem Tat-Substrat und *C.glutamicum* TatABC-Translokase. Daher wurde auch eine Coexpression heterologer *E.coli* Tat-Komponenten für eine Optimierung der Sekretion über den Tat-Weg in Betracht gezogen.

IV.2.2.1 Expression von *E.coli* Tat-Komponenten in der *C.glutamicum* Δ tatAC-Mutante und im *C.glutamicum* WT

Unterschiede in den Tat-Translokasen verschiedener Bakterien können dazu führen, dass bestimmte Tat-Substrate nicht akzeptiert werden. So ist z.B. das Tat-Substrat GFOR aus *Z.mobilis* und das *B.subtilis* PhoD nicht mit der *E.coli* Tat-Translokase kompatibel, wenn sie mit ihren authentischen Signalpeptiden in

E. coli exprimiert werden (Blaudeck *et al.*, 2001; Pop *et al.*, 2003). Ebenso wie bestimmte Signalpeptide inkompatibel mit bestimmten Translokasen sein können, kann auch der reife Teil eines Tat-Substrates eine Inkompatibilität mit einer Tat-Translokase hervorrufen. Ein Beispiel hierfür ist das *E. coli* Tat-Substrat DmsA (DMSO-Reduktase). Dieses Protein wird nicht von der *Rhodobacter capsulatus* Translokase akzeptiert, während sein Signalpeptid kompatibel zu diesem Translokase-System ist (Bruser, 2007; Lindenstrauss und Bruser, 2006). Folge ist in beiden Fällen die intrazelluläre Akkumulation von Vorläuferproteinen.

Während bereits mehrfach gezeigt wurde, dass vollständige Tat-Translokasen funktionell in *E. coli* exprimiert werden und dass aus heterologen Tat-Komponenten zusammen mit homologen *E. coli* Tat-Komponenten funktionelle Tat-Translokasen gebildet werden können (Hicks *et al.*, 2006; Lindenstrauss und Bruser, 2006; Oates *et al.*, 2003; Xiong *et al.*, 2007), wurde bisher nicht untersucht, ob umgekehrt auch die *E. coli* Tat-Translokase funktionell in einem Gram-positiven Bakterium exprimiert werden kann und ob bestimmte Komponenten der *E. coli* Tat-Translokase fehlende Komponenten einer Tat-Translokase eines Gram-positiven Bakteriums ersetzen können.

Die Ergebnisse der Kreuzkomplementationsexperimente zeigten, dass durch gemeinsame Expression von *E. coli* TatA- und TatC-Komponenten in der *C. glutamicum* Δ *tatAC*-Mutante der Wachstumsdefekt der Deletionsmutante in BHIS-Medium nicht aufgehoben werden konnte. Zudem konnte das Modellsubstrat TorA^{SP}GFP nicht sekretiert werden, wenn in der Δ *tatAC*-Mutante die *E. coli* *tatA* und *tatC* Gene exprimiert wurden. Dies bedeutete, dass mit diesen *E. coli* Tat-Komponenten keine funktionellen Tat-Translokasen in der *C. glutamicum* Δ *tatAC*-Mutante gebildet werden können. Ursache hierfür könnte zum einen ein falsches stöchiometrisches Verhältnis der Tat-Translokasekomponenten sein, und zum anderen könnte zur Ausbildung einer funktionellen Tat-Translokase die Anwesenheit des *E. coli* TatB Proteins erforderlich sein. In *E. coli* liegt dieses Protein im Komplex mit dem TatC Protein vor und bildet zusammen mit ihm den TatBC-Rezeptorkomplex aus, der für eine initiale Bindung des Tat-Substrates notwendig ist. Daher wurde als Nächstes untersucht, ob durch Expression des vollständigen *E. coli* *tatABC* Operons der Wachstumsdefekt der Deletionsmutante aufgehoben und das Modellsubstrat TorA^{SP}GFP sekretiert werden kann.

In diesem Fall zeigte die Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Δ *tatAC*-Mutante, die das *E. coli* *tatABC*-Operon exprimiert, nicht nur, dass der Wachstumsdefekt nicht aufgehoben werden konnte, sondern auch, dass dieser Stamm äußerst schlecht wuchs (siehe Abbildung 3-27, Wachstumskurve 4). Möglicherweise störte die Anwesenheit des vollständigen *E. coli* *tatABC* Operons die Zellintegrität der Deletionsmutante, so dass der Wachstumsdefekt verstärkt wurde. Auch das Modellprotein TorA^{SP}GFP wurde nicht sekretiert. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass im Fall der vollständigen Expression des *tatABC*-Operons keine Rekonstitution der Tat-Translokase in *C. glutamicum* erzielt werden konnte.

In einer Studie von Xiong *et al.* wurde gezeigt, dass die Expressionsstärke von Tat-Komponenten entscheidend sein kann, ob eine Rekonstitution einer funktionellen Tat-Translokase gelingt oder nicht (Xiong *et al.*, 2007).

Während im Fall der *Vibrio cholerae* TatABC-Translokase eine Kreuzkomplementation der *E.coli* Δ tatC-Mutante nur erzielt werden konnte, wenn die Expression der heterologen Translokase nicht durch Arabinose induziert wurde und auf einem basalen Niveau stattfand, konnte im Fall der *Magnetospirillum magnetotacticum* TatABC-Translokase eine Kreuzkomplementation der *E.coli* Δ tatC-Mutante nur erzielt werden, wenn die Expression der heterologen Tat-Translokase durch Arabinose induziert wurde.

Ähnliches könnte auf die *E.coli* Tat-Komponenten zutreffen, wenn sie in der *C.glutamicum* Δ tatAC-Mutante exprimiert werden. Möglicherweise ist hier wie im Fall der *Vibrio cholerae* TatABC-Translokase nur eine Rekonstitution bei sehr geringen Expressionsraten der *E.coli* Tat-Komponenten möglich. Eine andere Erklärung ist, dass das im Genom der Δ tatAC-Mutante verbliebene TatB mit der Ausbildung einer funktionellen *E.coli* Tat-Translokase bzw. Gemischt-Translokase interferiert. Untersuchungen von Xiong *et al.* zeigten jedoch, dass auch bei Anwesenheit genomisch codierter Tat-Komponenten funktionelle Tat-Translokasen aus heterologen TatABC-Komponenten in *E.coli* gebildet werden können (Xiong *et al.*, 2007).

Interessanterweise konnte eine Akkumulation des Modellsubstrates TorA^{SP}GFP in *C.glutamicum* Gesamtzellextrakten auch erzeugt werden, wenn *E.coli* Tat-Komponenten im *C.glutamicum* Wildtyp coexprimiert wurden. Die Anwesenheit von *E.coli* TatC-Komponenten oder von *E.coli* TatA-Proteinen zusammen mit TatC-Proteinen interferierte mit der Sekretion des Modellsubstrates TorA^{SP}GFP im *C.glutamicum* Wildtyp, so dass ein Exportblock und eine intrazelluläre Akkumulation von Vorläuferproteinen die Folge war. Wurde hingegen das vollständige *E.coli* tatABC-Operon im *C.glutamicum* Wildtyp exprimiert, trat kein Exportblock auf. Warum die Anwesenheit des vollständigen *E.coli* TatABC-Systems weniger mit der Sekretion des Modellsubstrates interferierte als z.B. das *E.coli* TatC alleine, ist nicht klar.

Möglich ist jedoch im Fall der Coexpression von *E.coli* TatC in *C.glutamicum*, dass das TatC Protein eine initiale Bindung mit dem Tat-Substrat TorA^{SP}GFP Protein eingeht, aus der sich das Modellsubstrat nicht mehr lösen kann, so dass in der Zelle durch TatC-gebundene Vorläuferproteine akkumulieren und eine Blockierung der Translokation über die *C.glutamicum* Tat-Translokase verursachen. Bekannt ist, dass TatC eine initiale Bindung mit Tat-Signalpeptiden eingeht, auch wenn TatB nicht anwesend ist (Alami *et al.*, 2003). Zwei neuere, unabhängige Studien zeigen außerdem, dass das *E.coli* TatC in Abwesenheit von *E.coli* TatB oder von anderen Tat-Komponenten einen stabilen Komplex ausbildet und nicht, wie in früheren Untersuchungen vermutet, auf die Anwesenheit von TatB zu seiner Stabilisierung angewiesen ist (Behrendt *et al.*, 2007; Orriss *et al.*, 2007; Sargent *et al.*, 1999). Dies könnte auch auf das in *C.glutamicum* überexprimierte TatC-Protein zutreffen, so dass es möglicherweise in *C.glutamicum* einen autonomen Komplex bildet, der nicht funktionell mit den *C.glutamicum* Tat-Komponenten interagiert. Aufgrund des Fehlens von geeigneten Interaktionspartnern wird eine Ablösung des Tat-Signalpeptids aus seiner Bindung mit dem *E.coli* TatC verhindert, so dass das Tat-Substrat schließlich als proteolytisch geschütztes Vorläuferprotein in der Zelle akkumuliert.

Ist hingegen das vollständige *E.coli* tatABC-Operon im *C.glutamicum* Wildtyp anwesend, könnte es sein, dass das *E.coli* TatC einen gemeinsamen Rezeptorkomplex mit dem *E.coli* TatB ausbildet und in der Lage

ist, funktionell mit weiteren Tat-Komponenten zu interagieren, so dass schließlich das GFP-Protein transloziert wird. Bekannt ist für die Interaktion des Signalpeptids am TatBC-Rezeptorkomplex, dass das Signalpeptid zunächst eine Bindung mit TatC eingeht. Dies ist durch mehrere Studien belegt (Alami *et al.*, 2003; Gerard und Cline, 2006, 2007). Als Nächstes geht TatB eine Bindung mit dem Signalpeptid ein. Dies kann entweder als „hand-off“- Mechanismus (Übergabe-Mechanismus) ablaufen, bei dem TatC das Signalpeptid an TatB weiterreicht (Alami *et al.*, 2003), oder simultan erfolgen, so dass TatB und TatC gleichzeitig das Signalpeptid binden (Gerard und Cline, 2006). Schließlich werden durch den TatBC-Komplex weitere Translokasekomponenten rekrutiert und das Vorläuferprotein transloziert.

Bei den weiteren Komponenten, die mit dem *E.coli* TatBC-Komplex interagieren, handelt es sich wahrscheinlich im Fall vom *C.glutamicum* WT um Komponenten des *C.glutamicum*s TatABC-Systems. Denn wenn das *E.coli* TatABC-System in der *C.glutamicum* Δ tatAC-Mutante exprimiert wird, ist es nicht funktionell und verstärkt den Wachstumsdefekt dieser Deletionsmutante. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das *E.coli* Tat-System auch nicht im *C.glutamicum* Wildtyp aktiv ist. Deshalb werden wahrscheinlich vom *E.coli* TatABC-System, wenn es in *C.glutamicum* WT exprimiert wird, nur bestimmte Teilfunktionen der Translokation ausgeübt, aber nicht die gesamte Translokation vollständig durchlaufen.

IV.2.2.2 Coexpression homologer Tat-Komponenten im *C.glutamicum* WT

Um zu überprüfen, ob durch Coexpression homologer Tat-Komponenten die Sekretion der Lipase GTL in *C.glutamicum* verbessert werden kann, wurde zunächst untersucht, ob durch Expression von plasmidlokalisierten *tatA* und *tatC* Genen in der *C.glutamicum* Δ tatAC-Mutante funktionelle Tat-Translokasen gebildet werden können. Wie in Abbildung 3-27, Wachstumskurve 3 zu erkennen ist, konnte durch Überexpression des *C.glutamicum* *tatAC*-Operons der Wachstumsdefekt der Δ tatAC-Mutante in BHIS-Medium aufgehoben werden. Zudem wurde bei Expression dieser Tat-Komponenten in der Deletionsmutante das rekombinante Modellsubstrat TorA^{SP}GFP effektiv in den Kulturüberstand sekretiert. Dies bedeutete, dass die Expressionsrate dieser plasmidkodierten Tat-Komponenten geeignet war, um funktionelle Tat-Translokasen in Gegenwart des genomisch codierten *tatB* Gens auszubilden.

Wurde nun das *C.glutamicum* *tatAC*-Operon gemeinsam mit dem Tat-Substrat TorA^{SP}GTL_{his} im *C.glutamicum* WT-Stamm coexprimiert, wurde im Kulturüberstand eine um den Faktor 3 erhöhte Aktivität gemessen. Auffällig war dabei, dass in Relation zur cytosolischen Abbaubande die Vorläuferbande sowohl bei Expression des Modellsubstrates TorA^{SP}GFP als auch bei Expression von TorA^{SP}GTL stark abnahm. Dies kann so interpretiert werden, dass die Vorläuferproteine aufgrund der erhöhten Zahl von Tat-Translokase-Komponenten effektiv in den Überstand transloziert werden, so dass es zu keiner Akkumulation von Vorläuferproteinen im Cytosol kommt.

Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass ein Mangel an funktionellen Tat-Translokasen bzw. von bestimmten Komponenten der Tat-Translokase einen Engpass der Tat-abhängigen Sekretion der Lipase GTL in *C.glutamicum* verursacht. Da bereits durch Coexpression von *TatA*- und *TatC*-Komponenten die Translokation der Lipase TorA^{SP}GTL_{his} in *C.glutamicum* verbessert werden konnte und die Coexpression von *TatB* nicht erforderlich war, wirkten demnach die Anzahl von *TatA* und *TatC* limitierend auf die

Translokation. Im *E.coli* TatBC-Komplex liegen TatB und TatC in einem equimolaren Verhältnis vor, während der Tat-Translokationskanal je nach Größe des Substrates aus einer variablen Anzahl von TatA-Protomeren besteht (Bolhuis *et al.*, 2001; Gohlke *et al.*, 2005; Oates *et al.*, 2005). Falls dieses auch für das TatABC-System in *C.glutamicum* gilt, kann daraus weiter geschlossen werden, dass es sich bei der Anzahl der TatA-Protomere um den eigentlich begrenzenden Faktor bei der Translokation in *C.glutamicum* handelt.

Da die Coexpression des homologen *tatAC*-Operons in *C.glutamicum* erfolgreich dazu eingesetzt werden konnte, die Sekretion der Lipase GTL und des Modellsubstrates GFP zu verbessern, eignet sich die Überexpression des *C.glutamicum* *tatAC*-Operons möglicherweise als generelle Strategie die Tat-abhängige Sekretion rekombinanter Proteine in *C.glutamicum* zu verbessern.

IV.2.3 Strategie 3: Ausnutzung des Tat-Proofreadings für eine verbesserte Sekretion rekombinanter Proteine durch Coexpression des Signalpeptid-spezifischen Chaperons TorD

Eine dritte Strategie, die Sekretion rekombinanter Proteine über den Tat-Weg in *C.glutamicum* zu verbessern, ist die Coexpression des cytosolischen Chaperons TorD. In *E.coli* gehört TorD, wie DmsD, zur Gruppe der REMPs (Redox Enzyme Maturation Proteins) (Turner *et al.*, 2004). Diese Chaperone besitzen die besondere Eigenschaft, spezifisch an die Signalpeptide ihrer Partnerenzyme wie die TMAO-Reduktase (TorA) oder die DMSO-Reduktase (DmsA) zu binden. In *E.coli* unterstützt das Chaperon TorD die TMAO-Reduktase bei der Aufnahme seines komplexen Molybdän-Cofaktors (Genest *et al.*, 2006a; Genest *et al.*, 2006b; Hatzixanthis *et al.*, 2005; Ilbert *et al.*, 2003). Durch Bindung an das TorA-Signalpeptid schirmt es die TMAO-Reduktase vor einer frühzeitigen Einschleusung in den Tat-Weg ab und verhindert so dessen vorzeitigen proteolytischen Abbau und ihre vorzeitige Einschleusung in die Tat-Translokase (Genest *et al.*, 2006a; Genest *et al.*, 2006b; Hatzixanthis *et al.*, 2005; Ilbert *et al.*, 2003). Diese durch TorD ausgeübte Qualitätskontrolle wird als Tat-Proofreading bezeichnet (Jack *et al.*, 2004; Jack *et al.*, 2005). Das TorD-abhängige Tat-Proofreading ist jedoch nicht an das reife TorA-Protein gebunden, sondern kann durch Transfer des TorA-Signalpeptids auch auf heterologe Proteine wie GFP oder die [NiFe]-Hydrogenase übertragen werden (Jack *et al.*, 2004; Jack *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). So wies ein Hybridprotein aus TorA-Signalsequenz und der [NiFe]-Hydrogenase (TorA^{SP}HybO) eine verbesserte Assemblierung mit seinen Untereinheiten auf, wenn TorD coexprimiert wurde, und die Sekretionseffizienz von TorA^{SP}GFP konnte in *E.coli* um den Faktor 3 verbessert werden, wenn es gemeinsam mit TorD exprimiert wurde. Daher lag es nahe zu untersuchen, ob das durch TorD ausgeübte Tat-Proofreading auch zu einer Verbesserung der Sekretion von TorA^{SP}-Hybridproteinen in *C.glutamicum* eingesetzt werden kann.

IV.2.3.1 In C.glutamicum ist die E.coli TorD Ablösung vom E.coli TorA-Signalpeptid blockiert

Die Untersuchung der Sekretionseffizienz von verschiedenen TorA^{SP}-Hybridproteinen in *C.glutamicum* ergab allerdings, dass bei Coexpression von TorD der Export dieser Modellsubstrate blockiert war. Bei Coexpression von TorD und TorA^{SP}GFP oder TorD und TorA^{SP}GTLhis akkumulierten die Vorläuferproteine dieser Modellsubstrate stark im Gesamtzellextrakt, während die Sekretion fast vollständig zum Erliegen kam. Diese durch TorD ausgeübte Retention wird besonders deutlich bei der Coexpression von TorD und dem Hybridprotein der Cutinase mit dem TorA-Signalpeptid (TorA^{SP}Cut).

Im Cytosol von *B.subtilis* ist die Cutinase intrinsisch instabil und akkumuliert nicht im Cytosol bei einer gestörten Sec-abhängigen Sekretion (Brockmeier, 2006).

Wird dieses Protein in Abwesenheit von TorD in *C.glutamicum* exprimiert, sind keine Vorläuferproteine im Gesamtzellextrakt nachweisbar, nur im Kulturüberstand ist die prozessierte Form dieses Proteins detektierbar. Wird nun TorD gemeinsam mit TorA^{SP}Cut coexprimiert, akkumuliert das Vorläuferprotein der Cutinase im Gesamtzellextrakt, während seine Sekretion in den Kulturüberstand blockiert ist. Durch Bindung von TorD an das Signalpeptid wird wahrscheinlich, ähnlich wie bei der TMAO-Reduktase in *E.coli*, ein proteolytischer Abbau des Signalpeptids und damit von Vorläuferproteinen verhindert, jedoch ist im Gegensatz zur Situation in *E.coli* die Translokation der Vorläuferproteine in *C.glutamicum* blockiert (vgl. Genest *et al.*, 2006).

Während in *E.coli* das Tat-Proofreading vollständig durchgeführt wird, d.h. dass TorD an das TorA-Signalpeptid bindet, es vor einem proteolytischen Abbau schützt und sich wieder ablöst, so dass das Zwillingsarginin-Motiv vom TatBC-Rezeptor erkannt werden kann, findet in *C.glutamicum* dieser Ablöseprozess offensichtlich nicht statt. Folge ist, dass TorA^{SP}-Vorläuferproteine stark im Gesamtzellextrakt akkumulieren. Dieses Ergebnis ist insofern interessant, als dass der Ablöseprozess von TorD vom TorA-Signalpeptid bisher nicht verstanden ist (Sargent, 2007).

Faktoren, die in *E.coli* eine Ablösung von TorD vom TorA-Signalpeptid verursachen sind unbekannt.

Daher war die Strategie der Coexpression des TorD Chaperons zwar nicht dazu geeignet, die Sekretion rekombinanter Proteine über den Tat-Weg in *C.glutamicum* zu verbessern, könnte jedoch helfen die TorD-Ablösung als einen kritischen Schritt während des Tat-Proofreadings in dem heterologen Umfeld von *C.glutamicum* genauer zu untersuchen.

IV.3 DER TOR-D-ABLÖSEPROZESSES ALS KRITISCHER SCHRITT WÄHREND DES TAT-PROOFREADINGS IN EINEM HETEROLOGEN MODELLSYSTEM

In *E. coli* stellt die Ablösung des TorD Chaperons von seinem Partnerenzym der TMAO-Reduktase einen kritischen Schritt während des Tat-Proofreadings dar, der bisher nicht verstanden ist (Genest *et al.*, 2006a; Sargent, 2007). Bekannt ist, dass das TorD Protein mit einer apparenten Dissoziationskonstante von $K_D \sim 1 \mu\text{M}$ an das TorA-Signalpeptid fest und spezifisch bindet (Genest *et al.*, 2006a; Hatzixanthis *et al.*, 2005; Sargent, 2007) und es vor einem proteolytischen Abbau schützt, solange es noch nicht die Translokation durch die Tat-Translokase eingeleitet hat (Genest *et al.*, 2006a; Li *et al.*, 2006). Gleichzeitig koordiniert es die Reifung seines Partnerenzym aufgrund seiner Proofreading-Eigenschaft (Jack *et al.*, 2004; Jack *et al.*, 2005). Erst nachdem das Partnerprotein des TorD Chaperons seine Reifung (Faltung, Assemblierung oder Cofaktoraufnahme) abgeschlossen hat, löst sich TorD am Ende des Tat-Proofreadings aus der Bindung mit dem TorA-Signalpeptid. Möglicherweise ist an diesem Ablöseprozess eine GTP-Hydrolyse beteiligt. Denn Hatzixanthis *et al.* konnten zeigen, dass GTP lose an TorD *in vitro* bindet ($K_D \sim 375 \mu\text{M}$) und dass die GTP-Bindung durch TorD verstärkt wird, wenn TorD das TorA-Signalpeptid zuvor gebunden hat ($K_D \sim 200 \mu\text{M}$) (Hatzixanthis *et al.*, 2005). Beim gegenwärtigen Modell des Tat-Proofreadings geht man daher davon aus, dass TorD zuerst das TorA-Signalpeptid bindet und dann in einem zweiten Schritt GTP aufnimmt. Nun könnte diesem Modell zufolge eine GTP-Hydrolyse eine Konformationsänderung von TorD veranlassen, so dass es sich aus seiner Bindung mit dem TorA-Signalpeptid ablöst und das TorA-Vorläuferprotein für die Translokation über die Tat-Translokase freigibt (vgl. Abbildung 1-08, Hatzianthis *et al.*, 2005; Sargent, 2007).

Was jedoch der Anstoß für die Ablösung von TorD vom TorA-Vorläuferprotein bzw. die GTP-Hydrolyse ist, ist bisher nicht geklärt. Gegenwärtig stehen in der Literatur vier Arbeitshypothesen zur Debatte, mit deren Hilfe die TorD-Ablösung erklärt werden kann (Sargent, 2007):

Hypothese 1: Der TatBC-Komplex besitzt eine höhere Affinität gegenüber dem TorA-Signalpeptid als TorD.

Das TorA-Signalpeptid wird aufgrund einer höheren Affinität des TatBC-Komplexes für das Signalpeptid vom TorD Chaperon an den TatBC-Komplex weitergereicht. Bisher sind allerdings die Dissoziationskonstanten (K_D) unbekannt, mit denen der TatBC-Komplex das TorA-Signalpeptid bindet. Nachteil dieser Hypothese ist, dass nach ihr die TorD-Ablösung unkoordiniert verläuft, da ein Kontrollmechanismus wie eine Nukleotidtriphosphat-Hydrolyse fehlt.

Hypothese 2: TorD wird durch die Faltung seines Partnerenzym von seiner Bindungsstelle auf dem TorA-Signlapeptid verdrängt.

Dadurch, dass sich das TorD-Partnerenzym in eine aktive Konformation faltet, kommt es zu einer Verdrängung von TorD vom TorA-Signalpeptid, vorausgesetzt TorD befindet sich nahe genug am reifen Teil des Proteins und es wird bei der Proteinfaltung ausreichend Energie frei, um eine Ablösung von TorD aus seiner Bindung mit dem Signalpeptid zu bewirken.

Allerdings wird normalerweise bei einer Proteinfaltung nur sehr wenig Energie freigesetzt, so dass sie nicht für eine Ablösung des TorD Chaperons aus seiner Bindung ausreichen dürfte.

Hypothese 3: *TorD* verhält sich bei der Bindung vom *TorA*-Signalpeptid wie eine molekulare Zeitschaltuhr.

Das Chaperon *TorD* verhält sich ähnlich wie eine molekulare Uhr, d.h., dass es sich erst nach Ablauf einer bestimmten Zeit vom Signalpeptid ablöst (Berks *et al.*, 2005). Bei diesem Model müsste allerdings die Dissoziationsrate K_D von *TorD* und Signalpeptid genau mit der Faltung oder der Assemblierung des reifen Proteinteils übereinstimmen. Dies ist aber nicht sehr wahrscheinlich, da die Proofreading-Aktivität von *TorD* auf unterschiedliche Proteine mit verschiedenen Faltungs- und Assemblierungseigenschaften übertragbar ist.

Hypothese 4: *Eine Interaktion von TorD mit Komponenten der Tat-Translokase löst eine Freisetzung des Signalpeptids aus und bewirkt eine GTP-Hydrolyse.*

Eine Interaktion von *TorD* mit Komponenten der *E.coli* *Tat*-Translokase selbst könnte eine Freisetzung des Signalpeptids und/oder eine GTP-Hydrolyse von *TorD* bewirken. Für diese Hypothese spricht, dass von dem zur TMAO-Reduktase verwandten *DmsD*-Protein bekannt ist, dass es an *TatB* und *TatC* Proteine bindet und mit ihnen an der Cytoplasmamembran interagiert (Genest *et al.*, 2006a; Papish *et al.*, 2003).

Da in *C.glutamicum* der Ablöseprozess von *TorD* vom *TorA*-Signalpeptid nicht stattfindet, ist dies ein Indiz dafür, dass, wie in Hypothese 1 und Hypothese 4 beschrieben, Interaktionen mit dritten Interaktionspartnern wie Komponenten der *E.coli* *Tat*-Translokase entscheidend für die Ablösung sind.

Daher wurde mit Hilfe des modifizierten Zweivektorensystems untersucht, ob durch eine Interaktion mit homologen oder heterologen *Tat*-Komponenten eine Ablösung von *TorD* und damit eine Translokation von *TorA*^{SP}-Vorläuferproteinen rekonstituiert werden kann. Bei dem modifizierten Zweivektorensystem befanden sich *TorA*^{SP}GFP und *TorD* im Tandem auf einem pEK2-Derivat, während die *Tat*-Komponenten von einem pEK2-Derivat exprimiert wurden (siehe Abbildung 3-36).

Mit dem zur Coexpression von *TorA*^{SP}GFP und *TorD* eingesetzten Vektorsystem, konnten die von Li *et al.* gemachten Literaturangaben prinzipiell reproduziert werden (Li *et al.*, 2006). Wenn *TorD* im Tandem mit *TorA*^{SP}GFP in *E.coli* exprimiert wurde, war der Export von GFP in die Periplasmafraktion stark erhöht.

Dies zeigte, dass in *E.coli* ein Ablöseprozess von *TorD* vom *TorA*-Signalpeptid stattfand und das *TorA*-Vorläuferprotein für eine Translokation freigegeben wurde. Im *C.glutamicum* WT blieb dieser Ablöseprozess hingegen aus, wenn *TorD* und das Modellssubstrat *TorA*^{SP}GFP im Tandem exprimiert wurden (siehe Abbildung 3-39). Stattdessen akkumulierten Vorläuferproteine stark im Gesamtzellextrakt von *C.glutamicum*, so dass eine Translokation des *TorA*-Vorläuferproteins nicht zustande kam.

Weil die durch *TorD* ausgelöste Blockade der Sekretion in *C.glutamicum* nicht aufgehoben wurde, wenn homologe *Tat*-Komponenten, wie *C.glutamicum* *TatA* und *TatC* Proteine, coexprimiert wurden, zeigte

dies, dass die Blockade der Sekretion nicht einfach durch ein vermehrtes Angebot von unspezifischen Tat-Translokasekomponenten aufgehoben werden konnte.

IV.3.1 Das *E.coli* TatABC-System ist an einer Ablösung von TorD beteiligt

Daher wurde als Nächstes untersucht, ob durch gemeinsame Expression verschiedener Kombinationen von *E.coli* Tat-Komponenten (TatC, TatAC oder TatABC) eine Abschwächung der durch TorD verursachten Retention nachgewiesen werden kann. Nur im Fall der gemeinsamen Expression des vollständigen *E.coli* TatABC-Systems und TorD war eine Sekretion, wenn auch eine geringe, von TorA^{SP}GFP möglich. Diese Tatsache zeigt, dass das *E.coli* TatABC-System direkt an der Ablösung des TorD Chaperons vom TorA-Signalpeptid beteiligt ist.

Möglicherweise geht hierbei das *E.coli* TatC eine initiale Bindung mit dem TorA-Signalpeptid und dem daran gebundenen Chaperon TorD ein. Untersuchungen in *E.coli* und Thylakoiden hatten gezeigt, dass das TatC Protein im TatBC-Rezeptorkomplex den ersten Kontakt zum Signalpeptid aufnimmt und an das Zwillingsargininmotiv bindet (Alami *et al.*, 2003; Gerard und Cline, 2006; Kreutzenbeck *et al.*, 2007). Aber das TatC Protein interagiert nicht nur mit dem TorA-Signalpeptid, sondern ist auch in der Lage, Kontakte mit dem Chaperon DmsD einzugehen (Papish *et al.*, 2003). Als nächste Translokase-Komponente bindet TatB an das Tat-Signalpeptid (Alami *et al.*, 2003). Dieses Protein ist ebenso wie TatC in der Lage, DmsD zu binden (Papish *et al.*, 2003). Das zu TorD engverwandte Chaperon DmsD geht jedoch keine Bindung mit *E.coli* TatA oder TatE Proteinen ein. Daher kann gefolgert werden, dass in Analogie zum Chaperon DmsD auch das Chaperon TorD Kontakte mit TatB und TatC eingeht, nicht aber mit TatA. Deshalb ist am Ablöseprozess des Chaperons TorD möglicherweise nur der *E.coli* TatBC-Komplex beteiligt, nicht aber das *E.coli* TatA Protein.

Kommt es nun zu einer Ablösung von TorD mit Hilfe der *E.coli* Tat-Translokasekomponenten wird das Modellsubstrat wahrscheinlich über Komponenten des funktionellen Tat-Systems von *C.glutamicum* transloziert. Denn in der *C.glutamicum* Δ tatAC-Mutante ist das *E.coli* TatABC-System nicht aktiv. Daher ist das *E.coli* TatABC-System, wenn es im *C.glutamicum* WT exprimiert wird, wahrscheinlich ebenso in der Fähigkeit gestört, eine Translokation zu bewerkstelligen. Die Fähigkeit der *E.coli* TatABC-Translokase, eine Ablösung von TorD zu leisten, ist davon offenbar nicht beeinträchtigt.

IV.3.2 Weitere Strategien zur Verbesserung der Tat-abhängigen Sekretion in *C.glutamicum* – ein Ausblick

Im Gegensatz zur Sec-abhängigen Sekretion rekombinanter Proteine wurden nur wenige Strategien zur Verbesserung der Tat-abhängigen Sekretion in Gram-positiven Bakterien entwickelt. Daher wurden in dieser Studie drei Strategien entwickelt, um einen typischen Engpass der Tat-abhängigen Proteinsekretion zu beheben und gleichzeitig die Sekretion der Lipase GTL über den Tat-Weg zu verbessern. Als Modellfall für einen typischen Engpass der Tat-abhängigen Sekretion wurde hierbei die Substratsättigung der Tat-Translokase gewählt. Beim Vergleich der verschiedenen Strategien fiel auf, dass nur durch Coexpression der homologen *C.glutamicum* TatA und TatC Komponenten eine Verbesserung der Sekretion um den Faktor 3 erzielt werden konnte. Offenbar stellte bei der Tat-abhängigen Translokation der Lipase GTL die Anzahl der Tat-Komponenten einen limitierenden Faktor in *C.glutamicum* dar.

Aber nicht nur die Anzahl der Tat-Komponenten kann limitierend auf die Sekretion wirken, auch die Energetisierung des Tat-Weges kann einen Engpass darstellen (Brüser, 2007).

Denn die Translokation von Proteinen über die Tat-Translokase ist von einem Protonengradienten abhängig, so dass es während der Translokation zu einem Protonenfluss in die Zelle kommt. Berechnungen von Alder und Theg zufolge sind dies für das Tat-System von Thylakoiden ca. 80.000 Protonen pro transportiertem Protein (Alder und Theg, 2003). Dieser hohe Protonenfluss kann unter Überexpressionsbedingungen von Tat-Substraten aufgrund der erhöhten Translokaseaktivität oder einer gestörten Translokation einen Membranstress verursachen, so dass Tat-Substrate weniger effizient transloziert werden. In *E.coli* konnte dieser durch Überexpression von Tat-Substraten hervorgerufene Membranstress durch Coexpression des Phagenschock-Proteins PspA ausgeglichen werden (DeLisa *et al.*, 2004). PspA zählt in *E.coli* zu den Membranstress-Faktoren und ist als Oligomer in der Lage, Ionenverluste durch die Membran zu vermindern (Kobayashi *et al.*, 2007). Durch Coexpression eines zu PspA homologen Proteins konnte der Tat-abhängige Export von GFP in *S.lividans* um den Faktor 3 verbessert werden (Vrancken *et al.*, 2007). Möglicherweise ist diese Strategie auch auf die Tat-abhängige Sekretion in *C.glutamicum* übertragbar.

Eine weitere Option, die Sekretion über den Tat-Weg zu verbessern, ist auch die Coexpression von generellen Chaperonen wie DnaK. Das Chaperon DnaK erkennt die hydrophoben Regionen von Tat-Signalpeptiden und bindet an sie (Graubner *et al.*, 2007; Perez-Rodriguez *et al.*, 2007). Dadurch verhindert es möglicherweise in Konkurrenz zu TorD eine Aggregation von Tat-Substraten (Perez-Rodriguez *et al.*, 2007). In *E.coli* konnte durch Überexpression von DnaK der Export homologer und heterologer Tat-Substrate verbessert werden (Perez-Rodriguez *et al.*, 2007), so dass dies in Analogie auch für *C.glutamicum* gelten könnte.

Insgesamt könnte eine Sammlung von verschiedenen Strategien zur Optimierung der Tat-abhängigen Sekretion in Gram-positiven Bakterien wie *C.glutamicum* helfen, den Tat-Weg als alternativen Sekretionsweg für die sekretorische Proteingewinnung zu etablieren, Stammentwicklungszeiten zu verkürzen und die Ausbeuten von biotechnologisch relevanten Enzymen über den Tat-Weg zu steigern, so dass sie kostengünstig für Anwendungen in der Weißen Biotechnologie bereitgestellt werden können.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Thermostabile Lipasen wie die Lipase GTL aus *Geobacillus thermoleovorans* IHI-91 sind biotechnologisch relevante Enzyme, die in der Feinchemie anstelle von chemischen Katalysatoren zur Umsetzung von langkettigen Fettsäuren unter hohen Temperaturen eingesetzt werden können. Um diese Enzyme mit geringen Aufarbeitungskosten zu produzieren, bietet sich die sekretorische Proteingewinnung in mesophilen Gram-positiven Bakterien an. Problem hierbei ist, dass rekombinante Proteine aufgrund einer mangelnden Anpassung an das heterologe Wirtssystem häufig nicht oder nur mit geringen Produktausbeuten im Kulturüberstand gewonnen werden können. Aus diesem Grund wurden zur Etablierung der sekretorischen Proteingewinnung der Lipase GTL, die bisher nur intrazellulär gewonnen wurde, nach dem Tool-Box-Prinzip verschiedene Gram-positive Wirtssysteme, Sekretionswege und Signalpeptide mit der Lipase GTL kombiniert. Dabei zeigte sich, dass die Lipase GTL in *Staphylococcus carnosus* sowohl mit ihrem eigenen Sec-Signalpeptid über den Sec-Weg als auch Tat-abhängig mit dem Signalpeptid der *Escherichia coli* TMAO-Reduktase (TorA) mit signifikanten Enzymsausbeuten gewonnen werden kann. Dabei war die Aktivität der Lipase GTL im Kulturüberstand etwa 4-mal höher, wenn sie über den Sec-Weg in einer ungefalteten Konformation transloziert wurde als wenn sie Tat-abhängig in einer gefalteten Konformation sekretiert wurde (0,7 U/ml).

Um die Tat-abhängige Sekretion der Lipase GTL in verschiedenen Gram-positiven Bakterien zu vergleichen, wurde sie in *Corynebacterium glutamicum* und in *Bacillus subtilis* mit dem *E.coli* TorA-Signalpeptid exprimiert. Während in *B.subtilis* die Expression der Lipase GTL die Zellintegrität störte und eine Zellyse verursachte, wurde die Lipase GTL mit einer Aktivität von ca. 1,25 U/ml über das TatABC-System von *C.glutamicum* sekretiert. Auffällig war, dass die Überexpression der Lipase GTL in *C.glutamicum* zu einer Substratsättigung der Tat-Translokase führt, bei der es zu einer starken Akkumulation von aktiven Enzymspezies im Gesamtzellextrakt kommt. Da es sich hierbei um einen typischen Engpass der Tat-abhängigen Sekretion handelt, wurde er als Modellfall gewählt, um drei unabhängige Strategien zu seiner Aufhebung zu entwickeln.

Bei der ersten Strategie war es das Ziel, über eine gerichtete Evolution das artfremde *E.coli* TorA-Signalpeptid an den Tat-Weg von *C.glutamicum* so anzupassen, dass die Lipase GTL mit einer erhöhten Aktivität in den Kulturüberstand sekretiert wird. Zu diesem Zweck wurden durch Zufallsmutagenese ca. 11.000 verschiedene Varianten des TorA-Signalpeptids erzeugt und mit der Lipase GTL fusioniert. Bei einem anschließenden Hochdurchsatz-Screening wurden jedoch keine *C.glutamicum* Transformanten mit einer signifikant erhöhten Aktivität der Lipase GTL im Kulturüberstand gefunden. Vielmehr wurden Determinanten im TorA-Signalpeptid identifiziert, die wichtig für die Funktionalität des *E.coli* TorA-Signalpeptids in *C.glutamicum* sind. Bei der zweiten Strategie war es das Ziel, durch Überexpression von homologen oder heterologen Tat-Komponenten die Translokationseffizienz der Lipase GTL zu verbessern. Während durch Coexpression von *E.coli* Tat-Komponenten keine funktionelle Translokation in *C.glutamicum* erzielt wurde, führte die Expression von homologen TatA und TatC Proteinen zu einer um den Faktor 4 verbesserten Sekretion der Lipase GTL. Dies zeigte, dass bei Überexpression der Lipase GTL die Anzahl der verfügbaren Tat-Komponenten limitierend wirkt.

Als dritte Strategie wurde untersucht, ob durch Coexpression des heterologen Chaperons TorD, das spezifisch an das TorA-Signalpeptid bindet, die Sekretion der Lipase GTL über den Tat-Weg in *C.glutamicum* verbessert werden kann. In *E.coli* koordiniert dieses Chaperon während des Tat-Proofreadings die Reifung von Tat-Substraten mit deren Translokation. Während in *E.coli* die Coexpression von TorD zu einer verbesserten Tat-Sekretion führte, kam es in *C.glutamicum* zu einem vollständigen Exportblock von TorA-Vorläuferproteinen. Ursache hierfür ist, dass der Faktor, der für die Ablösung von TorD vom TorA-Signalpeptid in *E.coli* verantwortlich ist, in *C.glutamicum* fehlt. Da es sich bei diesem Faktor wahrscheinlich um Komponenten der *E.coli* Tat-Translokase handelt, wurden verschiedene *E.coli* Tat-Komponenten gemeinsam mit dem Chaperon TorD und dem Modellsubstrat TorA^{SP}GFP in *C.glutamicum* Wildtypzellen coexprimiert. Dabei zeigte sich, dass es nur zu einer Sekretion des Modellsubstrates kam, wenn die *E.coli* TatABC-Translokase gemeinsam mit TorD in *C.glutamicum* exprimiert wurde. Dies bedeutet, dass die *E.coli* TatABC-Translokase direkt am Ablöseprozess von TorD vom TorA-Signalpeptid beteiligt ist.

VI. SUMMARY

Thermostable lipases like the lipase GTL from *Geobacillus thermoleovorans* IHI-91 offer great potential for biotechnological applications, as they can be used instead of chemical catalysts for the conversion of long chain fatty acids under high temperatures. A secretory production of these biotechnological, relevant enzymes in Gram-positive bacteria seems advantageous because the costs of downstream processing are low, since proteins can be purified directly from the culture supernatant. However, recombinant proteins are often secreted inefficiently in these heterologous host organisms, because they are not adapted to the secretory pathways in these bacteria.

The secretory production of the lipase GTL, which was only produced intracellularly so far, was analyzed by making use of a toolbox principle, i.e. combining different Gram-positive host organisms, secretory pathways, and signal sequences with the lipase GTL. In *Staphylococcus carnosus*, the lipase GTL was secreted with significant enzyme yields both Sec-dependently with its authentic signal sequence and Tat-dependently as a fusion with the signal sequence of the *Escherichia coli* TMAO-Reductase (TorA). The activity of the lipase GTL in the supernatant was 4 times higher when it was secreted via the Sec-pathway in an unfolded conformation (2,6 U/ml) than when it was translocated via the Tat-pathway in a fully folded conformation (0,7 U/ml).

In order to compare the Tat-dependent secretion of the lipase GTL in different Gram-positive bacteria, the lipase GTL was expressed as a fusion with the *E.coli* TorA-signal sequence also in *Corynebacterium glutamicum* and in *Bacillus subtilis*. While the expression of the precursor TorA^{SP}GTL in *B.subtilis* disturbed the cell integrity and caused cell lysis, the lipase GTL was secreted with a significant activity of about 1,25 U/ml via the TatABC-system of *C.glutamicum*. Strikingly the overexpression of the lipase GTL in *C.glutamicum* caused a substrate saturation of the Tat-translocase, consequently active enzyme species accumulated in the cytosol of *C.glutamicum*. As substrate saturation is a typical bottleneck of Tat-dependent secretion, it was chosen as a case study for testing the ability of three independent strategies to relieve this bottleneck.

The objective of the first strategy was to adjust the unrelated *E.coli* TorA-signal sequence to the Tat-pathway in *C.glutamicum* in such a way that the lipase GTL is secreted with a higher efficiency into the supernatant. Therefore, about 11.000 variants of the TorA-signal sequence were generated by random mutagenesis and fused to the lipase GTL. However, no *C.glutamicum* transformants with significantly increased enzyme activities in the corresponding culture supernatants could be detected in a subsequent high throughput screening. Nevertheless, using this approach, several determinants were identified which are important for the functionality of the *E.coli* TorA-signal sequence. The aim of the second strategy was to increase the translocation efficiency of lipase GTL by overexpression of homologous and heterologous Tat-components. While coexpression of *E.coli* Tat-components failed to produce functional Tat-translocases in *C.glutamicum*, the overexpression of the homologous *C.glutamicum* TatA and TatC proteins increased the activity of lipase GTL in the supernatant more than 3 times. This demonstrated that the number of Tat-components was a limitation for Tat-translocation under overexpression conditions of the hybrid precursor protein TorA^{SP}GTL. As a third strategy, it was examined whether the coexpression of the heterologous *E.coli* chaperone TorD, which specifically binds to the TorA-signal sequence, will increase the Tat-dependent secretion in *C.glutamicum*. This chaperone coordinates the maturation of TorA-precursor proteins during Tat-proofreading in *E.coli*. In contrast to *E.coli*, where co-overexpression of TorD results in a more efficient membrane translocation of TorA-precursor proteins, the coexpression of TorD in *C.glutamicum* caused surprisingly an almost complete export block of TorA-precursor proteins. A possible reason for this finding is that a special release factor for TorD, that is present in *E.coli*, is missing in *C.glutamicum*. Since such a release factor is probably a component of the *E.coli* Tat-translocase, different *E.coli* Tat-components were expressed together with the chaperone TorD and the model substrate TorA^{SP}GFP in *C.glutamicum* wild-type cells. As a result, it could be shown that secretion of the model substrate was only possible, if the *E.coli* TatABC-translocase was concomitantly coexpressed together with TorD in *C.glutamicum*. From this result it can be concluded, that the *E.coli* TatABC-translocase is directly involved in the release of the TorD chaperone from the TorA-signal sequence.

VII. LITERATUR

- Abe, S., Takyama, K. I. & Kinoshita, S. (1967).** Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **13**, 279-301.
- Alami, M., Trescher, D., Wu, L. F. & Muller, M. (2002).** Separate analysis of twin-arginine translocation (Tat)-specific membrane binding and translocation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **277**, 20499-20503.
- Alami, M., Luke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H. G., Brunner, J. & Muller, M. (2003).** Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Mol Cell*, **12**, 937-946.
- Alami, M., Dalal, K., Lelj-Garolla, B., Sligar, S. G. & Duong, F. (2007).** Nanodiscs unravel the interaction between the SecYEG channel and its cytosolic partner SecA. *Embo J*, **26**, 1995-2004.
- Alder, N. N. & Theg, S. M. (2003).** Energetics of protein transport across biological membranes. a study of the thylakoid DeltapH-dependent/cpTat pathway. *Cell*, **112**, 231-242.
- Bachmann, J., Bauer, B., Zwicker, K., Ludwig, B. & Anderka, O. (2006).** The Rieske protein from *Paracoccus denitrificans* is inserted into the cytoplasmic membrane by the twin-arginine translocase. *Febs J*, **273**, 4817-4830.
- Barrett, C. M., Ray, N., Thomas, J. D., Robinson, C. & Bolhuis, A. (2003).** Quantitative export of a reporter protein, GFP, by the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, **304**, 279-284.
- Battistuzzi, F. U., Feijao, A. & Hedges, S. B. (2004).** A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evol Biol*, **4**, 44.
- Bayan, N., Houssin, C., Chami, M. & Leblon, G. (2003).** Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. *J Biotechnol*, **104**, 55-67.
- Behrendt, J., Standar, K., Lindenstrauss, U. & Bruser, T. (2004).** Topological studies on the twin-arginine translocase component TatC. *FEMS Microbiol Lett*, **234**, 303-308.
- Behrendt, J., Lindenstrauss, U. & Bruser, T. (2007).** The TatBC complex formation suppresses a modular TatB-multimerization in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, **581**, 4085-4090.
- Bell, P. J., Sunna, A., Gibbs, M. D., Curach, N. C., Nevalainen, H. & Bergquist, P. L. (2002).** Prospecting for novel lipase genes using PCR. *Microbiology*, **148**, 2283-2291.
- Berks, B. C., Palmer, T. & Sargent, F. (2005).** Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr Opin Microbiol*, **8**, 174-181.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Blanch, H. W. & Clark, D. S. (1997).** *Biochemical Engineering*, 1st edn. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Blaudeck, N., Sprenger, G. A., Freudl, R. & Wiegert, T. (2001).** Specificity of signal peptide recognition in tat-dependent bacterial protein translocation. *J Bacteriol*, **183**, 604-610.
- Blaudeck, N., Kreutzenbeck, P., Freudl, R. & Sprenger, G. A. (2003).** Genetic analysis of pathway specificity during posttranslational protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Bacteriol*, **185**, 2811-2819.
- Blaudeck, N., Kreutzenbeck, P., Muller, M., Sprenger, G. A. & Freudl, R. (2005).** Isolation and characterization of bifunctional *Escherichia coli* TatA mutant proteins that allow efficient tat-dependent protein translocation in the absence of TatB. *J Biol Chem*, **280**, 3426-3432.
- Bogsch, E., Brink, S. & Robinson, C. (1997).** Pathway specificity for a delta pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein. *Embo J*, **16**, 3851-3859.

- Bolhuis, A., Tjalsma, H., Smith, H. E., de Jong, A., Meima, R., Venema, G., Bron, S. & van Dijl, J. M. (1999).** Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, **65**, 2934-2941.
- Bolhuis, A., Mathers, J. E., Thomas, J. D., Barrett, C. M. & Robinson, C. (2001).** TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **276**, 20213-20219.
- Bosley, A. D. & Ostermeier, M. (2005).** Mathematical expressions useful in the construction, description and evaluation of protein libraries. *Biomol Eng*, **22**, 57-61.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Braun, M., Teichert, O. & Zweck, A. (2006).** Biokatalyse in der industriellen Produktion - Fakten und Potenziale zur weißen Biotechnologie. *Zukünftige Technologien Nr. 57*.
- Brockmeier, U. (2006).** New strategies to optimize the secretion capacity for heterologous proteins in *Bacillus subtilis*, Ruhr-Universität Bochum.
- Brockmeier, U., Caspers, M., Freudl, R., Jockwer, A., Noll, T. & Eggert, T. (2006).** Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. *J Mol Biol*, **362**, 393-402.
- Bruser, T. & Sanders, C. (2003).** An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiol Res*, **158**, 7-17.
- Bruser, T., Yano, T., Brune, D. C. & Daldal, F. (2003).** Membrane targeting of a folded and cofactor-containing protein. *Eur J Biochem*, **270**, 1211-1221.
- Bruser, T. (2007).** The twin-arginine translocation system and its capability for protein secretion in biotechnological protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, **76**, 35-45.
- Buthe, A. (2006).** Charakterisierung und rationale Immobilisierung von Lipasen in biphasischen Reaktionssystemen. Dissertation, RWTH Aachen.
- Cadwell, R. C., Joyce, G. F. & (2003).** *Mutagenic PCR, Chapter 30*, 2nd edition edn.
- Calado, C. R., Almeida, C., Cabral, J. M. & Fonseca, L. P. (2003).** Development of a fed-batch cultivation strategy for the enhanced production and secretion of cutinase by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* SU50 strain. *J Biosci Bioeng*, **96**, 141-148.
- Cannon, K. S., Or, E., Clemons, W. M., Jr., Shibata, Y. & Rapoport, T. A. (2005).** Disulfide bridge formation between SecY and a translocating polypeptide localizes the translocation pore to the center of SecY. *J Cell Biol*, **169**, 219-225.
- Casadaban, M. J. (1976).** Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol*, **104**, 541-555.
- Caspers, M. (2006).** Untersuchung der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in nicht-pathogenen Gram-positiven Bakterien, Heinrich-Heine Universität.
- Champion, P. A., Stanley, S. A., Champion, M. M., Brown, E. J. & Cox, J. S. (2006).** C-terminal signal sequence promotes virulence factor secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, **313**, 1632-1636.
- Chan, C. S., Zlomislic, M. R., Tieleman, D. P. & Turner, R. J. (2007).** The TatA subunit of *Escherichia coli* twin-arginine translocase has an N-in topology. *Biochemistry*, **46**, 7396-7404.
- Chanal, A., Santini, C. & Wu, L. (1998).** Potential receptor function of three homologous components, TatA, TatB and TatE, of the twin-arginine signal sequence-dependent metalloenzyme translocation pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **30**, 674-676.
- Chanal, A., Santini, C. L. & Wu, L. F. (2003).** Specific inhibition of the translocation of a subset of *Escherichia coli* TAT substrates by the TorA signal peptide. *J Mol Biol*, **327**, 563-570.
- Chen, G., Ying, M. & Li, W. (2006).** Enzymatic conversion of waste cooking oils into alternative fuel-biodiesel. *Appl Biochem Biotechnol*, **129-132**, 911-921.
- Chen, M. & Nagarajan, V. (1994).** Effect of alteration of charged residues at the N termini of signal peptides on protein export in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **176**, 5796-5801.

- Chen, M., Xie, K., Yuan, J., Yi, L., Facey, S. J., Pradel, N., Wu, L. F., Kuhn, A. & Dalbey, R. E. (2005).** Involvement of SecDF and YidC in the membrane insertion of M13 procoat mutants. *Biochemistry*, **44**, 10741-10749.
- Cho, A. R., Yoo, S. K. & Kim, E. J. (2000).** Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol Lett*, **186**, 235-238.
- Cline, K. & Mori, H. (2001).** Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J Cell Biol*, **154**, 719-729.
- Costa-Riu, N., Burkovski, A., Kramer, R. & Benz, R. (2003).** PorA represents the major cell wall channel of the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol*, **185**, 4779-4786.
- Cristobal, S., de Gier, J. W., Nielsen, H. & von Heijne, G. (1999).** Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *Embo J*, **18**, 2982-2990.
- Dalbey, R. E. & Kuhn, A. (2004).** YidC family members are involved in the membrane insertion, lateral integration, folding, and assembly of membrane proteins. *J Cell Biol*, **166**, 769-774.
- Darmon, E., Noone, D., Masson, A., Bron, S., Kuipers, O. P., Devine, K. M. & van Dijl, J. M. (2002).** A novel class of heat and secretion stress-responsive genes is controlled by the autoregulated CssRS two-component system of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **184**, 5661-5671.
- Date, M., Itaya, H., Matsui, H. & Kikuchi, Y. (2006).** Secretion of human epidermal growth factor by *Corynebacterium glutamicum*. *Lett Appl Microbiol*, **42**, 66-70.
- De Buck, E., Vranckx, L., Meyen, E., Maes, L., Vandersmissen, L., Anne, J. & Lammertyn, E. (2007).** The twin-arginine translocation pathway is necessary for correct membrane insertion of the Rieske Fe/S protein in *Legionella pneumophila*. *FEBS Lett*, **581**, 259-264.
- De Greyt, W. (2004).** Chemical vs enzymatic interesterification. In: *IUPAC-AOCS Workshop on Fats, Oils & Oilseeds Analyses & Production*. Tunis, Tunisia.
- De Kathen, A. & Pickardt, T. (2005).** Plattformen zur Produktion rekombinanter Arzneimittel: Pflanzen im Vergleich. *Biotech Consult GbR; Büro für Technikfolgenabschätzung, download-2005-TAB-PMP.pdf* 133 S. .
- De Keersmaecker, S., Vrancken, K., Van Mellaert, L., Lammertyn, E., Anne, J. & Geukens, N. (2006).** Evaluation of TatABC overproduction on Tat- and Sec-dependent protein secretion in *Streptomyces lividans*. *Arch Microbiol*, **186**, 507-512.
- De Leeuw, E., Porcelli, I., Sargent, F., Palmer, T. & Berks, B. C. (2001).** Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway. *FEBS Lett*, **506**, 143-148.
- de Leeuw, E., Granjon, T., Porcelli, I., Alami, M., Carr, S. B., Muller, M., Sargent, F., Palmer, T. & Berks, B. C. (2002).** Oligomeric properties and signal peptide binding by *Escherichia coli* Tat protein transport complexes. *J Mol Biol*, **322**, 1135-1146.
- Dechema_e_v. (2004).** Weiße Biotechnologie: Chancen für Deutschland.
- DeLisa, M. P., Tullman, D. & Georgiou, G. (2003).** Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6115-6120.
- DeLisa, M. P., Lee, P., Palmer, T. & Georgiou, G. (2004).** Phage shock protein PspA of *Escherichia coli* relieves saturation of protein export via the Tat pathway. *J Bacteriol*, **186**, 366-373.
- Demchick, P. & Koch, A. L. (1996).** The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **178**, 768-773.
- Demleitner, G. & Gotz, F. (1994).** Evidence for importance of the *Staphylococcus hyicus* lipase propeptide in lipase secretion, stability and activity. *FEMS Microbiol Lett*, **121**, 189-197.
- Dharmsthiti, S. & Luchai, S. (1999).** Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. *FEMS Microbiol Lett*, **179**, 241-246.
- Diamond, D. L. & Randall, L. L. (1997).** Kinetic partitioning. Poising SecB to favor association with a rapidly folding ligand. *J Biol Chem*, **272**, 28994-28998.
- Dilks, K., Gimenez, M. I. & Pohlschroder, M. (2005).** Genetic and biochemical analysis of the twin-arginine translocation pathway in halophilic archaea. *J Bacteriol*, **187**, 8104-8113.

- Dilsen, S., Paul, W., Sandgathe, A., Tippe, D., Freudl, R., Thommes, J., Kula, M. R., Takors, R., Wandrey, C. & Weuster-Botz, D. (2000). Fed-batch production of recombinant human calcitonin precursor fusion protein using *Staphylococcus carnosus* as an expression-secretion system. *Appl Microbiol Biotechnol*, **54**, 361-369.
- Ding, H., Hunt, J. F., Mukerji, I. & Oliver, D. (2003). *Bacillus subtilis* SecA ATPase exists as an antiparallel dimer in solution. *Biochemistry*, **42**, 8729-8738.
- Dmitriev, B., Toukach, F. & Ehlers, S. (2005). Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall. *Trends Microbiol*, **13**, 569-574.
- Dorel, C., Lejeune, P. & Rodrigue, A. (2006). The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities? *Res Microbiol*, **157**, 306-314.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, **16**, 6127-6145.
- Doyle, R. J., Chaloupka, J. & Vinter, V. (1988). Turnover of cell walls in microorganisms. *Microbiol Rev*, **52**, 554-567.
- Drouault, S., Corthier, G., Ehrlich, S. D. & Renault, P. (2000). Expression of the *Staphylococcus hyicus* lipase in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 588-598.
- Economou, A., Pogliano, J. A., Beckwith, J., Oliver, D. B. & Wickner, W. (1995). SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecE. *Cell*, **83**, 1171-1181.
- Eggeling, L. B., M. (2005). *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Eggert, T. (2003). Directed evolution by random mutagenesis: a critical evaluation. In: *Enzyme functionality: design, engineering, and screening*, pp. 375-390.
- Eggert, T., Brockmeier, U., Droge, M. J., Quax, W. J. & Jaeger, K. E. (2003). Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: regulation of gene expression and enzyme activity by amino acid supply and external pH. *FEMS Microbiol Lett*, **225**, 319-324.
- Eikmanns, B. J., Kleinertz, E., Liebl, W. & Sahm, H. (1991). A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene*, **102**, 93-98.
- EuropaBio. (2003). White Biotechnology: Gateway to a more sustainable future.
- Facey, S. J. & Kuhn, A. (2004). Membrane integration of *E. coli* model membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 55-66.
- Ferrari, E., Jarnagin, A. S. & Schmidt, B. F. (1993). Commercial production of extracellular enzymes. In: *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria: chemistry, physiology, and molecular genetics* (Ed. by Losick, R.), pp. 917-937: ASM Press.
- Flower, A. M. (2007). The SecY translocation complex: convergence of genetics and structure. *Trends Microbiol*.
- Freudl, R. (2005). *Staphylococcus carnosus* and other Gram-Positive Bacteria. In: *Production of Recombinant Proteins* (Ed. by Prof. Dr. Gerd, G.), pp. 67-87.
- Fukuda, H., Kondo, A. & Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng*, **92**, 405-416.
- Gauthier, C., Li, H. & Morosoli, R. (2005). Increase in xylanase production by *Streptomyces lividans* through simultaneous use of the Sec- and Tat-dependent protein export systems. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 3085-3092.
- Genest, O., Seduk, F., Ilbert, M., Mejean, V. & Iobbi-Nivol, C. (2006a). Signal peptide protection by specific chaperone. *Biochem Biophys Res Commun*, **339**, 991-995.
- Genest, O., Seduk, F., Theraulaz, L., Mejean, V. & Iobbi-Nivol, C. (2006b). Chaperone protection of immature molybdoenzyme during molybdenum cofactor limitation. *FEMS Microbiol Lett*, **265**, 51-55.
- Genevaux, P., Keppel, F., Schwager, F., Langendijk-Genevaux, P. S., Hartl, F. U. & Georgopoulos, C. (2004). In vivo analysis of the overlapping functions of DnaK and trigger factor. *EMBO Rep*, **5**, 195-200.

- Gerard, F. & Cline, K. (2006).** Efficient twin arginine translocation (Tat) pathway transport of a precursor protein covalently anchored to its initial cpTatC binding site. *J Biol Chem*, **281**, 6130-6135.
- Gerard, F. & Cline, K. (2007).** The Thylakoid Proton Gradient Promotes an Advanced Stage of Signal Peptide Binding Deep within the Tat Pathway Receptor Complex. *J Biol Chem*, **282**, 5263-5272.
- Gerlach, R., Pop, O. & Muller, J. P. (2004).** Tat dependent export of *E. coli* phytase AppA by using the PhoD-specific transport system of *Bacillus subtilis*. *J Basic Microbiol*, **44**, 351-359.
- Gohlke, U., Pullan, L., McDevitt, C. A., Porcelli, I., de Leeuw, E., Palmer, T., Saibil, H. R. & Berks, B. C. (2005).** The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 10482-10486.
- Gotz, F. & Schumacher, B. (1987).** Improvements of protoplast transformation in *Staphylococcus carnosus*. *FEMS Microbiol Lett*, **40**, 285-288.
- Gotz, F. (1990).** *Staphylococcus carnosus*: a new host organism for gene cloning and protein production. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, **19**, 49S-53S.
- Gouffi, K., Gerard, F., Santini, C. L. & Wu, L. F. (2004).** Dual topology of the *Escherichia coli* TatA protein. *J Biol Chem*, **279**, 11608-11615.
- Graubner, W., Schierhorn, A. & Bruser, T. (2007).** DnaK Plays a Pivotal Role in Tat Targeting of CueO and Functions beside SlyD as a General Tat Signal Binding Chaperone. *J Biol Chem*, **282**, 7116-7124.
- Gunneriusson, E., Samuelson, P., Ringdahl, J., Gronlund, H., Nygren, P. A. & Stahl, S. (1999).** Staphylococcal surface display of immunoglobulin A (IgA)- and IgE-specific in vitro-selected binding proteins (affibodies) based on *Staphylococcus aureus* protein A. *Appl Environ Microbiol*, **65**, 4134-4140.
- Gupta, R., Gupta, N. & Rathi, P. (2004).** Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, **64**, 763-781.
- Gurkan, C. & Ellar, D. J. (2005).** Recombinant production of bacterial toxins and their derivatives in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, **4**, 33.
- Halbig, D., Wiegert, T., Blaudeck, N., Freudl, R. & Sprenger, G. A. (1999).** The efficient export of NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase to the periplasm of *Zymomonas mobilis* depends both on an intact twin-arginine motif in the signal peptide and on the generation of a structural export signal induced by cofactor binding. *Eur J Biochem*, **263**, 543-551.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hand, N. J., Klein, R., Laskewitz, A. & Pohlschroder, M. (2006).** Archaeal and bacterial SecD and SecE homologs exhibit striking structural and functional conservation. *J Bacteriol*, **188**, 1251-1259.
- Hansmeier, N., Albersmeier, A., Tauch, A., Damberg, T., Ros, R., Anselmetti, D., Puhler, A. & Kalinowski, J. (2006).** The surface (S)-layer gene *cspB* of *Corynebacterium glutamicum* is transcriptionally activated by a LuxR-type regulator and located on a 6 kb genomic island absent from the type strain ATCC 13032. *Microbiology*, **152**, 923-935.
- Hatzixanthis, K., Palmer, T. & Sargent, F. (2003).** A subset of bacterial inner membrane proteins integrated by the twin-arginine translocase. *Mol Microbiol*, **49**, 1377-1390.
- Hatzixanthis, K., Clarke, T. A., Oubrie, A., Richardson, D. J., Turner, R. J. & Sargent, F. (2005).** Signal peptide-chaperone interactions on the twin-arginine protein transport pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 8460-8465.
- Hegde, R. S. & Bernstein, H. D. (2006).** The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem Sci*, **31**, 563-571.
- Hernandez-Martin, E. & Otero, C. (2007).** Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym((R)) 435 and Lipozyme((R)) TL IM. *Bioresour Technol*.
- Hicks, M. G., Guymer, D., Buchanan, G., Widdick, D. A., Caldelari, I., Berks, B. C. & Palmer, T. (2006).** Formation of functional Tat translocases from heterologous components. *BMC Microbiol*, **6**, 64.
- Higerd, T. B. & Spizizen, J. (1973).** Isolation of two acetyl esterases from extracts of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **114**, 1184-1192.

- Hofmann, K. & Stoffel, W. (1993)**. TMBASE - A database of membrane spanning protein segments *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **374**, 166
- Houben, E. N., Zarivach, R., Oudega, B. & Luirink, J. (2005)**. Early encounters of a nascent membrane protein: specificity and timing of contacts inside and outside the ribosome. *J Cell Biol*, **170**, 27-35.
- Houssin, C., Nguyen, D. T., Leblon, G. & Bayan, N. (2002)**. S-layer protein transport across the cell wall of *Corynebacterium glutamicum*: in vivo kinetics and energy requirements. *FEMS Microbiol Lett*, **217**, 71-79.
- Hyyrylainen, H. L., Bolhuis, A., Darmon, E., Muukkonen, L., Koski, P., Vitikainen, M., Sarvas, M., Pragai, Z., Bron, S., van Dijl, J. M. & Kontinen, V. P. (2001)**. A novel two-component regulatory system in *Bacillus subtilis* for the survival of severe secretion stress. *Mol Microbiol*, **41**, 1159-1172.
- Ikeda, M. & Clark, D. S. (1998)**. Molecular cloning of extremely thermostable esterase gene from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, **57**, 624-629.
- Ikeda, M. & Nakagawa, S. (2003)**. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, **62**, 99-109.
- Ilbert, M., Mejean, V., Giudici-Orticoni, M. T., Samama, J. P. & Iobbi-Nivol, C. (2003)**. Involvement of a mate chaperone (TorD) in the maturation pathway of molybdoenzyme TorA. *J Biol Chem*, **278**, 28787-28792.
- Jack, R. L., Buchanan, G., Dubini, A., Hatzixanthis, K., Palmer, T. & Sargent, F. (2004)**. Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins. *Embo J*, **23**, 3962-3972.
- Jack, R. L., Dubini, A., Palmer, T. & Sargent, F. (2005)**. Common principles in the biosynthesis of diverse enzymes. *Biochem Soc Trans*, **33**, 105-107.
- Jaeger, K. E. & Reetz, M. T. (1998)**. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol*, **16**, 396-403.
- Jaeger, K. E. & Eggert, T. (2002)**. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, **13**, 390-397.
- Jeong, S. T., Kim, H. K., Kim, S. J., Chi, S. W., Pan, J. G., Oh, T. K. & Ryu, S. E. (2002)**. Novel zinc-binding center and a temperature switch in the *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase. *J Biol Chem*, **277**, 17041-17047.
- Jiang, F., Chen, M., Yi, L., de Gier, J. W., Kuhn, A. & Dalbey, R. E. (2003)**. Defining the regions of *Escherichia coli* YidC that contribute to activity. *J Biol Chem*, **278**, 48965-48972.
- Jilaveanu, L. B., Zito, C. R. & Oliver, D. (2005)**. Dimeric SecA is essential for protein translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7511-7516.
- Jilaveanu, L. B. & Oliver, D. (2006)**. SecA dimer cross-linked at its subunit interface is functional for protein translocation. *J Bacteriol*, **188**, 335-338.
- Jongbloed, J. D., Grieger, U., Antelmann, H., Hecker, M., Nijland, R., Bron, S. & van Dijl, J. M. (2004)**. Two minimal Tat translocases in *Bacillus*. *Mol Microbiol*, **54**, 1319-1325.
- Jozwik, A. M. & Wolska, K. I. (1999)**. Molecular chaperones. *Acta Microbiol Pol*, **48**, 221-231.
- Kaderbhai, M. A., Davey, H. M. & Kaderbhai, N. N. (2004)**. A directed evolution strategy for optimized export of recombinant proteins reveals critical determinants for preprotein discharge. *Protein Sci*, **13**, 2458-2469.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B. J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Kramer, R., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Mockel, B., Pfefferle, W., Puhler, A., Rey, D. A., Ruckert, C., Rupp, O., Sahn, H., Wendisch, V. F., Wiegrabe, I. & Tauch, A. (2003)**. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol*, **104**, 5-25.
- Kawamura, F. & Doi, R. H. (1984)**. Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. *J Bacteriol*, **160**, 442-444.
- Kellens, M. (2000)**. Chemical interesterification: process conditions. *Sci Lecture Papers Series*, 1-3.
- Ki, J. J., Kawarasaki, Y., Gam, J., Harvey, B. R., Iverson, B. L. & Georgiou, G. (2004)**. A periplasmic fluorescent reporter protein and its application in high-throughput membrane protein topology analysis. *J Mol Biol*, **341**, 901-909.

- Kiefer, D. & Kuhn, A. (2007).** YidC as an Essential and Multifunctional Component in Membrane Protein Assembly. *Int Rev Cytol*, **259**, 113-138.
- Kikuchi, Y., Date, M., Itaya, H., Matsui, K. & Wu, L. F. (2006).** Functional analysis of the twin-arginine translocation pathway in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 7183-7192.
- Kim, D. Y. & Kim, K. K. (2005).** Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control. *J Biochem Mol Biol*, **38**, 266-274.
- Kim, H., Sung, M., Kim, H. & Oh, T. (1994).** Occurrence of Thermostable Lipase in Thermophilic *Bacillus* Sp. Strain 398. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **58** 961-962
- Kim, H. K., Choi, H. J., Kim, M. H., Sohn, C. B. & Oh, T. K. (2002).** Expression and characterization of Ca(2+)-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochim Biophys Acta*, **1583**, 205-212.
- Kim, M. H., Kim, H. K., Lee, J. K., Park, S. Y. & Oh, T. K. (2000).** Thermostable lipase of *Bacillus Stearothermophilus*: high-level production, purification, and calcium-dependent thermostability. *Biosci Biotechnol Biochem*, **64**, 280-286.
- Kobayashi, R., Suzuki, T. & Yoshida, M. (2007).** *Escherichia coli* phage-shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes. *Mol Microbiol*, **66**, 100-109.
- Kreutzenbeck, P., Kroger, C., Lausberg, F., Blaudeck, N., Sprenger, G. A. & Freudl, R. (2007).** *Escherichia coli* twin-arginine (Tat) mutant translocases possessing relaxed signal peptide recognition specificities. *J Biol Chem*.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lammertyn, E. & Anne, J. (1998).** Modifications of *Streptomyces* signal peptides and their effects on protein production and secretion. *FEMS Microbiol Lett*, **160**, 1-10.
- Lammertyn, E., Desmyter, S., Schacht, S., Van Mellaert, L. & Anne, J. (1998).** Influence of charge variation in the *Streptomyces venezuelae* alpha-amylase signal peptide on heterologous protein production by *Streptomyces lividans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **49**, 424-430.
- Lee, P. A., Tullman-Ercek, D. & Georgiou, G. (2006).** The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu Rev Microbiol*, **60**, 373-395.
- Lehtio, J., Wernerus, H., Samuelson, P., Teeri, T. T. & Stahl, S. (2001).** Directed immobilization of recombinant staphylococci on cotton fibers by functional display of a fungal cellulose-binding domain. *FEMS Microbiol Lett*, **195**, 197-204.
- Li, S. Y., Chang, B. Y. & Lin, S. C. (2006).** Coexpression of TorD enhances the transport of GFP via the TAT pathway. *J Biotechnol*, **122**, 412-421.
- Li, W., Zhou, X. & Lu, P. (2004).** Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol*, **155**, 605-610.
- Liljeqvist, S., Cano, F., Nguyen, T. N., Uhlen, M., Robert, A. & Stahl, S. (1999).** Surface display of functional fibronectin-binding domains on *Staphylococcus carnosus*. *FEBS Lett*, **446**, 299-304.
- Lindenstrauss, U. & Bruser, T. (2006).** Conservation and variation between *Rhodobacter capsulatus* and *Escherichia coli* Tat systems. *J Bacteriol*, **188**, 7807-7814.
- Ling Lin, F., Zi Rong, X., Wei Fen, L., Jiang Bing, S., Ping, L. & Chun Xia, H. (2007).** Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: implication for optimization of heterologous protein secretion. *Biotechnol Adv*, **25**, 1-12.
- Luirink, J. & Sinning, I. (2004).** SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 17-35.
- Luirink, J., von Heijne, G., Houben, E. & de Gier, J. W. (2005).** Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*, **59**, 329-355.
- Markossian, S., Becker, P., Markl, H. & Antranikian, G. (2000).** Isolation and characterization of lipid-degrading *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 from an icelandic hot spring. *Extremophiles*, **4**, 365-371.
- Markossian, S. (2003).** Isolierung des neuen thermophilen, ölabbauenden Stammes *Geobacillus thermoleovorans* IHI-91, Klonierung, Reinigung und Characterisierung seiner Esterase und Lipase, Technische Universität Hamburg-Harburg.

- Martinez, C., De Geus, P., Lauwereys, M., Matthysens, G. & Cambillau, C. (1992).** Fusarium solani cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature*, **356**, 615-618.
- McDevitt, C. A., Hicks, M. G., Palmer, T. & Berks, B. C. (2005).** Characterisation of Tat protein transport complexes carrying inactivating mutations. *Biochem Biophys Res Commun*, **329**, 693-698.
- McDevitt, C. A., Buchanan, G., Sargent, F., Palmer, T. & Berks, B. C. (2006).** Subunit composition and in vivo substrate-binding characteristics of Escherichia coli Tat protein complexes expressed at native levels. *Febs J*, **273**, 5656-5668.
- Meens, J., Herbort, M., Klein, M. & Freudl, R. (1997).** Use of the pre-pro part of Staphylococcus hyicus lipase as a carrier for secretion of Escherichia coli outer membrane protein A (OmpA) prevents proteolytic degradation of OmpA by cell-associated protease(s) in two different gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol*, **63**, 2814-2820.
- Meissner, D. (2005).** Vergleichende Analyse der Sec- und Tat-abhängigen sekretorischen Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien als Wirtsorganismen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Meissner, D., Vollstedt, A., van Dijl, J. M. & Freudl, R. (2007).** Comparative analysis of twin-arginine (Tat)-dependent protein secretion of a heterologous model protein (GFP) in three different Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Mejean, V., Iobbi-Nivol, C., Lepelletier, M., Giordano, G., Chippaux, M. & Pascal, M. C. (1994).** TMAO anaerobic respiration in Escherichia coli: involvement of the tor operon. *Mol Microbiol*, **11**, 1169-1179.
- Mergulhao, F. J., Summers, D. K. & Monteiro, G. A. (2005).** Recombinant protein secretion in Escherichia coli. *Biotechnol Adv*, **23**, 177-202.
- Miller, J. H. (1972).** *Experiments in Molecular Genetics*.
- Mitra, K., Schaffitzel, C., Shaikh, T., Tama, F., Jenni, S., Brooks, C. L., 3rd, Ban, N. & Frank, J. (2005).** Structure of the E. coli protein-conducting channel bound to a translating ribosome. *Nature*, **438**, 318-324.
- Mitra, K., Frank, J. & Driessen, A. (2006).** Co- and post-translational translocation through the protein-conducting channel: analogous mechanisms at work? *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 957-964.
- Monroy-Lagos, O., Soberon, X., Gaytan, P. & Osuna, J. (2006).** Improvement of an unusual twin-arginine transporter leader peptide by a codon-based randomization approach. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 3797-3801.
- Mori, H. & Cline, K. (2002).** A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid [Delta]pH/Tat translocase. *J Cell Biol*, **157**, 205-210.
- Muller, J. P., Bron, S., Venema, G. & van Dijl, J. M. (2000a).** Chaperone-like activities of the CsaA protein of Bacillus subtilis. *Microbiology*, **146** (Pt 1), 77-88.
- Muller, J. P., Ozegowski, J., Vettermann, S., Swaving, J., Van Wely, K. H. & Driessen, A. J. (2000b).** Interaction of Bacillus subtilis CsaA with SecA and precursor proteins. *Biochem J*, **348 Pt 2**, 367-373.
- Nakamura, K., Yahagi, S., Yamazaki, T. & Yamane, K. (1999).** Bacillus subtilis histone-like protein, HBsu, is an integral component of a SRP-like particle that can bind the Alu domain of small cytoplasmic RNA. *J Biol Chem*, **274**, 13569-13576.
- Oates, J., Mathers, J., Mangels, D., Kuhlbrandt, W., Robinson, C. & Model, K. (2003).** Consensus structural features of purified bacterial TatABC complexes. *J Mol Biol*, **330**, 277-286.
- Oates, J., Barrett, C. M., Barnett, J. P., Byrne, K. G., Bolhuis, A. & Robinson, C. (2005).** The Escherichia coli twin-arginine translocation apparatus incorporates a distinct form of TatABC complex, spectrum of modular TatA complexes and minor TatAB complex. *J Mol Biol*, **346**, 295-305.
- Orriss, G. L., Tarry, M. J., Ize, B., Sargent, F., Lea, S. M., Palmer, T. & Berks, B. C. (2007).** TatBC, TatB, and TatC form structurally autonomous units within the twin arginine protein transport system of Escherichia coli. *FEBS Lett*, **581**, 4091-4097.
- Osborne, A. R. & Rapoport, T. A. (2007).** Protein translocation is mediated by oligomers of the SecY complex with one SecY copy forming the channel. *Cell*, **129**, 97-110.

- Ouzzine, M., Fournel-Gigleux, S., Pillot, T., Burchell, B., Siest, G. & Magdalou, J. (1994).** Expression of the human UDP-glucuronosyltransferase UGT1*6 in *Escherichia coli*. Influence of bacterial signal peptides on the production and localization of the recombinant protein. *FEBS Lett*, **339**, 195-199.
- Paik, S. H., Chakicherla, A. & Hansen, J. N. (1998).** Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *J Biol Chem*, **273**, 23134-23142.
- Papanikolau, Y., Papadovasilaki, M., Ravelli, R. B., McCarthy, A. A., Cusack, S., Economou, A. & Petratos, K. (2007).** Structure of dimeric SecA, the *Escherichia coli* preprotein translocase motor. *J Mol Biol*, **366**, 1545-1557.
- Papish, A. L., Ladner, C. L. & Turner, R. J. (2003).** The twin-arginine leader-binding protein, DmsD, interacts with the TatB and TatC subunits of the *Escherichia coli* twin-arginine translocase. *J Biol Chem*, **278**, 32501-32506.
- Perez-Rodriguez, R., Fisher, A. C., Perlmutter, J. D., Hicks, M. G., Chanal, A., Santini, C. L., Wu, L. F., Palmer, T. & Delisa, M. P. (2007).** An Essential Role for the DnaK Molecular Chaperone in Stabilizing Over-expressed Substrate Proteins of the Bacterial Twin-arginine Translocation Pathway. *J Mol Biol*, **367**, 715-730.
- Plou, F. J., Ferrer, M., Nuero, O. M., Calvo, M. V., Alcalde, M., Reyes, F. & Ballesteros, A. (1998).** Analysis of Tween 80 as an esterase/ lipase substrate for lipolytic activity assay. *Biotechnology Techniques*, **12**, 183-186.
- Pohlschroder, M., Gimenez, M. I. & Jarrell, K. F. (2005).** Protein transport in Archaea: Sec and twin arginine translocation pathways. *Curr Opin Microbiol*, **8**, 713-719.
- Pop, O., Martin, U., Abel, C. & Muller, J. P. (2002).** The twin-arginine signal peptide of PhoD and the TatAd/Cd proteins of *Bacillus subtilis* form an autonomous Tat translocation system. *J Biol Chem*, **277**, 3268-3273.
- Pop, O. I., Westermann, M., Volkmer-Engert, R., Schulz, D., Lemke, C., Schreiber, S., Gerlach, R., Wetzker, R. & Muller, J. P. (2003).** Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatAd indicates protein-mediated targeting of the Tat export in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, **278**, 38428-38436.
- Prim, N., Sanchez, M., Ruiz, C., Javier Pastor, F. I. & Diaz, P. (2003).** Use of methylumbeliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **22**, 339-346.
- Quax, W. J. (2006).** *Bacterial enzymes*: Springer New York.
- Randall, L. L., Crane, J. M., Lilly, A. A., Liu, G., Mao, C., Patel, C. N. & Hardy, S. J. (2005).** Asymmetric binding between SecA and SecB two symmetric proteins: implications for function in export. *J Mol Biol*, **348**, 479-489.
- Richter, S., Lindenstrauss, U., Lucke, C., Bayliss, R. & Bruser, T. (2007).** Functional Tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins. *J Biol Chem*.
- Robson, A. & Collinson, I. (2006).** The structure of the Sec complex and the problem of protein translocation. *EMBO Rep*, **7**, 1099-1103.
- Rodrigue, A., Chanal, A., Beck, K., Muller, M. & Wu, L. F. (1999).** Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. *J Biol Chem*, **274**, 13223-13228.
- Rosenstein, R. & Gotz, F. (2000).** Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie*, **82**, 1005-1014.
- Royter, M. (2006).** Cloning and Characterization of Thermostable Lipases from Thermophilic Anaerobic Bacteria TU Hamburg-Harburg.
- Rusch, S. L. & Kendall, D. A. (2007).** Oligomeric states of the SecA and SecYEG core components of the bacterial Sec translocon. *Biochim Biophys Acta*, **1768**, 5-12.
- Sadaie, Y. & Kada, T. (1983).** Formation of competent *Bacillus subtilis* cells. *J Bacteriol*, **153**, 813-821.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.

- Samuelson, P., Cano, F., Robert, A. & Stahl, S. (1999).** Engineering of a *Staphylococcus carnosus* surface display system by substitution or deletion of a *Staphylococcus hyicus* lipase propeptide. *FEMS Microbiol Lett*, **179**, 131-139.
- Sanchez, F. & Vasudevan, P. T. (2006).** Enzyme catalyzed production of biodiesel from olive oil. *Appl Biochem Biotechnol*, **135**, 1-14.
- Sandgathe, A., Tippe, D., Dilsen, S., Meens, J., Halfar, M., Weuster-Botz, D., Freudl, R., Thommes, J. & Kula, M. R. (2003).** Production of a human calcitonin precursor with *Staphylococcus carnosus*: secretory expression and single-step recovery. *Process Biochemistry*, **38**, 1351-1363.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sargent, F., Stanley, N. R., Berks, B. C. & Palmer, T. (1999).** Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. A distinct and pivotal role for the TatB protein. *J Biol Chem*, **274**, 36073-36082.
- Sargent, F., Gohlke, U., De Leeuw, E., Stanley, N. R., Palmer, T., Saibil, H. R. & Berks, B. C. (2001).** Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure. *Eur J Biochem*, **268**, 3361-3367.
- Sargent, F., Berks, B. C. & Palmer, T. (2006).** Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins. *FEMS Microbiol Lett*, **254**, 198-207.
- Sargent, F. (2007).** Constructing the wonders of the bacterial world: biosynthesis of complex enzymes. *Microbiology*, **153**, 633-651.
- Sarvas, M., Harwood, C. R., Bron, S. & van Dijl, J. M. (2004).** Post-translocational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 311-327.
- Schaerlaekens, K., Schierova, M., Lammertyn, E., Geukens, N., Anne, J. & Van Mellaert, L. (2001).** Twin-arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol*, **183**, 6727-6732.
- Schafer, A., Kalinowski, J. & Puhler, A. (1994).** Increased fertility of *Corynebacterium glutamicum* recipients in intergeneric matings with *Escherichia coli* after stress exposure. *Appl Environ Microbiol*, **60**, 756-759.
- Schallmey, M., Singh, A. & Ward, O. P. (2004).** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol*, **50**, 1-17.
- Schleifer, K. H. & Fischer, U. (1982).** Description of a new species of the genus *Staphylococcus carnosus*. *Int J Syst Bacteriol* **32** 153 -156.
- Schmid, R. D. (2002).** *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnologie*. Weinheim: Wiley-VCH
- Schmidt-Dannert, C., Rua, M. L., Atomi, H. & Schmid, R. D. (1996).** Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochim Biophys Acta*, **1301**, 105-114.
- Scholz, C., Eckert, B., Hagn, F., Schaarschmidt, P., Balbach, J. & Schmid, F. X. (2006).** SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities. *Biochemistry*, **45**, 20-33.
- Settles, A. M., Yonetani, A., Baron, A., Bush, D. R., Cline, K. & Martienssen, R. (1997).** Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science*, **278**, 1467-1470.
- Shapova, Y. A. & Paetzel, M. (2007).** Crystallographic analysis of *Bacillus subtilis* CsaA. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **63**, 478-485.
- Sianidis, G., Pozidis, C., Becker, F., Vrancken, K., Sjoeholm, C., Karamanou, S., Takamiya-Wik, M., van Mellaert, L., Schaefer, T., Anne, J. & Economou, A. (2006).** Functional large-scale production of a novel *Jonesia* sp. xyloglucanase by heterologous secretion from *Streptomyces lividans*. *J Biotechnol*, **121**, 498-507.
- Singer, S. J. & Nicolson, G. L. (1972).** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.
- Singh, S. M. & Panda, A. K. (2005).** Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng*, **99**, 303-310.

- Smith, M. A., Clemons, W. M., Jr., DeMars, C. J. & Flower, A. M. (2005).** Modeling the effects of prl mutations on the Escherichia coli SecY complex. *J Bacteriol*, **187**, 6454-6465.
- Stanley, N. R., Palmer, T. & Berks, B. C. (2000).** The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in Escherichia coli. *J Biol Chem*, **275**, 11591-11596.
- Straathof, A. J., Panke, S. & Schmid, A. (2002).** The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol*, **13**, 548-556.
- Strauch, E. M. & Georgiou, G. (2007).** A bacterial two-hybrid system based on the twin-arginine transporter pathway of E. coli. *Protein Sci*, **16**, 1001-1008.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**, 113-130.
- Sturmfels, A., Gotz, F. & Peschel, A. (2001).** Secretion of human growth hormone by the food-grade bacterium Staphylococcus carnosus requires a propeptide irrespective of the signal peptide used. *Arch Microbiol*, **175**, 295-300.
- Sugihara, A., Ueshima, M., Shimada, Y., Tsunasawa, S. & Tominaga, Y. (1992).** Purification and characterization of a novel thermostable lipase from Pseudomonas cepacia. *J Biochem (Tokyo)*, **112**, 598-603.
- Tauch, A., Kirchner, O., Löffler, B., Gotker, S., Puhler, A. & Kalinowski, J. (2002).** Efficient electrotransformation of corynebacterium diphtheriae with a mini-replicon derived from the Corynebacterium glutamicum plasmid pGA1. *Curr Microbiol*, **45**, 362-367.
- Thiemann, V., Saake, B., Vollstedt, A., Schafer, T., Puls, J., Bertoldo, C., Freudl, R. & Antranikian, G. (2006).** Heterologous expression and characterization of a novel branching enzyme from the thermoalkaliphilic anaerobic bacterium Anaerobranca gottschalkii. *Appl Microbiol Biotechnol*, **72**, 60-71.
- Thomas, J. D., Daniel, R. A., Errington, J. & Robinson, C. (2001).** Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in Escherichia coli. *Mol Microbiol*, **39**, 47-53.
- Thum, O. O., M. (2006).** Biocatalysis: A sustainable process for production of cosmetic ingredients. In: *IFSCC Congress 2006*, pp. 1-7. Osaka, Japan.
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S. & van Dijl, J. M. (2000).** Signal peptide-dependent protein transport in Bacillus subtilis: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 515-547.
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J. D., Braun, P. G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J. Y., Westers, H., Zanen, G., Quax, W. J., Kuipers, O. P., Bron, S., Hecker, M. & van Dijl, J. M. (2004).** Proteomics of protein secretion by Bacillus subtilis: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**, 207-233.
- Tranier, S., Mortier-Barriere, I., Ilbert, M., Birck, C., Iobbi-Nivol, C., Mejean, V. & Samama, J. P. (2002).** Characterization and multiple molecular forms of TorD from Shewanella massilia, the putative chaperone of the molybdoenzyme TorA. *Protein Sci*, **11**, 2148-2157.
- Tranier, S., Iobbi-Nivol, C., Birck, C., Ilbert, M., Mortier-Barriere, I., Mejean, V. & Samama, J. P. (2003).** A novel protein fold and extreme domain swapping in the dimeric TorD chaperone from Shewanella massilia. *Structure*, **11**, 165-174.
- Tullman-Ercek, D., Delisa, M. P., Kawarasaki, Y., Iranpour, P., Ribnicky, B., Palmer, T. & Georgiou, G. (2007).** Export pathway selectivity of Escherichia coli twin-arginine translocation signal peptides. *J Biol Chem*.
- Turner, R. J., Papish, A. L. & Sargent, F. (2004).** Sequence analysis of bacterial redox enzyme maturation proteins (REMPs). *Can J Microbiol*, **50**, 225-238.
- Tyndall, J. D., Sinchaikul, S., Fothergill-Gilmore, L. A., Taylor, P. & Walkinshaw, M. D. (2002).** Crystal structure of a thermostable lipase from Bacillus stearothermophilus P1. *J Mol Biol*, **323**, 859-869.
- Ullers, R. S., Ang, D., Schwager, F., Georgopoulos, C. & Genevoux, P. (2007).** Trigger Factor can antagonize both SecB and DnaK/DnaJ chaperone functions in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 3101-3106.

- Utaiida, S., Dunman, P. M., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S. J., Singh, V. K., Jayaswal, R. K. & Wilkinson, B. J. (2003). Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon. *Microbiology*, **149**, 2719-2732.
- Van den Berg, B., Clemons, W. M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C. & Rapoport, T. A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, **427**, 36-44.
- van der Wolk, J. P., Fekkes, P., Boorsma, A., Huie, J. L., Silhavy, T. J. & Driessen, A. J. (1998). PrlA4 prevents the rejection of signal sequence defective preproteins by stabilizing the SecA-SecY interaction during the initiation of translocation. *Embo J*, **17**, 3631-3639.
- van Gemeren, I. A., Beijersbergen, A., Musters, W., Gouka, R. J., van den Hondel, C. A. & Verrips, C. T. (1996). The effect of pre- and pro-sequences and multicopy integration on heterologous expression of the *Fusarium solani* pisi cutinase gene in *Aspergillus awamori*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **45**, 755-763.
- van Kampen, M. D., Dekker, N., Egmond, M. R. & Verheij, H. M. (1998). Substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase and *Staphylococcus aureus* lipase as studied by in vivo chimeragenesis. *Biochemistry*, **37**, 3459-3466.
- Van Mellart, L., Anne, J. & Pandalai, S. G. (1999). Protein secretion in Gram-positive bacteria with high GC-content. In: *Recent research developments in microbiology* (pp. 425- 440).
- van Roosmalen, M. L., Geukens, N., Jongbloed, J. D., Tjalsma, H., Dubois, J. Y., Bron, S., van Dijk, J. M. & Anne, J. (2004). Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 279-297.
- Veenendaal, A. K., van der Does, C. & Driessen, A. J. (2004). The protein-conducting channel SecYEG. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 81-95.
- Veit, T. (2005). Some like it hot - Extremophile organisms as pathfinders to sustainable chemistry *Degussa Science Newsletter*, **05**, 16-19.
- Ventura, S. & Villaverde, A. (2006). Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol*, **24**, 179-185.
- Vitikainen, M., Lappalainen, I., Seppala, R., Antelmann, H., Boer, H., Taira, S., Savilahti, H., Hecker, M., Vihinen, M., Sarvas, M. & Kontinen, V. P. (2004). Structure-function analysis of PrsA reveals roles for the parvulin-like and flanking N- and C-terminal domains in protein folding and secretion in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, **279**, 19302-19314.
- Vitikainen, M., Hyyrylainen, H. L., Kivimaki, A., Kontinen, V. P. & Sarvas, M. (2005). Secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis* can be improved by engineering cell components affecting post-translocational protein folding and degradation. *J Appl Microbiol*, **99**, 363-375.
- Vollstedt, A. (2004). Sekretorische Gewinnung von Enzymen aus dem thermoalkaliphilen Bakterium *Anaerobranca gottschalkii* im mesophilen Wirt *Staphylococcus carnosus*, Heinrich-Heine-Universität
- von Heijne, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol*, **184**, 99-105.
- Vorderwulbecke, S., Kramer, G., Merz, F., Kurz, T. A., Rauch, T., Zachmann-Brand, B., Bukau, B. & Deuerling, E. (2005). Low temperature of GroEL/ES overproduction permits growth of *Escherichia coli* cells lacking trigger factor DnaK. *FEBS Lett*, **579**, 181-187.
- Vrancken, K., De Keersmaecker, S., Geukens, N., Lammertyn, E., Anne, J. & Van Mellaert, L. (2007). *pspA* overexpression in *Streptomyces lividans* improves both Sec- and Tat-dependent protein secretion. *Appl Microbiol Biotechnol*, **73**, 1150-1157.
- Vrontou, E. & Economou, A. (2004). Structure and function of SecA, the preprotein translocase nanomotor. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 67-80.
- Weiss, B. & Richardson, C. C. (1967). Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid, I. Repair of single-strand breaks in DNA by an enzyme system from *Escherichia coli* infected with T4 bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **57**, 1021-1028.
- Wendisch, V. & (1997). Ph.D. thesis, Heinrich-Heine-Universität, .
- Wendisch, V. F. (2007). *Amino Acid Biosynthesis - Pathways, Regulation and Metabolic Engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Wernerus, H. & Stahl, S. (2004). Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. *Biotechnol Appl Biochem*, **40**, 209-228.

- Westers, L., Westers, H. & Quax, W. J. (2004).** Bacillus subtilis as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 299-310.
- Wexler, M., Sargent, F., Jack, R. L., Stanley, N. R., Bogsch, E. G., Robinson, C., Berks, B. C. & Palmer, T. (2000).** TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export. *J Biol Chem*, **275**, 16717-16722.
- Widner, W. (2006).** Bacillus expression host 2006. In: *Novozymes Inc.* Davis, CA.
- Wieland, K. P., Wieland, B. & Gotz, F. (1995).** A promoter-screening plasmid and xylose-inducible, glucose-repressible expression vectors for Staphylococcus carnosus. *Gene*, **158**, 91-96.
- Winkler, U. K. & Stuckmann, M. (1979).** Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by Serratia marcescens. *J Bacteriol*, **138**, 663-670.
- Xiong, Y., Santini, C. L., Kan, B., Xu, J., Filloux, A. & Wu, L. F. (2007).** Expression level of heterologous tat genes is crucial for in vivo reconstitution of a functional Tat translocase in Escherichia coli. *Biochimie*, **89**, 676-685.
- Yahr, T. L. & Wickner, W. T. (2001).** Functional reconstitution of bacterial Tat translocation in vitro. *Embo J*, **20**, 2472-2479.
- Yamada, K., Sanzen, I., Ohkura, T., Okamoto, A., Torii, K., Hasegawa, T. & Ohta, M. (2007).** Analysis of twin-arginine translocation pathway homologue in Staphylococcus aureus. *Curr Microbiol*, **55**, 14-19.
- Yamane, K., Bunai, K. & Kakeshita, H. (2004).** Protein traffic for secretion and related machinery of Bacillus subtilis. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**, 2007-2023.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-119.
- Ying, B. W., Taguchi, H., Kondo, M. & Ueda, T. (2005).** Co-translational involvement of the chaperonin GroEL in the folding of newly translated polypeptides. *J Biol Chem*, **280**, 12035-12040.
- Zanen, G., Houben, E. N., Meima, R., Tjalsma, H., Jongbloed, J. D., Westers, H., Oudega, B., Luirink, J., van Dijk, J. M. & Quax, W. J. (2005).** Signal peptide hydrophobicity is critical for early stages in protein export by Bacillus subtilis. *Febs J*, **272**, 4617-4630.

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

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R.. Freudl für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung, die stete Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen Ratschläge während des Fortganges dieser Arbeit.

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

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

Frau Dr. Maryna Royter von der Universität Hamburg-Harburg danke ich für die Zusammenarbeit und die Beratung zum Thema „thermostabile Lipasen“ im Rahmen des von der Deutschen Bundestiftung Umwelt (DBU) geförderten Projektes. Zudem möchte ich Herrn Dr. Samson Markosyan danken für die Hinweise zur Arbeit mit der Lipase GTL.

Herrn Dr. Ulf Brockmeier vom Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf danke ich für die fachliche Einweisung beim Hochdurchsatz-Screening. Auch Herrn Holger Gieren danke ich für seine Ratschläge bei der Bedienung des Tecan-Pipettierroboters.

Bei den gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Astrid Bida, Michael Caspers, Gabi Decker, Peter Kreutzenbeck, Carsten Kröger, Frank Lausberg, Daniel Meißner, Anna Rumpf, Anna-Lena Weiss, Sandra Scheele und Dr. Karl-Ludwig Schimz möchte ich mich für das sehr gute Arbeitsklima und für viele anregende Diskussionen bedanken. Dabei bedanke ich mich ganz besonders bei Astrid Bida, meiner Arbeitskollegin im Labor 219, da sie mir immer mit vielen nützlichen Ratschlägen bei den alltäglichen Arbeiten im Labor zur Seite gestanden hat und ich mit ihr sehr gerne zusammen gearbeitet habe.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie I danken für ihre Hilfsbereitschaft und für die gute Arbeitsatmosphäre im gesamten Haus.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine Eltern und an meine Freunde. Ihr Rückhalt während des gesamten Studiums und besonders während der Doktorarbeit bedeutet mir sehr viel.

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

Jülich, im September 2007