

**Optimierung heterologer Proteinsekretion
in *Bacillus* unter Verwendung
wirtsfremder und künstlicher Signalpeptide**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Christian Degering

aus
Erkrath

Düsseldorf, Mai 2010

Aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger
Korreferent: Prof. Dr. Roland Freudl

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2010

*Für meine Eltern
und Sara*

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion:

Christian Degering, Thorsten Eggert, Michael Puls, Johannes Bongaerts, Stefan Evers, Karl-Heinz Maurer, Karl-Erich Jaeger (2010). Optimization of protease secretion in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by screening of homologous and heterologous signal peptides. *Appl. Envir. Microbiol.* **76**: 6370-6376

Degering et al. (2010). Patentanmeldung in Vorbereitung (Henkel AG & Co. KGaA).

Weitere Veröffentlichungen:

Caspers, M., U. Brockmeier, C. Degering, T. Eggert & R. Freudl (2010). Improvement of Sec-dependent secretion of a heterologous model protein in *Bacillus subtilis* by saturation mutagenesis of the N-domain of the AmyE signal peptide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**: 1877-1885.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	V
Abkürzungen.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Mechanismen für die Proteinsekretion in <i>Bacillus</i>	1
1.2 Der generelle Sekretionsweg für ungefaltete Proteine (Sec-Weg) in <i>Bacillus subtilis</i>	3
1.2.1 Erkennungssequenz für die Sekretion: Das N-terminale Signalpeptid.....	4
1.2.2 Signalpeptiderkennung und Transport zum Translokon.....	6
1.2.3 Die Translokation über die Sec-Pore.....	7
1.2.4 Freisetzung und Faltung des Substratproteins.....	9
1.3 <i>Bacillus</i> als Wirt für die extrazelluläre Proteinproduktion.....	11
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Chemikalien und Enzyme.....	15
2.2 Bakterienstämme und Plasmide.....	15
2.3 Oligonukleotide.....	17
2.4 Anzucht und Lagerung von Bakterien.....	18
2.4.1 Nähr- und Indikatormedien.....	18
2.4.2 Medien für die Transformation von <i>Bacillus subtilis</i> über die natürliche Kompetenz.....	19
2.4.3 Medien für die Protoplastentransformation von <i>Bacillus subtilis</i>	19
2.4.4 FB-Medium für die Hochzell-dichte-Fermentation von <i>Bacillus subtilis</i>	20
2.4.5 Kultivierung und Lagerung von Bakterien.....	20
2.5 Hochzell-dichtefermentation von <i>Bacillus subtilis</i> im Fed-Batch Verfahren.	21
2.6 Isolierung von Nukleinsäuren.....	22
2.7 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	23
2.8 <i>In vitro</i> Rekombination von DNA.....	23
2.9 Methylierung von Plasmid-DNA.....	23
2.10 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA.....	24
2.10.1 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	24

2.10.2	Transformation von <i>Bacillus subtilis</i> über die natürliche Kompetenz.....	24
2.10.3	Protoplastentransformation von <i>Bacillus subtilis</i>	24
2.10.4	Transformation von <i>Bacillus licheniformis</i> mittels Elektroporation.....	25
2.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	25
2.11.1	Standard-PCR.....	25
2.11.2	Overlap Extension-PCR.....	26
2.12	Sequenzierung von DNA.....	26
2.13	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	26
2.14	Präzipitation von Proteinen.....	26
2.15	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.16	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	27
2.17	Spektralphotometrische Methode zu Bestimmung der proteolytischen Enzymaktivität.....	28
2.18	Hochdurchsatz-Screening von Signalpeptid-Bibliotheken.....	29
2.19	Computerprogramme und Datenbanken.....	30
3.	Ergebnisse.....	31
3.1	Homologie-Untersuchungen der für die Sec-Sekretion relevanten Komponenten von <i>Bacillus subtilis</i> und <i>Bacillus licheniformis</i>	32
3.1.1	Hohe Homologie der cytoplasmatischen Sec-Komponenten.....	32
3.1.2	Nicht alle Komponenten des Sec-Apparates weisen hohe Homologien auf..	33
3.1.3	Sequenzunterschiede der homolog vorkommenden Signalpeptide.....	34
3.1.4	Die Verteilung der Aminosäuren an den „+1“-Positionen der sekretierten Proteine ist in beiden Organismen sehr ähnlich.....	36
3.2	Optimierung der heterologen Proteinsekretion in <i>Bacillus licheniformis</i>	37
3.2.1	Klonierung der Proteasen A und L in den <i>Bacillus</i> -Vektor pBSM _{ul5}	38
3.2.2	Optimierung des Exports von zwei Proteasen in einem <i>Bacillus licheniformis</i> Hochleistungs-Sekretionsstamm.....	40
3.2.3	Untersuchungen zum Einfluss des N-Terminus der Substratproteine auf die Sekretionseffizienz mit verschiedenen Signalpeptiden.....	42
3.2.4	Konstruktion der Signalpeptid-Bank mit 220 <i>Bacillus licheniformis</i> DSM13 Signalpeptiden.....	44
3.3	Wirtsfremde Signalpeptide zur Optimierung der heterologen Proteinsekretion von <i>Bacillus</i>	46
3.3.1	Klonierung von Subtilisin BPN ⁶ und dem Benchmark-Signalpeptid.....	46

3.3.2	Die Kupplung zwischen Signalpeptid und Propeptid hat einen hohen Einfluss auf den Proteaseexport.....	47
3.3.3	Signalpeptid-Screening im Wirt <i>Bacillus subtilis</i> mit wirtseigenen und wirtsfremden Signalpeptiden.....	49
3.3.3.1	Die besten Exportleistungen wurden unter anderem mit wirtsfremden Signalpeptiden erreicht.....	49
3.3.3.2	Vorhersage über die Effizienz der Signalpeptide nicht möglich.....	54
3.3.4	Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem MTP-Screening auf Produktionssysteme im größeren Maßstab.....	58
3.3.4.1	Die in Mikrotiterplatten-Anzuchten ermittelten Sekretionseffizienzen konnten in Kolbenanzuchten bestätigt werden.....	58
3.3.4.2	Das identifizierte Signalpeptid führte zu einer deutlich gesteigerten Sekretionsleistung in Hochzelldichte-Fermentationen.....	59
3.3.5	Untersuchung der Effizienz wirtseigener und wirtsfremder Signalpeptide in verschiedenen industriell relevanten <i>Bacilli</i>	63
3.4	Neue Methode zur Optimierung der Sekretion durch Verwendung künstlicher Signalpeptide.....	68
3.4.1	Optimierung des Exports von Protease B in <i>Bacillus licheniformis</i>	68
3.4.2	Konstruktion künstlicher Signalpeptide durch Austausch der funktionellen Domänen.....	69
4.	Diskussion.....	75
4.1	Die an der Sekretion beteiligten Komponenten von <i>Bacillus subtilis</i> und <i>Bacillus licheniformis</i> weisen sehr unterschiedliche Homologien auf...	75
4.2	Optimierung der extrazellulären Proteaseproduktion im Wirt <i>Bacillus licheniformis</i> unter Verwendung einer Signalpeptid-Bank aus <i>Bacillus subtilis</i>	78
4.3	Direkter Vergleich der Export-Effizienzen von wirtseigenen und wirtsfremden Signalpeptiden.....	84
4.4	Neue Methode zur Weiterentwicklung der im Screening identifizierten Signalpeptide durch Konstruktion künstlicher Varianten.....	93
5.	Zusammenfassung.....	97
6.	Summary.....	99
7.	Literatur.....	101
8.	Anhang.....	113

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abb. 1	Schematische Übersicht über die Domänenstruktur eines typischen Sec-Signalpeptids	4
Abb. 2	Modell des Ablaufs der Insertion von Signalpeptiden in die Cytoplasmamembran	5
Abb. 3	Modell des katalytischen Zyklus des SecA-Proteins an der Sec-Pore	8
Abb. 4	Schematische Darstellung des Ablaufs der Proteinsekretion über den Sec-Apparat in <i>B. subtilis</i>	10
Abb. 5	Alignment der Aminosäuresequenz des Ffh-Proteins aus <i>B. subtilis</i> (Bs) und <i>B. licheniformis</i> (Bl)	32
Abb. 6	Alignment der Aminosäuresequenzen verschiedener SP aus <i>B. subtilis</i> (Bs) und <i>B. licheniformis</i> (Bl)	35
Abb. 7	Prozentuale Häufigkeit der Aminosäuren an den „+1“-Positionen der sekretierten Proteine in <i>B. subtilis</i> 168 und <i>B. licheniformis</i> DSM13	36
Abb. 8	Schema der Klonierungsstrategie für das Signalpeptidscreening im <i>Bacillus</i> -Vektor pBSM _{ul5}	39
Abb. 9	Proteolytische Aktivität im Kulturüberstand von <i>B. licheniformis</i> H402 der im SP-Screening identifizierten Konstrukte mit den besten Sekretionsleistungen für die Sekretion von Protease A und L	41
Abb. 10	Darstellung der Sekretionsleistung von zehn verschiedenen Signalpeptiden mit Protease A und Protease L in <i>B. licheniformis</i> H402 zur Untersuchung des Einflusses vom N-Terminus des sekretierten Proteins	43
Abb. 11	Konstruktion der Signalpeptid-Bank mit 220 <i>B. licheniformis</i> DSM13 Signalpeptiden	45
Abb. 12	Einfluss der im Hochdurchsatz-Screening verwendeten Kupplung auf den Protease-Export von Subtilisin BPN [‘]	48
Abb. 13	Beispielhafte Darstellung der proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand von <i>B. subtilis</i> aller Klone von einer typischen MTP aus dem Signalpeptid-Screening	50
Abb. 14	Ermittlung der acht Konstrukte mit den höchsten Sekretionsleistungen aus dem Hochdurchsatz-Screening mit Subtilisin BPN [‘] im Wirt <i>B. subtilis</i> TEB1030 und allen SP aus <i>B. subtilis</i> und <i>B. licheniformis</i>	51
Abb. 15	Korrelation von Proteaseaktivität und Proteinmenge im Kulturüberstand von <i>B. subtilis</i> TEB1030	52
Abb. 16	Immunologischer Nachweis von intrazellulärem BPN [‘] mittels Western-Blot Analyse	53
Abb. 17	Sekundärstrukturvorhersage von drei Signalpeptiden	57

Abb. 18	Proteolytische Aktivität im Kulturüberstand der Stämme aus einer Kolbenanzucht mit ausgewählten Konstrukten aus dem Hochdurchsatz-Screening	59
Abb. 19	Hochzelldichtefermentation von <i>B. subtilis</i> TEB1030 im Fed-Batch Verfahren (Prozess B) für die Produktion von Subtilisin BPN‘	61
Abb. 20	SDS-PAGE der sekretorischen Expression von Subtilisin BPN‘ in <i>B. subtilis</i> TEB1030 im Fed-Batch Verfahren / Western-Blot Analyse für den immunologischen Nachweis von Subtilisin BPN‘ im Kulturüberstand der Fermentationen	62
Abb. 21	Schematischer Überblick über das Vorgehen für die Überprüfung der Übertragbarkeit der in <i>B. subtilis</i> ermittelten Sekretionseffizienzen verschiedener Konstrukte auf zwei verschiedene <i>B. licheniformis</i> -Wirte	64
Abb. 22	Korrelation von Proteaseaktivität und Proteinmenge im Kulturüberstand von <i>B. licheniformis</i> H402.	65
Abb. 23	Untersuchung der Sekretionseffizienzen von drei Konstrukten mit unterschiedlichen Signalpeptiden in drei verschiedenen <i>Bacillus</i> -Wirten	66
Abb. 24	Vergleich der Sekretionseffizienzen verschiedener Konstrukte in drei verschiedenen <i>Bacillus</i> -Wirten	67
Abb. 25	Optimierung von Signalpeptiden durch die Konstruktion von Varianten mit den funktionellen Domänen aus unterschiedlichen Signalpeptiden	70
Abb. 26	Exporteffizienz aller durch Austausch der funktionellen Domänen künstlich konstruierter Signalpeptide in <i>B. licheniformis</i> H402 mit Protease B	71
Abb. 27	Schematische Übersicht über einige der künstlich konstruierten SP mit jeweils unterschiedlichen Domänen der nativen Ausgangssignalpeptide	72
Abb. 28	Überprüfung der Anwendbarkeit von in dieser Arbeit identifizierten Signalpeptiden mit gesteigerten Exportleistungen in einem industriell relevanten Fermentationsprozess	90
Abb. 29	Relevanz der potentiellen Interaktionen zwischen Zielprotein, Signalpeptid und Expressionswirt und deren Einfluss auf die Exporteffizienz	93
Abb. 30	Kontrollsequenz zur Regulation der Fermentationsprozesse	120

Tabellen

Tab. 1	Übersicht über beispielhaft ausgewählte, heterolog in <i>B. subtilis</i> produzierte Proteine	12
Tab. 2	Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme	15
Tab. 3	Übersicht über die verwendeten Plasmide	16
Tab. 4	Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide	17

Tab. 5	Antibiotika-Konzentrationen zur Selektion der verschiedenen Bakterienstämme	21
Tab. 6	Untersuchung der Sequenzidentitäten von cytoplasmatischen Komponenten des Sec-Apparates von <i>B. subtilis</i> und <i>B. licheniformis</i>	31
Tab. 7	Untersuchung der Sequenzidentität von Komponenten des Sec-Apparates von <i>B. subtilis</i> und <i>B. licheniformis</i>	33
Tab. 8	Untersuchung der Sequenzidentität der SP von den homolog in <i>B. subtilis</i> und <i>B. licheniformis</i> vorkommenden sekretorischen Proteinen auf Basis der Aminosäuresequenzen	34
Tab. 9	Übersicht über die Anzahl der Transformanten von <i>B. subtilis</i> und <i>B. licheniformis</i> , die hofbildenden Klone und die in DW-MTP Anzuchten kultivierten Klone aus dem SP-Screening mit Protease A und L	41
Tab. 10	Ursprung und Funktion der Wildtyp-Proteine, von denen die im Hochdurchsatz-Screening identifizierten Signalpeptide abstammen	55
Tab. 11	Eigenschaften und Sequenz der im Hochdurchsatz-Screening identifizierten Signalpeptide	56
Tab. 12	Unterschiede der Feed-Lösung in Prozess A und B	60
Tab. 13	Enzymaktivität pro Volumen im Überstand der Fermentationsbrühe von Prozess A und B	61
Tab. 14	Tabellarischer Vergleich der Genome von <i>B. subtilis</i> 168 und <i>B. licheniformis</i> DSM13	76
Tab. 15	Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Signalpeptide aus <i>B. licheniformis</i> DSM13	113
Tab. 16	Sequenz der Benchmark-Signalpeptide	114
Tab. 17	Liste der Oligos die für die Amplifikation der Signalpeptide aus <i>B. licheniformis</i> DSM13 verwendet wurden	114
Tab. 18	DNA-Sequenz der künstlich konstruierten Signalpeptid-Varianten Nr. 01-24 und Sequenz der synthetisch hergestellten DNA-Fragmente für die Klonierung der Varianten	117
Tab. 19	Liste der für die Konstruktion der Signalpeptid-Varianten verwendeten Oligos	118
Tab. 20	Strategie zur Konstruktion der Signalpeptid-Varianten unter Verwendung verschiedener Kombinationen aus Primerpaaren und template-DNA	119

Abkürzungen

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgeführt. Ausgenommen sind solche, die in der deutschen Sprache üblich sind sowie SI-Einheiten. Aminosäuren wurden in dem gebräuchlichen Ein-Buchstabencode abgekürzt.

A. dest.	Aqua destillata
AAPF	suc-AAPF-para-Nitroanilid (Peptidsubstrat)
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure(n)
BSA	Rinderserumalbumin
CME	Zellulosemischester
C-Terminus	Carboxyterminus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2`-Desoxynukleosid-5`-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
DW-MTP	<i>Deepwell</i> -Mikrotiterplatten
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ffh	<i>fifty-four homologue</i>
GRAS	<i>generally regarded as safe</i>
h	Stunde(n)
HT	<i>high-throughput</i>
HTS	<i>high-throughput screening</i>
Kan	Kanamycin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
LB	Luria-Bertani Broth
M	molar
m	milli
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTP	Mikrotiterplatten
NCBI	<i>National Centre for Biotechnology Information</i>
nm	Nanometer
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>

PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pNA	para-Nitroanilid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	<i>ribosomal</i> RNA
RT	Raumtemperatur
scRNA	<i>small cytoplasmic</i> RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAG	SDS-Polyacrylamid-Gel
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SP	Signalpeptid(e)
SRP	<i>signal recognition particle</i>
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
tRNA	<i>transfer</i> RNA
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U	<i>unit</i> / Enzymeinheit
ÜK	Übernachtkultur
ÜN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar

1. Einleitung

Die Grundvoraussetzung für einen geregelten Stoffwechsel und Energiehaushalt in Zellen ist die Kompartimentierung. Sowohl eukaryotische als auch prokaryotische Zellen sind von mindestens einer Membran umgeben, die aus einer Phospholipid-Doppelschicht besteht. Diese Membranen dienen zum einen als Permeabilitätsbarriere für beispielsweise cytoplasmatische Moleküle. Zum anderen ist es jedoch für die Zelle überlebensnotwendig, dass ein gezielter Stoffaustausch zwischen verschiedenen Kompartimenten stattfinden kann, da die Proteine und damit auch die Funktion der Kompartimente meist völlig unterschiedlich sind. Während eukaryotische Zellen sich in bis zu zehn kompartimentierte Organellen einteilen lassen, finden sich bei prokaryotischen Zellen meist nur drei solcher Kompartimente (bei Gram-positiven Bakterien: Cytoplasma, Cytoplasmamembran und Zellwand). Für das Überleben von Zellen ist es essentiell, dass ein beidseitiger Austausch mit dem extrazellulären Raum stattfinden kann, um Veränderungen der Umweltbedingungen wahrnehmen und darauf reagieren zu können. Für den gezielten Austausch von Stoffwechselprodukten und anderen Molekülen verfügen die Organismen daher über verschiedene Transportsysteme, die z.B. aus membranständigen Multiprotein-Komplexen gebildet werden. Bei Bakterien werden alle Proteine im Cytoplasma synthetisiert und müssen daher für den als Sekretion bezeichneten Transport vom Cytoplasma zu dem Bestimmungsort in einem der anderen Kompartimente markiert werden, um von der jeweiligen Transportmaschinerie erkannt zu werden. Zu diesem Zweck werden Proteine, die für die Sekretion bestimmt sind, als Vorläuferproteine mit einem N-terminalen Signalpeptid (SP) synthetisiert, das von der Export-Maschinerie erkannt wird (von Heijne, 1990).

Im Folgenden sollen die verschiedenen Mechanismen für die Proteinsekretion in *Bacilli* am Beispiel des Modellorganismus *B. subtilis* vorgestellt werden. Bei *B. subtilis* handelt es sich um ein Gram-positives, ubiquitär vorkommendes Bakterium, das genetisch gut zugänglich ist und dessen Genom vollständig entschlüsselt wurde (Kunst *et al.*, 1997; Barbe *et al.*, 2009).

1.1 Mechanismen für die Proteinsekretion in *Bacillus*

Gram-negative Bakterien verfügen über eine innere und eine äußere Zellmembran und lassen sich daher in vier verschiedene Kompartimente unterteilen (Cytoplasma, innere Membran, Periplasma und äußere Membran). Vertreter der Gram-positiven Bakterien, zu denen auch *B. subtilis* gehört, sind noch einfacher strukturiert und besitzen statt einer äußeren Membran eine für die meisten Moleküle durchlässige Zellwand und somit keinen periplasmatischen Raum. Dennoch existieren auch in *B. subtilis* zahlreiche verschiedene Mechanismen, um einen Proteintransport zwischen diesen drei Kompartimenten zu gewährleisten. Ein Großteil der sekretierten Proteine wird über die Sec-abhängige Sekretion transportiert, die in 1.2

detailliert dargestellt wird. Neben dem Sec-Weg sind noch mindestens drei weitere, Sec-abhängige Proteinexportwege in *B. subtilis* bekannt, über die eine kleine Anzahl von spezifischen Proteinen sekretiert wird. Einer der Sec-unabhängigen Proteinexportwege besteht aus einem ABC-Transportsystem (ATP-Binding Cassette), das für die Sekretion der von einigen *Bacillus*-Arten produzierten Peptid-Antibiotika verantwortlich ist (Nakano & Zuber, 1990). Ein Beispiel für ein ribosomal produziertes Lantibiotikum, das mit einem Signalpeptid für ein ABC-Transportsystem synthetisiert wird, ist „Sublancin 168“ von *B. subtilis* 168, das im *sunT-sunS* Operon kodiert ist und über ABC-Transporter sekretiert wird (Paik *et al.*, 1998). Die für die Ausbildung der natürlichen Kompetenz von *B. subtilis* benötigten Com-Proteine, die Ähnlichkeiten zu den Typ IV-Pili-Proteinen aus Gram-negativen Bakterien aufweisen (Chung *et al.*, 1998), werden hingegen über das sog. Com-System sekretiert, von speziellen Signalpeptidasen prozessiert und in der Membran verankert (Dubnau, 1997).

In vielen Gram-negativen Bakterien wurde neben den Mechanismen für die Sekretion von ungefalteten Proteinen auch ein Transportsystem identifiziert, welches Proteine in ihrer nativen Konformation transportiert. Aufgrund der spezifischen Merkmale der N-terminalen Signalpeptide wurde dieses System als Tat-System (Twin Arginin Translocation) bezeichnet. Über den Tat-Weg werden über einen Protonengradienten als Energiequelle vor allem Proteine transportiert, die einen Cofaktor benötigen, der bereits während der Translation integriert wird (Jongbloed *et al.*, 2002). Die in *B. subtilis* identifizierten Komponenten, die aufgrund von Homologie-Untersuchungen dem Tat-Weg zugeordnet werden, weisen jedoch im Vergleich zu dem in *E. coli* bekannten Tat-Weg einige Unterschiede auf. Der Tat-Weg, der auch als Δ pH-Weg bezeichnet wird, wurde zuerst in den Thylakoidmembranen von Chloroplasten entdeckt (Settles *et al.*, 1997). Die meisten Untersuchungen zum Tat-Weg wurden jedoch inzwischen in *E. coli* durchgeführt. Daher soll im Folgenden kurz auf die Unterschiede zwischen *E. coli* und *B. subtilis* in diesem Bereich eingegangen werden. Vier Gene von *E. coli* werden dem Tat-Weg zugeordnet. Dabei handelt es sich zum einen um die Operon-Struktur aus den drei Genen *tatA*, *tatB* und *tatC*, sowie um das monocystronisch vorliegende *tatE* (Bogsch *et al.*, 1998; Dalbey & Robinson, 1999). Zwar wurde im *tatABC*-Operon ein weiterer Leserahmen identifiziert, der für das als TatD bezeichnete Protein kodiert, allerdings konnte anfangs kein direkter funktioneller Zusammenhang zwischen TatD und der Tat-Translokase identifiziert werden (Wexler *et al.*, 2000). Inzwischen wurde jedoch postuliert, dass TatD eine Funktion in einem Kontrollsystem ausübt, das mit dem Tat-System verknüpft ist (Matos *et al.*, 2009). Die TatABCE-Proteine scheinen hingegen alle membranständig zu sein und als Translokase in der Cytoplasmamembran zu fungieren. Im Gegensatz zu den meisten anderen Organismen, in denen ein Tat-System identifiziert wurde, verfügt *B. subtilis* Homologie-Untersuchungen zu Folge über mehrere TatA- und TatC-Homologe, die als TatA_c, TatA_d und TatA_y sowie außerdem als TatC_d und TatC_y bezeichnet werden (Kunst *et al.*, 1997). Das Homologon zu dem in *E. coli* identifizierten TatB scheint in *B. subtilis* jedoch zu fehlen (Pop *et al.*, 2002). Die Signalpeptide von Tat-sekretierten

Proteinen sind im Durchschnitt 14 Aminosäuren länger als Sec-Signalpeptide und verfügen außerdem über die charakteristische Twin-Arginin-Konsensus Sequenz R-R-X-Z-Z (R=Arginin; X=beliebige AS; Z=hydrophobe AS) in der N-Domäne (Tjalsma *et al.*, 2000). Die Prozessierung der Signalpeptide erfolgt, wie auch bei den Sec-Signalpeptiden, über Typ I-Signalpeptidasen. Für *B. subtilis* wurden 69 Signalpeptide identifiziert, die potentiell vom Tat-System erkannt werden. Allerdings konnte bisher nur für zwei dieser Proteine mit potentiellen Tat-SP tatsächlich nachgewiesen werden, dass die Translokation über das Tat-System erfolgt. Dabei handelt es sich um das Protein PhoD (Jongbloed *et al.*, 2002) und um YwbN (Jongbloed *et al.*, 2004). Einiges deutet jedoch darauf hin, dass nicht allein das SP für die Tat-Spezifität des sekretierten Proteins verantwortlich sein kann. So wurde das SP von YwbN vor verschiedene Proteine kloniert und die Sekretion dieser Proteine in *B. subtilis* untersucht. Dabei haben Kolkman *et al.* (2008) festgestellt, dass einige Proteine Tat-abhängig, andere aber auch Tat-unabhängig sekretiert werden. Für LipA und zwei weitere Proteine aus *B. subtilis* wurde trotz des potentiell Tat-abhängigen SP eine strikt Sec-abhängige Sekretion nachgewiesen (Jongbloed *et al.*, 2002). Allerdings konnte inzwischen gezeigt werden, dass wenn LipA stark überexprimiert wird, die Sekretion dann vor allem über das Tat-System erfolgt (Kouwen *et al.*, 2009).

1.2 Der generelle Sekretionsweg für ungefaltete Proteine (Sec-Weg) in *Bacillus subtilis*

Die meisten der für den Export bestimmten Proteine werden in Bakterien in ungefalteter Form über den Sec-Weg sekretiert. Der Mechanismus der Sec-Sekretion wurde bisher am besten im Gram-negativen Organismus *E. coli* untersucht (Driessen, 1994; den Blaauwen & Driessen, 1996; Driessen *et al.*, 1998). Die Komponenten des Sec-Systems in *E. coli* bestehen aus verschiedenen, membranständigen und membrandurchspannenden Proteinen, die die Translokationspore bilden, sowie aus cytoplasmatischen Komponenten, die für die Erkennung und den Transport zur Membran verantwortlich sind. Da in *B. subtilis* für die meisten dieser Komponenten Homologe identifiziert wurden, geht man davon aus, dass der Mechanismus der Sekretion weitgehend hoch konserviert ist (Nakamura *et al.*, 1990; Jeong *et al.*, 1993; Oguro *et al.*, 1995; van Wely *et al.*, 1999; Kakeshita *et al.*, 2000). Allerdings sind auch signifikante Unterschiede zwischen beiden Organismen bekannt, auf die in der folgenden detaillierten Darstellung des Ablaufs der Sekretion über den Sec-Weg eingegangen werden soll.

1.2.1 Erkennungssequenz für die Sekretion: Das N-terminale Signalpeptid

Proteine, deren Bestimmungsort nicht im Cytoplasma liegt, werden als sog. Vorläuferproteine mit einer N-terminalen Erkennungssequenz, dem Signalpeptid (SP) synthetisiert, die von Komponenten der Sekretionsmaschinerie erkannt wird (von Heijne, 1990). In *B. subtilis* wurden für die in 1.1 beschriebenen unterschiedlichen Sekretionsmechanismen auch Signalpeptide mit unterschiedlichen Eigenschaften identifiziert, die von Tjalsma *et al.* (2000) zusammengefasst wurden. Obwohl Signalpeptide generell alle die gleiche Funktion erfüllen und alle von der jeweiligen Translokationsmaschinerie erkannt werden müssen, weisen sie kaum Sequenzhomologien untereinander auf. Stattdessen ist jedoch eine gemeinsame Domänenstruktur und somit eine Strukturhomologie erkennbar (von Heijne, 1990). Die meisten Signalpeptide lassen sich in drei funktionell unterschiedliche Domänen einteilen. Der detaillierte Aufbau eines Signalpeptids ist im Folgenden anhand der häufigsten Erkennungssequenz für den Proteinexport, dem Sec-Signalpeptid dargestellt (Abb. 1). Die positiv geladene N-Domäne eines Signalpeptids interagiert mit den Phospholipiden der Cytoplasmamembran und dem SecA-Protein (Akita *et al.*, 1990), die hydrophobe N-Domäne durchspannt die Phospholipid-Doppelschicht in einer α -helicalen Struktur (Briggs *et al.*, 1986) und die C-Domäne besteht aus der Konsensus-Sequenz A-X-A (X = beliebige AS). Die Prozessierung des Vorläuferproteins erfolgt durch eine Typ I Signalpeptidase, die das Signalpeptid vom reifen Protein abspaltet. Helix-brechende Aminosäuren (z.B. Prolin) am Ende der H-Domäne sind relativ häufig und erleichtern vermutlich das Abspalten der Signalsequenz durch die spezifische Signalpeptidase (Paetzel *et al.*, 1998).

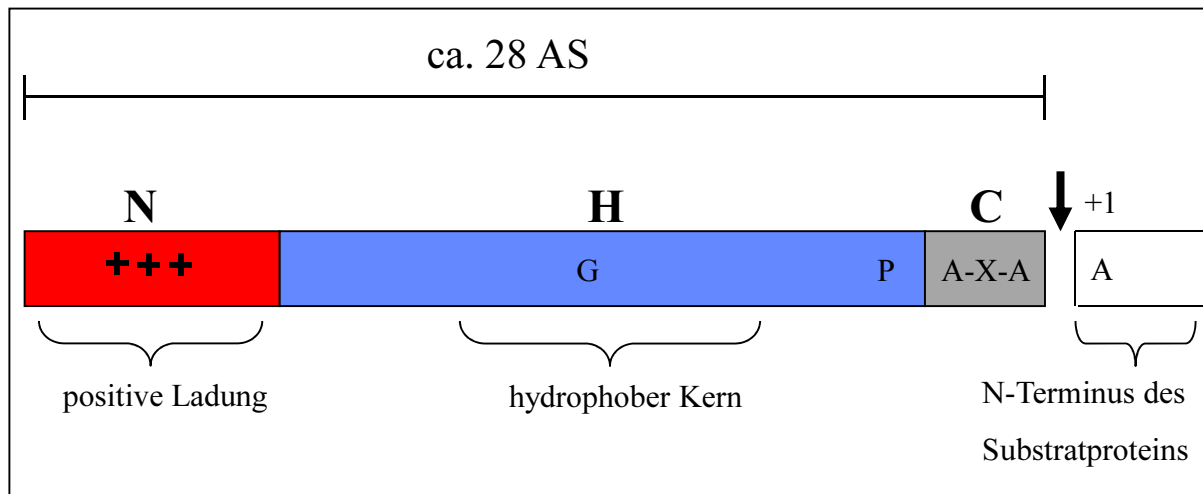


Abb. 1: Schematische Übersicht über die Domänenstruktur eines typischen Sec-Signalpeptids. Ein Signalpeptid besteht aus drei funktionellen Domänen. Der positiv geladene N-Domäne, die mit den Phospholipiden der Cytoplasmamembran interagiert, einer hydrophoben H-Domäne, die in die Membran inseriert und der C-Domäne mit der Erkennungssequenz A-X-A für Typ I Signalpeptidasen (X = beliebige AS). Die Schnittstelle der Signalpeptidasen ist mit einem Pfeil markiert. Die Länge eines *B. subtilis* Sec-SP variiert zwischen 19-44 Aminosäuren und liegt den Vorhersagen zur Folge durchschnittlich bei 28 AS. Die erste Aminosäure am N-Terminus des reifen Proteins wird als „+1“-Position bezeichnet und ist oft ein Alanin.

Ein vereinfachtes Modell ohne die beteiligten Komponenten der Sekretionsmaschinerie für den Ablauf der Insertion von Signalpeptiden in die Cytoplasmamembran ist in Abb. 2 dargestellt.

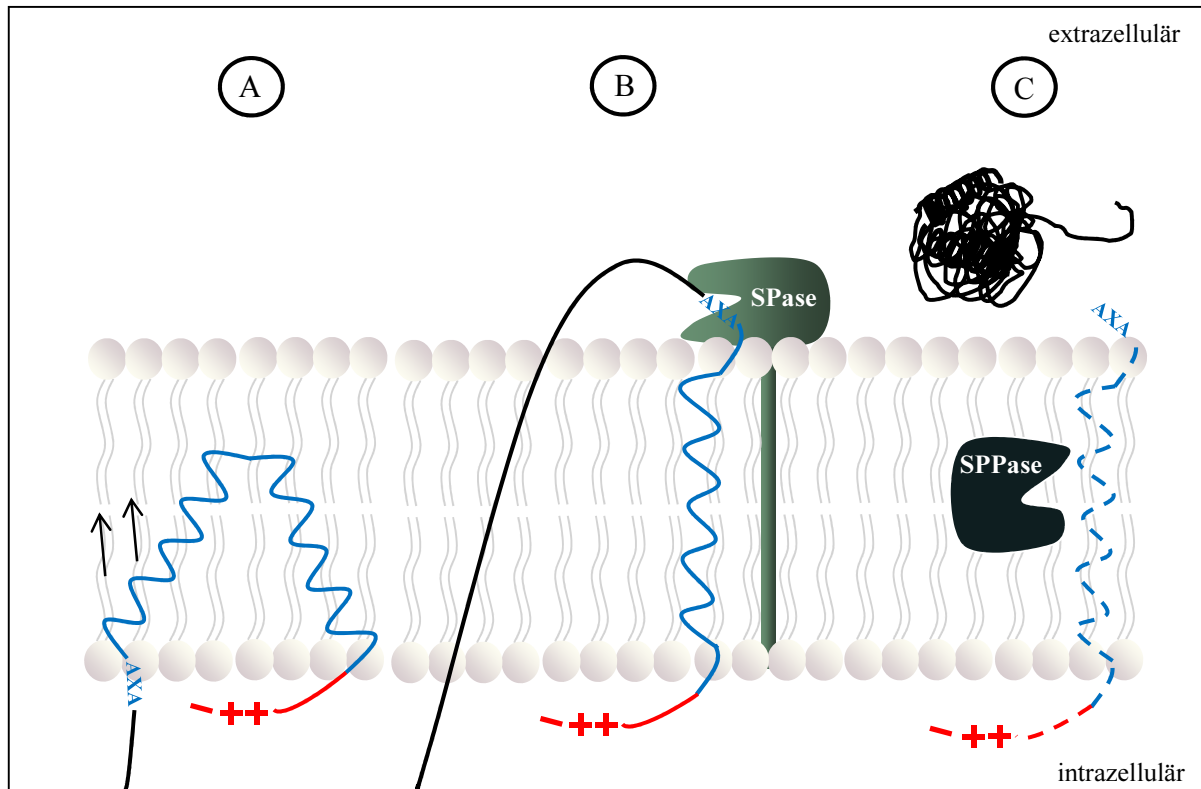


Abb. 2: Modell des Ablaufs der Insertion von Signalpeptiden in die Cytoplasmamembran (modifiziert nach Tjalsma *et al.*, 2000 und van Roosmalen *et al.*, 2004). (A) Die positiv geladene N-Domäne des SP (rot) interagiert mit den negativ geladenen Phospholipiden an der Innenseite der Cytoplasmamembran. Die H-Domäne des SP (blau) inseriert durch Ausbildung von α -helicalen Strukturen in die Phospholipid-Doppelschicht der Cytoplasmamembran. (B) Durch die Insertion des SP wird der erste Teil des Vorläuferproteins (schwarz) mittransloziert und das SP durchspannt die Membran. Während oder kurz nach der Translokation des Substratproteins durch die Komponenten der Translokationsmaschinerie (aus Übersichtsgründen hier nicht dargestellt) wird das SP an der exponierten C-Domäne (Erkennungssequenz „AXA“; X = beliebige AS) durch eine Signalpeptidase (SPase) abgespalten und das Substratprotein freigesetzt. (C) Das in der Cytoplasmamembran verbleibende Signalpeptid wird durch Signalpeptid-Peptidasen (SPPase) degradiert und das Substratprotein erlangt seine native Konformation.

Neben den Sec-Signalpeptiden lassen sich weitere Klassen von SP in *B. subtilis* identifizieren, die von den verschiedenen Transportmechanismen erkannt werden. Die ebenfalls von der Sec-Maschinerie translozierten Lipo-Proteine verfügen beispielsweise über durchschnittlich etwas kürzere SP mit einer sog. „Lipobox“, die als Erkennungssequenz für Typ II Signalpeptidasen dient (L-X-X-C; X = beliebige AS). Nach der Translokation wird das Cystein der „Lipobox“ durch Lipide modifiziert, so dass das Cystein nach der Prozessierung durch Typ II Signalpeptidasen an der Membran fixiert wird und als Membrananker für das Substratprotein dient (Tjalsma *et al.*, 2000).

Einige sekretierte Proteine aus Gram-positiven Bakterien, wie z.B. Proteasen, werden mit

einem weiteren N-terminalen Peptid synthetisiert, das nach der Sekretion abgespalten wird. Dieses zwischen Signalpeptid und reifer Protease lokalisierte und als Propeptid bezeichnete Element dient als intramolekulares Chaperon und unterstützt die Faltung der Protease (Kojima *et al.*, 1998). Das Propeptid wird autokatalytisch nach der Translokation über die Zellmembran abgespalten und dient außerdem als Inhibitor, der dafür sorgt, dass die Protease nicht bereits verfrüht im Cytoplasma aktiviert wird (Shinde *et al.*, 1993; Takagi & Takahashi, 2003).

1.2.2 Signalpeptiderkennung und Transport zum Translokon

Die Signalpeptide der ribosomal synthetisierten Proteine, die für den Export bestimmt sind, werden während der Translation von Komponenten der Translokationsmaschinerie erkannt und gebunden. In *B. subtilis* spielt dabei das sog. SRP (Signal **R**ecognition **P**article), welches das Substratprotein in einer exportkompatiblen, ungefalteten Konformation hält, eine zentrale Rolle (Park *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1989). Das SRP ist ein hochkonservierter Protein-RNA Komplex, der auch in Säugetieren identifiziert wurde. In Säugern besteht das SRP aus sechs verschiedenen Proteinen, die einen Komplex mit einer strukturbildenden RNA bilden (Althoff *et al.*, 1994). Die in Prokaryoten identifizierten SRP-Komplexe bestehen meist aus weniger Komponenten. Das SRP in *B. subtilis* wird aus zwei Proteinen und der scRNA (small cytoplasmic RNA) gebildet. Bei den Proteinen handelt es sich um das Protein HBSu Protein, welches als Dimer vorkommt und das für die Zelle essentielle Ffh-Protein (**F**ifty **f**our **h**omologue), das seinen Namen aufgrund der Homologie zum 54 kDa Protein des SRP von Säugern erhalten hat. Bei der scRNA handelt es sich um das Homologon der in *E. coli* identifizierten 4,5S RNA des SRP (Struck *et al.*, 1988). Das Ffh-Protein verfügt über eine GTPase Aktivität und bildet einen Komplex mit der scRNA *in vivo* (Nakamura *et al.*, 1994). Es lässt sich in verschiedene Domänen unterteilen und scheint eine Konformationsänderung bei der Bindung an das Signalpeptid zu durchlaufen (Ahn *et al.*, 2009). Die ca. 300 AS umfassende G-Domäne mit konservierten GTP-Binderegionen geht eine Interaktion mit dem SRP-Rezeptor Protein FtsY ein (Powers & Walter, 1995; Macao *et al.*, 1997; Farmery *et al.*, 1998). In einer Studie von Bradshaw *et al.* (2009) wurde weiterhin vermutet, dass die Bindung des SRP an das Signalpeptid die Komplexbildung mit FtsY beschleunigt. Die deutlich kürzere, Methionin-reiche M-Domäne ist für die Bindung des Signalpeptids (Takamatsu *et al.*, 1997) und auch für die Bindung an die scRNA verantwortlich (van Wely *et al.*, 2001). Durch die Bindung an das SRP im Cytoplasma wird das Substratprotein in einem ungefalteten Zustand gehalten und mit Hilfe des SRP-Rezeptors FtsY zur Translokationsmaschinerie des Sec-Apparates transportiert (Abb. 4). In *E. coli* existiert neben dem SRP ein weiteres cytoplasmatisches Protein, welches diese Aufgabe übernimmt und als SecB bezeichnet wurde. Allerdings findet dieser Prozess post-translational und nicht wie beim SRP co-translational statt. Bei SecB handelt es sich um ein Chaperon, das an den reifen Teil

des Vorläuferproteins post-translational bindet und so dessen ungefalteten Zustand aufrecht erhält (Kumamoto & Francetic, 1993). Das SecB-Protein besitzt eine Affinität zum SecA-Protein und auf diese Weise wird das Substratprotein zur Sec-Pore transportiert (Fekkes *et al.*, 1997). Da der co-translationaler Weg über das SRP und der post-translationaler Weg über SecB an der Sec-Pore zusammentreffen (Valent *et al.*, 1998), wurde vermutet, dass *B. subtilis* über ein SecB Homologon verfügt. Allerdings konnte in *B. subtilis* kein eindeutiges SecB Homologon identifiziert werden, was möglicherweise in Zusammenhang mit den in Vergleich zu *E. coli* meist stärker hydrophoben SP von *B. subtilis* stehen könnte, da stärker hydrophobe SP in *E. coli* meist vom SRP und nicht von SecB erkannt werden (Valent *et al.*, 1995; Valent *et al.*, 1997). Außerdem werden in *E. coli* über den SecB-Weg vor allem Proteine sekretiert, die an der äußeren Membran lokalisiert sind (Diamond & Randall, 1997), welche in *B. subtilis* nicht vorhanden ist. Dennoch wurde von Mueller *et al.* (1992) das CsaA-Protein von *B. subtilis* als Suppressor einer *E. coli* SecA-Mutante identifiziert und damit in den Focus als mögliches SecB-Homologon gerückt. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass CsaA Chaperon-ähnliche Aktivitäten zeigt und Affinität zu Signalpeptiden sowie zu SecA aufweist (Mueller *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2000b). Zwar zeigen CsaA und SecB aus *E. coli* kaum Sequenzhomologien, allerdings führt in beiden Fällen eine abgeschwächte Expression dazu, dass einige Proteine nicht mehr auf einem nachweisbaren Niveau sekretiert werden (van Wely *et al.*, 2001). Inzwischen wurde die Kristallstruktur von CsaA in *B. subtilis* aufgeklärt (Shapova & Paetzl, 2007). Dennoch konnte die Funktion von CsaA im Zusammenhang mit der Sekretion in *B. subtilis* bisher nicht endgültig geklärt werden.

1.2.3 Die Translokation über die Sec-Pore

Das für den Export bestimmte Vorläuferprotein wird mit Hilfe des SRP und des SRP-Rezeptors FtsY zur Sec-Pore transportiert und bindet dort an das für die Zelle essentielle SecA-Protein. Das SecA-Protein ist der Motor für die Translokation des Substratproteins durch die Membran und kommt als Monomer und auch als Dimer im Cytosol und membrangebunden vor (Zimmer *et al.*, 2006). Untersuchungen haben gezeigt, dass SecA seine Funktion bei der Proteintranslokation auch in monomerer Form erfüllen kann (Or *et al.*, 2005). Aufgrund von Homologie- und Komplementations-Untersuchungen geht man davon aus, dass der Ablauf der Translokation in *E. coli* und *B. subtilis* sehr ähnlich ist (Tjalsma *et al.*, 2004). Das SecA-Protein bindet sowohl das Substratprotein als auch das Signalpeptid. Es gab zahlreiche Untersuchungen, um die Bindedomäne für das Signalpeptid und das Substratprotein selber zu identifizieren (Musial-Siwiek *et al.*, 2007). Gelis *et al.* haben 2007 postuliert, dass das SecA-Protein eine Bindetasche ausbilden kann, in der die Signalpeptide der Vorläuferproteine gebunden werden, wenn diese eine α -Helix ausbilden. Laut einer aktuellen Studie von Auclair *et al.* (2010), in der versucht wurde die Bindetasche für das SP mit Hilfe der Methode des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) zu identifizieren, liegen die für die Bindung des SP verantwortlichen Positionen jedoch auf etwa 20 % des gesamten

SecA-Proteins verteilt. Nachdem SecA an das Substratprotein gebunden hat, beginnt ein katalytischer Zyklus bei dem durch Konformationsänderung des SecA-Proteins unter ATP-Verbrauch das Substratprotein durch die Cytoplasmamembran tranloziert wird (Abb. 3).

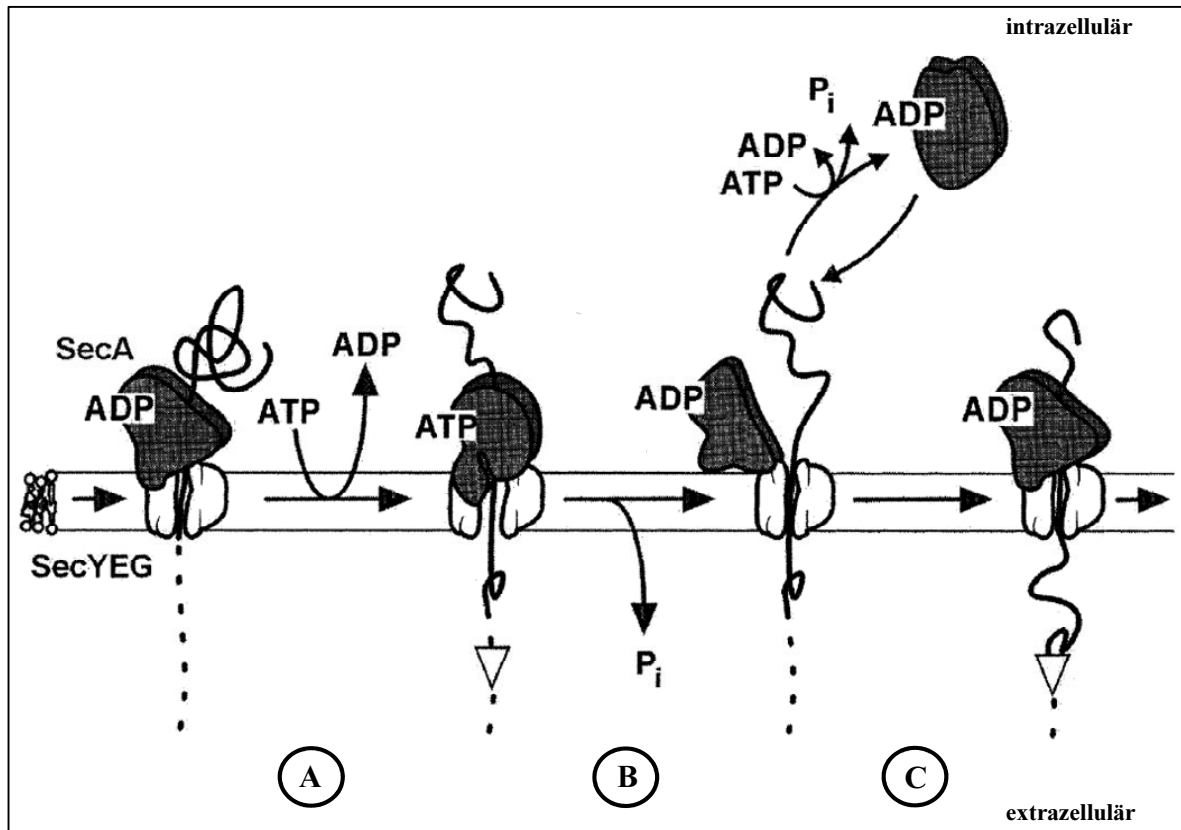


Abb. 3: Modell des katalytischen Zyklus des SecA-Proteins an der Sec-Pore (modifiziert nach Van Wely *et al.*, 2001). (A) Durch den Austausch von ADP gegen ATP wird eine Konformationsänderung des SecA-Proteins hervorgerufen und SecA inseriert teilweise in die Sec-Pore (SecYEG). Dabei werden 20-30 Aminosäuren des an SecA gebundenen Substratproteins über die Membran tranloziert. (B) Die Hydrolyse des ATP zu ADP bewirkt die Deinsertion von SecA aus der Pore und die Freigabe des Substratproteins. Das SecA-Protein an der Pore kann nun durch Hydrolyse eines weiteren ATP mit cytosolischen SecA-Molekülen ausgetauscht werden. (C) Durch die erneute Bindung eines SecA-Moleküls an das teilweise tranlozierte Substratprotein wiederholt sich der katalytische Zyklus, bis das Vorläuferprotein vollständig durch die Membran geschleust wurde.

Für die Translokation des ungefalteten Substratproteins durch die Cytoplasmamembran ist ein Protein-Kanal in der Membran verankert. Dieser hydrophile Translokationskanal wird aus den Proteinen SecY, SecE und SecG gebildet (Akimaru *et al.*, 1991; Manting *et al.*, 2000). Das SecY-Protein ist in *B. subtilis* über 10 Transmembransegmente in der Cytoplasmamembran verankert, während das kleinere SecE-Protein nur einen Transmembrananker aufweist. Diese beiden für die Zelle essentiellen Proteine bilden zusammen die Kernstruktur der Sec-Pore, die aus einer oligomeren Ringstruktur besteht und Ähnlichkeiten zur eukaryotischen Sec61p im endoplasmatischen Retikulum aufweist (Meyer *et al.*, 1999). Das über zwei Transmembransegmente verankerte SecG Protein hingegen ist nicht essentiell, verbessert aber die Translokationseffizienz, indem es seine Konformation ändert und so den SecA-Zyklus

(Abb. 3) energetisch begünstigt (Nishiyama *et al.*, 1993; Nishiyama *et al.*, 1994). Neben den bereits beschriebenen Proteinen sind einige weitere Komponenten direkt oder indirekt an der Sekretion über den Sec-Weg beteiligt. So üben beispielsweise die Proteine SecDF und YajC verschiedene unterstützende Funktionen aus und interagieren mit den zentralen Komponenten des Sec-Apparats (Economou *et al.*, 1995; Duong & Wickner, 1997; Bolhuis *et al.*, 1998; Samuelson *et al.*, 2000; Nouwen & Driessen, 2002; Yuan *et al.*, 2010).

1.2.4 Freisetzung und Faltung des Substratproteins

Während oder kurz nach der vollständigen Translokation des Substratproteins wird das N-terminale Signalpeptid durch Signalpeptidasen abgespalten (Abb. 2) und das reife Protein freigesetzt (Dalbey & Robinson, 1999). Während in den meisten Eubakterien, Archaea und Hefen nur jeweils eine Signalpeptidase für diesen Vorgang vorhanden ist (Goffeau *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997), wurden in *B. subtilis* fünf verschiedene, genomisch kodierte Typ I Signalpeptidasen mit paralogen Funktionen identifiziert (Kunst *et al.*, 1997). Diese wurden als SipS, SipT, SipU, SipV und SipW bezeichnet, wovon jedoch nur SipS und SipT essentiell sind (Tjalsma *et al.*, 1999). Die Interaktion von Signalpeptidasen und Signalpeptiden wurde inzwischen auch auf struktureller Ebene untersucht (Kim *et al.*, 2008; Choo *et al.*, 2008b). Lipid-modifizierte Vorläuferproteine (Lipo-Proteine) werden durch eine Typ II Signalpeptidase, die als Lsp bezeichnet wurde, prozessiert (Pragai *et al.*, 1997). Nach der Prozessierung verbleibt das Signalpeptid in der Membran und wird durch Signalpeptid-Peptidasen degradiert (Bolhuis *et al.*, 1999).

Nach der Freisetzung erlangt das Substratprotein im Zellwandbereich seine native Konformation mit der Unterstützung von Faltungshelfern, die an der äußeren Seite der Cytoplasmamembran lokalisiert sind. Einer dieser Faltungshelfer ist das PrsA-Protein, das über eine Lipidmodifikation in der Membran verankert ist (Kontinen *et al.*, 1991; Kontinen & Sarvas, 1993; Kim *et al.*, 2005). Das PrsA-Protein ist für *B. subtilis* essentiell und wurde aufgrund von Sequenzhomologien der Parvulin-Familie von Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) zugeordnet (Vitikainen *et al.*, 2004). PPIasen katalysieren die *cis/trans* Isomerisation von Peptidyl-Prolyl-Bindungen in Proteinen (Rahfeld *et al.*, 1994). In *B. subtilis* wurden außerdem drei verschiedene Proteine identifiziert (BdbA, BdbB und BdbC), die für Disulfid-Oxidoreduktasen kodieren und die Ausbildung von Disulfid-Brückenbindungen in sekretierten Proteinen katalysieren (Chung *et al.*, 1998; Bolhuis *et al.*, 1999). Interessanterweise wurde in *B. subtilis* bisher jedoch nur ein sekretiertes Protein mit einer Disulfidbrückenbindung identifiziert (ComC).

Eine Übersicht über den gesamten Ablauf der Sekretion über den Sec-Apparat ist in Abb. 4 dargestellt. Der Begriff der „Proteinsekretion“ wird in dieser Arbeit mit dem Begriff „Proteinexport“ gleichgesetzt, auch wenn die Abläufe der einzelnen Schritte der Sekretion nicht im Detail untersucht wurden, sondern nur der generelle Proteinexport.

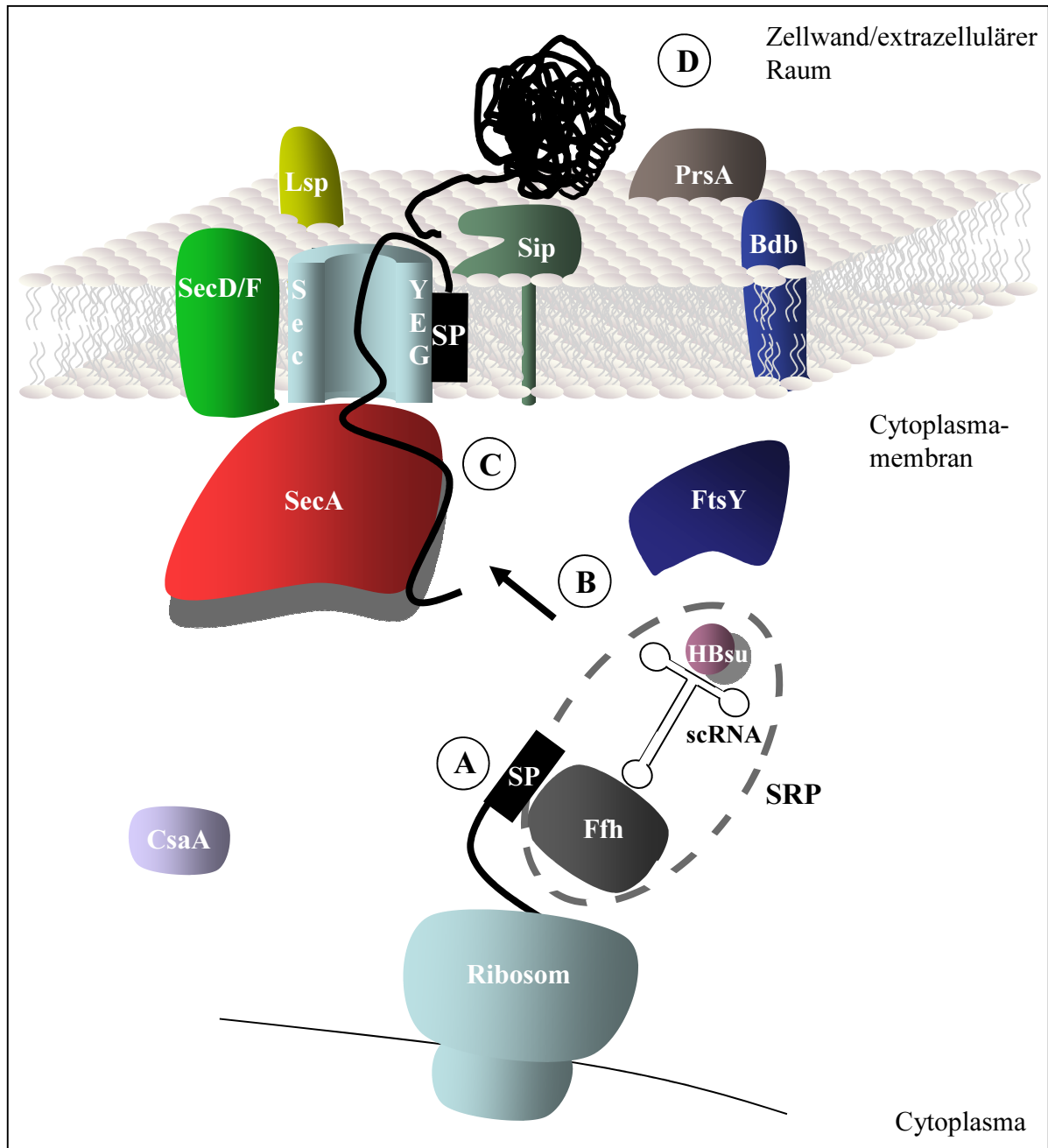


Abb. 4: Schematische Darstellung des Ablaufs der Proteinsekretion über den Sec-Apparat in *B. subtilis*. (A) Der Protein-RNA-Komplex des SRP bindet während der Proteinbiosynthese an das N-terminale Signalpeptid (SP) von für den Export bestimmten Proteinen und bewirkt so die Beibehaltung der ungefalteten Konformation, um die Substratproteine exportkompetent zu halten. (B) Mit Hilfe des SRP-Rezeptor-Proteins FtsY wird der Komplex aus SRP und Substratprotein zur Membran transportiert und dort das Signalpeptid und Teile des reifen Proteins an den Translokationsmotor SecA gebunden. (C) Durch Konformationsänderung im katalytischen Zyklus des SecA-Proteins (Abb. 3) wird das Substratprotein unter ATP-Verbrauch durch die Membranpore transloziert. (D) Nach der Freisetzung der Peptidkette durch das Abspalten der SP durch eine Typ I Signalpeptidase (Sip) erlangt das Substratprotein mit Hilfe von Faltungshelfern (z.B. PrsA) seine native Konformation.

1.3 *Bacillus* als Wirt für die extrazelluläre Proteinproduktion

Für die bakterielle Proteinproduktion im industriellen Maßstab werden je nach Zielprotein unterschiedliche Organismen eingesetzt. Die häufigsten Produktionswirte sind *Escherichia coli* und Gram-positive Organismen der Gattung *Bacillus* (Westers *et al.*, 2004). Die Proteinproduktion in *E. coli* erfolgt fast immer intrazellulär im Cytoplasma, weshalb die Zellen für die Gewinnung des Zielproteins aufgeschlossen werden müssen (Sorensen & Mortensen, 2005; Graumann & Premstaller, 2006). Für eine wirtschaftliche Proteinproduktion im industriellen Maßstab sind neben einer hohen Proteinausbeute auch der Aufwand und die Kosten für die Aufreinigung des Zielproteins entscheidend. Die Lyse von *E. coli*-Zellen im großen Maßstab ist ein aufwändiger Prozess und es kommt hinzu, dass das Produkt durch die zahlreichen Wirtsproteine aus dem Cytoplasma verunreinigt wird. Weitere Nachteile der Proteinproduktion im Cytoplasma sind, dass das Zielprotein zahlreichen cytoplasmatischen Enzymen mit proteolytischer Aktivität ausgesetzt ist und dass bei einer starken Überexpression die Bildung unlöslicher Proteinaggregate, sog. Einschlusskörper („inclusion bodies“), zu verringerten Produktausbeuten führen. Daher ist die Sekretion von rekombinanten Proteinen direkt in das Medium, d.h. deren extrazelluläre Produktion, eine interessante Alternative, durch die der Zellaufschluss überflüssig wird und lediglich eine einfache Fest-Flüssig-Trennung von Zellen und Medien durchgeführt werden muss. Zusätzlich ist die Aufreinigung des Zielproteins stark vereinfacht, da zum einen keine „inclusion bodies“-Bildung im Kulturüberstand auftritt und des Weiteren deutlich weniger Wirtsproteine das Produkt verunreinigen. Zwar gibt es Ansätze, eine Sekretion von rekombinanten Proteinen in *E. coli* zu ermöglichen, allerdings sind diese meist mit schwerwiegenden Nachteilen in Bezug auf das Wuchsverhalten in der Kultivierung der modifizierten Stämme verbunden (Choi & Lee, 2004; Ni & Chen, 2009; Sommer *et al.*, 2010). Für die Sekretion von Proteinen werden daher Gram-positive Organismen bevorzugt, da diese nur über eine Membran verfügen, während in Gram-negativen Bakterien zwei Zellmembranen überwunden werden müssen. Insbesondere Organismen der Gattung *Bacillus* werden, aufgrund ihrer Fähigkeit, mehrere Gramm pro Liter Zielprotein in den Kulturüberstand sekretieren zu können, bevorzugt für die extrazelluläre Proteinproduktion im industriellen Maßstab eingesetzt (Schallmey *et al.*, 2004). Die Einstufung der nicht-pathogenen, Endotoxin-freien *Bacillus*-Arten als GRAS (generally regarded as safe) durch die „Food and Drug Administration“ und die Verfügbarkeit von kostengünstigen Nährmedien und Verfahren für die Hochzelldichte-Kultivierung von *Bacillus* machen diese Organismen zu einem langjährig bewährten und oft verwendeten Produktionswirt für homologe und heterologe Proteine in industriellen Prozessen (Westers *et al.*, 2004). *Bacillus* sekretiert natürlicherweise verschiedene hydrolytische Enzyme wie Proteasen, Amylasen und Lipasen, u.a. um auf veränderte Umweltbedingungen reagieren zu können und komplexe Nährstoffe in der Umgebung der Zelle zu hydrolysieren und so in eine Import-kompatible Form

umzuwandeln. Wie von Schallmey *et al.* (2004) zusammengefasst, werden viele dieser hydrolytischen Enzyme industriell in mikrobiellen Fermentationsprozessen produziert. Neben *B. subtilis* kommen dafür weitere Wirte, wie *B. amyloliquefaciens* und *B. licheniformis*, mit vorteilhaften Eigenschaften für die Produktion des jeweiligen Zielproteins zum Einsatz. Neben den homologen Enzymen aus *Bacillus* werden aber auch zahlreiche heterologe Proteine bis hin zu Membran-Proteinkomplexen mit *Bacillus*-Wirten produziert und die Vorteile von *Bacillus* als bakterieller Expressionswirt für die extrazelluläre Proteinproduktion ausgenutzt (Wong, 1995; Li *et al.*, 2004; Westers *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2005; Vitikainen *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2007; Zweers *et al.*, 2008; Özdamar *et al.*, 2009). Den bedeutendsten Anteil an der weltweiten Enzymproduktion haben jedoch hydrolytische Enzyme wie Proteasen, Amylasen und Lipasen. Die Hauptanwendung dieser Enzymklassen ist bei Wasch- und Reinigungsmittel zu finden, weshalb diese Enzyme jährlich im Tonnenmaßstab produziert werden. Des Weiteren finden Proteasen beispielsweise Anwendung in zahlreichen Prozessen der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie, zur Produktion von Lederwaren (Veredelung, Weichen und Beizen von Rohleder) und auch in organischen Synthesen (Rao *et al.*, 1998; Bordusa, 2002; Gupta *et al.*, 2002; Haki & Rakshit, 2003; Olempska-Beer *et al.*, 2006; Lageiro *et al.*, 2007). Etwa 60 % aller kommerziell produzierten Enzyme werden mit verschiedenen *Bacillus*-Wirten produziert (Fu *et al.*, 2007). Während die extrazelluläre Produktion homologer Enzyme meist zu sehr hohen Proteinausbeuten im Bereich von mehreren Gramm pro Liter führt (Schallmey *et al.*, 2004), erweist sich die Expression und Sekretion von heterologen Proteinen in *Bacillus* als oftmals deutlich weniger effizient und es gibt zahlreiche bekannte Engpässe, die zu vergleichsweise geringen Proteinausbeuten führen (Bolhuis *et al.*, 1999b; Li *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2007). Wie von Nijland & Kuipers (2008) zusammengefasst, treten während des gesamten Prozesses der Protein-Synthese, von der Transkription über die Translation, die Sekretion und anschließende Prozessierung, sowie die Faltung des Proteins in die native Konformation, potentielle Engpässe auf, die zu reduzierten Proteinausbeuten führen können. Daher gibt es verschiedene Ansätze, diesen Engpässe durch Modifikation des Expressionssystems entgegen zu wirken (Fu *et al.*, 2007). Einer der wichtigsten potentiellen Engpässe ist die Auswahl eines Signalpeptids, das vor das zu sekretierende Protein fusioniert wird und einen großen Einfluss auf die Sekretionseffizienz des Zielproteins hat. In Tab. 1 sind beispielhaft einige Fusionen aus SP und verschiedenen Proteinen in *B. subtilis* dargestellt, die eine erfolgreiche heterologe Proteinsekretion bewirken konnten. Dabei wurden sowohl wirtseigene SP (wie z.B. SacB, NprE und NprB), als auch vereinzelt wirtsfremde SP aus Gram-negativen Organismen und auch ein pflanzliches Signalpeptid erfolgreich für die Sekretion in *B. subtilis* eingesetzt (Tab. 1). Inzwischen wurde weiterhin gezeigt, dass ein bakterielles SP auch in Pflanzen funktionell sein kann (Moeller *et al.*, 2009).

Tab. 1: Übersicht über beispielhaft ausgewählte, heterolog in *B. subtilis* produzierte Proteine. Angegeben sind jeweils Bezeichnung und Ursprungs-Organismus des Proteins, der *B. subtilis*-Stamm der als Produktionswirt verwendet wurde und das jeweils vor das heterologe Protein fusionierte Signalpeptid (SP).

Protein	Ursprung	Produktions-Wirt	SP*	Referenz
α -Amylase	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i> DB403	BLA	(Heng <i>et al.</i> , 2005)
Cutinase	<i>Fusarium solani pisi</i>	<i>B. subtilis</i> TEB1030	Epr	(Brockmeier <i>et al.</i> , 2006)
Proinsulin	Human	<i>B. subtilis</i> DB431	NprE	(Olmos-Soto & Contreras-Flores, 2003)
Methyl Parathion Hydrolase	<i>Plesiomonas sp.</i>	<i>B. subtilis</i> WB800	NprB	(Zhang <i>et al.</i> , 2005)
Cystatin	Soja	<i>B. subtilis</i> WB600	KerA	(Kang <i>et al.</i> , 2004)
α -Amylase (AmyQ)	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i> 1012	BAA	(Phan <i>et al.</i> , 2006)
Interleukin-3	Human	<i>B. subtilis</i> WB700/WB800	Lat	(Westers <i>et al.</i> , 2006)
Monellin	<i>Dioscoreophyllum cumminsii</i>	<i>B. subtilis</i> DB104/DB403	SacB	(Chen <i>et al.</i> , 2007)
Alkalische Phosphatase	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i> BG4103/BE1500	Pla	(Ribbe & Nagarajan, 1992)
Protease	<i>Dichelobacter nodosus</i>	<i>B. subtilis</i> DB403	BprV	(Wang <i>et al.</i> , 1993)

*Erläuterungen: BLA: *B. licheniformis* α -Amylase; BAA: *B. amyloliquefaciens* α -Amylase; Lat: modifiziertes AmyL; Pla: pflanzliches SP.

Wie in Tab. 1 erkennbar, werden unterschiedliche SP für die Sekretion heterologer Proteine in *B. subtilis* eingesetzt. Oftmals werden SP von bekanntermaßen stark sekretierten Proteinen des jeweiligen Wirts vor das entsprechende Zielprotein fusioniert, um ebenfalls eine maximale Sekretion zu erreichen (Fu *et al.*, 2007; Nijland & Kuipers, 2008). Inzwischen konnte aber in mehreren Studien zur Identifizierung der optimalen SP für das jeweilige Zielprotein in verschiedenen Expressions-Wirten gezeigt werden, dass diese Strategie meist nicht zielführend ist und oft SP von völlig unbekanntem Wirtsproteinen dennoch sehr gute Sekretionsleistungen bewirken (Brockmeier *et al.*, 2006; Mathiesen *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2009). Die Vorhersage über die Effizienz eines SP mit einem bestimmten Zielprotein in *Bacillus* ist daher bisher nicht möglich.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Gram-positive Organismen der Gattung *Bacillus* werden seit Jahrzehnten für die industrielle Produktion von Proteinen eingesetzt, da sie in der Lage sind, große Mengen von Protein in den Kulturüberstand zu sekretieren, was einen aufwändigen Zellaufschluss, der bei der intrazellulären Produktion notwendig ist, überflüssig macht (Schallmey *et al.*, 2004). Für die extrazelluläre Produktion von hydrolytischen Enzymen werden vor allem *B. subtilis* und *B. licheniformis* eingesetzt, die sich mit kostengünstigen Nährmedien in effizienten Hochzelldichte-Fermentationen kultivieren lassen und in der Lage sind, mehrere Gram pro Liter des Zielproteins in den Kulturüberstand zu sekretieren. Gerade für die extrazelluläre Produktion von heterologen Proteinen gibt es jedoch zahlreiche Engpässe und einen dementsprechend hohen Bedarf, die Abläufe der Sekretion zu optimieren (Fu *et al.*, 2007; Nijland & Kuipers, 2008). Einer dieser Engpässe ist die Auswahl eines Signalpeptids, das einen effizienten Export des Zielproteins erlaubt. Bisher durchgeführte Studien zur Identifikation von Signalpeptiden, die einen gesteigerten Proteinexport bewirken, wurden ausschließlich mit wirtseigenen Signalpeptiden durchgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte erstmals untersucht werden, ob sich die Diversität der verfügbaren Signalpeptide für einen Wirt durch die Verwendung von wirtsfremden Signalpeptiden effizient erhöhen lässt. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob wirtseigene Signalpeptide gegenüber wirtsfremden von der Sekretionsmaschinerie des jeweiligen Wirtes bevorzugt werden, sollte eine Signalpeptid-Bank mit allen Signalpeptiden aus *B. licheniformis* konstruiert werden. Diese sollte im direkten Vergleich mit den Signalpeptiden aus *B. subtilis* in Bezug auf ihre Exporteffizienz mit einem heterologen Zielprotein im Wirt *B. subtilis* durchmustert werden. Außerdem sollte in dieser Arbeit erstmals untersucht werden, ob sich die Methode des Signalpeptid-Screenings auch effizient in einem Organismus anwenden lässt, der anwendungstechnisch interessante Eigenschaften aufweist und bereits auf eine maximale Sekretionsleistung optimiert wurde. Dafür wurde ein industriell relevanter Stamm von *B. licheniformis* ausgewählt und die Signalpeptid-Bank aus *B. subtilis* verwendet, um den Export von zwei heterologen Serinproteasen aus *B. lentus* und *B. gibsonii* zu optimieren. Als weiterführendes Ziel sollten außerdem die Exportleistungen verschiedener Fusionen aus der Serinprotease Subtilisin BPN¹ und einer Auswahl unterschiedlicher wirtseigener und wirtsfremder Signalpeptide in mehreren *Bacillus*-Wirten miteinander verglichen werden. Dabei sollte untersucht werden, ob sich die Exporteffizienzen der verschiedenen Konstrukte, die im Screening-Wirt *B. subtilis* ermittelt wurden, auf zwei verschiedene *B. licheniformis* Stämme übertragen lassen.

Im letzten Teil der Arbeit sollte außerdem eine neue Methode entwickelt werden, die auf der Strategie des Hochdurchsatz-Screenings für die Identifikation von effizienten Signalpeptiden aufbaut und eine weitere Optimierung der auf diese Weise identifizierten, effizienten Signalpeptide ermöglicht.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den folgenden Firmen in p.A.-Qualität bezogen:

Antibiotika: Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

Chemikalien: Alfa Aesar (Ward Hill, USA), Bachem (Weil am Rhein), Difco (Detroit, USA), Fluka (Sternheim), New England Biolabs (Schwalbach), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Carl Roth (Karlsruhe)

Enzyme: Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (Schwalbach) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Weitere Enzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen: Die „Phusion[®] High Fidelity“-DNA-Polymerase von New England Biolabs (Schwalbach). Die Shrimp Alkaline Phosphatase und die T4-DNA-Ligase von Roche (Mannheim), Lysozym von Serva (Heidelberg).

Medienkomponenten: Alfa Aesar (Ward Hill, USA), Carl Roth (Karlsruhe), Difco (Detroit, USA), Merck (Darmstadt)

Antikörper: Der Zweitantikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat) wurde von der Firma BioRad (München) bezogen.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Quelle / Referenz
<i>B. amyloliquefaciens</i> ATCC 23844	Wildtyp	ATCC, USA
<i>B. licheniformis</i> DSM13	Wildtyp (identisch zu ATCC 14580)	DSMZ, Braunschweig
<i>B. licheniformis</i> H101		Henkel AG & Co., KGaA, Düsseldorf
<i>B. licheniformis</i> H402	<i>B. licheniformis</i> H101 <i>aprE mpr</i>	Henkel AG & Co., KGaA, Düsseldorf
<i>B. licheniformis</i> MW3	<i>B. licheniformis</i> DSM13 <i>hsdR1 hsdR2</i>	(Waschkau <i>et al.</i> , 2008)
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	(Kunst <i>et al.</i> , 1997)
<i>B. subtilis</i> TEB1030	<i>B. subtilis</i> 168 <i>his nprE aprE bpf ispl</i> <i>lipA lipB</i>	(Eggert <i>et al.</i> , 2003)

Fortsetzung Tab. 2:

<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U196 (Φ 80 Δ <i>lacZM15</i>) <i>hsdR17 recA1 endA1</i> <i>gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)
-----------------------------	---	---------------------------------

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Plasmide.

Plasmid	Genotyp	Quelle / Referenz
pBSMul3	<i>E. coli</i> – <i>Bacillus</i> shuttle Plasmid <i>ColE1 repB Km^r</i> <i>Amp^r P_{HpaII}</i>	(Brockmeier <i>et al.</i> , 2006)
pBSMul5	pBSMul3 verkürzt; <i>Bacillus</i> Plasmid <i>repB Km^r</i> <i>P_{HpaII}</i>	diese Arbeit
pBSMul5A	pBSMul5 mit 1062 Bp Gen von Protease A aus <i>B. lentus</i> ohne Signalpeptid über <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> kloniert	diese Arbeit
pBSMul5A_subC	pBSMul5A mit Signalpeptid <i>subC</i> aus <i>B. licheniformis</i> über <i>HindIII</i> und <i>EcoRI</i> kloniert	
pBSMul5A-ss*	pBSMul5A mit jeweils einem der 173 verschiedenen <i>B. subtilis</i> SP kloniert über <i>HindIII</i> und <i>EcoRI</i>	diese Arbeit
pBSMul5B	pBSMul5 mit 1062 Bp Variante von Protease A ohne Signalpeptid über <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> kloniert	diese Arbeit
pBSMul5B_subC	pBSMul5B mit Signalpeptid <i>subC</i> aus <i>B. licheniformis</i> über <i>HindIII</i> und <i>EcoRI</i> kloniert	diese Arbeit
pBSMul5BPN	pBSMul5 mit 1074 Bp <i>apr</i> -Gen (BPN ⁺) aus <i>B. amyloliquefaciens</i> ATCC 23844 ohne Signalpeptid über <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> kloniert	diese Arbeit
pBSMul5BPN_wtSP	pBSMul5BPN mit dem wildtypischen <i>apr</i> -Signalpeptid aus <i>B. amyloliquefaciens</i> ATCC 23844 über <i>HindIII</i> und <i>EcoRI</i> kloniert	diese Arbeit
pBSMul5BPN_wtSPkk	pBSMul5 mit 1149 Bp <i>apr</i> -Gen (BPN ⁺) inklusive Signalpeptid aus <i>B. amyloliquefaciens</i> ATCC 23844 über <i>HindIII</i> und <i>BamHI</i> ohne Kupplung kloniert	diese Arbeit
pBSMul5BPN-ss*	pBSMul5BPN mit jeweils einem der 173 verschiedenen <i>B. subtilis</i> SP und außerdem jeweils einem der 220 verschiedenen <i>B. licheniformis</i> SP kloniert über <i>HindIII</i> und <i>EcoRI</i>	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 3:

pBSMul5B-sB**	pBSMul5B mit jeweils einer der 24 verschiedenen künstlich konstruierten SP kloniert über <i>HindIII</i> und <i>EcoRI</i>	
pBSMul5B-ss*	pBSMul5B mit jeweils einem der 220 verschiedenen <i>B. licheniformis</i> SP kloniert über <i>HindIII</i> und <i>EcoRI</i>	diese Arbeit
pBSMul5L	pBSMul5 mit 1062 Bp Gen von Protease L aus <i>B. gibsonii</i> ohne Signalpeptid über <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> kloniert	diese Arbeit
pBSMul5L_subC	pBSMul5L mit Signalpeptid <i>subC</i> aus <i>B. licheniformis</i> über <i>HindIII</i> und <i>EcoRI</i> kloniert	diese Arbeit
pBSMul5L-ss*	pBSMul5L mit jeweils einem der 173 verschiedenen <i>B. subtilis</i> SP kloniert über <i>HindIII</i> und <i>EcoRI</i>	diese Arbeit

* „ss“ steht für das jeweils im Mix klonierte Gemisch aus den 173 SP von *B. subtilis* 168 (Details: Brockmeier *et al.*, 2006) bzw. den 220 SP von *B. licheniformis* DSM13 (Details: siehe Anhang).

** „sB“ steht für jeweils eins der 24 künstlich konstruierten SP (Nr. 1-24).

2.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden über die Firmen Thermo Scientific (Dreieich) oder Metabion (Martinsried) in HPLC-gereinigter und lyophilisierter Form bezogen und sind im Detail in Tab. 4 aufgeführt. Die DNA wurde im jeweils vom Hersteller angegebenen Volumen A. dest. aufgenommen, so dass eine Konzentration von 100 pmol/μl erreicht wurde.

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide*. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, Start- und Stopcodons sind mit kursiv gedruckten Buchstaben markiert. Die Ribosomenbindestelle ist durch fett gedruckte Buchstaben gekennzeichnet. Wenn abweichend zur Originalsequenz des zu amplifizierenden Gens eine stille Mutation, z.B. zur Eliminierung einer Restriktionsschnittstelle, im Oligonukleotid vorgenommen wurde, so ist diese Base Rot markiert.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Merkmale
A_dn	ATAT <u>G</u> GATC <u>C</u> TAGCGTGTG <u>C</u> CGCTTCTGC	<i>BamHI</i> <i>Stopcodon</i>
A_up	ATATGAATTCGCTGAGGAAGCAAAGAAAA	<i>EcoRI</i>
A_eco#ov_dn	GATTGAGCTTGCACCTGAATT <u>T</u> CCAGATGC	gezielte Mutation
A_eco#ov_up	TTGTTGTAGCGGCATCTGG <u>A</u> AATTCAGGTGC	gezielte Mutation

Fortsetzung Tab. 4:

BPN_dn	ATAT <u>GGATCCTT</u> ACTGAGCTGCCGCCTGTACG	<i>Bam</i> HI <i>Stopcodon</i>
BPN_up	ATATGAATTCGCAGGGAAATCAAACGGGG	<i>Eco</i> RI
L_dn	ATAT <u>GGATCCTT</u> AGCGCGTTGCTGCATCTGC	<i>Bam</i> HI <i>Stopcodon</i>
L_up	ATATGAATTCGCTGAGGAAGCAAAGAAA	<i>Eco</i> RI
L_eco#ov_dn	TAGGTATGTGCTTTGAATG <u>CCAACACCAGG</u>	gezielte Mutation
L_eco#ov_up	ATTGTTGCACCTGGTGTGG <u>CATTCAAAGC</u>	gezielte Mutation
L_hind#ov_dn	ACTCTCCTGGTACAAAGCTG <u>GCTCCCCAC</u>	gezielte Mutation
L_hind#ov_up	ATTCGTGGGGGAGC <u>CAGCTTTGTACCAGGA</u>	gezielte Mutation
SubC_dn	ATATGAATTCAGCTGCAGAAGCGGAATCGCTGAA	<i>Eco</i> RI
SubC_up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGATGAGGAAAA AGAGTTTT	<i>Hind</i> III, RBS , <i>Startcodon</i>
wtSP_dn	ATATGAATTCAGCCGCCTGGGCAGAGGATGTGCT	<i>Eco</i> RI
wtSP_up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGAGAGGCAA AAAAGTATGG	<i>Hind</i> III, RBS , <i>Startcodon</i>

*Alle Oligonukleotide, die für die Amplifikation der *B. licheniformis* DSM13 Signalpeptide und für die Konstruktion der künstlichen Signalpeptide mittels PCR verwendet wurden, sind im Anhang in Tab. 17 aufgelistet.

2.4 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Alle Nährmedien wurden für 15 min bei 121 °C und 200 kPa autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wie Antibiotika wurden mit CME-Membranfiltern mit einem Porendurchmesser von 0,22 µm oder 0,45 µm (Carl Roth, Karlsruhe) sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium ab einer Temperatur von unter 60 °C zugesetzt.

2.4.1 Nähr- und Indikatormedien

LB-Flüssigmedium (Sambrook *et al.*, 1989):

10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt

In A. dest. gelöst und autoklaviert.

Zur Herstellung von Festmedien wurde dem entsprechenden Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar hinzugefügt.

416-Medium:

10 g/l NaCl, 20 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 2 M Sucrose
Trypton, Hefeextrakt und NaCl wurden in 900 ml H₂O (A. dest.) gelöst und autoklaviert.
Die Sucrose-Lösung wurde getrennt autoklaviert und 100 ml dem Medium steril zugesetzt.

Skim-Milk – Indikatormedium:

Zur Herstellung von Skim-Milk-Agarplatten wurde dem LB-Medium zusätzlich 1 % Skim-Milk (w/v) zugesetzt. Dafür wurde eine 5 %ige (w/v) Skim-Milk-Lösung getrennt autoklaviert (15 min, 121 °C, 200 kPa, Referenzvolumen nicht größer als das der Skim-Milk-Lösung, um den Autoklaviervorgang möglichst kurz zu halten).

2.4.2 Medien für die Transformation von *Bacillus subtilis* über die natürliche Kompetenz (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961; Young & Spizizen, 1961)**Paris-Medium:**

60 mM K₂HPO₄, 40 mM KH₂PO₄, 3 mM Na₃-Citrat, 1 % (w/v) Glukose, 20 mM K-Glutamat, 2,2 mg/l Fe_(III)NH₄-Citrat, 0,1 % (w/v) Casaminoacids, 20 mg/l Tryptophan, 3 mM MgSO₄
In A. dest. gelöst und autoklaviert.

2.4.3 Medien für die Protoplastentransformation von *Bacillus subtilis* (modifiziert nach Chang & Cohen (1979))**4 x PAB:**

70 g/l “Bacto-Antibiotic Medium 3“
In A. dest. gelöst und autoklaviert.

2 x SMM:

500 ml 2 M Sucrose, 20 ml 1 M MgCl₂, 480 ml 40 mM Maleinsäure
Alle Lösungen wurden getrennt autoklaviert und steril gemischt und der pH mit NaOH auf 6,5 eingestellt.

SMMP:

Es wurden gleiche Mengen 2 x SMM und 4 x PAB steril gemischt.

SMMP + BSA:

Es wurden 2 g BSA in 100 ml SMMP gelöst und die Lösung anschließend sterilfiltriert.

40 % (w/v) PEG/SMM-Lösung:

1,15 g/l Maleinsäure wurden in 250 ml A. dest. gelöst, mit 1 M NaOH auf pH 6,5 eingestellt, anschließend 400 g PEG6000 zugegeben und unter Wärmezufuhr gelöst, auf 740 ml mit A. dest. aufgefüllt und autoklaviert. Nachträglich wurden 250 ml 2 M Sucrose und 10 ml 1 M MgCl₂ steril zugegeben.

DM3-Agar:

40 g/l Agar, 35 g/l K₂HPO₄ und 15 g/l KH₂HPO₄, 203 g/l MgCl₂, 50 g/l Casaminoacids, 100 g/l Hefextrakt, 200 g/l Glukose, 20 g/l BSA, 118 g/l Bernsteinsäure

Der pH-Wert der Bernsteinsäure-Lösung wurde mit NaOH auf 7,3 eingestellt. Die BSA-Lösung wurde sterilfiltriert, alle anderen Lösungen wurden getrennt voneinander autoklaviert, auf ca. 60 °C vortemperiert und in folgenden Mengen steril gemischt:

200 ml Agar

100 ml Phosphatpuffer

20 ml MgCl₂

50 ml Casaminoacids

50 ml Hefeextrakt

30 ml Glukose

5 ml BSA

500 ml Bernsteinsäure

Vor dem Gießen erfolgte die Zugabe des entsprechenden Antibiotikums.

2.4.4 FB-Medium für die Hochzelldichte-Fermentation von *Bacillus subtilis* (Park et al., 1992)

Für die Anzucht von *B. subtilis* in Fed-Batch-Fermentationen wurde folgendes Medium verwendet:

4 g/l K₂HPO₄, 4 g/l KH₂PO₄, 7 g/l Na₂HPO₄, 1,2 g/l (NH₄)SO₄, 0,2 g/l NH₄Cl, 5 g/l Pepton, 0,5 g/l K-Glutamat, 0,5 g/l Tryptophan.

Die verschiedenen Komponenten wurden in A. dest. gelöst und im Fermenter autoklaviert. Nachträglich wurden folgende getrennt autoklavierte Lösungen steril zugegeben:

10 ml MgSO₄ (100 g/l), 1 ml CaCl₂ (40 g/l), 20 ml Glukose (500 g/l) und 5 ml Spurenelementlösung bestehend aus:

8 g/l FeSO₄, 2 g/l MnSO₄, 0,8 g/l CoCl₂, 0,4 g/l NaMoO₄, 0,4 g/l ZnSO₄, 0,2 g/l AlCl₃, 0,2 g/l CuCl₂, 0,1 g/l H₃BO₄.

Die Komponenten für die Spurenelementlösung wurden in autosteriler 5 M HCl gelöst.

2.4.5 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Anzucht von *E. coli*, *B. subtilis* und *B. licheniformis* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in LB-Medium bei 37 °C. Dabei wurden Stämme mit Plasmid-kodierten Resistenzmarkern unter dem entsprechenden Selektionsdruck kultiviert (siehe Tab. 5). Kulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden im Reagenzglas und größere Volumina im Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen max. 1/5 des Gefäßvolumens) mit Schikanen auf einem Rundschtüttler (150-180 UpM) bebrütet. Übernachtkulturen wurden mindestens 16 h inkubiert. Hauptkulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, jeweils aus einer Übernachtkultur auf eine O.D.₆₀₀ von 0,01 angeimpft. Die Zelldichte von Kulturen wurde turbidometrisch in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen das entsprechende Medium als Referenz ermittelt. Zur Durchmusterung der Signalpeptid-Bibliotheken wurden die plasmidtragenden *B. subtilis* bzw. *B. licheniformis* Klone in Deepwell-Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten und einem Fassungsvermögen von 2,2 ml (Greiner Bio-One, Frickenhausen) in einem Volumen von 1 ml LB-Medium angezogen und 20 h bei 600 UpM auf einem Mikrotiterplattenschüttler (Timix 5, Edmund-Bühler, Hechingen) bebrütet. Für die Inokulation von Kulturen wurden grundsätzlich Einzelkolonien von Agarplatten verwendet, die am Vortag frisch beimpft und dann 1 x über Nacht (ÜN) inkubiert wurden. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden Übernachtkulturen (ÜK) mit 10 % (v/v) sterilem Glycerol vermischt und bei -80 °C gelagert.

Tab. 5: Antibiotika-Konzentrationen zur Selektion der verschiedenen Bakterienstämme.

Antibiotikum	Konzentration (µg/ml)		
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>
Kanamycin	---	50	50
Ampicillin	100	---	---

2.5 Hochzelldichtefermentation von *Bacillus subtilis* im Fed-Batch

Verfahren

Die Hochzelldichtefermentation von *B. subtilis* wurde in einem Glaskörper-Fermenter „Labfors 3“ mit 7,5 Liter Totalvolumen (Nutzvolumen maximal 5 Liter) der Firma Infors (Bottmingen, Schweiz) durchgeführt. Als Kulturmedium wurden 2 Liter des unter 2.4.4 beschriebenen Hochzelldichte-Mediums von Park *et al.* (1992) verwendet und 50 µg/ml Kanamycin zugegeben. Die Begasung erfolgte mit Druckluft und für die Zufütterung (Feed) wurde eine Glukose-Lösung mit 500 g/l verwendet. Die Temperatur und der pH-Wert der Kultur wurden automatisiert überwacht und reguliert. Für die Regulation des pH-Wertes

wurden je nach Bedarf Phosphorsäure (4 N) oder Base (10 % (w/v) Ammoniak) zudosiert. Der Sauerstoffpartialdruck wurde je nach Prozessphase über die Feed-Rate, die Begasung, sowie teilweise auch über die Rührergeschwindigkeit reguliert.

Als Vorkultur wurde eine frische Einzelkolonie von *B. subtilis* in 4 ml selektives LB-Medium überimpft und 8 h bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Für die Hauptkultur (500 ml Schikanekolben, 37 °C, 180 UpM) wurden 400 µl der Vorkultur in 40 ml FB-Medium (50 µg/ml Kanamycin) überimpft und ÜN inkubiert. Für die Inokulation des Fermenters wurden die gesamten 40 ml der Hauptkultur verwendet.

Der in dieser Arbeit entwickelte Fermentationsprozess lässt sich in zwei Phasen unterteilen. In der ersten Phase, der Batch-Phase, wird keine Glukose-Lösung zugefüttert und der Sauerstoffeintrag (gesteuert über Rührer und Begasung) relativ gering gehalten. In dieser Phase ist die Zelldichte relativ gering und keine starke Begasung oder hohe Rührergeschwindigkeit erforderlich, um den Sauerstoffpartialdruck konstant zu halten. Es handelt sich um die Anwuchsphase, in der ein exponentielles Wachstum der Bakterien erreicht wird, bis die Hauptkohlenstoffquelle Glukose, im Batch-Medium verbraucht ist. Um das Einbrechen des Zellwachstum zu verhindern, wird daher die Zufütterung von Glukose gestartet. Der Zeitpunkt, an dem die Glukose im Batch-Medium verbraucht wurde, ist eindeutig an einem plötzlichen Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks zu erkennen. Gesteuert über die Kontrollsequenz beginnt erst zu diesem Zeitpunkt die externe Zufütterung der Glukose-Lösung, um den Glukose-Überschuss in der Kultur so gering wie möglich zu halten und die zweite Phase, die Fed-Batch Phase der Fermentation wird eingeleitet. Die Zudosierung der Glukose wurde an den Sauerstoffpartialdruck der Kultur gekoppelt. Stieg der Sauerstoffpartialdruck deutlich über den Sollwert, so wurde die Glukose-Zufuhr erhöht und umgekehrt. Der Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks wurde zu Beginn der Batch-Phase auf 40 % und nach 22 h auf 30 % festgelegt, so dass sich die Kultur stets im aeroben Bereich befand.

Die für die Regulation des beschriebenen Prozesses verwendete Kontrollsequenz ist im Anhang dargestellt (Abb. 30).

2.6 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Minipräp-Kits der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) sowie des Minipräp- und Midipräp-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben.

Genomische DNA wurde mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

Für die Isolation von Nukleinsäuren aus *Bacillus* wurden die Zellen im Resuspensionspuffer des jeweiligen Kits nach der Zugabe von 100 µg Lysozym für 30 min bei 37 °C inkubiert, um

eine vollständige Zellyse zu gewährleisten.

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Präparationen erfolgte durch analytische Agarose-Gelelektrophorese.

2.7 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA sowie der gezielten präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach der bei Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Methode. Es wurde 0,5 x TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM EDTA, pH 8,3) als Elektrophorese-Puffer verwendet. Als Längenstandard diente die „1 kb-ladder“ von der Firma Invitrogen (Karlsruhe). Zur Dokumentation der Elektrophorese-Ergebnisse wurde das Videodokumentationssystem G:BOX der Firma Syngene (Frederick, USA) verwendet.

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des „omni-pure-OLS[®]-Kits“ der Firma Omni Life Science (Bremen) und im Falle von DNA-Fragmenten, die kleiner als 200 bp waren, unter Verwendung des „QIAex II gel extraction“-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben.

2.8 *In vitro* Rekombination von DNA

Die Restriktion von DNA, Modifikation von DNA-Enden und Ligation von DNA-Fragmenten wurde nach Sambrook *et al.* (1989), sowie nach Angaben der Hersteller der jeweiligen Enzyme in den mitgelieferten Puffern durchgeführt.

2.9 Methylierung von Plasmid-DNA (Donahue *et al.*, 2000)

Für einige Bakterienstämme mit Restriktions-Modifikationssystemen ist es erforderlich, die Plasmid-DNA vor der Transformation mit Stamm-eigenen Enzymen zu methylieren. Dazu wurde der Rohextrakt des Stammes nach der Methode von Donahue *et al.* (2000) aufbereitet und die Plasmid-DNA vor der Transformation damit methyliert.

Für die Methylierung von Plasmid-DNA wurde 1 Volumen DNA-Lösung (1-5 µg Plasmid-DNA) mit 1 Volumen Zellextraktüberstand gemischt und S-Adenosylmethionin in einer Endkonzentration von 200 µM zugegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und im Anschluss daran die Plasmid-DNA mit Hilfe des Minipräp-Kits der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt.

2.10 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

2.10.1 Transformation von *Escherichia coli*

Die Herstellung von transformationskompetenten *E. coli*-Zellen, sowie die Transformation mit Plasmid-DNA wurden nach der RbCl-Methode (Hanahan, 1983) durchgeführt.

2.10.2 Transformation von *Bacillus subtilis* über die natürliche Kompetenz (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961; Young & Spizizen, 1961)

Zur Transformation von *B. subtilis* Zellen mit Plasmid-DNA wurde eine modifizierte Methode nach Anagnostopoulos & Spizizen (1961) verwendet. Hierzu wurden *B. subtilis* Kulturen in 5 ml Paris-Medium bis zu einer O.D.₆₀₀ = 1,0 bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde dann in 0,5 ml Aliquots aufgeteilt und nach Zugabe von jeweils 1 µg Plasmid-DNA für weitere 6 h bei 37 °C bebrütet. Die Selektion der Transformanten erfolgte anschließend auf selektiven Agarplatten.

2.10.3 Protoplastentransformation von *Bacillus subtilis* (modifiziert nach Chang & Cohen (1979))

Zur Herstellung von *B. subtilis* Protoplasten wurden 30 ml 416-Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit einer frischen Einzelkolonie beimpft und ÜN bei 180 UpM und 37 °C inkubiert, um damit am folgenden Tag die Hauptkultur (40 ml 416-Medium, 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen) auf eine O.D.₆₀₀ von ca. 0,1 anzuimpfen. Die Hauptkultur wurde ebenfalls bei 180 UpM bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,4-0,5 kultiviert und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (3200 \times g, 20 min, 4 °C) geerntet, in 5 ml SMMP resuspendiert und in ein steriles 13 ml Rundbodenröhrchen (Sarstedt, Nürnberg) überführt. Anschließend wurden 200 µl Lysozymbilösung (10 mg/ml) zugesetzt und die Zellen bei 80 UpM und 37 °C für 30 min inkubiert. Die Kontrolle der Protoplastierung erfolgte mikroskopisch und bei einem Anteil von 80 % - 90 % protoplastierten Zellen wurden 9 ml SMMP zugegeben. Die Suspension wurde vorsichtig gemischt, 10 min bei Raumtemperatur (RT) und 3000 \times g zentrifugiert und im Anschluss in 2,5 ml SMMP resuspendiert. Die zu transformierende Plasmid-DNA (0,2-1 µg Pl. DNA) wurde in maximal 25 µl Elutionspuffer oder A. dest. aufgenommen und mit 1 Volumen 1 \times SMM versetzt. Für die Transformation wurden 500 µl der Protoplastensuspension verwendet. Das DNA/Protoplasten-Gemisch wurde zu 1,5 ml 40 % PEG-Lösung gegeben, vorsichtig gemischt und 2 min bei RT inkubiert bevor 5 ml SMMP+BSA zugegeben und erneut vorsichtig gemischt wurde. Nach der Zentrifugation mit 2000 \times g für 10 min bei RT wurde der Überstand abgenommen und 1 ml frisches SMMP+BSA zugegeben. Vor dem Ausplattieren auf selektiven DM3-Agarplatten

wurden die Ansätze bei 37 °C und 150 UpM für 2-3 h inkubiert. Die DM3-Agarplatten wurden 2-3 Tage bei 37 °C bebrütet.

2.10.4 Transformation von *Bacillus licheniformis* mittels Elektroporation (Vehmaanperae, 1989; Brigidi *et al.*, 1991)

B. licheniformis wurde mittels Elektroporation mit Plasmid-DNA transformiert. Dazu wurden 30 ml 416-Medium (500 ml Schikanekolben) mit einer frischen Einzelkolonie beimpft und ÜN bei 180 UpM und 37 °C inkubiert. Die Hauptkultur (40 ml 416-Medium, 500 ml Schikanekolben) wurde auf eine O.D.₆₀₀ von ca. 0,15 angeimpft und ebenfalls bei 180 UpM bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,5-0,7 kultiviert. Die Zellernte erfolgte mittels Zentrifugation bei 3200 x g und 4 °C für 20 min, um das Zellpellet anschließend 2 x mit 40 ml und 1 x mit 10 ml gekühltem EP-Puffer (272 mM Sucrose; 1 mM MgCl₂; 7 mM KH₂PO₄; pH 7,4) zu waschen. Bei jedem Waschschrift wurde jeweils, wie schon zuvor zentrifugiert und die Suspension stets auf Eis gekühlt. Schließlich wurde das Zellpellet in 1 ml gekühltem EP-Puffer resuspendiert, in 100 µl Aliquots aufgeteilt und bis zur Lagerung bei -80 °C auf Eis gekühlt.

Für die Transformation wurden 0,25-1 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 5-10 µl A. dest. oder Elutionspuffer verwendet. Als Elektroporator diente das Gerät „ECM 630“ der Firma BTX (Holliston, USA). Nach erfolgter Elektroporation in vorgekühlten Elektroporationsküvetten mit 2 mm Spaltbreite (1,2 kV, 129 Ω, 50 µF) wurde sofort 1 ml 416-Medium zugegeben und die Ansätze dann für 3 h bei 37 °C und 150 UpM bebrütet. Im Anschluss daran wurden die Ansätze auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert und 2 Tage bei 37 °C inkubiert.

2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.11.1 Standard-PCR

Die PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde nach Saiki *et al.* (1988) durchgeführt. Es wurden standardmäßig PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 µl angesetzt, die sich wie folgt zusammensetzten: 1-5 ng Plasmid oder 10-50 ng genomische DNA als Matrizen-DNA, 25 pmol von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 1 U „Phusion[®] High Fidelity“-DNA-Polymerase im Reaktionspuffer des Herstellers. Die PCR wurde in dem PCR-Automaten „Mastercycler[®] ep gradient“ der Firma Eppendorf (Hamburg) und wenn nicht anders angegeben mit dem folgenden Programm durchgeführt: 1 x (3 min, 98 °C), 35 x (1 min, 98 °C; 0,5 min, 58 °C; 1 min, 72 °C abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments), 1 x (7 min, 72 °C). Alle PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.7) aufgereinigt.

2.11.2 Overlap Extension-PCR (Ho *et al.*, 1989)

Die ortsgerichtete Mutagenese von DNA-Fragmenten nahe des 5'- oder 3'-Terminus wurde mittels Standard-PCR (2.11.1) und mutagenisierter Oligonukleotiden durchgeführt.

Basenaustausche, die sich mit dieser Methode nicht erreichen ließen, wurden mittels Overlap-Extension-PCR nach Ho *et al.* (1989) durchgeführt. Dabei wurden zwei Standard-PCRs mit mutagenisierten Oligonukleotiden durchgeführt, so dass das zu amplifizierende DNA-Fragment an der Stelle, wo der Basenaustausch erreicht werden sollte, unterteilt wurde. Die so amplifizierten vorderen und hinteren Enden des DNA-Fragments bildeten an dieser Stelle einen homologen Bereich aus, der den über die mutagenisierten Oligonukleotide eingefügten Basenaustausch enthält. In einer dritten Standard-PCR wurden diese beiden PCR-Produkte äquimolar anstatt der Oligonukleotide eingesetzt und aufgrund des überlappenden Bereichs kam es zu einer Überlappungs- und späteren Auffüllreaktion, so dass wieder das DNA-Fragment in der vollen Länge und mit dem zielgerichteten Basenaustausch vorlag.

2.12 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde als Auftragsarbeit von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) und Microsynth (Balgach, Schweiz) durchgeführt.

2.13 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) spektralphotometrisch bei 595 nm bestimmt (UV1800, Shimadzu, Kyoto, Japan). Als Referenzsubstanz diente eine definierte Konzentrationsreihe von Rinderserumalbumin (BSA).

2.14 Präzipitation von Proteinen (Peterson, 1977)

Für die Präzipitation von Proteinen mittels Trichloressigsäure (TCA), wurden die Proben mit 0,1 Volumen 1 %iger (w/v) Natriumdesoxycholat-Lösung vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 0,1 Volumen 70 %iger (w/v) Trichloressigsäure wurden die Ansätze gemischt und wieder für 10 min auf RT inkubiert. Nach der Zentrifugation (15 min, 20000 \times g, RT) wurde das Sediment mit 80 % (v/v) Aceton gewaschen und getrocknet.

2.15 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli (1970), bestehend aus einem 5 %igen Sammel- und einem 12,5 %igen Trenngel. Als Molekulargewichtsstandard diente der „Broad Range Protein Marker“ der Firma New England Biolabs (Schwalbach). Die Proteinproben wurden in SDS-Probenpuffer („Roti[®] Load 1“, Carl Roth, Karlsruhe) aufgenommen und vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min bei 98 °C denaturiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in SDS-Laufpuffer (14,4 g/l Glycin; 3 g/l Tris; 1 g/l SDS) in der Gelapparatur „Mini PROTEAN Tetra Electrophoresis System“ (BioRad, München) bei einer Spannung von 80-160 V). Die aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fluka, Sternheim) gefärbt.

2.16 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die durch SDS-PAGE (2.15) aufgetrennten Proteine wurden unter Verwendung der von BioRad (München) hergestellten Apparatur „Mini Trans-Blot Cell“ auf eine Sequiblot-PVDF-Membran (BioRad, München) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte mittels Elektroblot in einem nach Dunn (1986) beschriebenen Puffer (10 mM NaHCO₃; 3 mM Na₂CO₃; 20 % (v/v) Methanol) bei 150 mV für 15 min und 300 mV für weitere 20 min. Die PVDF-Membran wurde anschließend für 1 h bei 30 °C in TBST-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 6,8; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 0,2 % (v/v) Tween 20) mit 5 % (w/v) Milchpulver blockiert. Die auf der PVDF-Membran fixierten Proteine wurden nun, nach zwei Waschschritten mit TBST-Puffer, mit dem jeweiligen in TBS-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 6,8; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂) verdünnten spezifischen Antiserum 1 h bei 30 °C inkubiert. Dabei wurde das Antiserum für Protease BPN[‘] 1:2000 und das Antiserum für Protease A und B 1:500 verdünnt (beide Antiseren wurden von der Firma Henkel AG & Co, KGaA (Düsseldorf) zur Verfügung gestellt). Durch Waschen mit TBST-Puffer wurde ungebundenes Antiserum von der PVDF-Membran entfernt und im folgenden Schritt 1 h bei 30 °C mit dem 1:5000 in TBST-Puffer verdünnten zweiten Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat, BioRad, München) inkubiert. Durch erneutes Waschen mit TBST-Puffer wurden nicht gebundene Antikörper entfernt und das „ECL Western Blotting Substrate“ (Pierce, Rockford, USA) für die Peroxidase-Reaktion verwendet. Die Detektion der Lumineszenz erfolgte mit Hilfe des Luminographen „LB 980“ (Berthold, Bad Wildbad) nach den Angaben des Herstellers. Bei Bedarf wurden die Proteine auf der PVDF-Membran mit Hilfe einer Amidoschwarz-Färbelösung (0,1 % (w/v) Amidoschwarz; 40 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure) für 10 min angefärbt. Durch Entfärben des Hintergrunds mit einer Entfärberlösung (40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) wurden die Proteinbanden auf der PVDF-Membran sichtbar gemacht.

2.17 Spektralphotometrische Methode zu Bestimmung der proteolytischen Enzymaktivität

Für die spektralphotometrische Bestimmung der proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand wurde das Peptidsubstrat suc-Ala-Ala-Pro-Phe-para-Nitroanilid (AAPF-pNA) der Firma Bachem (Weil am Rhein) verwendet (DelMar *et al.*, 1979). Durch proteolytische Aktivität wird das Substrat in AAPF und pNA gespalten. Die Freisetzung des pNA aus dem Peptidsubstrat verursacht eine Zunahme der Absorption bei 405 nm, deren zeitlicher Verlauf ein Maß für die enzymatische Aktivität ist. Um zu gewährleisten, dass sich die Messung der Enzymaktivität auf einen auswertbaren linearen Bereich der Aktivitätskurve bezieht, wurden entsprechende Verdünnungen der Kulturüberstände im Reaktionspuffer (0,1 M Tris; 0,1 % (w/v) Brij[®]35; pH 8,6) hergestellt. Von der jeweiligen Verdünnung wurden 25 µl in Mikrotiterplatten (96 Kavitäten, F-Boden, glasklar, Greiner Bio-One, Frickenhausen) vorgelegt und 175 µl Reaktionspuffer zugegeben. Für die Erstellung der Substratlösung wurden 21 mg AAPF-pNA in 0,3 ml wasserfreiem DMSO gelöst und mit 5,7 ml Reaktionspuffer vermischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl der Substratlösung und unverzüglichem Mischen gestartet. Die Aufnahme der Absorptionskinetik erfolgte über 5 min bei 30 °C, während alle 0,5 min mit dem Spektralphotometer „SpectraMAX 250“ (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) ein Messpunkt aufgezeichnet wurde. Als Nullwert wurde ein Testansatz mit LB-Medium anstelle von Kulturüberstand verwendet. Die Auswertung der Daten wurde mit der SOFTmax Pro 3.0 Software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) vorgenommen. Jede Messung wurde mindestens in Doppel- oder Dreifachbestimmung durchgeführt. Die proteolytische Aktivität in U/ml ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$) berechnet sich wie folgt:

$$\text{U/ml} = \frac{\text{dE/min} \cdot V \cdot F}{d \cdot \epsilon_{405} \cdot \text{Proben Vol.}}$$

dE/ min: Absorptionssänderung pro Minute (gemessen in mOD/min)

V: Gesamtvolumen des Testansatzes = 0,25 ml

F : Verdünnungsfaktor der Enzymlösung

ϵ_{405} : Absorptionskoeffizient bei 405 nm = 8,48 cm² / μmol

d: Lichtweg durch die Lösung = $V / r^2 \cdot 1/\pi = 0,65$ cm

Proben Vol.: Proben Volumen = 0,025 ml

2.18 Hochdurchsatz-Screening von Signalpeptid-Bibliotheken

Zur Erstellung der jeweiligen Signalpeptid-Bank wurden die mittels PCR (2.11.1) amplifizierte Signalpeptide (SP) äquimolar gemischt und dann in den Expressionsvektor pBSM_{ul5} (Tab. 3) kloniert. Der Vektor enthielt bereits das entsprechende Sekretionstarget und im Folgenden wurde *Bacillus* über Protoplastentransformation (2.10.3) transformiert. Die Zellen wurden auf selektiven Agarplatten (Kanamycin) vereinzelt und nach der Inkubation bei 37 °C (1 x ÜN) eine qualitative Untersuchung des Proteaseexports anhand der Hofbildung auf Skim-Milk-Agarplatten (2.4.1) durchgeführt. Für die quantitative Bestimmung der Export-Effizienz wurden die Einzelkolonien direkt von den Skim-Milk-Agarplatten in Deepwell-MTP (96 Kavitäten mit je 1 ml selektiven LB-Medium) überführt. Dabei wurde jede Einzelkolonie parallel in mindestens zwei Kavitäten überführt, um eine Doppel- oder auch Dreifach-Bestimmung durch die Mehrfach-Anzucht des jeweiligen Klons zu erhalten und so falsch-positive bzw. falsch-negative Klone soweit wie möglich ausschließen zu können. Für das Beimpfen der Deepwell-MTP wurden ausschließlich Klone verwendet, die 1 x ÜN bei 37 °C inkubiert wurden. Nach der Anzucht für 20 h bei 37 °C (2.4.5) wurden alle Klone auf LB-Agarplatten repliziert und anschließend die Zellen mittels Zentrifugation sedimentiert (3200 x g, 20 min, 4 °C). Alle folgenden Pipettierschritte wurden mit Hilfe von Mehrkanalpipetten (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt, wobei der „reverse pipetting“-Modus verwendet wurde und keine Volumina kleiner als 15 µl pipettiert wurden. Es wurde jeweils das kleinste Volumen in der MTP vorgelegt und die größeren Volumina dazu gegeben und die MTP bei jedem Verdünnungsschritt 10 Sekunden im Spektralphotometer „Spektramax 250“ (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) gemischt. Für die Erstellung der entsprechenden Verdünnungen wurde der Kulturüberstand per Mehrkanalpipette abgenommen und in Mikrotiterplatten (96 Kavitäten, F-Boden, glasklar, Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt. Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität erfolgte wie in 2.17 beschrieben im „Spektramax 250“ (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) und die Auswertung wurde mit Hilfe der Software „SOFTmax pro 3.0“ vorgenommen. Die Korrelation von Proteinmenge und ermittelter Proteaseaktivität wurde insgesamt für mindestens 35 Konstrukte mittels SDS-PAGE (2.15) oder Western-Blot Analyse (2.16) überprüft. Für die Ermittlung der Sekretionseffizienz der verschiedenen Klone wurde in jeder MTP-Anzucht ein internes Benchmark-Konstrukt mit angezogen. Die im Kulturüberstand ermittelte proteolytische Aktivität des Stammes mit dem Benchmark-Konstrukt wurde als 100 % definiert und die proteolytische Aktivität im Kulturüberstand der Stämme mit den anderen Konstrukten dazu in Relation gesetzt.

2.19 Computerprogramme und Datenbanken

Die Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „CLONE Manager for Windows Version 9“ (Scientific and Educational Software, Cary, USA). Homologievergleiche wurden mit den BLAST-Algorithmen des „National Center for Biotechnology Information“-Servers (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt (Altschul *et al.*, 1997). Alignments wurden mit Hilfe der Software BioEdit (Hall, 1999) und des ClustalW2 Alignment Tools (Larkin *et al.*, 2007) erstellt. DNA-Sequenzinformationen von *B. subtilis*, *B. licheniformis* und *B. amyloliquefaciens* wurden über die NCBI Genomdatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome>) bezogen. Zur Identifizierung und Analyse von Signalsequenzen wurde der SignalP 3.0 Algorithmus verwendet (Bendtsen *et al.*, 2004). Vorhersagen für die Sekundärstruktur von Proteinen wurden auf Basis der Aminosäuresequenzen mit Hilfe des PsiPred Servers (Jones, 1999) durchgeführt. Als Software zur Auswertung der spektralphotometrischen Daten wurde „SOFTmax pro 3.0“ verwendet. Zur Steuerung der Fermentationsprozesse wurde die Software „IRIS 5.02“ der Firma Infors (Bottmingen, Schweiz) verwendet.

In dieser Arbeit wurden Ergebnisse mit Hilfe eines Scanners, einer digitalen Kamera sowie einer Videodokumentationsanlage digitalisiert und elektronisch in das Manuskript eingebunden. Während der Datenerfassung und der Datenverarbeitung wurden keine inhaltlichen Änderungen der Abbildungen vorgenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Homologie-Untersuchungen der für die Sec-Sekretion relevanten Komponenten von *Bacillus subtilis* und *Bacillus licheniformis*

Da im Rahmen dieser Arbeit verschiedene *Bacilli* als Sekretionswirte in Bezug auf die Interaktion mit wirtseigenen und wirtsfremden Signalpeptiden untersucht werden sollten, wurden zunächst Homologie-Untersuchungen der für die Sekretion über den Sec-Apparat relevanten Komponenten durchgeführt. Dazu wurden die Sequenzdaten aus den Genomprojekten von *B. subtilis* 168 (Kunst *et al.*, 1997) und *B. licheniformis* DSM13 (Rey *et al.*, 2004; Veith *et al.*, 2004) verwendet. Der Ablauf der Sekretion eines Proteins über den Sec-Apparat in *B. subtilis* wurde in den letzten Jahren detailliert untersucht und beschrieben (1.3). Die im Folgenden dargestellten Homologie-Untersuchungen zwischen *B. subtilis* und *B. licheniformis* wurden auf Basis der Aminosäuresequenzen durchgeführt und die im Alignment mit ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007) ermittelten Sequenzidentitäten in Prozent angegeben.

3.1.1 Hohe Homologie der cytoplasmatischen Sec-Komponenten

Alle an der Sekretion über den Sec-Apparat beteiligten cytoplasmatischen Komponenten in *B. subtilis* 168 sind homolog auch in *B. licheniformis* DSM13 vorhanden (Veith *et al.*, 2004). In Tab. 6 ist der Grad der Homologie in Prozent für die einzelnen Komponenten dargestellt. Die Funktion der einzelnen Komponenten ist in 1.2 beschrieben.

Tab. 6: Untersuchung der Sequenzidentitäten von cytoplasmatischen Komponenten des Sec-Apparates von *B. subtilis* und *B. licheniformis* auf Basis der Aminosäuresequenzen im Alignment mit ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007). Für die RNA-Komponente *scr* (scRNA) wurde die Sequenzhomologie anhand der Nukleotidsequenz ermittelt.

Bezeichnung	Identität [%]
SecA	91
Ffh	91
<i>scr</i>	90
HBsu	98
FtsY	82
CsaA	77
SecY	83
SecE	83
SecG	84
SecDF	84

Es wird deutlich, dass die cytoplasmatischen Komponenten größtenteils relativ hohe Homologien aufweisen (durchschnittlich 84,4 %). Die Proteine SecA und Ffh sind unter den in Tab. 45 aufgeführten Komponenten die einzigen, die direkt an der Bindung des SP während des Ablaufs der Translokation beteiligt sind. Beide weisen mit 91 % eine sehr hohe Homologie in *B. subtilis* und *B. licheniformis* auf. Das Ffh-Protein ist Bestandteil des SRP und bindet das SP des Substratproteins während der Translation am Ribosom. Die Region der Aminosäuren 297-337 wurde im Ffh-Protein in *B. subtilis* als SP-Bindedomäne identifiziert (Kurita *et al.*, 1996; Takamatsu *et al.*, 1997). Wie in Abb. 5 dargestellt, unterscheidet sich die SP-Bindedomäne des Ffh-Proteins von *B. subtilis* und *B. licheniformis* in vier Positionen, wobei es sich um Austausch mit ähnlichen Aminosäuren handelt.

Ffh_Bs	MAFEGLADRLQQTISKIRGKGVSEQDVKEMMREVRLLALLEADVNFVKVDFVKKVSERA	60
Ffh_Bl	MAFEGLADRLQQTISKIRGKGVTEQDVKEMMREVRLLALLEADVNFVKVDFVKKVSERA	60
	*****:*****	
Ffh_Bs	VGQDVMKSLTPGQQVIKVVQEELTELMGGEESKIAVAKRPPTVIMMVGLQGAGKTTTSGK	120
Ffh_Bl	VGQDVMKSLTPGQQVIKVVKEELTELMGGEESKIAAAKRPPTVIMMVGLQGAGKTTTSGK	120
	*****:*****:*****:*****	
Ffh_Bs	LANLLRKKHNRKPLVAADIYRPAAIKQLETLGKQLDMPVFSLGQVSPVEIAKQAIEKA	180
Ffh_Bl	LANLLRKKHNRNPLLVAADIYRPAAIKQLETLGKQLDMPVFSLGDKVSPVEIAKQAIEKA	180
	*****:*.*****:*****:*****	
Ffh_Bs	KEEHYDYLVDLTDAGRLHIDHELMDELTVNKEIANPEEILFVVDVSMGTQDAVNVAKSFNEQ	240
Ffh_Bl	KEDHHDYVLIDTAGRLHIDEELMDELEQVKETAQPEEILFVVDVSMGTQDAVNVAKSFNEQ	240
	:*:*:*:*:***:*****:***:*.*****:*****	
Ffh_Bs	LGLTGVVLTCLKDGDTRGGAALSIRAVTNTPIKFAGLGEKLEDALEPFHPERMASRILGMD	300
Ffh_Bl	LGVTGVIILTKLDGDTRGGAALSIRAVTNTPIKFAGMGEKLEDALEPFHPERMASRILGMD	300
	:*:*:*:***:*****:*****:*****	
Ffh_Bs	VLTLEKAQASVDEDKAKELEQKMRMTSFTLDDFLEQLGQVRNMGPLEDLQMPGAGKM	360
Ffh_Bl	VLTLEKAQANVDEEKAKELEQKMNMSFTLDDFLEQLGQVRNMGPLEDLQMPGAGKM	360
	*****:***:*****:*****:*****:*****:***:*****	
Ffh_Bs	KGLKNIQVDEKQLNHVEAIIKSMTVLEKEQPDIINASRRKRIAKGSGTSVQEVNRLKQF	420
Ffh_Bl	KGLKNVQVDEKQLSHIEAIIKSMTGKEKEQPEIINASRRKRIAKGSGTSVQEVNRLKQF	420
	*****:*****:*.*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Ffh_Bs	DEMCKMMKQMTNMSKGGKGGFKLPFM	446
Ffh_Bl	EEMCKMMKQMTNMTKGGKGGFKLPFM	446
	*:*****:*****:*****	

Abb. 5: Alignment der Aminosäuresequenz des Ffh-Proteins aus *B. subtilis* (Bs) und *B. licheniformis* (Bl). Das Alignment wurde mit Hilfe des ClustalW2 Alignment Tools erstellt (Larkin *et al.*, 2007). Dargestellt sind die Sequenzen des Ffh-Proteins und die ermittelte Identität („*“) sowie Aminosäuren mit teilweise ähnlichen Eigenschaften („:“ und „.“) an der jeweiligen Position. Die Aminosäurepositionen 297-337 umfassen die SP-Bindedomäne und wurden eingerahmt.

Neben dem Ffh-Protein ist auch das SecA-Protein direkt an der Bindung des SP beteiligt. Die für die SP-Bindung zuständige Region des SecA-Proteins ist immer noch umstritten. Inzwischen wurden zahlreiche Studien zur Identifikation der Domänen des SecA Proteins, die für die Bindung des SP und des reifen Substratproteins zuständig sind, in *E. coli* und *B. subtilis* durchgeführt (Musial-Siwiek *et al.*, 2007). Zuletzt wurde versucht, die Bindetasche für das SP mit Hilfe der Methode des Förster-Resonanzenergietransfers (FRTE) zu

identifizieren (Auclair *et al.*, 2010), wonach vermutet wurde, dass die für die SP-Bindung zuständigen Positionen über große Teile des SecA-Proteins auf etwa 20 % aller Positionen verteilt liegen. Bisher wurde angenommen, dass sich die SP-Bindedomäne von SecA auf eine spezielle Region eingrenzen lässt. Da somit nicht klar ist, welcher Bereich des SecA-Proteins die SP-Bindedomäne umfasst, wurde im Folgenden auf einen detaillierten Homologie-Vergleich der SecA-Proteine aus *B. subtilis* und *B. licheniformis* verzichtet. Mit 91 % Sequenzidentität ist die Homologie des SecA-Proteins jedoch ebenfalls - wie auch schon beim Ffh-Protein - sehr hoch.

3.1.2 Nicht alle Komponenten des Sec-Apparates weisen hohe Homologien auf

Neben den in 3.1.1 betrachteten cytoplasmatischen und translokationskanal-bildenden Komponenten des Sec-Apparats sind weitere Komponenten an der Sekretion beteiligt, die deutlich schwächere Homologien zwischen *B. subtilis* und *B. licheniformis* zeigen. Während *B. subtilis* über fünf verschiedene Signalpeptidasen verfügt, wurden in *B. licheniformis* nur vier gefunden, da für SipU kein Homologon identifiziert werden konnte (Voigt *et al.*, 2009). Die vier Signalpeptidasen, die homolog vorhanden sind, weisen mit durchschnittlich 63 % eine deutlich geringere Homologie auf als die bisher betrachteten Sec-Komponenten (Tab. 6). Die Signalpeptidase SipS ist sogar nur zu 47 % homolog in beiden Organismen.

Tab. 7: Untersuchung der Sequenzidentität von Komponenten des Sec-Apparates von *B. subtilis* und *B. licheniformis* auf Basis der Aminosäuresequenzen im ClustalW2-Alignment (Larkin *et al.*, 2007).

Bezeichnung	Identität [%]
SipS	47
SipT	75
SipU	/
SipV	67
SipW	63
PrsA	67
SppA	71
TepA	89

Neben den Signalpeptidasen wurden in Tab. 7 außerdem die Signalpeptid-Peptidasen, die für den Abbau des Signalpeptids verantwortlich sind, und das Faltungshelfer-Protein PrsA, das an der Außenseite der Cytoplasmamembran lokalisiert ist, aufgeführt. Dabei wird deutlich, dass auch das PrsA-Protein, wie auch schon die Signalpeptidasen, eine geringere Homologie als die cytoplasmatischen Sec-Komponenten aufweist.

3.1.3 Sequenzunterschiede der homolog vorkommenden Signalpeptide

In der Veröffentlichung von Voigt *et al.* (2006) wurden alle sekretorischen Proteine von *B. licheniformis* DSM13 mit Hilfe von SignalP 2.0 (Nielsen *et al.*, 1997) vorhergesagt. Um zu ermitteln, wie viele der sekretierten Proteine homolog in *B. subtilis* vorkommen, wurden im Folgenden die Daten aus dem Genom-Projekt von *B. subtilis* 168 (Kunst *et al.*, 1997) verwendet und anhand der annotierten Proteine alle homolog in *B. licheniformis* vorkommenden sekretorischen Proteine bestimmt. Insgesamt konnten so 71 homolog vorkommende sekretorische Proteine identifiziert und jeweils in Alignments die prozentuale Sequenzidentität ermittelt werden (Tab. 8).

Tab. 8: Untersuchung der Sequenzidentität der SP von den homolog in *B. subtilis* und *B. licheniformis* vorkommenden sekretorischen Proteinen auf Basis der Aminosäuresequenzen. Die Homologien wurden mit dem Alignment Tool ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007) ermittelt.

SP	Identität [%]	SP	Identität [%]	SP	Identität [%]
TasA	92	YlxW	50	PbpX	23
AspB	90	YpmS	50	YvnB	23
YocH	86	YpuD	50	YqzG	22
YpcP	86	YqfZ	50	YrvJ	22
YpjP	86	AprE	48	YoqH	21
PbpB	85	YdjM	48	YndA	20
YkwD	76	FliL	47	YveB	20
YojL	76	PbpD	46	Pel	19
YhjA	74	YrrR	46	YbdN	19
YwoF	74	LytC	45	YkvV	19
SpoIIQ	72	YbbC	43	YxiA	19
SpoIIR	70	Bpr	33	YbbE	17
YqzC	68	YdhT	33	YwmD	17
YpmB	66	YfjS	33	YhcR	15
SacB	65	YrrL	33	YwtD	15
LytE	63	YunA	33	AbnA	12
YwtC	63	YvpA	33	YvgO	12
YkvT	61	YwtF	33	GlpQ	11
Vpr	57	NucB	31	LytD	11
YlbL	57	YqxM	30	Mpr	6
YfkD	56	YoaW	29	YwaD	6
YvcE	53	LytB	28	PelB	4
BglC	51	YurI	28	YckD	3
YdjN	50	Epr	26		

Im Durchschnitt sind alle 71 SP zu 41,7 % identisch. Wie in Tab. 8 dargestellt, gibt es jedoch sehr große Abweichungen in der Ähnlichkeit der SP bei der Betrachtung der Aminosäuresequenzen. Während die schwach homologen SP teilweise nur zu 3-10 %

identisch sind, gibt es einige SP, die mit bis zu 92 % sehr hohe Homologien in beiden Organismen aufweisen, wie z.B. die SP von TasA und AspB.

Da die homolog vorkommenden SP jedoch teilweise deutliche Unterschiede in der Länge aufweisen, ist eine Aussage über die reine Homologie auf Aminosäuresequenzebene wie in Tab. 8 jedoch nicht immer aussagekräftig. In Abb. 6 sind beispielhaft einige Alignments von verschiedenen SP gezeigt, die dies verdeutlichen. Dafür wurden die Daten der Signalpeptid-Vorhersagen von Tjalsma *et al.* (2000) für *B. subtilis* und von Voigt *et al.* (2006) für *B. licheniformis* verwendet.

AspB_Bs	MKLAKRVSALTPSTTLAITAKA	22
AspB_Bl	MNLAKRVSALTPSATLAIKAKA	22
	*:*****:*****	
TasA_Bs	MGMKKKLSLGVASAALGLALVGGGTWA	27
TasA_Bl	MGTKKKLGSLGVASAALGLALVGGGTWA	27
	** ****.*****	
PbpB_Bs	MIQMPKKNKFMNRGAAILSICFALFFFVILGRMA-----	34
PbpB_Bl	---MPKKNKFMNRGAAILSICFALFFFVIVGRFAFIQATGKVNG	41
	*****:***:	
LytE_Bs	MKKQIITATTAVVLG-ALFA-----	19
LytE_Bl	MKKQVITAASAVVLGSTLFAGAASA	25
	****:***:***** :***	
YpmB_Bs	MRKKALIFTVIFGIIFLAVLLVSASIIKSAMA	32
YpmB_Bl	MGKKTILIFILIFGIIFLTALLAGA-----	24
	* **:*** :*****:***.*	
GlpQ_Bs	MRKNRILALFVLSLGLLSF---MVTPVSA	26
GlpQ_Bl	MKR-LVRSIFLITAAIAAFGFGFSGHAEA	28
	:: : :::: :. :* : ..*	

Abb. 6: Alignment der Aminosäuresequenzen verschiedener SP aus *B. subtilis* (Bs) und *B. licheniformis* (Bl). Das Alignment wurde mit Hilfe des ClustalW2 Alignment Tools erstellt. Dargestellt sind die Sequenzen der SP des jeweiligen Organismus und die ermittelte Identität („*“) sowie Aminosäuren mit teilweise ähnlichen Eigenschaften („:“ und „.“) an der jeweiligen Position.

Für die SP AspB und TasA wurden im Alignment Sequenzhomologien von über 90 % ermittelt (Tab. 8), wie auch in Abb. 6 deutlich wird. Bei Betrachtung des Alignments von dem SP PbpB wird deutlich, dass die SP im überlappenden Bereich ebenfalls Sequenzidentitäten von über 93 % aufweisen. Da das SP PbpB in *B. subtilis* laut Vorhersage aber nur 34 Aminosäuren und in *B. licheniformis* 41 Aminosäuren lang ist, kommt es an beiden Seiten zu Sequenzüberhängen im Alignment und es wurde nur eine Gesamtidentität

von 85 % ermittelt, da bei dem Alignment der N-terminale Überhang anscheinend nicht beachtet wurde. Wenn man jedoch den nicht überlappenden, endständigen Bereich ebenfalls mit berechnen würde, läge der ermittelte Wert für die Gesamtidentität bei nur ca. 65 %. Weitere Beispiele dafür, dass die homologen SP teilweise deutliche Unterschiede in der vorhergesagten Länge des SP im jeweiligen Organismus aufweisen, sind die SP LytE und YpmB. Dementsprechend lassen nicht in alle in Tab. 8 ermittelten Werte eindeutige Schlüsse zu und die so ermittelten Sequenzhomologien sollen nur als Übersicht dienen, während in Einzelfällen das Alignment im Detail betrachtet werden muss.

Es ist bekannt, dass sich SP vor allem in den strukturellen Eigenschaften ihrer Domänen sehr stark ähneln (Abb. 1). Daher war durchaus zu erwarten, dass die Sequenzhomologien der meisten SP nicht besonders hoch sein würden, wie in Tab. 8 bestätigt wurde. Am Beispiel des Alignments von GlpQ (Abb. 6) wird deutlich, dass sich die SP in beiden Organismen trotz einer Sequenzidentität von nur 11 % dennoch strukturell sehr stark ähneln, da sich an den meisten Positionen im SP strukturell ähnliche Aminosäuren finden.

3.1.4 Die Verteilung der Aminosäuren an den „+1“-Positionen der sekretierten Proteine ist in beiden Organismen sehr ähnlich

Die erste Aminosäure im „reifen“ Protein ohne Signalpeptid, wird als „+1“-Position bezeichnet (Abb. 1). Es ist bekannt, dass der Bereich in der direkten Nachbarschaft der C-Domäne des SP einen direkten Einfluss auf die Sekretionseffizienz des sekretierten Proteins haben kann (Choo & Ranganathan, 2008). Daher sollte im Folgenden die Häufigkeiten der verschiedenen Aminosäuren an der „+1“-Position in beiden Organismen untersucht werden.

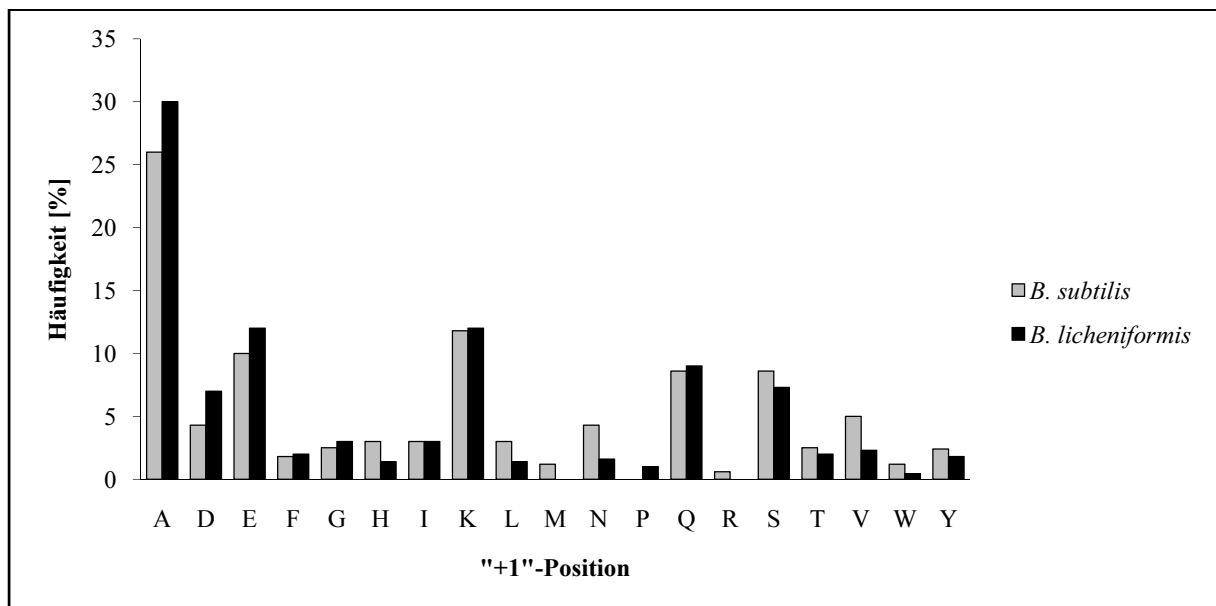


Abb. 7: Prozentuale Häufigkeit der Aminosäuren an den „+1“-Positionen der sekretierten Proteine in *B. subtilis* 168 und *B. licheniformis* DSM13. Es wurden jeweils alle sekretierten Proteine untersucht, die ein SP mit Schnittstelle für Typ I Signalpeptidasen aufwiesen (Tjalsma *et al.*, 2000; Voigt *et al.*, 2006) und die prozentuale Häufigkeit der Aminosäuren (Ein-Buchstabencode) ermittelt.

Die Häufigkeit der verschiedenen Aminosäuren an der „+1“-Position der sekretierten Proteine ist in *B. subtilis* und *B. licheniformis* überwiegend sehr ähnlich (Abb. 7). Mit 25-30 % stellt Alanin (A) die häufigste Aminosäure an der „+1“-Position der sekretierten Proteine in beiden Organismen dar. Mit 8-12 % Häufigkeit folgen die Aminosäuren Glutamat, Lysin, Glutamin und Serin.

Für den in Abb. 7 dargestellten Vergleich wurden nicht nur die homolog in beiden Organismen vorkommenden Proteine, sondern alle sekretierten Proteine herangezogen. Daher ist es durchaus überraschend, dass sich die Verteilung der Aminosäuren an dieser Position sehr stark ähnelt.

Die Homologie-Untersuchungen der an der Sekretion beteiligten Komponenten von *B. subtilis* und *B. licheniformis* haben gezeigt, dass die meisten Komponenten hohe Ähnlichkeiten aufweisen, jedoch vor allem die Signalpeptidasen deutlich schwächer homolog sind. Die Homologie der homolog in beiden Organismen vorkommenden Signalpeptide lag durchschnittlich bei ca. 42 % und war mit bis zu 91 % teilweise überraschend hoch.

3.2 Optimierung der heterologen Proteinsekretion in *Bacillus licheniformis*

Der Begriff der „Proteinsekretion“ wird in dieser Arbeit mit dem Begriff „Proteinexport“ gleichgesetzt, auch wenn die Abläufe der einzelnen Schritte der Sekretion nicht im Detail untersucht wurden, sondern nur der generelle Proteinexport.

Aufgrund ihrer Fähigkeit, große Mengen des überexprimierten Proteins direkt in den Kulturüberstand sekretieren zu können, gehören Organismen der Gattung *Bacillus* (v.a. *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* und *B. licheniformis*) zu den bevorzugten Organismen für die industrielle, extrazelluläre Produktion hydrolytischer Enzyme (Gupta *et al.*, 2002; Schallmey *et al.*, 2004). Zwar stehen inzwischen effiziente Expressions- und Sekretionssysteme für *Bacilli* zur Verfügung, dennoch gibt es weiterhin zahlreiche Engpässe im Sekretionsablauf und einen dementsprechend hohen Bedarf für die Optimierung derselben (Li *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2007). Vor allem für die Sekretion von heterologen Proteinen ist einer dieser Engpässe die Erkennung durch die Komponenten des Sec-Apparates und der damit verbundene Transport zur Cytoplasmamembran, sowie die darauf folgende Translokation. Für diesen Prozess ist die Auswahl eines effizienten Signalpeptids von entscheidender Bedeutung. Für die bisher veröffentlichten Ansätze zur Identifikation und Anwendung effizienter Signalpeptide wurden bisher zumeist Stämme ausgewählt, die in erster Linie

molekularbiologisch leicht zu handhaben waren (Brockmeier *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2008; Mathiesen *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2009; Caspers *et al.*, 2010). Die für die industrielle Produktion von Enzymen verwendeten Stämme sind jedoch meist auf besonders hohe Expressions- und Sekretionsleistung ausgelegt und molekularbiologisch oft schwerer zugänglich (Maurer, 2004). Um zu untersuchen, inwieweit sich auch die Sekretionsleistung von Hochleistungs-Sekretionsstämmen durch ein Signalpeptid-Screening optimieren lässt, wurde im Folgenden ein Signalpeptid-Screening im Stamm *B. licheniformis* H402 mit zwei verschiedenen, anwendungstechnisch interessanten alkalischen Subtilisin Proteasen durchgeführt. Dabei sollte außerdem erstmals untersucht werden, ob sich die Proteinsekretion mit Hilfe von wirtsfremden Signalpeptiden optimieren lässt. Inzwischen wurden zwar diverse Ansätze zur Identifikation effizienter Signalpeptide veröffentlicht, allerdings wurden in Form einer Signalpeptid-Bank bisher ausschließlich wirtseigene oder mutagenisierte SP eingesetzt (Brockmeier *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2008; Mathiesen *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2009; Caspers *et al.*, 2010). Eine Signalpeptid-Bank mit 173 SP aus *B. subtilis* konnte erfolgreich für die Optimierung der heterologen Proteinsekretion in *B. subtilis* angewendet werden (Brockmeier *et al.*, 2006). Im Folgenden soll untersucht werden, ob sich mit Hilfe dieser Signalpeptid-Bank auch die Proteinsekretion vom Hochleistungs-Sekretionsstamm *B. licheniformis* H402 optimieren lässt. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Methoden zur Durchmusterung von Signalpeptid-Banken, wurden in dieser Arbeit ein Screening mit 173 SP aus *B. subtilis* im Wirt *B. licheniformis* durchgeführt und daher erstmals wirtsfremde SP für die Sekretionsoptimierung verwendet.

3.2.1 Klonierung der Proteasen A und L in den Bacillus-Vektor pBSMu5

Für die Durchmusterung der Signalpeptid-Bank sollten die Subtilisin Proteasen ProtA aus *B. lentus* und ProtL aus *B. gibsonii* über *EcoRI* und *BamHI* in den *Bacillus*-Vektor pBSMu5 kloniert werden. Dafür war es erforderlich, eine intern in *protA* vorkommende *EcoRI*-Schnittstelle zu eliminieren. Dies wurde mit Hilfe von Overlap-Extension-PCR (2.11.2) und der Primer „A_eco#ov_up“ und „A_eco#ov_dn“ sowie der beiden nicht modifizierten Primern „A_up“ und „A_dn“ durchgeführt. Für die Klonierung von *protL* mussten eine *EcoRI*- sowie eine *HindIII*-Schnittstelle in zwei aufeinanderfolgenden Durchgängen von Overlap-Extension PCRs entfernt werden. Dafür wurden die Primer „L_eco#ov_up“, „L_eco#ov_dn“, „L_hind#ov_up“ und „L_hind#ov_dn“ konstruiert und in Kombination mit den Primern „L_up“ und „L_dn“ die Schnittstellen über das Einfügen von stillen Mutationen entfernt (2.11.2). Die Eliminierung der Schnittstellen wurde mit Hilfe von Restriktionsanalysen und Sequenzierung (2.12) überprüft. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt, mit den Endonukleasen *EcoRI* und *BamHI* hydrolysiert und anschließend mit dem ebenfalls hydrolysierten Zielvektor pBSMu5 ligiert (2.8). Das Konstrukt mit *protA* wurde als pBSMu5A und das Konstrukt mit *protL* als

pBSMu5L bezeichnet. Das Benchmark-Signalpeptid SubC wurde mit Hilfe der Primer „SubC_up“ und „SubC_dn“ amplifiziert und in pBSMu5A bzw. pBSMu5L kloniert. Für die Identifikation von verbesserten SP für beide Sekretionstargets sollte die Signalpeptid-Bank mit 173 SP aus *B. subtilis* (Brockmeier *et al.*, 2006) eingesetzt werden. Dafür wurde ein Gemisch aller SP über *Hind*III und *Eco*RI in den *Bacillus*-Vektor pBSMu5 mit dem entsprechenden Sekretionstarget kloniert. Die detaillierte Klonierungsstrategie ist in Abb. 8 dargestellt.

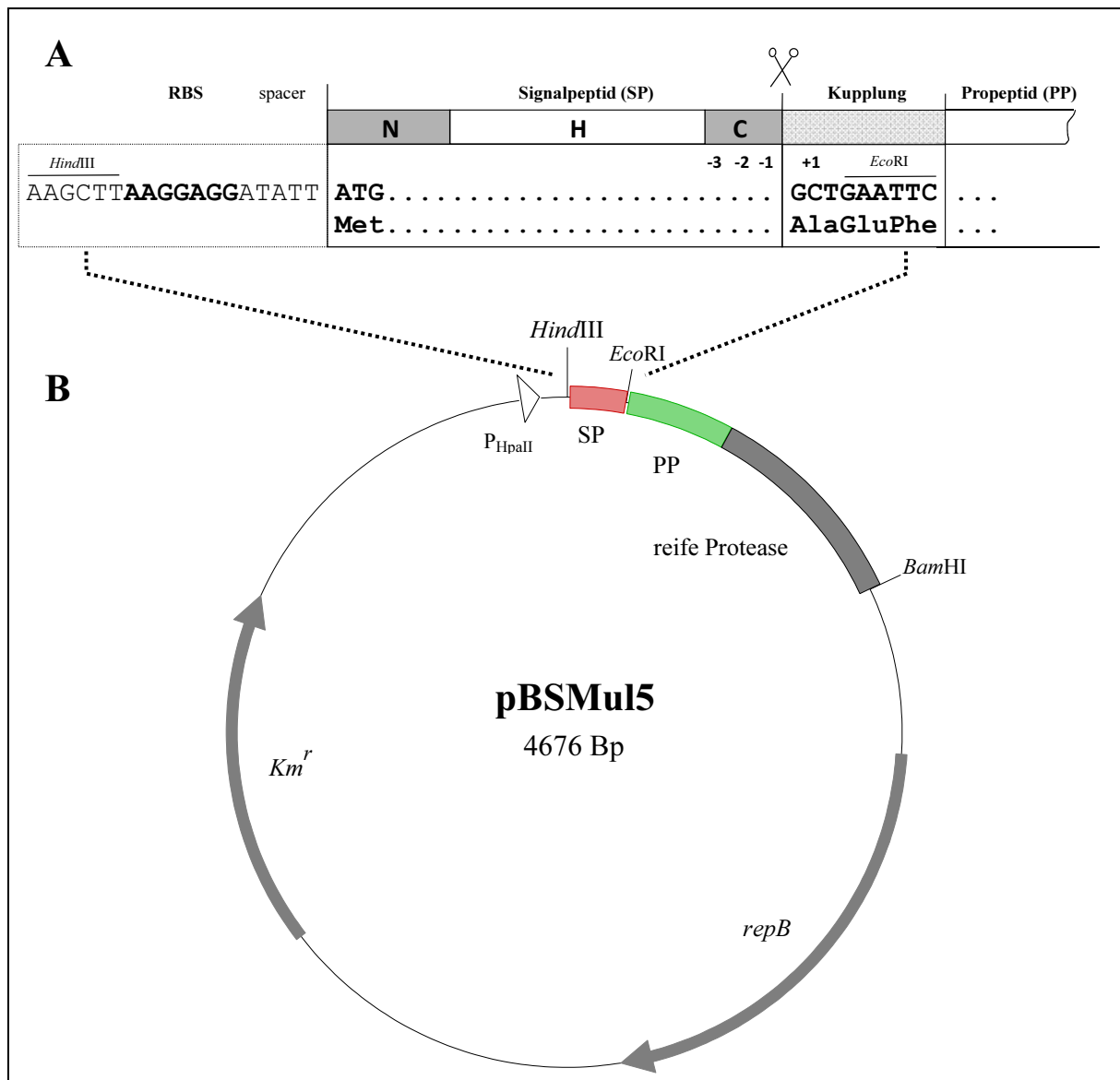


Abb. 8: Schema der Klonierungsstrategie für das Signalpeptidscreening im *Bacillus*-Vektor pBSMu5 (modifiziert nach Brockmeier *et al.*, 2006). (A) Alle SP wurden mit einer N-terminalen *Hind*III-Restriktionsschnittstelle, einer standardisierten Ribosomenbindestelle (RBS) gefolgt von einer Spacer-Region und dem standardisierten Startcodon für Methionin amplifiziert. Zwischen SP und N-Terminus des Sekretionstargets wurde eine Kupplung mit einem Alanin an der „+1“-Position und der *Eco*RI-Restriktionsschnittstelle angefügt. (B) Vektorkarte des *Bacillus*-Vektors pBSMu5 mit dem starken, konstitutiven *Hpa*II-Promotor, dem jeweiligen Sekretionstarget kloniert über *Eco*RI und *Bam*HI, sowie der Kanamycin-Resistenz-Kassette und dem Replikationsprotein *repB* für *Bacillus*.

3.2.2 Optimierung des Exports von zwei Proteasen in einem *Bacillus licheniformis* Hochleistungs-Sekretionsstamm

Bei den in Abschnitt 3.2.1 klonierten Proteasen handelt es sich um anwendungstechnisch interessante Proteasen des Subtilisin-Typs. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich der Export dieser Proteasen in einem Hochleistungs-Sekretionsstamm wie *B. licheniformis* H402 weiter optimieren lässt. Da *B. licheniformis* H402 über ein Restriktions-Modifikationssystem verfügt, welches fremde Plasmid-DNA effektiv degradiert, erwies sich die Transformation des Stammes als sehr aufwendig und ineffizient, was das SP-Screening erheblich erschwerte. Für die Durchführung des SP-Screenings mit Protease A aus *B. lentus* und Protease L aus *B. gibsonii* wurde die Klonierung der Signalpeptid-Bank daher in *B. subtilis* vorgenommen. Dafür wurden pBSM_{ul5A} bzw. pBSM_{ul5L} mit den Endonuclease *Hind*III und *Eco*RI hydrolysiert und mit dem Gemisch der 173 SP aus *B. subtilis* ligiert. Im darauffolgenden Schritt wurde *B. subtilis* TEB1030 mit den Ligationsansätzen mittels Protoplastierung transformiert (2.10.3), die auf DM3-Agarplatten generierten Transformanten auf LB-Agarplatten überstempelt und ÜN inkubiert. Anschließend wurden die Klone von den LB-Agarplatten abgeschwemmt und die Plasmid-DNA aus diesem Gemisch der Transformanten isoliert (2.6). Vor der Transformation von *B. licheniformis* H402 mittels Elektroporation (2.10.4) wurde die Plasmid-DNA mit stamm-eigenen Enzymen methyliert (2.9). Im Genom von *B. licheniformis* H402 sind die Gene der extrazellulären Proteasen AprE und Mpr deletiert, um eine möglichst geringe proteolytische Hintergrundaktivität im Kulturüberstand zu erzielen. Für die durchgeführten SP-Screenings wurde teilweise ein Vorläuferstamm verwendet (*B. licheniformis* H101), der nicht über diese Deletionen verfügte. Für die im Folgenden beschriebenen Arbeiten konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Stämmen festgestellt werden und daher wurde die Verifizierung der im Screening ermittelten Ergebnisse ausschließlich in *B. licheniformis* H402 durchgeführt.

Im Fall von Protease L wurden nur 86 *B. licheniformis* Klone in DW-MTP kultiviert und die Signalpeptid-Bank aus *B. subtilis* bisher nicht vollständig abgedeckt. In Tab. 9 ist eine Übersicht über die Anzahl der Transformanten von *B. subtilis* und *B. licheniformis* sowie Angaben zur Hofbildung der Transformanten auf LB-Agarplatten mit Skim-Milk und die in DW-MTP angezogenen Klone gegeben.

Tab. 9: Übersicht über die Anzahl der Transformanten von *B. subtilis* und *B. licheniformis*, die hofbildenden Klone und die in DW-MTP Anzuchten kultivierten Klone aus dem SP-Screening mit Protease A und L.

Organismus/Enzym	Transformanten	Hofbildner	DW-MTP Anzucht
Protease A			
<i>B. subtilis</i>	ca. 400	ca. 280	/
<i>B. licheniformis</i>	ca. 780	ca. 345	218
Protease L			
<i>B. subtilis</i>	ca. 700	ca. 500	/
<i>B. licheniformis</i>	ca. 230	ca. 200	86

Von allen in DW-MTP kultivierten Klonen wurde die proteolytische Aktivität (2.17) im Kulturüberstand mit dem Substrat AAPF bestimmt, in Relation zu der proteolytischen Aktivität des Benchmark-Konstruktes mit SP SubC aus *B. licheniformis* (NCBI Accession Number: X91260.1) gesetzt und anhand dessen die Sekretionseffizienz der verschiedenen Konstrukte ermittelt. Bei SubC handelt es sich um ein etabliertes SP für die Sekretion von Protease A und L. Die im SP-Screening ermittelten Sekretionsleistungen für verschiedene Konstrukte aus Protease A mit unterschiedlichen SP im Wirt *B. licheniformis* wurden in Abb. 9 dargestellt.

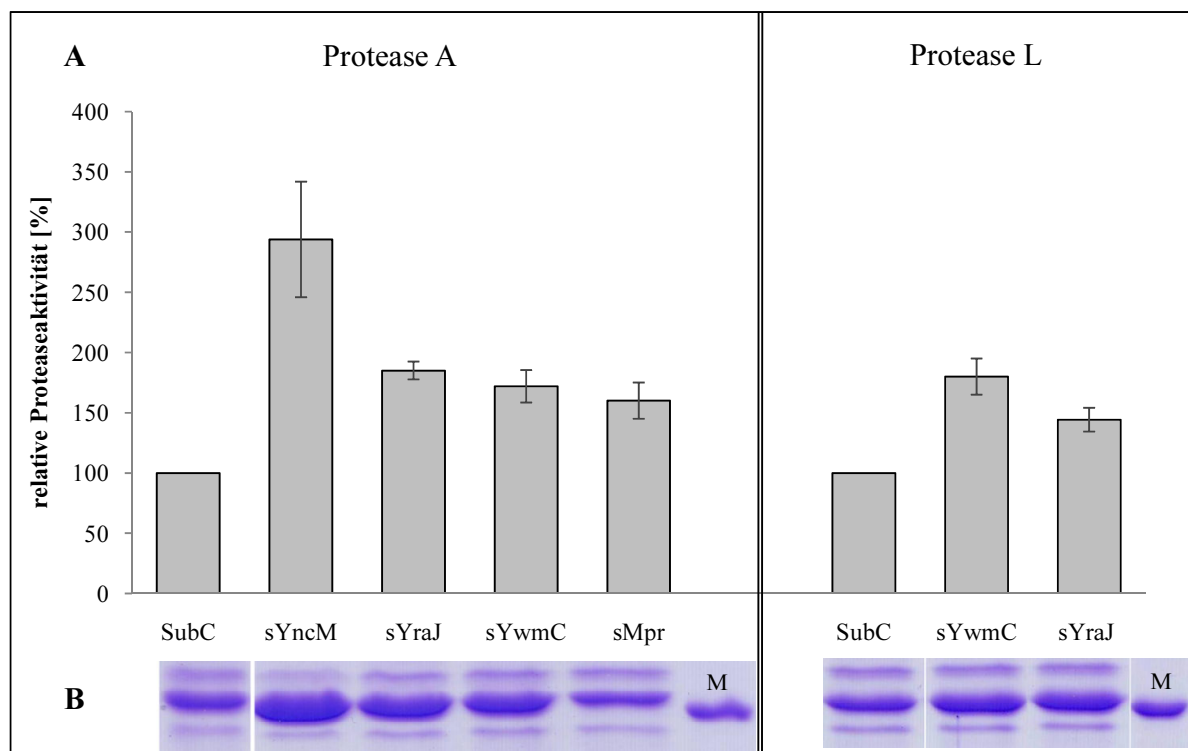


Abb. 9: Proteolytische Aktivität im Kulturüberstand von *B. licheniformis* H402 der im SP-Screening identifizierten Konstrukte mit den besten Sekretionsleistungen für die Sekretion von Protease A und L. (A) Dargestellt ist jeweils die relative proteolytische Aktivität mit dem Substrat AAPF im Kulturüberstand der Konstrukte mit verschiedenen SP aus *B. subtilis* für Protease A und Protease L. Das „s“ vor dem Namen des jeweiligen SP (z.b. sMpr) gibt an, dass das SP aus *B. subtilis* stammt. Bei „SubC“ handelt es sich um das Konstrukt aus pBSM_{ul5A} bzw. pBSM_{ul5L} mit dem Benchmark-SP SubC aus *B. licheniformis*. (B) Bestimmung

der Proteinmenge von Protease A und L im Kulturüberstand mittels SDS-PAGE Analyse. Die gesamten Proteine aus jeweils 75 µl Kulturüberstand wurden mittels TCA-Proteinfällung aufkonzentriert und aufs Gel aufgetragen. Das Molekulargewicht der gezeigten Bande des Proteinmarkers (M) lag bei 27 kDa.

Wie in Abb. 9 erkennbar konnten sowohl für Protease A, als auch für Protease L Signalpeptide identifiziert werden, die eine deutlich verbesserte Sekretion als das Benchmark-SP SubC in *B. licheniformis* H402 bewirkten. Für Protease L konnte die Sekretionsleistung von *B. licheniformis* H402 mit pBSMu5L_sYwmC um 80 % auf 180 % gesteigert werden. Für Protease A wurde mit pBSMu5A_sYncM ein Konstrukt identifiziert, das eine Erhöhung der Sekretionsleistung des Stammes auf ca. 300 % bewirken konnte. In SDS-PAGE Analysen wurde die Korrelation von Proteinmenge im Kulturüberstand und extrazellulärer proteolytischer Aktivität untersucht (Abb. 9, B). Die zu erwartenden Molekulargewichte beider Proteasen wurden anhand der Aminosäuresequenz berechnet. Nach der erfolgreichen Translokation sollte im Kulturüberstand nur die reife Protease, ohne Signalpeptid und ohne Propeptid vorliegen. Dementsprechend wurde für Protease A ein Molekulargewicht von 27 kDa und für Protease L ein Molekulargewicht von 27,4 kDa ermittelt. Die in Abb. 9 gezeigte Bande des Proteinmarkers läuft auf einer Höhe, die laut Herstellerangaben einem Molekulargewicht von 27 kDa entspricht. Die Proteinbanden, die in den verschiedenen Stämmen mit den Signalpeptid-Konstrukten eine deutlich Zu- bzw. Abnahme zeigten, laufen daher auf der erwarteten Höhe und dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass es sich um die jeweilige Protease handelt. Die Proteinmenge der Proteasen im Kulturüberstand korreliert in den meisten Fällen sehr gut mit der ermittelten proteolytischen Aktivität (Abb. 9, B).

3.2.3 Untersuchungen zum Einfluss des N-Terminus der Substratproteine auf die Sekretionseffizienz mit verschiedenen Signalpeptiden

Die in Abschnitt 3.2.2 eingesetzten Proteasen A und L verfügen über das gleiche Propeptid (siehe Anhang) und sind insgesamt (ohne Signalpeptid) zu 83 % auf Aminosäuresequenzebene identisch. Das Propeptid wird nach erfolgreicher Translokation autokatalytisch abgespalten und die reife Protease erlangt erst dann die endgültige Konformation und wird aktiviert. Es ist bekannt, dass der N-Terminus des Substratproteins einen Einfluss auf die Sekretionseffizienz hat (Choo & Ranganathan, 2008). Daher sollten im Folgenden gezielt verschiedene SP mit potentiell unterschiedlichen Sekretionseffizienzen vor Protease A und L kloniert und die Sekretionsleistungen mit beiden Proteasen verglichen werden.

Dafür wurden vier verschiedene SP aus *B. subtilis* und auch sechs SP aus *B. licheniformis* mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Hind*III und *Eco*RI in pBSMu5A bzw. pBSMu5L kloniert. Anschließend wurden *B. subtilis* (2.10.3) bzw. *B. licheniformis* (2.10.4) mit den Konstrukten transformiert, die Klonierung mittels

Sequenzierung überprüft und die Klone in Mehrfachbestimmungen in DW-MTP kultiviert (2.4.5). Anhand der proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand (2.17) wurde die Sekretionseffizienz der einzelnen SP mit der jeweiligen Protease ermittelt und in Relation zur Sekretionsleistung des Benchmark-SP SubC gesetzt (Abb. 10).

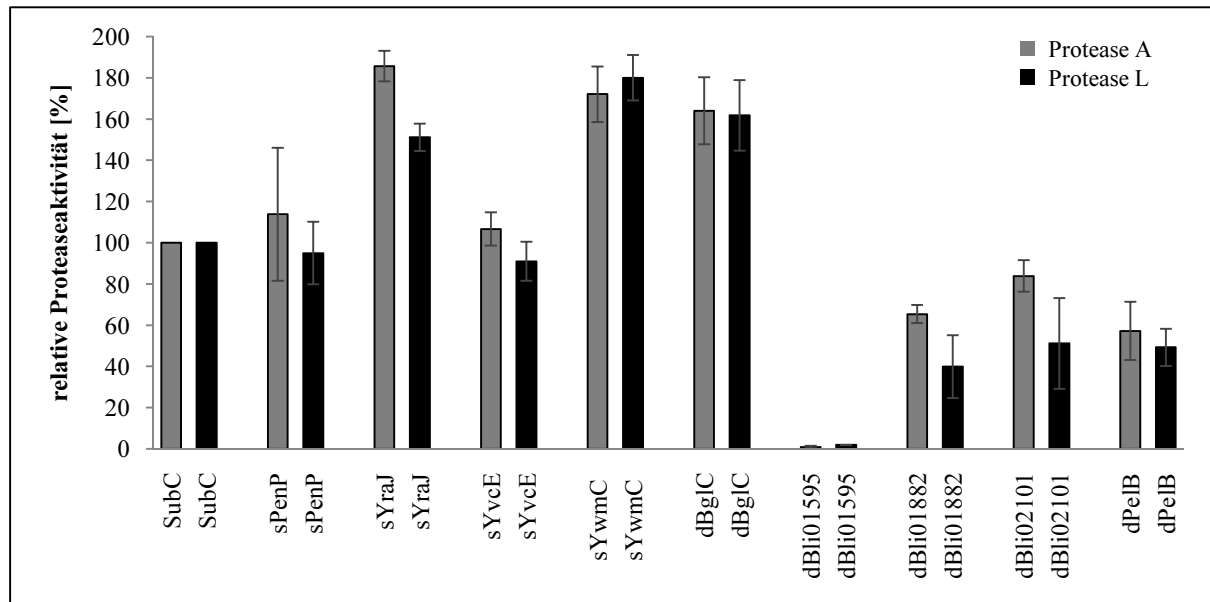


Abb. 10: Darstellung der Sekretionsleistung von zehn verschiedenen Signalpeptiden mit Protease A und Protease L in *B. licheniformis* H402 zur Untersuchung des Einflusses vom N-Terminus des sekretierten Proteins. Dargestellt ist jeweils die in Relation zum Benchmark-SP SubC ermittelte, proteolytische Aktivität mit dem Substrat AAPF im Kulturüberstand von verschiedenen Konstrukten mit SP aus *B. subtilis* und *B. licheniformis* mit Protease A (graue Balken) und Protease L (schwarze Balken). Die Fehlerbalken geben die prozentuale Standardabweichung zwischen den Werten aus voneinander unabhängig durchgeführten MTP-Anzuchten an. Ein „s“ vor dem Namen des SP gibt an, dass das SP aus *B. subtilis* stammt, während ein „d“ *B. licheniformis* DSM13 als Herkunft definiert.

Wie in Abb. 10 dargestellt, wiesen die verschiedenen SP sehr ähnliche Sekretionseffizienzen für die beiden ausgewählten Proteasen A und L auf. Während z.B. mit SP dBli01595 für beide Proteasen keine Sekretion erreicht werden konnte, wies SP sYwmC und dBglC mit beiden Proteasen sehr gute Sekretionseffizienzen auf. Auch die Sekretionseffizienzen der übrigen SP waren mit beiden Proteasen sehr ähnlich.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die Sekretionsleistung für zwei verschiedene Proteasen im Stamm *B. licheniformis* H402 sowohl mit wirtsfremden SP aus *B. subtilis*, als auch mit wirtseigenen SP aus *B. licheniformis* (dBglC) effizient steigern ließ.

3.2.4 Konstruktion der Signalpeptid-Bank mit 220 *Bacillus licheniformis* DSM13 Signalpeptiden

Nachdem in Abschnitt 3.2 gezeigt werden konnte, dass der Export verschiedener Proteasen auch mit wirtsfremden SP signifikant gesteigert werden konnte, sollte im Folgenden im größeren Maßstab untersucht werden, welche Sekretionsleistungen sich mit SP aus verschiedenen Organismen in unterschiedlichen *Bacillus*-Wirten erreichen lassen. Dafür sollten alle SP aus *B. licheniformis* DSM13 für die Konstruktion einer neuen SP-Bank amplifiziert werden. Für die Konstruktion der SP-Bank wurden die Signalpeptid-Vorhersagen von Voigt *et al.* (2006) verwendet. Für alle dieser 220 Signalpeptide wurde eine Erkennungssequenz für Typ I Signalpeptidasen vorhergesagt (siehe Anhang, Tab. 15). Für 19 der 220 SP wurden von Voigt *et al.* (2006) potentielle Tat-Erkennungssequenzen identifiziert. In *B. subtilis* wurde bisher von 69 SP mit potentiellen Erkennungssequenzen für die Tat-Sekretion nur für zwei Proteine (PhoD und YwbN) eine Tat-abhängige Sekretion nachgewiesen und für 13 dieser SP hingegen eine Sec-Sekretion (Jongbloed *et al.*, 2002; Kolkman *et al.*, 2008). Da die Vorhersage von Tat-abhängig sekretierten Proteinen bisher schwierig scheint, wurden auch die SP der potentiell Tat-sekretierten Proteine aus *B. licheniformis* DSM13 für das geplante SP-Screening mit amplifiziert.

Für die Erstellung der Signalpeptid-Bank wurde die genomische DNA von *B. licheniformis* DSM13 isoliert (2.6) und insgesamt 220 Signalpeptide von *B. licheniformis* DSM13 mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend über Agarose-Gelelektrophorese (2.7) aufgereinigt und in einer weiteren Agarose-Gelelektrophorese in Bezug auf Konzentration und Fragment-Größe kontrolliert und äquimolar vermischt. Alle für die Amplifikation der einzelnen SP konstruierten Primer sind im Anhang (Tab. 17) aufgeführt.

Der so erstellte SP-Mix wurde im Gemisch in den Vektor pBSMu5 kloniert, der das jeweilige Zielprotein enthielt. Für die Bestimmung der Religationsrate wurden 30 Klone willkürlich, mit und ohne Hof gepickt und in Restriktionsanalysen überprüft, ob jeweils erfolgreich ein SP kloniert wurde. Dabei wurde eine Religationsrate <10 % ermittelt. Der vollständige Ablauf der Signalpeptid-Bank-Konstruktion ist schematisch in Abb. 11 dargestellt.

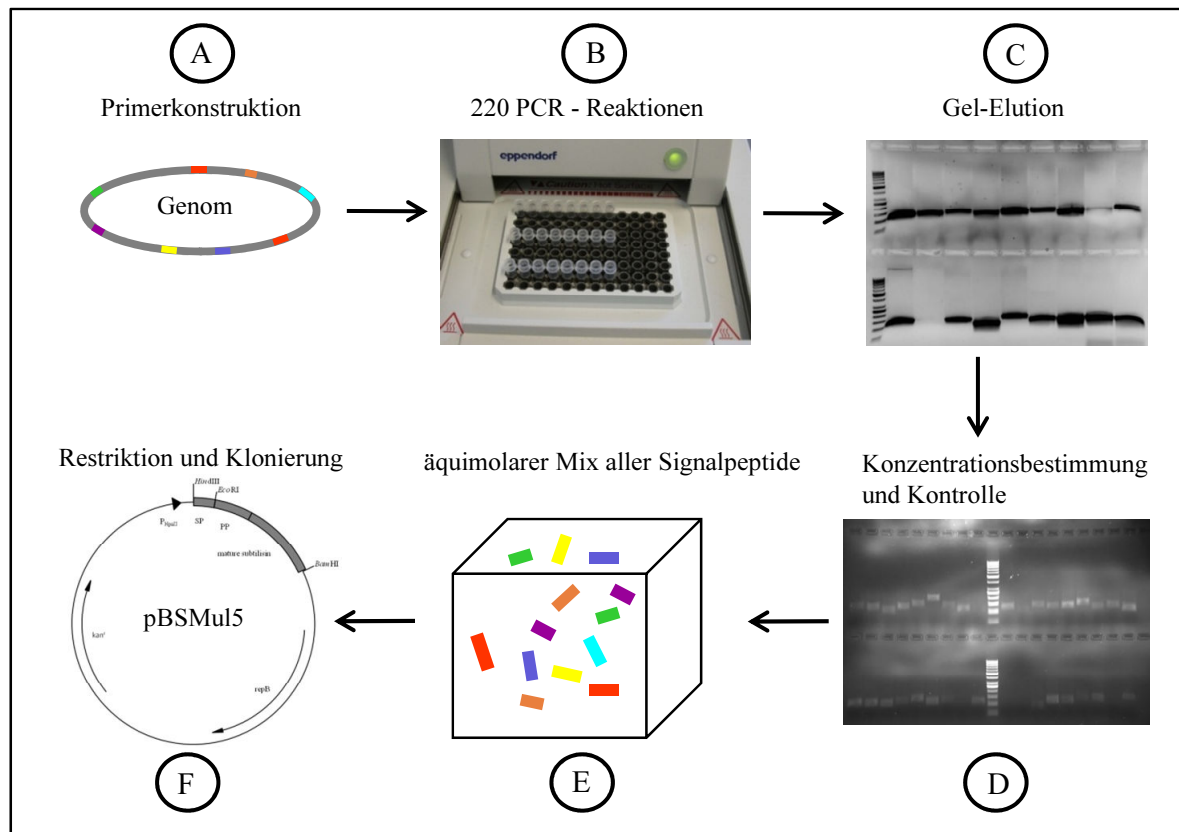


Abb. 11: Konstruktion der Signalpeptid-Bank mit 220 *B. licheniformis* DSM13 Signalpeptiden. (A) Für die Konstruktion der Primer wurden die SP-Vorhersagen von Voigt *et al.* (2006) verwendet. (B) Die SP wurden alle mittels PCR und der genomischen DNA von *B. licheniformis* DSM13 amplifiziert. (C) Alle PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Gelelution aufgereinigt. (D) Mit Hilfe einer weiteren Agarose-Gelelektrophorese wurden Größe und Konzentration des gereinigten PCR-Produkts kontrolliert. (E) Nach der Aufkonzentration von schwach konzentrierten Eluaten, wurden alle SP äquimolar vermisch. (F) Der Mix aller 220 SP wurde mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Eco*RI hydrolysiert und in den Vektor pBSMu15 mit dem entsprechenden Zielgen kloniert.

Der Export von zwei anwendungstechnisch interessanten Subtilisin-Proteasen konnte in einem *B. licheniformis* Hochleistungs-Sekretionsstamm teilweise um das Dreifache im Vergleich zum Benchmark-Stamm gesteigert werden. Dafür wurde eine Signalpeptid-Bank mit wirtsfremden Signalpeptiden aus *B. subtilis* Signalpeptiden verwendet. Für die Erhöhung der Diversität der verfügbaren Signalpeptid-Banken wurden außerdem 220 Signalpeptide aus *B. licheniformis* DSM13 mittels PCR amplifiziert, aufgereinigt und die Fragmentgröße sowie DNA-Konzentration kontrolliert. Des Weiteren wurde untersucht welchen Einfluss der N-Terminus des Substratproteins auf die Exporteffizienz mit verschiedenen Signalpeptiden hat.

3.3 Wirtsfremde Signalpeptide zur Optimierung der heterologen Proteinsekretion von *Bacillus*

Als Modell-Protein für die Untersuchung der heterologen Proteinsekretion in verschiedenen *Bacillus*-Wirten mit SP aus unterschiedlichen Organismen wurde das Subtilisin „*Bacillus* Protease Novo type“ (BPN[‘]) aus *B. amyloliquefaciens* ATCC 23844 (Tab. 2) ausgewählt. Bei Subtilisin BPN[‘] handelt es sich um eine alkalische Protease, die der Klasse der Serinproteasen zugeordnet wird. Serinproteasen finden beispielsweise eine breite Anwendung in der Waschmittelindustrie und werden daher jährlich im Tonnenmaßstab produziert (Maurer, 2004). Daher ist der Bedarf an Methoden zur Optimierung der Sekretion dieser Enzyme sehr groß.

Des Weiteren ergab sich daraus die interessante Fragestellung, ob sich Muster erkennen lassen, die darauf hindeuten, dass wirtseigene Signalpeptide gegenüber wirtsfremden bevorzugt werden. Daher sollte außerdem die Sekretionseffizienz von Konstrukten mit BPN[‘] und verschiedenen SP in unterschiedlichen *Bacillus*-Wirten miteinander verglichen werden.

3.3.1 Klonierung von Subtilisin BPN[‘] und dem Benchmark-Signalpeptid

Für die folgenden Arbeiten war es erforderlich, das ausgewählte Modellprotein Subtilisin BPN[‘] aus *B. amyloliquefaciens* ATCC 23844 (NCBI Accession Number: K02496.1) in den *Bacillus*-Expressionsvektor pBSMul5 zu klonieren. Dafür wurde die genomische DNA von *B. amyloliquefaciens* isoliert (2.6) und BPN[‘] mittels PCR (2.11.1) und den Primern „BPN_up“ und „BPN_dn“ (Tab. 4) amplifiziert. Dabei wurden die Primer so konstruiert, dass nur das Propeptid und der reife Teil von BPN[‘] ohne das Signalpeptid amplifiziert wurden. Das PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Elution gereinigt (2.7), mit den Endonukleasen *EcoRI* und *BamHI* hydrolysiert und in den ebenfalls mit *EcoRI* und *BamHI* hydrolysierten Zielvektor pBSMul5 kloniert. Im Anschluss daran wurde das so konstruierte Plasmid pBSMul5BPN mittels Protoplastentransformation (2.10.3) in *B. subtilis* TEB1030 eingebracht und sequenziert (2.12).

Um zu untersuchen, ob sich durch die Verwendung verschiedener SP Steigerungen der Sekretionsleistung von BPN[‘] erreichen lassen, sollte das wildtypische SP von BPN[‘] mit Ursprung in *B. amyloliquefaciens* als Benchmark-SP amplifiziert werden. Dieses Benchmark-SP für Subtilisin BPN[‘] wird im Folgenden als „wtSP“ bezeichnet (siehe Anhang, Tab. 16). Für die Amplifikation des „wtSP“ wurden die Primer „wtSP_up“ und „wtSP_dn“ verwendet, das aufgereinigte PCR-Produkt (2.11.1) und der Zielvektor pBSMul5BPN wurden mit *HindIII* und *EcoRI* hydrolysiert und das „wtSP“ vor das Subtilisin BPN[‘] kloniert. Das konstruierte Plasmid wurde als pBSMul5BPN_wtSP bezeichnet und diente als Benchmark-Konstrukt, dessen Sekretionseffizienz im Screening der SP-Banken als 100 % definiert wurde (2.18).

3.3.2 Die Kupplung zwischen Signalpeptid und Propeptid hat einen hohen Einfluss auf den Proteaseexport

Alle in dieser Arbeit für das Screening klonierten SP wurden nach der in Abb. 8 dargestellten Klonierungsstrategie vor das entsprechende Zielenzym kloniert. Dabei wurde eine Kupplung von 9 Basenpaaren verwendet, die eine *EcoRI*-Schnittstelle beinhaltet und für das standardisierte „+1“-Alanin kodiert (Abb. 8). Nach der Translokation des sekretierten Proteins über die Cytoplasmamembran wird das SP durch die Signalpeptidasen abgespalten. Bei der hier gewählten Klonierungsstrategie bleiben dabei drei Aminosäuren am Propeptid zurück. Es ist denkbar, dass diese zusätzlichen drei Aminosäuren am N-Terminus einen Einfluss auf die Eigenschaften des sekretierten Proteins haben. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zielproteinen handelt es sich ausschließlich um Proteasen mit einem N-terminalen Propeptid. Die drei zusätzlichen Aminosäuren aus der Kupplung verändern daher das Propeptid der reifen Protease. Das Propeptid ist ein Faltungshelfer, der autokatalytisch nach der Translokation des Proteins abgespalten wird. Es hat einen direkten Einfluss auf die Aktivierung und die Faltung der reifen Protease (Takagi & Takahashi, 2003).

Somit verändert die Kupplung nicht die reife Protease, sondern das Propeptid. Dennoch sind Fälle bekannt, wo eine Veränderung des Propeptids auch die Eigenschaften der reifen Protease beeinflussen kann (Shinde *et al.*, 1997). Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Kupplung einen Einfluss auf die Proteaseaktivität von Subtilisin BPN⁺ hat. Dafür wurde Subtilisin BPN⁺ mit seinem wildtypischen SP aus *B. amyloliquefaciens* ohne Kupplung amplifiziert. In einer PCR-Reaktion wurden dafür die Primer „wtSP_up“ und „BPN_dn“ eingesetzt (2.11.1), das aufgereinigte PCR-Produkt mit *HindIII* und *BamHI* hydrolysiert und in den Zielvektor pBSMu5 kloniert. Das so konstruierte Plasmid wurde als pBSMu5BPN_wtSPkk bezeichnet. Nach der Transformation von *B. subtilis* TEB1030 (2.10.3) wurden der Stamm mit Plasmid pBSMu5BPN_wtSP (kloniert wie in Abb. 8) und pBSMu5BPN_wtSPkk (kloniert ohne Kupplung zwischen SP und PP) parallel in DW-MTP kultiviert, um die Proteaseaktivität im Kulturüberstand zu ermitteln (2.17).

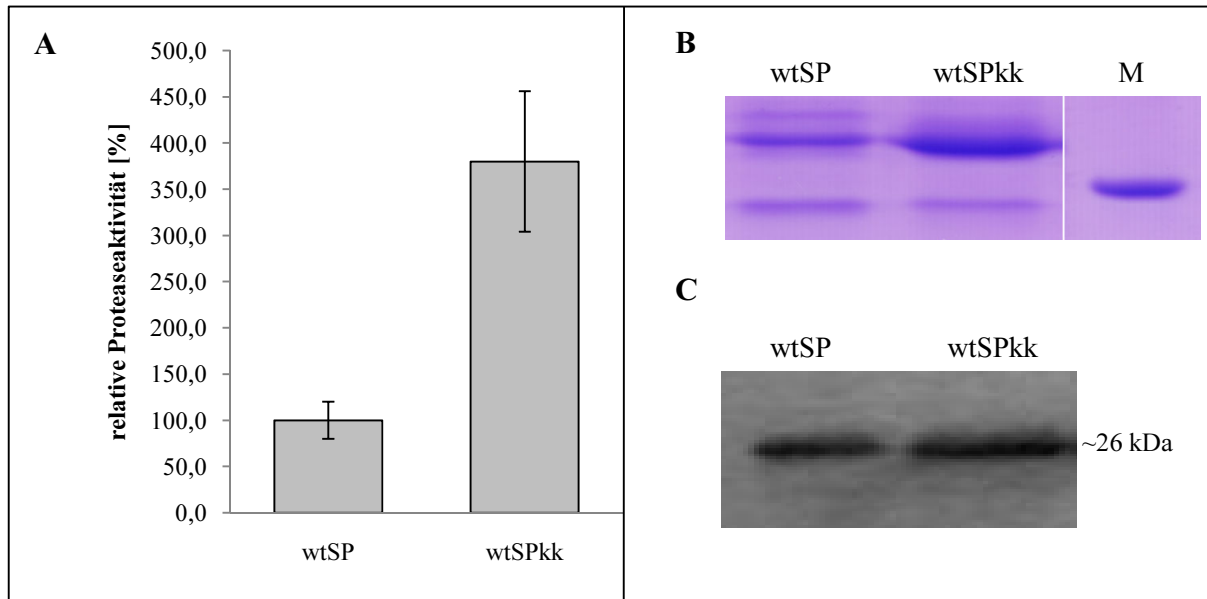


Abb. 12: Einfluss der im Hochdurchsatz-Screening verwendeten Kupplung auf den Protease-Export von Subtilisin BPN'. (A) Dargestellt ist jeweils die relative proteolytische Aktivität im Kulturüberstand mit AAPF als Substrat von *B. subtilis* TEB1030. Bei „wtSP“ handelt es sich um pBSMul5BPN_wtSP, bei dem die Kupplung eingefügt wurde und bei „wtSPkk“ handelt es sich um das Konstrukt aus BPN' und dem wtSP, bei dem keine Kupplung zwischen SP und PP eingefügt wurde. Die Fehlerbalken geben die prozentuale Standardabweichung zwischen fünf voneinander unabhängigen Anzuchten in verschiedenen DW-MTP an. (B) Untersuchung der Proteinmenge im Kulturüberstand in einer SDS-PAGE Analyse. Dafür wurden 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die gezeigte Bande des Proteinmarkers (M) entspricht laut Herstellerangaben 27 kDa. (C) Bestimmung der Proteinmenge im Kulturüberstand mittels Western-Blot Analyse und spezifischen Antikörpern für Subtilisin BPN'. Anhand des Proteinmarkers auf der nachträglich gefärbten PVDF-Membran des Western-Blots wurde für das detektierte Signal ein Molekulargewicht von etwa 26 kDa ermittelt.

Wie in Abb. 12 (A) erkennbar wurde für das Konstrukt ohne Kupplung eine ca. 4x erhöhte proteolytische Aktivität im Kulturüberstand detektiert. Dies deutet darauf hin, dass entweder die Sekretion oder die Faltung und Aktivierung bzw. die Konformation der reifen Protease selber durch das Einfügen der Kupplung beeinträchtigt wurden. Um zu untersuchen, ob die verringerte proteolytische Aktivität im Kulturüberstand beim Stamm der das Konstrukt mit Kupplung enthält, auf einen Export-Effekt oder auf eine veränderte Konformation der reifen Protease zurückzuführen ist, wurden die Proteinmengen im Kulturüberstand untersucht. Dazu wurde eine SDS-PAGE Analyse (Abb. 12, B) und zusätzlich eine Western-Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern für Subtilisin BPN' durchgeführt (Abb. 12, C). Dabei konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Aktivität im Kulturüberstand mit der in der SDS-PAGE und Western-Blot Analyse ermittelten Proteinmenge in etwa korreliert. Somit ist die spezifische Aktivität von Subtilisin BPN' nicht verändert und die Kupplung hat dementsprechend einen negativen Einfluss auf den Export von Subtilisin BPN'. Trotz des negativen Einflusses der Kupplung war die Proteaseaktivität immer noch gut detektierbar und da die SP aus *B. subtilis* und *B. licheniformis* unter den gleichen Bedingungen gescreent werden sollten, wurde die in Abb. 8 beschriebene Klonierungsstrategie fortgesetzt.

3.3.3 Signalpeptid-Screening im Wirt *Bacillus subtilis* mit wirtseigenen und wirtsfremden Signalpeptiden

Nachdem bisher ausschließlich Signalpeptid-Banken mit wirtseigenen Signalpeptiden im großen Maßstab für die Identifizierung effizienter SP durchmustert wurden, sollte im Folgenden untersucht werden, ob es möglich ist, die heterologe Proteinsekretion im Wirt *B. subtilis* TEB1030 durch das Screening von wirtsfremden Signalpeptiden zu optimieren. Dafür wurde das in 3.3.1 klonierte Modell-Protein Subtilisin BPN⁺ verwendet. Dabei war insbesondere interessant, wie effektiv sich die wirtsfremden Signalpeptide einsetzen lassen, und ob sich die Sekretionseffizienzen der Konstrukte in verschiedenen *Bacillus*-Wirten unterscheiden.

3.3.3.1 Die besten Exportleistungen wurden unter anderem mit wirtsfremden Signalpeptiden erreicht

Für die Optimierung der Proteinsekretion von BPN⁺ sollten 173 *B. subtilis*-SP und 220 wirtsfremde SP aus *B. licheniformis* auf ihre Sekretionsleistung hin untersucht werden. Im Hochdurchsatz-Screening im Wirt *B. subtilis* TEB1030 sollten die Signalpeptide mit den höchsten Sekretionseffizienzen im Vergleich zum Benchmark-Konstrukt pBSMul5BPN⁺_wtSP identifiziert werden. Dafür wurden alle SP aus *B. subtilis* und aus *B. licheniformis* vor die Protease BPN⁺ kloniert (Abb. 11). Im Anschluss daran wurde *B. subtilis* TEB1030 mittels Protoplastentransformation (2.10.3) mit den Konstrukten transformiert und die Proteaseaktivität aller Klone qualitativ auf Skim-Milk-Agarplatten überprüft (2.4.1). Für das Screening der 173 *B. subtilis* SP wurden insgesamt ca. 970 Transformanten erzeugt, von denen ca. 515 Klone eine eindeutige Lysehof-Bildung auf Skim-Milk-Agar aufwiesen. Von den hofbildenden Klonen wurden insgesamt 330 Klone in DW-MTP angezogen und die Proteaseaktivität im Kulturüberstand spektralphotometrisch ermittelt (2.17). Damit wurde für die Signalpeptid-Bank der *B. subtilis*-SP eine 5x-Abdeckung auf Skim-Milk-Agar und eine 2x-Abdeckung im Flüssigaktivitätstest erzielt. Für das Screening der 220 *B. licheniformis* SP zeigten ca. 480 der 950 erzeugten Transformanten eine eindeutige Hofbildung auf Skim-Milk-Agar. Für die spektralphotometrische Bestimmung der proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand mit AAPF als Substrat wurden insgesamt 420 Klone in DW-MTP kultiviert. Somit wurde die SP-Bank in 4x-Abdeckung auf Skim-Milk-Agar und in ca. 2x-Abdeckung im Flüssigaktivitätstest gescreent.

Bei beiden SP-Screenings zeigten somit ca. 50 % der Transformanten eine eindeutige Hofbildung auf Skim-Milk-Agar nach einer ÜN-Inkubation. Davon ausgehend, dass keine Konstrukte in der Ligation und Transformation benachteiligt oder bevorzugt werden, deutet dies darauf hin, dass etwa 50 % der SP eine gute und die übrigen keine oder nur eine sehr schwache Sekretion von BPN⁺ bewirken, da die Religationsrate unter 10 % lag.

In Abb. 13 ist beispielhaft die Auswertung der proteolytischen Aktivität aller Klone auf einer der MTP aus dem Screening dargestellt. Es wurde jeweils spektralphotometrisch die proteolytische Aktivität im Kulturüberstand ermittelt (2.17). Da für die quantitative Bestimmung der proteolytischen Aktivität ausschließlich Klone mit Lysehof verwendet wurden, war in den meisten Fällen auch im Kulturüberstand eine deutliche proteolytische Aktivität detektierbar.

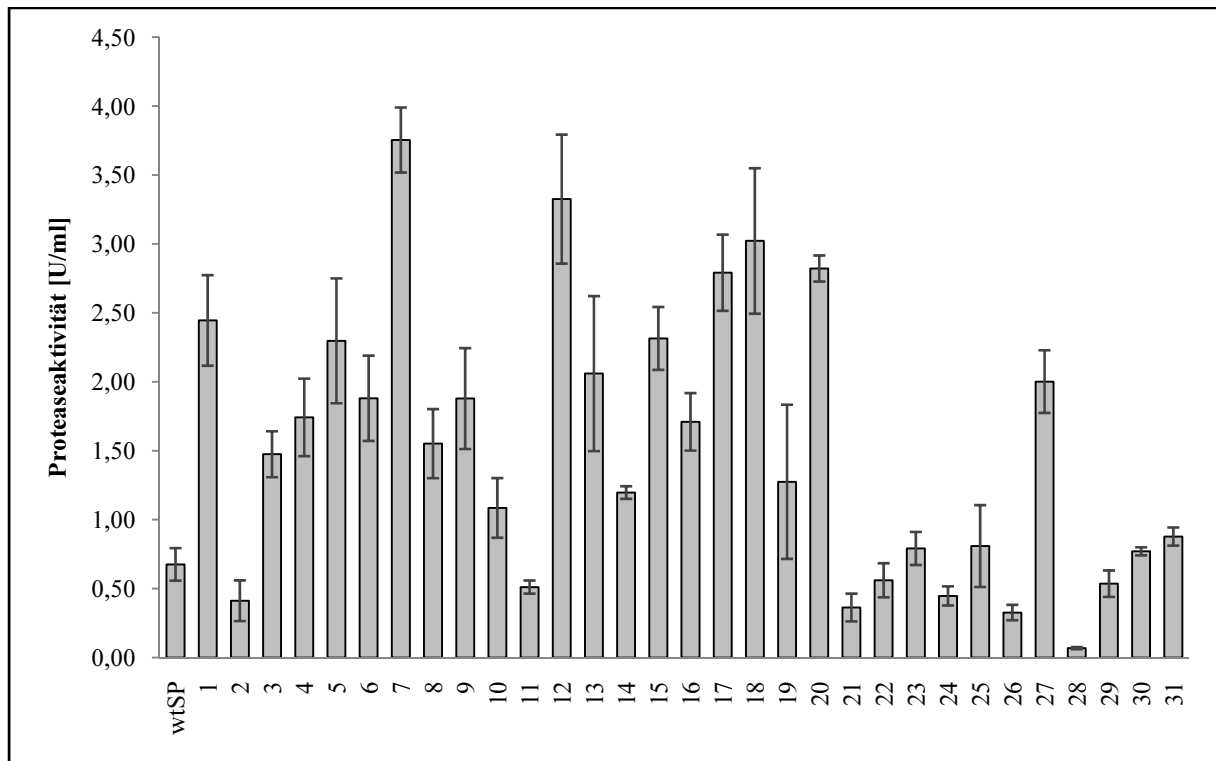


Abb. 13: Beispielhafte Darstellung der proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand von *B. subtilis* aller Klone von einer typischen MTP aus dem Signalpeptid-Screening. Dargestellt ist jeweils die proteolytische Aktivität im Kulturüberstand von *B. subtilis* TEB1030 unter Verwendung von AAPF als Substrat. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte von drei voneinander unabhängigen Anzuchten in derselben DW-MTP. Die Fehlerbalken geben die absolute Standardabweichung an. Bei „wtSP“ handelt es sich um das Benchmark-Konstrukt pBSMu5BPN_wtSP mit dem wildtypischen SP von Subtilisin BPN‘. Die 31 gescreenten Klone mit verschiedenen SP aus dem Signalpeptid-Mix sind nummeriert.

Wie anhand der 31 in Abb. 13 dargestellten Klone erkennbar, wurde im Rahmen des Screenings ein breites Spektrum an Proteaseaktivität im Kulturüberstand detektiert. Neben Klonen, die eine ähnliche hohe Proteaseaktivität im Kulturüberstand aufwiesen wie das Konstrukt mit dem Benchmark-SP („wtSP“), wurden auch Klone mit deutlich verringerten Sekretionsleistungen identifiziert. Die Mehrheit der gescreenten Konstrukte mit den verschiedenen SP aus dem Signalpeptid-Mix zeigen jedoch verbesserte Sekretionsleistungen im Vergleich zum Benchmark-Konstrukt pBSMu5BPN_wtSP, was für die in Abschnitt 3.2 durchgeführten SP-Screenings nicht der Fall war.

Nachdem beide SP-Banken mit den *B. subtilis*- und *B. licheniformis*-SP mehrfach abgedeckt

wurden, konnten die Konstrukte mit den besten Sekretionseffizienzen für die Sekretion von Subtilisin BPN⁺ im Wirt *B. subtilis* TEB1030 definiert werden. In Abb. 14 sind die Sekretionseffizienzen der acht besten SP, die im Hochdurchsatz-Screening ermittelt wurden, in Relation zum Benchmark-SP „wtSP“ dargestellt. Insgesamt konnte die Sekretionsleistung im Vergleich zum Benchmark-Konstrukt „wtSP“ von 100 % auf ca. 700 % gesteigert werden. Interessanterweise zeigten dabei nicht nur SP aus dem Screening-Wirt *B. subtilis* die besten Sekretionseffizienzen, sondern auch wirtsfremde SP aus *B. licheniformis*. So wurde das Konstrukt aus Subtilisin BPN⁺ und dem in der Genomdatenbank als „Bli00338“ bezeichnete SP aus *B. licheniformis* DSM13 (dBli00338) als eines der effizientesten SP für die Sekretion von Subtilisin BPN⁺ identifiziert.

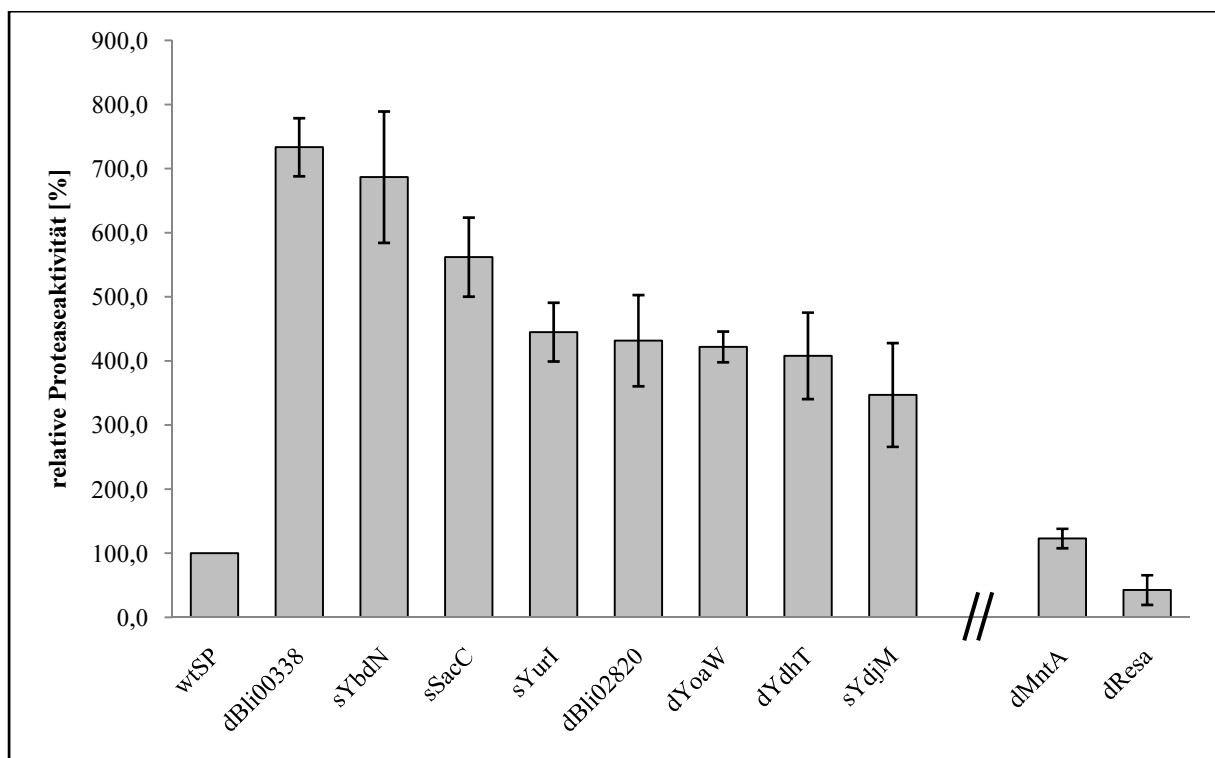


Abb. 14: Ermittlung der acht Konstrukte mit den höchsten Sekretionsleistungen aus dem Hochdurchsatz-Screening mit Subtilisin BPN⁺ im Wirt *B. subtilis* TEB1030 und allen SP aus *B. subtilis* und *B. licheniformis*. Die proteolytische Aktivität des Benchmark-Signalpeptids „wtSP“ wurde als 100 % definiert und in Relation dazu die Sekretionseffizienz der anderen BPN⁺-SP-Fusionen ermittelt. Die ermittelten Sekretionseffizienzen wurden mehrfach reproduziert und die hier angegebenen Mittelwerte in mindestens zwei voneinander unabhängigen Anzuchten in verschiedenen MTP bestimmt. Die Fehlerbalken geben die prozentuale Standardabweichung zwischen diesen Anzuchten an. Die auf der X-Achse angegebenen Namen stehen jeweils für ein SP aus *B. subtilis* (gekennzeichnet mit einem „s“, z.B. sYbdN) oder *B. licheniformis* („d“, z.B. dYoaW).

Die acht effizientesten SP (Abb. 14) wiesen eine Steigerung der Sekretionsleistung im Bereich von maximal 7x (dBli00338, sYbdN) bis 4x (sYdjM) auf. Die Konstrukte mit SP dMntA und dResA wurden als Kontroll-Konstrukte mitgeführt, um zu zeigen, dass auch SP identifiziert wurden, die ähnliche oder auch schwächere Sekretionsleistungen wie das

Benchmark-SP bewirken.

Um zu überprüfen, ob die Proteinmenge von Subtilisin BPN[‘] im Kulturüberstand mit der detektierten Proteaseaktivität übereinstimmt, wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein mittels TCA-Fällung (2.15) für die SDS-PAGE Analyse aufkonzentriert. Für den immunologischen Nachweis von BPN[‘] in der Western-Blot Analyse (2.16) hingegen wurden nur je 15 µl Volumen des Kulturüberstands von *B. subtilis* TEB1030 verwendet. Die Wachstumsunterschiede der verschiedenen Stämme wurden spektralphotometrisch ermittelt (2.4.5), um Effekte durch stark unterschiedlichen Wuchs auszuschließen. Die Abweichungen in den Zelldichten lagen dabei unter 10 %. Untersucht wurden sechs verschiedene *B. subtilis* TEB1030 Stämme mit Konstrukten aus dem SP-Screening, dem Benchmark-Konstrukt („wtSP“) sowie dem Stamm mit dem Leervektor als Negativkontrolle (Abb. 15).

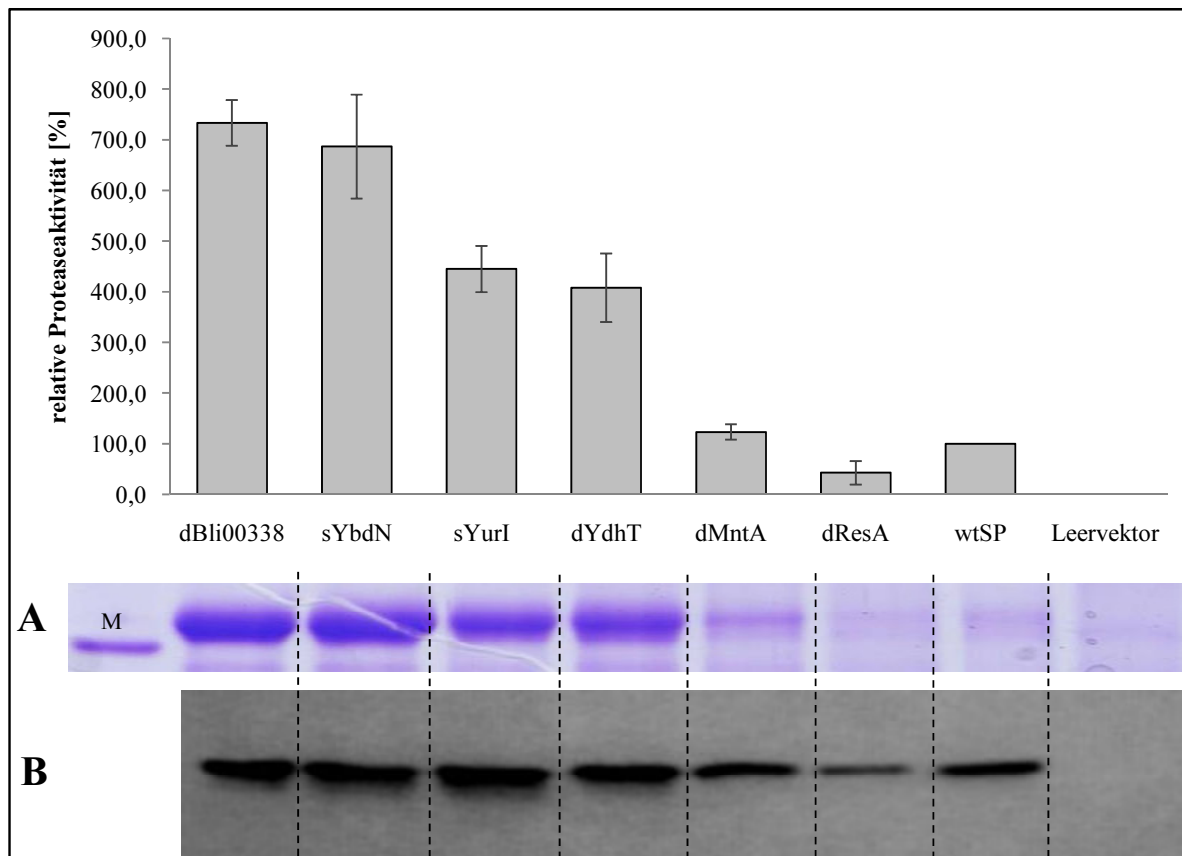


Abb. 15: Korrelation von Proteaseaktivität und Proteinmenge im Kulturüberstand von *B. subtilis* TEB1030. Die relative Proteaseaktivität wurde in Bezug zum Benchmark-Konstrukt mit dem wtSP in mindestens zwei voneinander unabhängigen Anzuchten in der DW-MTP ermittelt. Die Fehlerbalken geben die prozentuale Standardabweichung zwischen aus diesen Anzuchten ermittelten Werten an. **(A)** Für die SDS-PAGE Analyse wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die gezeigte Bande des Proteinmarkers (M) entspricht laut Herstellerangaben 27 kDa. **(B)** Für die Western-Blot Analyse wurden je 15 µl Volumen des Kulturüberstands und spezifische Antikörper für BPN[‘] verwendet.

Subtilisin BPN[‘] ohne SP und ohne PP hat ein kalkuliertes Molekulargewicht von 27,6 kDa. Das Molekulargewicht der über den Proteinmarker in der SDS-PAGE Analyse ermittelten Banden (Abb. 15, A) stimmte daher mit dem erwarteten Molekulargewicht von BPN[‘] überein. Für die in Abb. 15 (A) dargestellten Banden aus der SDS-PAGE Analyse wurden die gleichen Molekulargewichte ermittelt wie für die Signale aus dem immunologischen Nachweis von BPN[‘] mittels spezifischer Antikörper (Abb. 15, B).

Wie in Abb. 15 erkennbar, korrelierte die ermittelte proteolytische Aktivität in den meisten Fällen mit der detektierten Proteinmenge im Kulturüberstand. Während sich bei der Western-Blot Analyse die Proteinmengen der Stämme mit den höchsten Sekretionsleistungen (400-700 %) teilweise nicht mehr eindeutig unterscheiden ließen, waren diese Unterschiede auf der SDS-PAGE Analyse jedoch deutlich erkennbar. Bei den Konstrukten mit geringeren Sekretionsleistungen (dMntA, dResA und wtSP) wurden hingegen die unterschiedlichen Proteinmengen im Kulturüberstand sehr deutlich auch in der Western-Blot Analyse abgebildet. Der Leervektorstamm zeigte wie erwartet kein Signal auf der entsprechenden Höhe der Membran.

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob Subtilisin BPN[‘] intrazellulär nachweisbar ist und ob sich die Stämme mit den stark unterschiedlichen Sekretionsleistungen in Bezug auf das Vorkommen von intrazellulärem BPN[‘] unterscheiden und sich so Hinweise auf mögliche Ursachen für hohe oder niedrige Sekretionsleistungen finden lassen.

Dafür wurde jeweils das Volumen einer Kultur geerntet, was einer OD₆₀₀ von 5 entsprach und der Zellaufschluss durch Zugabe von Lysozym und Ultraschall durchgeführt. Nach der Ermittlung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Proteinbestimmung (2.13) wurden 20 µg Gesamtprotein für den immunologischen Nachweis von Subtilisin BPN[‘] in der Western-Blot Analyse verwendet (2.16).

Die Blot-Membran wurde nachträglich mittels Amidoschwarz-Färbung eingefärbt (2.16) und so anhand des Proteinmarkers die in Abb. 16 angegebenen Molekulargewichte ermittelt.

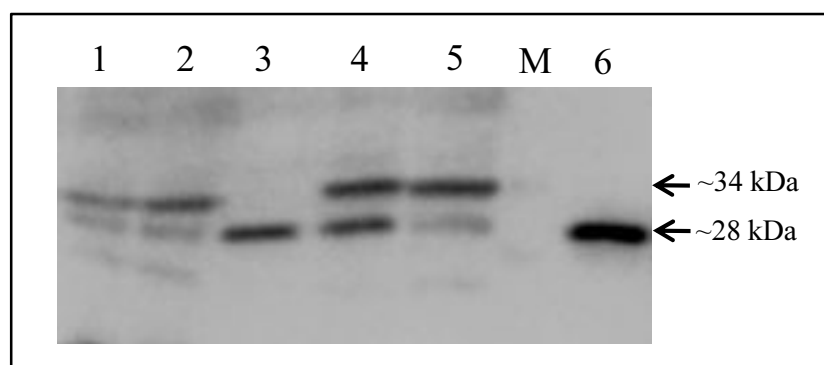


Abb. 16: Immunologischer Nachweis von intrazellulärem BPN[‘] mittels Western-Blot Analyse. 1: Leervektor; 2: wtSP; 3: dBli00338; 4: sYbdN; 5: dResA; M: Proteinmarker; 6: Kontroll-Kulturüberstand von dBli00338. Die Molekulargewichte wurden anhand des nachträglich auf der Blot-Membran gefärbten Proteinmarkers ermittelt. Aufgetragen wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein des Rohextrakts.

Die in Abb. 16 dargestellten Ergebnisse des intrazellulären Nachweises von BPN⁺ waren auch nach Wiederholung der Western-Blot Analyse nicht eindeutig auswertbar. Bei der Bande in Spur 6 handelt es sich um BPN⁺ im Kulturüberstand von *B. subtilis* TEB1030 mit dem Konstrukt pBSMu5BPN_dBli00338 ohne Propeptid und ohne SP (erwartetes Molekulargewicht: 27,6 kDa). In den Spuren 1-6 wurden die Proteine des Rohextrakts des jeweiligen Stammes aufgetragen. Auch in diesen Proben wurde ein unterschiedlich intensives Signal auf der gleichen Höhe wie der des BPN⁺ im Kulturüberstand detektiert. Die Signalstärke auf der beschriebenen Höhe war in Spur 3 und 4 (dBli00338 und sYbdN) deutlich erhöht. Allerdings konnte dieses Signal auch im Rohextrakt des Leervektorstammes (Spur 1) identifiziert werden, daher handelt es sich dabei möglicherweise auch um ein anderes, intrazellulär vorkommendes Protein, das mit den gewählten Antikörpern schwach detektierbar war. Wie in Abb. 15 erkennbar, konnte im Kulturüberstand des Leervektorstammes wie erwartet kein Signal auf der Höhe von BPN⁺ im Kulturüberstand detektiert werden.

Außer in Spur 3 wurde außerdem bei allen Proben ein weiteres Signal auf Höhe von ca. 34 kDa detektiert. Dieser Effekt war im Kulturüberstand ebenfalls nicht aufgetreten und es wäre daher möglich, dass es sich dabei um unreifes BPN⁺ mit Propeptid handelt (erwartetes Molekulargewicht: ca. 36,2 kDa).

3.3.3.2 Vorhersage über die Effizienz der Signalpeptide nicht möglich

Um zu untersuchen, ob systematische Ähnlichkeiten zwischen den SP zu erkennen sind, die ursächlich für die besonders effiziente Sekretion von Subtilisin BPN⁺ sein könnten, wurden in Tab. 10 die Funktionen der Wildtyp-Proteine in *B. subtilis* bzw. *B. licheniformis* aufgeführt, sofern diese bekannt waren. Dabei wurde deutlich, dass im Fall der hier aufgeführten SP keinerlei Zusammenhang zwischen der ursprünglichen Funktion des Wildtyp-Proteins und dem Maß der Sekretionseffizienz des jeweiligen SP für die Sekretion von Subtilisin BPN⁺ erkennbar war. Auch die Untersuchung der Homologien der Wildtyp-Proteine mit Subtilisin BPN⁺ erbrachten diesbezüglich keine neuen Erkenntnisse. Alle Wildtyp-Proteine (deren SP hier untersucht wurden) wiesen nur eine sehr schwache Homologie zu Subtilisin BPN⁺ auf (3-11 % auf Aminosäureebene) und es war nicht erkennbar, dass eine höhere Homologie auch zu einem verbesserten Proteinexport geführt hat.

Tab. 10: Ursprung und Funktion der Wildtyp-Proteine, von denen die im Hochdurchsatz-Screening identifizierten Signalpeptide abstammen. Angegeben wurde jeweils die Exporteffizienz in Prozent (Effizienz), die Funktion des Wildtyp-Proteins im Ursprungs-Organismus, sofern diese bekannt war und die jeweilige „NCBI Accession Number“.

Effizienz [%]	Name	Funktion des Wildtyp-Proteins	Ursprung des Wildtyp-Proteins	„NCBI Accession Number“
733	dBli00338	putative Chitinase	<i>B. licheniformis</i>	YP_089989
686	sYbdN	unbekannt	<i>B. subtilis</i>	NP_388086
562	sSacC	Levanase (Wanker <i>et al.</i> , 1995)	<i>B. subtilis</i>	NP_390581
445	sYurI	Ribonuclease	<i>B. subtilis</i>	NP_391134
431	dBli02820	putative Phosphoesterase	<i>B. licheniformis</i>	YP_079963
422	dYoaW	unbekannt	<i>B. licheniformis</i>	YP_079183
408	dYdhT	β -Mannanase	<i>B. licheniformis</i>	ACX94051
347	sYdjM	unbekannt	<i>B. subtilis</i>	NP_388506
123	dMntA	Mangan-Transport	<i>B. licheniformis</i>	YP_080639
43	dResA	Thiol-Disulfid-Oxidoreductase	<i>B. licheniformis</i>	YP_079620
100	wtSP	alkalische Protease (BPN ⁺)	<i>B. amyloliquefaciens</i>	K_02496

Für die weiterführende Charakterisierung der im Hochdurchsatz-Screening identifizierten SP wurden die Aminosäuresequenz, die Länge des SP, der über SignalP 3.0 ermittelte D-Score, die Ladung der N-Domäne und die Hydrophobizität untereinander verglichen (Tab. 11). Dabei wurde deutlich, dass die acht besten SP keine signifikanten Ähnlichkeiten in Bezug auf diese Eigenschaften aufwiesen. Die Hydrophobizität war bei den besten acht SP relativ ähnlich und lag bei 48-58 %. Anhand der Vorhersage über SignalP 3.0 (Bendtsen *et al.*, 2004) lässt sich die Wahrscheinlichkeit vorhersagen, dass es sich bei der untersuchten Sequenz um ein Signalpeptid handelt. Sequenzen mit einem D-Score von $>0,5$ werden als Signalpeptid klassifiziert und die Wahrscheinlichkeit, dass es sich dabei um ein funktionales SP handelt, steigt mit der Annäherung an den D-Score von 1. Es konnte gezeigt werden, dass alle acht SP über einen hohen D-Score (0,86-0,93) verfügen. Die beiden Kontrollkonstrukte mit den SP dMntA und dResA, welche eine Sekretionseffizienz auf oder unter Benchmarkniveau aufwiesen, verfügen hingegen über einen deutlich niedrigeren D-Score (0,617-0,783). Allerdings verfügt das Benchmark-SP wtSP über einen der höchsten D-Scores aus Tab. 11 (0,93) und dennoch nur über eine relativ schwache Sekretionsleistung. Somit konnte hier, wie auch schon zuvor von Brockmeier *et al.* (2006) postuliert, bestätigt werden, dass der D-Score allein als Vorhersage für die Effizienz eines SP nicht ausreicht.

Tab. 11: Eigenschaften und Sequenz der im Hochdurchsatz-Screening identifizierten Signalpeptide.

Effizienz [%]	Name	Aminosäuresequenz des Signalpeptids	Länge (AS)	D-Score ^a	Ladung N-Domäne ^b	Hydrophobizität (%) ^c
733	dBli00338	MLINKSKKFFVFSFIFVMMLSLSFVNGEVAKA	32	0,897	3	53
686	sYbdN	MVKKWLIQFAVMLSVLSTFTYSASA	25	0,930	2	48
562	sSacC	MKKRLIQVMIMFTLLLMAFSADA	24	0,927	3	58
445	sYurI	MTKKAWFLPLVCVLLISGWLAPAASASA	28	0,915	2	68
431	dBli02820	MRMKRLRMRKHLLIAVCTLALLLSSPIVSDA	31	0,936	6	52
422	dYoaW	MKKIVCLMVFSIMTAFGIHQPAEA	25	0,864	2	56
408	dYdhT	MKKNIVCSIFALLLAFVSVQPSYA	24	0,870	2	58
347	sYdjM	MLKKVILAAFILVGSTLGAFSFSDDASA	28	0,915	2	57
123	dMntA	MKWKQTLAIAAALILILAAGCSSKSSS	27	0,783	2	59
43	dResA	MKKKRFYIRTGILLVLLAALGYTLYSVAVFQNTESV	35	0,617	5	51
100	wtSP	MRGKKVWISLLFALALIFTMAFGSTSSAQA	30	0,930	3	57

^aDer D-score wurde mittels SignalP 3.0 berechnet (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>).

^bFür die Berechnung der Netto-Ladung der N-Domäne wurden die Aminosäuren D und E als -1, R und K als +1 und alle anderen AS als 0 definiert.

^cDer prozentuale Anteil der hydrophoben Aminosäuren in jeder Signalsequenz wurde berechnet, indem folgende AS als hydrophob definiert wurden: G, A, V, L, I, M, F, W und P. Alle anderen AS wurden als hydrophil definiert.

Da über die Primärstruktur und die übrigen Charakteristika keine Vorhersage zur Effizienz eines SP möglich war, wurde als weiterführende Untersuchung die Sekundärstruktur, basierend auf der Aminosäuresequenz der Fusionen aus SP und BPN⁴, mit Hilfe des PsiPred-Servers vorhergesagt (Jones, 1999). Dafür wurden die Aminosäuresequenzen von allen in Tab. 11 aufgeführten SP (in Fusion mit BPN⁴) verwendet, um die Sekundärstrukturen vorherzusagen. In Abb. 17 wurden beispielhaft die Ergebnisse der PsiPred-Vorhersagen für die SP dBli00338, dResA und wtSP dargestellt.

3.3.4 Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem MTP-Screening auf Produktionssysteme im größeren Maßstab

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Sekretionsleistung von *B. subtilis* TEB1030 für das heterologe Enzym Subtilisin BPN[®] im MTP-Maßstab deutlich verbessert werden konnte, sollte untersucht werden, inwieweit diese Ergebnisse auf größere Systeme übertragbar sind. Dafür wurden Stämme mit unterschiedlich hohen Sekretionsleistungen aus dem Hochdurchsatz-Screening ausgewählt und im Schüttelkolben bzw. in Fed-Batch Fermentationen kultiviert und die Sekretionsleistungen verglichen.

3.3.4.1 Die in Mikrotiterplatten-Anzuchten ermittelten Sekretionseffizienzen konnten in Kolbenanzuchten bestätigt werden

Für eine erste Untersuchung der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus der MTP in einen größeren Maßstab wurden vier Stämme mit unterschiedlich guten SP ausgewählt und im Schüttelkolben für 24 h in selektivem LB-Medium kultiviert (2.4.5). Nach 4, 5, 6, 8 und 24 h wurden jeweils Proben entnommen und die Wuchsdichte sowie die Proteaseaktivität im Kulturüberstand ermittelt. Dabei sollte überprüft werden, ob die Stämme mit hohen Sekretionsleistungen möglicherweise im Wuchs benachteiligt sind und ein verändertes Wuchsverhalten aufweisen. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden die verschiedenen Stämme in zwei voneinander unabhängigen Anzuchten kultiviert und jeweils Mittelwerte aus beiden Anzuchten verwendet.

Die Zelldichte zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde spektralphotometrisch (2.4.5) ermittelt. Dabei zeigte keiner der untersuchten Stämme ein deutlich verändertes Wuchsverhalten.

In Abb. 18 ist die Proteaseaktivität im Kulturüberstand (2.17) der einzelnen Stämme zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Dabei wurde deutlich, dass die Sekretionsleistungen zu den verschiedenen Zeitpunkten sehr ähnlich waren und sich im Verlauf von 24 h kaum Unterschiede feststellen ließen.

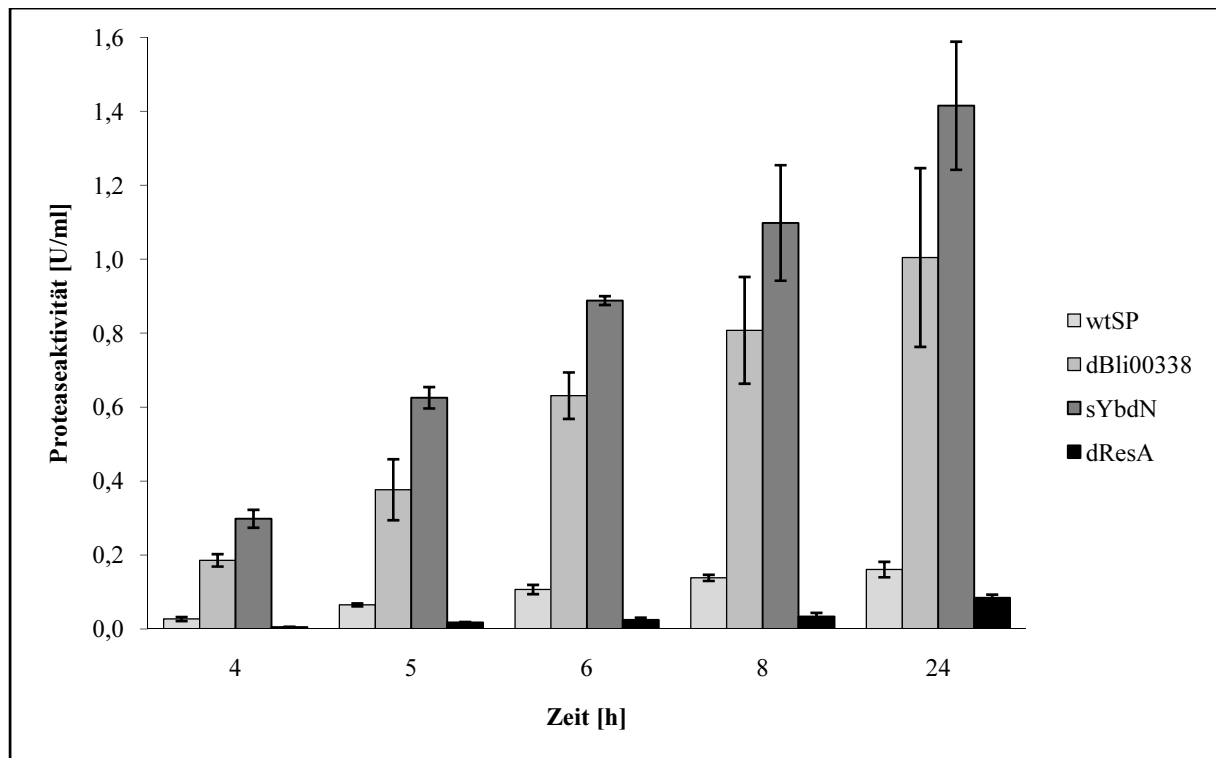


Abb. 18: Proteolytische Aktivität im Kulturüberstand der Stämme aus einer Kolbenanzucht mit ausgewählten Konstrukten aus dem Hochdurchsatz-Screening. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der ermittelten proteolytischen Aktivität mit dem Substrat AAPF aus zwei voneinander unabhängigen Kolbenanzuchten. Die Fehlerbalken geben die absolute Standardabweichung zwischen diesen Anzuchten an. Für die Kolbenanzucht wurden Stämme mit verschiedenen Konstrukten aus pBSMul5BPN und Signalpeptiden mit unterschiedlich hohen Exportleistungen ausgewählt.

In Abb. 18 wird deutlich, dass sich die in der MTP ermittelten Sekretionseffizienzen in der Kolbenanzucht bestätigen ließen. Während die SP dBli00338 und sYbdN beide eine deutlich gesteigerte Sekretionsleistung im Vergleich zum Benchmark-Konstrukt „wtSP“ aufwiesen, wurde für den Stamm mit SP dResA, wie auch schon in der MTP, eine deutlich schwächere Sekretionsleistung nachgewiesen. Während SP dBli00338 und sYbdN jedoch in den MTP-Anzuchten sehr ähnliche Sekretionsleistungen aufwiesen, wurde in den Kolbenanzuchten für sYbdN eine höhere Sekretionsleistung als für dBli00338 ermittelt.

3.3.4.2 Das identifizierte Signalpeptid führte zu einer deutlich gesteigerten Sekretionsleistung in Hochzelldichte-Fermentationen

Da die in der MTP-Anzucht ermittelten Ergebnisse im Schüttelkolben bestätigt werden konnten, sollte im Anschluss daran untersucht werden, inwieweit sich die Ergebnisse auf ein für industrielle Zwecke einsetzbares System übertragen lassen. Dafür wurden Hochzelldichtefermentationen im Fed-Batch Verfahren mit *B. subtilis* TEB1030 durchgeführt (2.5). Für die Fermentation wurde zum einen der Stamm mit pBSMul5BPN und dem Benchmark-SP „wtSP“ ausgewählt und außerdem der Stamm mit pBSMul5BPN_dBli00338,

der sowohl in den MTP-Anzuchten, als auch in den Kolbenanzuchten eine ca. 6-7x gesteigerte Sekretionsleistung aufwies. Die Zusammensetzung des FB-Mediums für Hochzelldichte-Kultivierung von *Bacillus* nach Park *et al.* (1992) ist unter 2.4.3 aufgeführt.

Die detaillierte Vorgehensweise für die Erstellung der Vorkulturen und die Durchführung der Fed-Batch Fermentation ist unter 2.5 dargestellt. Jeder Stamm wurde 2x in voneinander unabhängigen Prozessen fermentiert (Prozess A und B). Dabei wurde der Prozess B jedoch dahingehend angepasst, dass nach 22 h der pO₂-Setpoint von 45 % auf 30 % abgesenkt wurde. Um in Prozess B die Zelldichte weiter zu steigern, wurde außerdem die für die Zufütterung verwendete Lösung modifiziert (Tab. 12).

Tab. 12: Unterschiede der Feed-Lösung in Prozess A und B. Die Zusammensetzung der Spurenelementlösung ist in Abschnitt 2.4.3 aufgeführt.

Feed-Lösung Prozess A	Feed-Lösung Prozess B
Glukose 500 g/l	Glukose 500 g/l
--	Spurenelementlösung 5 ml/l
--	MgSO ₄ 1 g/l
--	CaCl ₂ 40 mg/l
--	Hefeextrakt 12 g/l

Während in Prozess A nur Pepton als komplexe Nährstoffquelle verwendet wurde (2.4.3), sollte in Prozess B untersucht werden, ob sich die Zelldichte der Fermentationen durch die zusätzliche Zufütterung von Hefeextrakt - als weitere komplexe Stickstoff- und Kohlenstoffquelle - weiter steigern lässt.

Bei der Fermentation von pBSMul5BPN_wtSP und pBSMul5BPN_dBli00338 wurden in Prozess A nach 48 h eine OD₆₀₀ von 68,3 bzw. 65,3 erreicht. Durch die Modifikation der Feed-Lösung in Prozess B (Tab. 12) konnte die OD₆₀₀ um 35 % auf jeweils ca. 100 erhöht werden (Tab. 13). Die in Tab. 13 dargestellten Werte für die Proteaseaktivität können in Einzelfällen bis zu 25 % von den in Abb. 19 dargestellten Werten abweichen, da verschiedene Substrat-Chargen für den Aktivitätstest verwendet wurden und die Werte nur in Relation zueinander bewertet wurden. Für die Bestimmung der absoluten U/ml (Tab. 13) wurde daher nur eine Substrat-Charge verwendet und alle Ergebnisse in der gleichen MTP erstellt.

Tab. 13: Enzymaktivität pro Volumen im Überstand der Fermentationsbrühe von Prozess A und B. Um eine Vergleichbarkeit der Gesamtausbeute an Protease zu erhalten, wurde die Proteaseaktivität im Kulturüberstand für alle Proben mit der gleichen Substrat-Charge durchgeführt und in Mehrfachbestimmung in einer MTP gemessen.

Name	U/ml	Exporteffizienz [%]	OD ₆₀₀
wtSP A	8,9	100	68,3
dBli00338 A	59,7	671	65,3
wtSP B	5,75	100	99,6
dBli00338 B	57,25	995	99,1

Der Verlauf der Proteaseaktivität im Kulturüberstand und die Zelldichte zu verschiedenen Zeitpunkten von pBSMul5BPN_wtSP und pBSMul5BPN_dBli00338 im Stamm *B. subtilis* TEB1030 ist in Abb. 19 dargestellt (Prozess B).

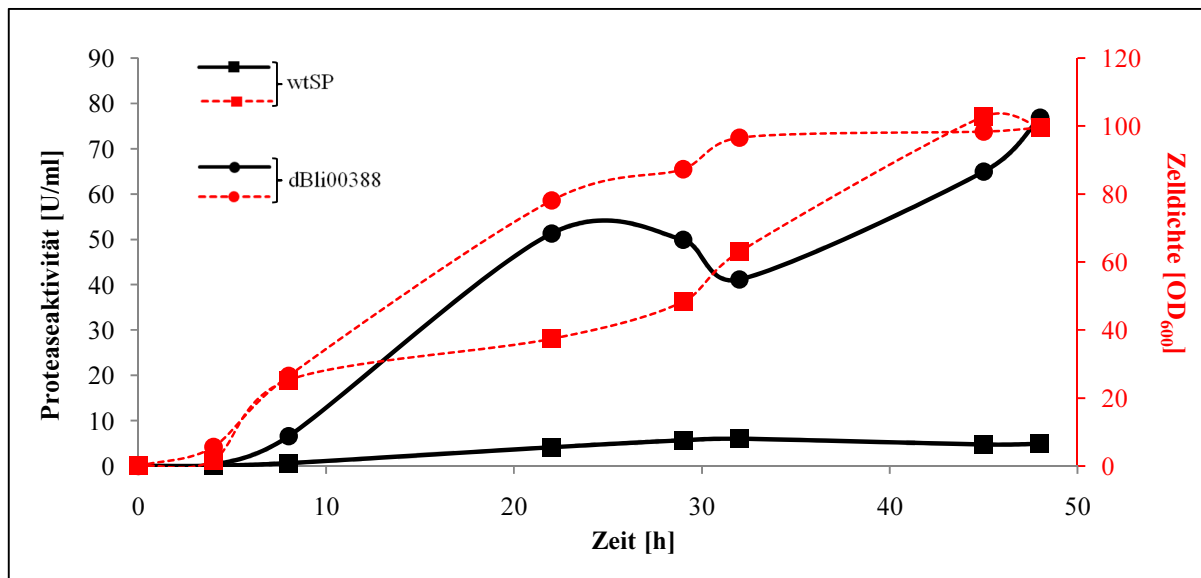


Abb. 19: Hochzelldichtefermentation von *B. subtilis* TEB1030 im Fed-Batch Verfahren (Prozess B) für die Produktion von Subtilisin BPN⁺. Dargestellt sind die ermittelten Werte für die Proteaseaktivität im Kulturüberstand (schwarze Linie) und die Zelldichte (rote, gestrichelte Linie) zu den jeweiligen Zeitpunkten für das Konstrukt mit dem Benchmark-SP „wtSP“ (Rechtecke) und dem SP dBli00338 (Kreise).

Wie in Abb. 19 dargestellt, unterscheiden sich die beiden Prozesse mit dem Benchmark-SP und dem optimierten SP aus dem SP-Screening (dBli00338) vor allem in der Protease-Ausbeute bei der Ernte durch Zentrifugation nach 48 h. Anhand der Proteaseaktivität im Kulturüberstand nach 48 h wurde ermittelt, dass die Sekretionsleistung des Stammes mit dem optimierten SP dBli00338 ca. 10 x höher war als die des Stammes mit dem Benchmark-SP. Beide Stämme erreichten bei der Ernte nach 48 h eine OD₆₀₀ von ca. 100 und wiesen somit trotz der sehr unterschiedlichen Produktionsleistungen keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten auf. Die Wuchskurven beider Stämme unterschieden sich jedoch im

Verlauf voneinander. Während der Stamm mit SP dBli00338 nach 22 h bereits eine OD_{600} von ca. 80 erreicht hatte, lag die OD_{600} des Benchmark-Stammes zu diesem Zeitpunkt nur bei ca. 40. Die Ursache für diesen Effekt ist bisher unklar und konnte in Prozess A nicht beobachtet werden (Ergebnisse nicht aufgeführt).

Für den immunologischen Nachweis von Subtilisin BPN⁺ und die Überprüfung der Korrelation von Proteinmenge und Proteaseaktivität wurde der Kulturüberstand der 48h-Proben mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (Abb. 20). Für die SDS-PAGE wurden dabei 50 μ l Kulturüberstand mittels TCA-Proteinfällung aufkonzentriert (2.14) und komplett aufs Gel aufgetragen. Für die Western-Blot Analyse wurden aufgrund der deutlich sensitiveren Detektionsgrenze direkt 15 μ l Kulturüberstand ohne vorheriges Aufkonzentrieren verwendet.

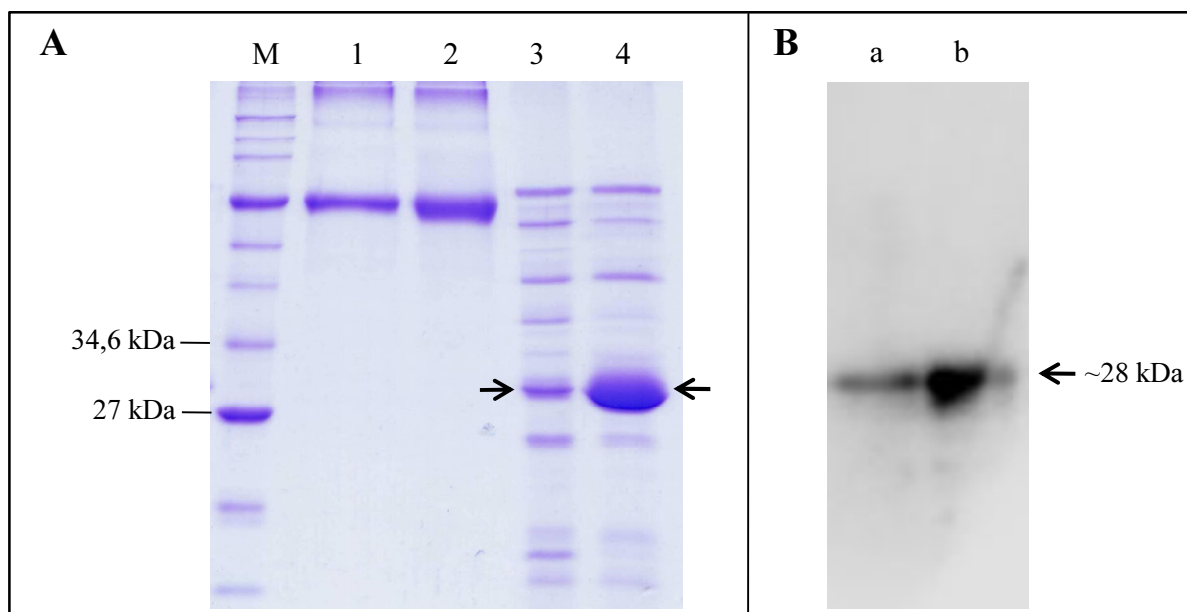


Abb. 20: (A) SDS-PAGE der sekretorischen Expression von Subtilisin BPN⁺ in *B. subtilis* TEB1030 im Fed-Batch Verfahren. M: Proteinmarker; 1: 1,5 μ g BSA-Standard; 2: 5 μ g BSA-Standard; 3: 50 μ l Kulturüberstand pBSMul5BPN_wtSP; 4: 50 μ l Kulturüberstand pBSMul5BPN_dBli00338. Die Proteinbande von Subtilisin BPN⁺ ist mit Pfeilen markiert. **(B) Western-Blot Analyse für den immunologischen Nachweis von Subtilisin BPN⁺ im Kulturüberstand der Fermentationen.** a: 15 μ l Kulturüberstand von pBSMul5BPN_wtSP; b: 15 μ l Kulturüberstand von pBSMul5BPN_dBli00338. Sowohl für die SDS-PAGE Analyse (A) als auch für die Western-Blot Analyse (B) wurde jeweils der Kulturüberstand der 48h-Proben aus den Fed-Batch Fermentationen mit Prozess-Variante B verwendet.

Wie in Abb. 20 erkennbar, konnten die Ergebnisse aus den Aktivitätstests (Abb. 19) auch in der SDS-PAGE bzw. Western-Blot Analyse bestätigt werden. In der Fermentation mit dem optimierten SP dBli00338 konnte die Ausbeute im Vergleich zur Fermentation mit dem Benchmark-SP deutlich gesteigert werden. Es fällt auf, dass sich die Bandenmuster beider Fermentationen geringfügig unterscheiden. Bei der stärkeren Sekretion von Subtilisin BPN⁺ werden einige extrazellulär vorkommende Proteine offensichtlich auch stärker abgebaut.

Damit konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse aus dem Hochdurchsatz-Screening auf ein Produktionssystem im 3-5 L-Maßstab trotz unterschiedlichem Kultivierungs-Medium und veränderten Prozessbedingungen übertragbar waren.

Die im Hochdurchsatz-Screening ermittelten Exporteffizienzen verschiedener Signalpeptide konnten erfolgreich auf Kultivierungen in Kolbenanzuchten und auf anwendungstechnisch interessante Hochzelldichte-Fermentationen von *B. subtilis* übertragen werden.

3.3.5 Untersuchung der Effizienz wirtseigener und wirtsfremder Signalpeptide in verschiedenen industriell relevanten *Bacilli*

Neben *B. subtilis* spielen weitere *Bacillus*-Arten eine wichtige Rolle bei der extrazellulären Produktion von Proteinen im industriellen Maßstab (Schallmey *et al.*, 2004). Für die Waschmittelindustrie werden Proteasen des Subtilisin-Typs im Tonnenmaßstab vor allem mit dem Wirt *B. licheniformis* produziert (Maurer, 2004). Daher ist die Optimierung der Proteinsekretion von *B. licheniformis* von großem anwendungstechnischem Interesse. Allerdings sind die für die industrielle Produktion eingesetzten *Bacillus*-Stämme oft nur schwer molekular zugänglich (Maurer, 2004; Waschkau *et al.*, 2008) und die Erstellung von großen Mutanten- oder SP-Banken daher oft kaum praktikabel (siehe Abschnitt 3.2). Daher wäre der Einsatz von leicht zu handhabenden Wirten für ein Vor-Screening sehr vorteilhaft. Nachdem in Abschnitt 3.1 bereits untersucht wurde, welchen Grad der Homologie der Sekretionsapparat von *B. subtilis* und *B. licheniformis* aufweisen, sollte im Folgenden versucht werden, die teilweise sehr hohen Homologien zu nutzen und die Ergebnisse aus dem Screening im Wirt *B. subtilis* (Abschnitt 3.3) auf zwei verschiedene *B. licheniformis*-Wirte zu übertragen. Dabei handelt es sich zum einen um den *B. licheniformis* DSM13-Typstamm und zum anderen um den industriell relevanten *B. licheniformis* H402. Eine Übersicht über das Vorgehen ist in Abb. 21 dargestellt. Es sollten verschiedene Konstrukte aus dem Hochdurchsatz-Screening (HT-Screening) im Wirt *B. subtilis* in beide *B. licheniformis*-Wirte transformiert und die Sekretionseffizienzen in allen drei Wirten miteinander verglichen werden. Auf diese Weise sollte ermittelt werden, wie stark sich die Sekretionseffizienzen der verschiedenen Konstrukte aus dem Hochdurchsatz-Screening in den unterschiedlichen Wirten unterscheiden.

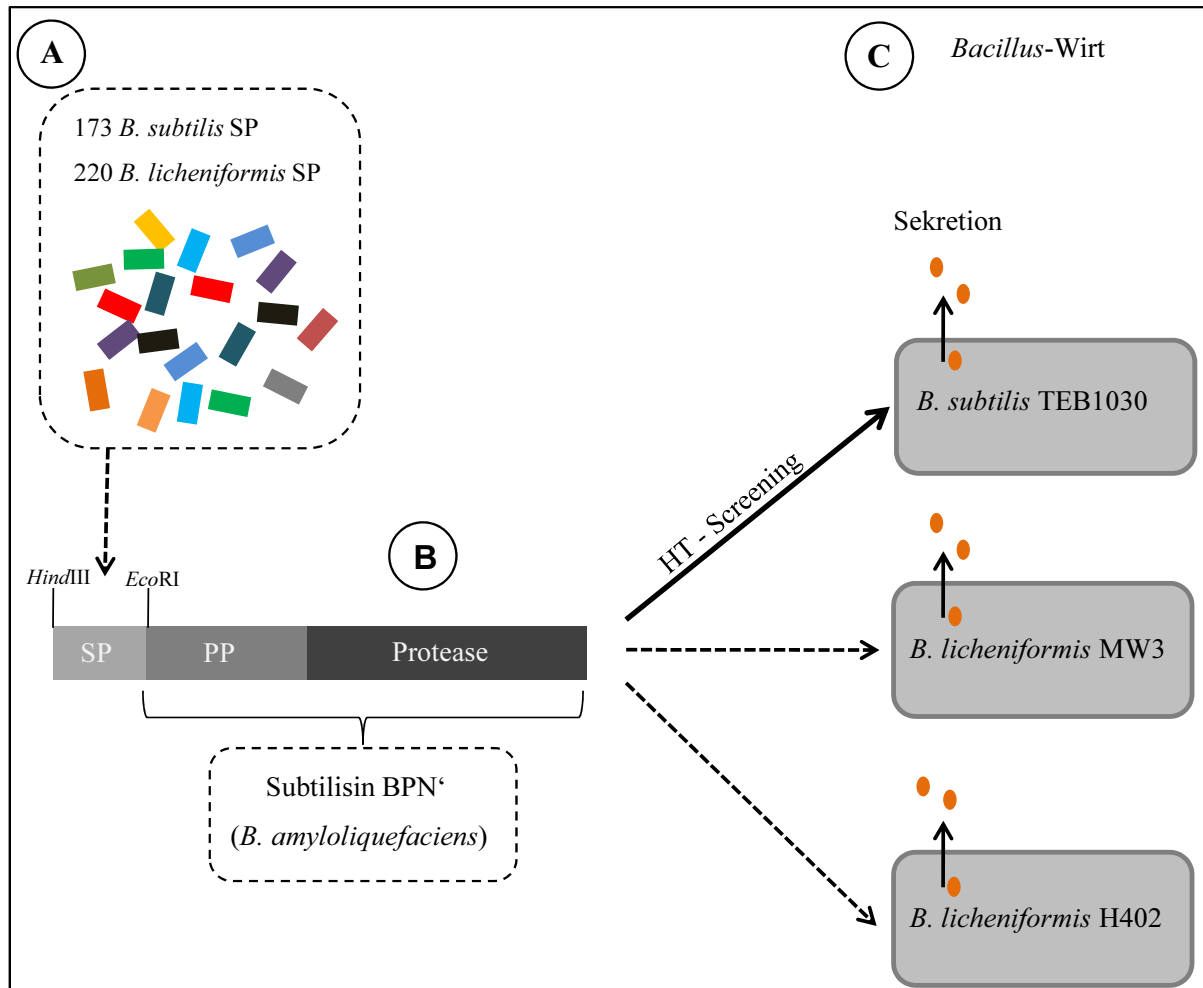


Abb. 21: Schematischer Überblick über das Vorgehen für die Überprüfung der Übertragbarkeit der in *B. subtilis* ermittelten Sekretionseffizienzen verschiedener Konstrukte auf zwei verschiedene *B. licheniformis*-Wirte. (A) Das HT-Screening im Wirt *B. subtilis* TEB1030 mit insgesamt 393 SP aus *B. subtilis* und *B. licheniformis* für die Sekretionsoptimierung von (B) Subtilisin BPN' wurde in Abschnitt 3.3 beschrieben. (C) Die Übertragbarkeit der Effizienzen unterschiedlicher Signalpeptide in verschiedenen *Bacilli* sollte am Beispiel der Wirte *B. licheniformis* MW3 und *B. licheniformis* H402 überprüft werden. Dazu wurden die Mengen der exportierten Proteine, die durch die unterschiedlichen Signalpeptide erreicht werden, in allen Wirten miteinander verglichen und in Bezug zum Benchmark-Konstrukt mit dem „wtSP“ gesetzt (gestrichelte Pfeile).

Für die Überprüfung der Übertragbarkeit der in *B. subtilis* ermittelten Sekretionseffizienzen auf verschiedene *Bacillus*-Wirte sollten verschiedene Fusionen aus Subtilisin BPN' und SP im Vektor pBSMu5 in *B. licheniformis* MW3 und *B. licheniformis* H402 transformiert werden. Beide *B. licheniformis*-Stämme wurden mit den entsprechenden Konstrukten mittels Elektroporation (2.10.4) transformiert und für die Untersuchung der Sekretionseffizienzen in DW-MTP kultiviert (2.4.5). Für die Ermittlung der Sekretionseffizienz der einzelnen Konstrukte wurde jeweils das Konstrukt mit dem Benchmark-SP (pBSMu5BPN_wtSP) parallel kultiviert und so anhand der proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand die Sekretionseffizienz ermittelt (2.17). In Abb. 22 wurde für verschiedene Konstrukte die

Korrelation von Proteaseaktivität und Proteinmenge im Kulturüberstand von *B. licheniformis* H402 mit Hilfe von SDS-PAGE und Western-Blot Analysen ermittelt. Wie auch schon für *B. subtilis* (Abb. 15) konnte dabei in den meisten Fällen eine gute Korrelation nachgewiesen werden. Für SP dYdhT zeigte die Western-Blot Analyse jedoch ein unterwartet intensives Signal in Relation zur detektierten proteolytische Aktivität. Auf dem SDS-PAG trat dieser Effekt nicht auf und die Proteinbande korrelierte in etwa mit der Proteaseaktivität.

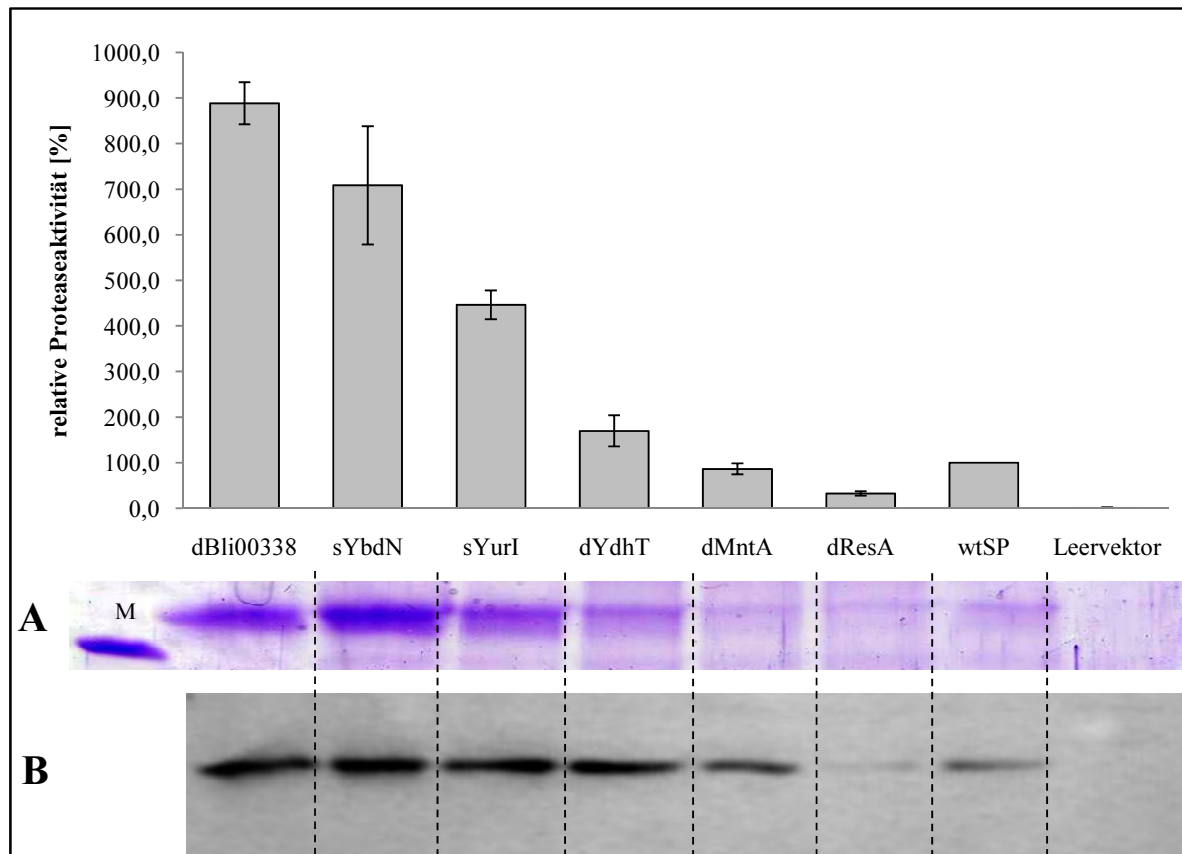


Abb. 22: Korrelation von Proteaseaktivität und Proteinmenge im Kulturüberstand von *B. licheniformis* H402. Die relative Proteaseaktivität wurde in Bezug zum Benchmark-Konstrukt mit dem wtSP in mindestens zwei voneinander unabhängigen Anzuchten in der DW-MTP ermittelt. Die Fehlerbalken geben die prozentuale Standardabweichung zwischen diesen Anzuchten an. **(A)** Für die SDS-PAGE Analyse wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die gezeigte Bande des Proteinmarkers (M) entsprach laut Herstellerangaben 27 kDa. **(B)** Für die Western-Blot Analyse wurden je 15 µl Volumen des Kulturüberstands verwendet.

Bei den in Abb. 22 untersuchten Kulturüberständen ist auf der SDS-PAGE Analyse auf der erwarteten Laufhöhe teilweise eine Doppelbande zu sehen während in der Western-Blot Analyse jedoch eindeutig nur jeweils ein Signal zu erkennen war.

Für weitere Untersuchungen wurden *B. licheniformis* H402 und *B. licheniformis* MW3 mit insgesamt zehn verschiedenen Konstrukten, dem Benchmark-Konstrukt und der Leervektor-Kontrolle transformiert (2.10.4) und in mehreren voneinander unabhängigen DW-MTP Anzuchten kultiviert. Anhand der proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand wurde anschließend die Sekretionseffizienz des jeweiligen Konstruktes ermittelt. Für drei der

Konstrukte wurden die ermittelten Sekretionseffizienzen beispielhaft in Abb. 23 dargestellt. Der vollständige Überblick über die Sekretionseffizienzen aller untersuchten Konstrukte in den verschiedenen Wirten folgt in Abb. 24

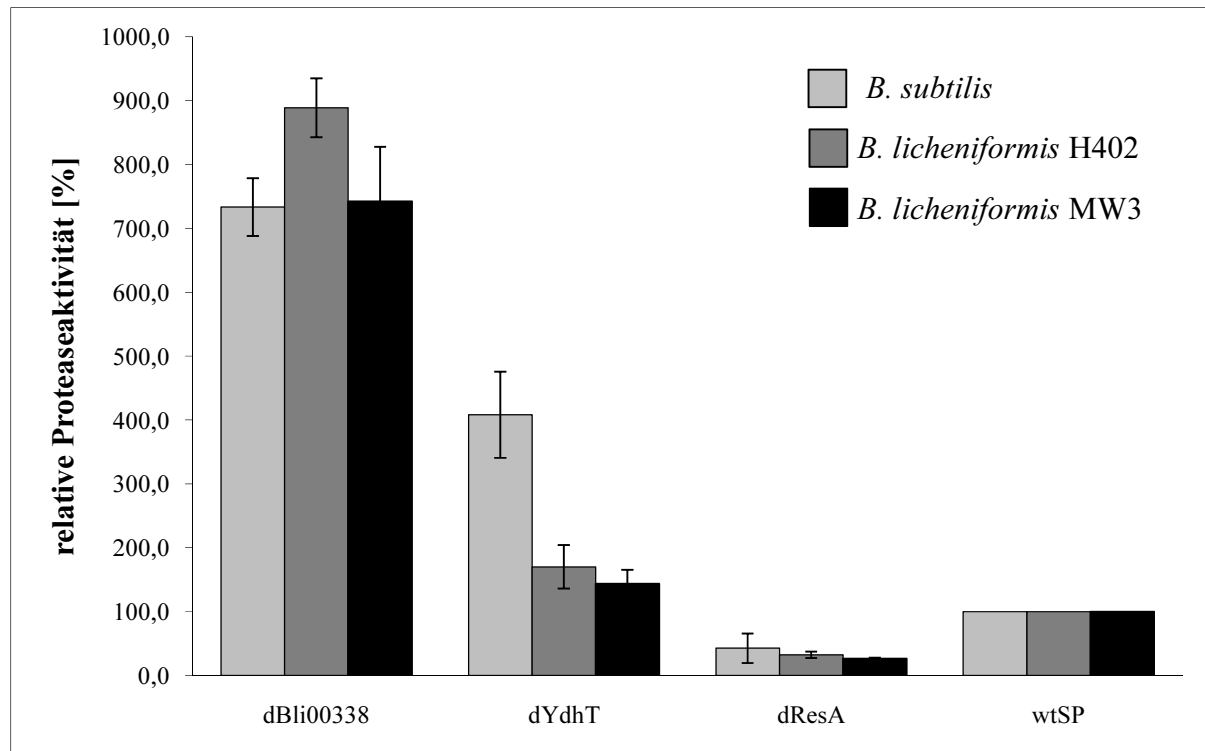


Abb. 23: Untersuchung der Sekretionseffizienzen von drei Konstrukten mit unterschiedlichen Signalpeptiden in drei verschiedenen *Bacillus*-Wirten. Für jedes Konstrukt wurde im entsprechenden Wirt die proteolytische Aktivität im Kulturüberstand ermittelt, in Relation zur proteolytischen Aktivität des ebenfalls in jedem Wirt kultivierten Benchmark-Konstrukts „wtSP“ gesetzt und anhand dessen die Sekretionseffizienz anhand der relativen Proteaseaktivität ermittelt. Die Fehlerbalken geben jeweils die prozentuale Standardabweichung aus mehreren voneinander unabhängigen DW-MTP Anzuchten an.

Der Großteil der in Abb. 23 dargestellten Konstrukte wies in allen drei *Bacillus*-Wirten eine sehr ähnliche Sekretionseffizienz auf. Für das Konstrukt mit SP dYdhT jedoch wurde deutlich, dass die Sekretionseffizienz in beiden *B. licheniformis*-Wirten deutlich von der in *B. subtilis* abweicht. Für beide *B. licheniformis*-Stämme wurde eine etwa halb so hohe proteolytische Aktivität im Kulturüberstand ermittelt wie in *B. subtilis* (von 400 % auf 200 % reduziert).

In Abb. 24 ist die Abweichung dieser Sekretionseffizienzen im Vergleich zu den in *B. subtilis* ermittelten Werten von allen zehn untersuchten Konstrukten dargestellt.

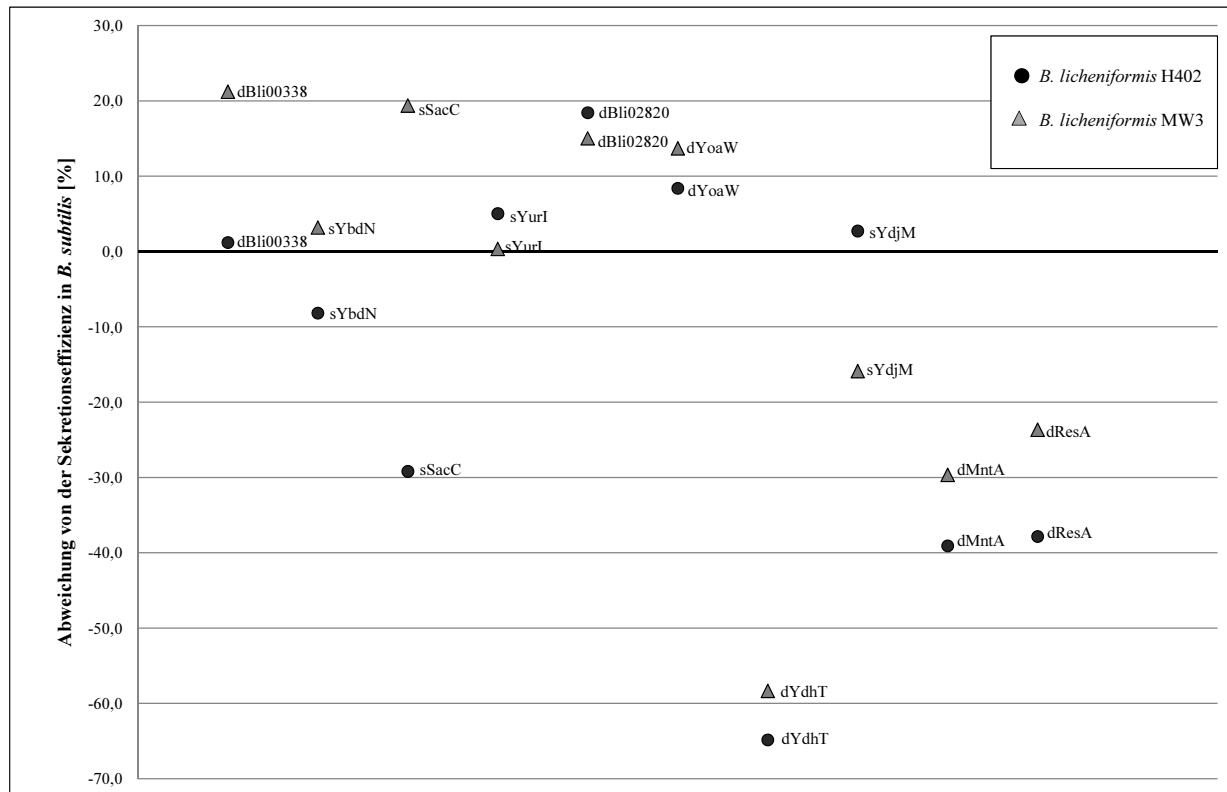


Abb. 24: Vergleich der Sekretionseffizienzen verschiedener Konstrukte in drei verschiedenen *Bacillus*-Wirten. Für die im jeweiligen *B. licheniformis*-Stamm ermittelten Sekretionseffizienzen wurde jeweils die Abweichung zu der im Screening-Wirt *B. subtilis* bestimmten Effizienz ermittelt. Eine Abweichung von 0 % (X-Achse) besagt, dass die Sekretionseffizienz des entsprechenden Konstrukts identisch zu der in *B. subtilis* war. Untersucht wurden die Abweichungen der Sekretionseffizienzen von *B. licheniformis* H402 (Kreise) und *B. licheniformis* MW3 (Dreiecke).

Aus Abb. 23 und Abb. 24 wird deutlich, dass ein Großteil der untersuchten Konstrukte in allen drei Wirten sehr ähnliche Sekretionseffizienzen aufwiesen (Abweichung unter 20 %) und nur wenig signifikante Abweichungen von den in *B. subtilis* ermittelten Sekretionseffizienzen auftraten. Das einzige Konstrukt, das signifikante Abweichungen aufwies, war die Fusion aus Subtilisin BPN⁴ und SP dYdhT. Die Sekretionseffizienzen dieses Konstruktes wichen in beiden *B. licheniformis*-Wirten um ca. 60 % von der Sekretionseffizienz in *B. subtilis* ab. Insgesamt wurde jedoch festgestellt, dass die Sekretionseffizienzen der verschiedenen Konstrukte in den unterschiedlichen Wirten sehr ähnlich waren.

In den meisten Fällen waren die Exporteffizienzen von zehn Fusionen aus verschiedenen Signalpeptiden und Subtilisin BPN⁴ in drei unterschiedlichen *Bacillus*-Wirten sehr ähnlich.

3.4 Neue Methode zur Optimierung der Sekretion durch Verwendung künstlicher Signalpeptide

In den vorhergegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass sich der Export der Zielprotease in verschiedenen Wirten und mit unterschiedlichen heterologen Proteinen durch das Screening nativer SP signifikant verbessern ließ. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob sich die Sekretionseffizienz der im Hochdurchsatz-Screening identifizierten, nativen SP mit Hilfe einer neu entwickelten Methode noch weiter verbessern lässt. Die bisher beschriebenen Methoden zur Optimierung einzelner SP beruhen zumeist auf Sättigungsmutagenesen bestimmter Positionen im SP oder Mutagenese einzelner, funktioneller Domänen (Ravn *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2008; Caspers *et al.*, 2010). Ziel der im Folgenden dargestellten Untersuchungen war es, eine Methode zu entwickeln, die mit der Strategie des Hochdurchsatz-Screenings von nativen SP kombiniert werden konnte. Die neue Methode zur Konstruktion künstlicher Signalpeptide beruhte auf der Kombination der funktionellen Domänen von unterschiedlichen Signalpeptiden.

3.4.1 Optimierung des Exports von Protease B in *Bacillus licheniformis*

Am Beispiel von Protease B sollte untersucht werden, ob sich die neue Methode zur Konstruktion von optimierten, künstlichen SP für eine Sekretionsoptimierung effektiv einsetzen lässt. Protease B unterscheidet sich von der in 3.2.2 verwendeten Protease A nur an wenigen Aminosäurepositionen. Daher wurde nun das Gemisch der 220 Signalpeptide aus *B. licheniformis* DSM13 eingesetzt, um im Hochdurchsatz-Screening SP zu identifizieren, die in der Lage sind, einen gesteigerten Export von Protease B zu bewirken. Da in 3.3 gezeigt werden konnte, dass sich die Sekretionseffizienzen verschiedener Konstrukte in *B. subtilis* und *B. licheniformis* in den meisten Fällen stark ähneln, wurde das Signalpeptid-Screening im Wirt *B. subtilis* TEB1030 durchgeführt. Die Amplifikation und Klonierung von *protB* erfolgte wie in Abschnitt 3.2.1 am Beispiel von *protA* beschrieben. Das Konstrukt aus Protease B in pBSMul5 wurde als pBSMul5B bezeichnet. Im darauf folgenden Hochdurchsatz-Screening (2.18) wurden alle 220 SP aus *B. licheniformis* DSM13 verwendet, deren Amplifizierung in Abschnitt 3.2.3 beschrieben wurde.

Für die Identifizierung der effizientesten SP wurden ca. 3000 Transformanten von *B. subtilis* erzeugt, wovon ca. 1800 eine eindeutige Hofbildung auf Skim-Milk-Agarplatten aufwiesen. Von diesen hofbildenden Klonen wurden 415 in Doppelbestimmung in DW-MTP angezogen (2.4.5) und die proteolytische Aktivität im Kulturüberstand ermittelt (2.17). Als Benchmark-Konstrukt wurde pBSMul5B mit dem Signalpeptid SubC aus *B. licheniformis* verwendet, das bereits für die Sekretion von Protease B etabliert wurde (pSMul5B_SubC, Sequenz siehe Anhang Tab. 16).

Im Hochdurchsatz-Screening wurden verschiedene SP identifiziert, die zu einer signifikant

verbesserten Sekretion von Protease B im Wirt *B. subtilis* geführt haben (Abb. 26, schwarze Balken). Die beiden Signalpeptide mit den höchsten Sekretionsleistungen waren dYcdA und dBli01455. Daher wurde *B. licheniformis* H402 mit den Konstrukten pBSMul5B_dYcdA und pBSMul5B_dBli01455 mittels Elektroporation (2.10.4) transformiert, in mehreren voneinander unabhängigen Anzuchten in DW-MTP kultiviert und die Sekretionseffizienz anhand der proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand ermittelt (2.17). Mit SP dYcdA konnten in *B. licheniformis* H402 Sekretionsleistungen von 190 % und mit dBli01455 390 % im Vergleich zum Benchmark-SP SubC erreicht werden (Abb. 26).

Aufgrund der sehr guten Sekretionsleistungen, die das SP sYncM aus *B. subtilis* mit Protease A gezeigt hatte (Abb. 9), wurde diese SP zusätzlich gezielt über die Endonukleasen *HindIII* und *EcoRI* in pBSMul5B kloniert und *B. subtilis* damit transformiert. Nach der Überprüfung des Konstruktes mittels Sequenzierung, wurde *B. licheniformis* H402 damit transformiert und ebenfalls in DW-MTP kultiviert. Die anschließend ermittelte Sekretionseffizienz lag bei 330 % im Vergleich zum Benchmark-Konstrukt pBSMul5B_SubC.

3.4.2 Konstruktion künstlicher Signalpeptide durch Austausch der funktionellen Domänen

Der Ansatz, die funktionellen Domänen verschiedener nativer Signalpeptide untereinander auszutauschen, um so künstliche Signalpeptide zu konstruieren und diese auf verbesserte Sekretionsleistung zu durchmustern, ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Die Methode sollte mit SP getestet werden, die im SP-Screening verbesserte Sekretionsleistungen für das Sekretionstarget aufwiesen, da davon auszugehen ist, dass diese SP über für das jeweilige Target günstige Eigenschaften verfügen. Die Strategie war daher, die Domänen und damit diese Eigenschaften zu durchmischen und so Varianten mit noch weiter gesteigerten Sekretionsleistungen zu konstruieren. Jedes Signalpeptid verfügt über drei funktionelle Domänen. Aus drei Signalpeptiden ließen sich daher (unter Beibehaltung der funktionellen Reihenfolge der Domänen: N, H, C) 24 verschiedene Varianten konstruieren, wie schematisch in Abbildung 25 dargestellt.

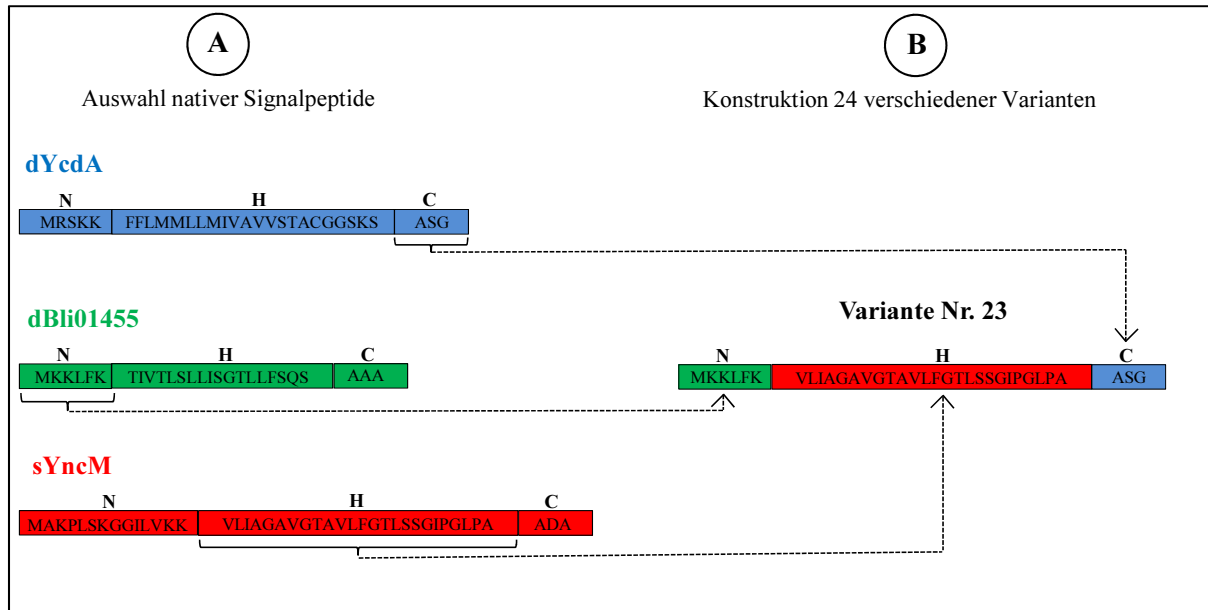


Abb. 25: Optimierung von Signalpeptiden durch die Konstruktion von Varianten mit den funktionellen Domänen aus unterschiedlichen Signalpeptiden. A: Drei der im Hochdurchsatz-Screening identifizierten nativen SP mit den höchsten Sekretionsleistungen wurden für den Austausch der funktionellen Domänen untereinander ausgewählt. B: Aus den drei nativen SP wurden alle 24 möglichen Varianten konstruiert.

Für die Konstruktion dieser künstlichen SP wurden sechs Varianten synthetisch konstruiert (Geneart, Regensburg) und die übrigen mittels PCR, unter Verwendung der entsprechend modifizierten Primer, amplifiziert (die Sequenzen der synthetisch hergestellten Konstrukte und alle verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt; Tab. 19, Tab. 18). Alle Kombinationen von den verwendeten Primern und der jeweiligen Template-DNA, die für die Amplifikation der einzelnen Varianten verwendet wurden sind im Anhang erläutert (Tab. 20). Für die Ermittlung der Exporteffizienz der einzelnen Varianten wurden diese über die Endonukleasen *EcoRI* und *HindIII* in pBSMu5B kloniert und *B. subtilis* TEB1030 damit transformiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA aus *B. subtilis* isoliert und *B. licheniformis* H402 mit allen Varianten transformiert (2.10.4). Nur Variante Nr. 03 konnte aus ungeklärten Gründen nicht erfolgreich kloniert und transformiert werden.

In mehreren voneinander unabhängigen DW-MTP Anzuchten wurde die Exporteffizienz der künstlichen SP anhand der proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand ermittelt (2.17). In Abb. 26 sind die Sekretionsleistungen der verschiedenen Varianten in Relation zum Benchmark-Konstrukt pBSMu5B_SubC und pBSMu5B mit den nativen SP dYcdA, dBli01455 und sYncM dargestellt.

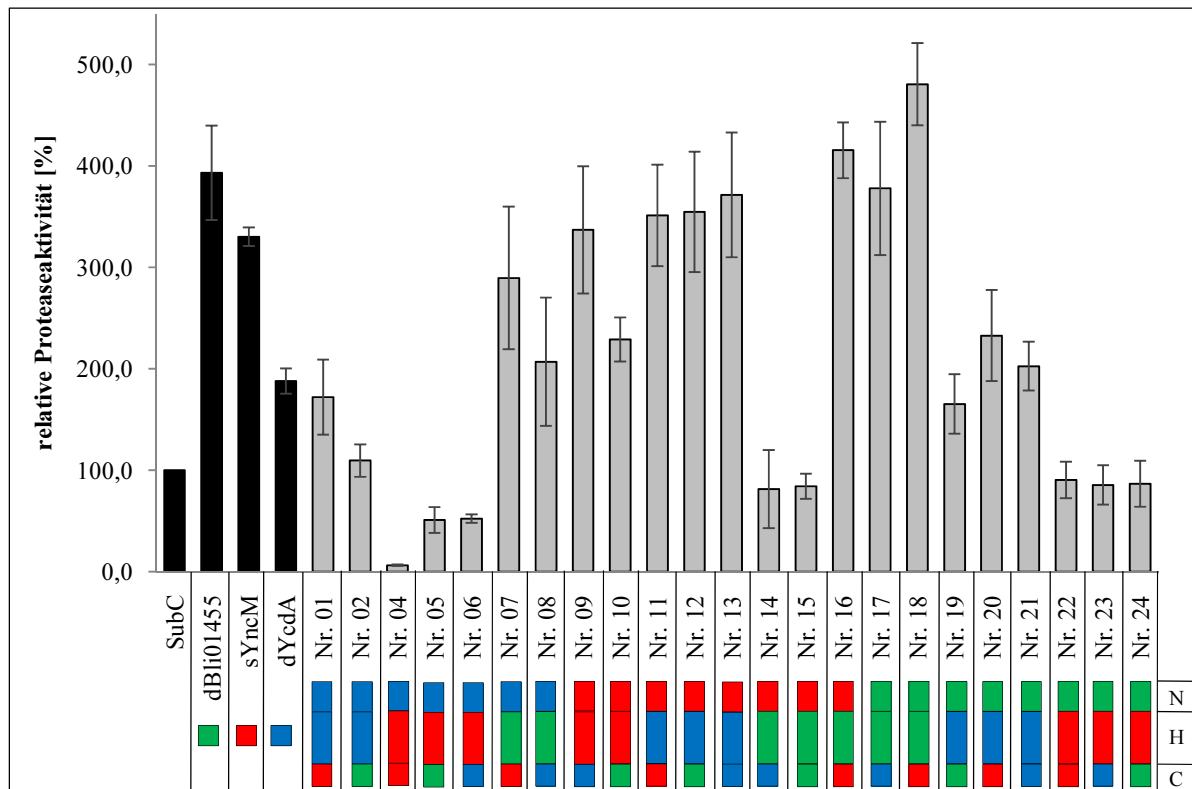


Abb. 26: Exporteffizienz aller durch Austausch der funktionellen Domänen künstlich konstruierter Signalpeptide in *B. licheniformis* H402 mit Protease B. Dargestellt ist jeweils die relative Proteaseaktivität im Bezug zum Benchmark-Konstrukt „SubC“ (pBSMul5B_SubC) von den nativen SP (schwarze Balken), deren funktionelle Domänen durchmischt wurden und den daraus konstruierten Varianten Nr. 01-24 (graue Balken). Die Zusammensetzung der einzelnen Varianten mit den jeweiligen N-, H- bzw. C-Domänen aus dBli01455 (Grün), sYncM (Rot) und dYcdA (Blau) sind mit dem entsprechenden Farbcode schematisch dargestellt. Die Fehlerbalken geben die prozentuale Standardabweichung der in voneinander unabhängig durchgeführten Anzuchten ermittelten Werte an.

Bis auf Nr. 04 und die nicht klonierbare Variante Nr. 03 konnte für alle Stämme mit den künstlichen SP eine signifikante Proteaseaktivität im Kulturüberstand ermittelt werden. Die Konstruktion von SP durch Austausch der funktionellen Domänen unterschiedlicher Signalpeptide war somit erfolgreich und führte zu größtenteils funktionellen, neuen SP. Die Exporteffizienzen der neuen SP sind sehr unterschiedlich und weichen teilweise sehr deutlich von den Exporteffizienzen der nativen SP ab (Abb. 26). So lag die Sekretionseffizienzen von den Konstrukten mit den SP Nr. 04, 05 und 06 beispielsweise sogar deutlich unter der des Konstruktes mit dem Benchmark-SP SubC, obwohl die nativen alle signifikant gesteigerte Exporteffizienzen aufwiesen. Des Weiteren wurden SP konstruiert, die ähnliche gute Exportleistungen zeigten, wie die nativen SP (z.B. Nr. 11-13). Mit Variante Nr. 18 wurde außerdem ein künstliches SP konstruiert, das eine signifikante Steigerung der bereits hohen Exportleistung der nativen SP aus dem Hochdurchsatz-Screening bewirken konnte.

In Abb. 27 ist die Domänenstruktur von einigen beispielhaft ausgewählten künstlich erstellten SP schematisch dargestellt. Während die Konstrukte mit den Varianten Nr. 04, 05 und 06 alle

deutlich schwächere Exportleistungen als das Benchmark-Konstrukt zeigten (Abb. 26), wiesen die Konstrukte mit den Varianten Nr. 11, 12 und 13 Sekretionseffizienzen auf, die in etwa auf dem Niveau des nativen SP dBli01455 lagen. Interessanterweise wiesen diese Konstrukte mit sehr ähnlichen Exporteffizienzen jeweils untereinander immer die gleiche N- und H-Domäne auf und nur die C-Domäne wurde variiert (Abb. 27). Wie in Abb. 27 erkennbar, setzt sich auch SP Nr. 18, mit dem eine signifikante Steigerung des Proteaseexports erreicht werden konnte, aus der N- und H-Domäne des nativen SP dBli01455 und der C-Domäne von sYncM zusammen. Auch hier wurde also lediglich die C-Domäne variiert.

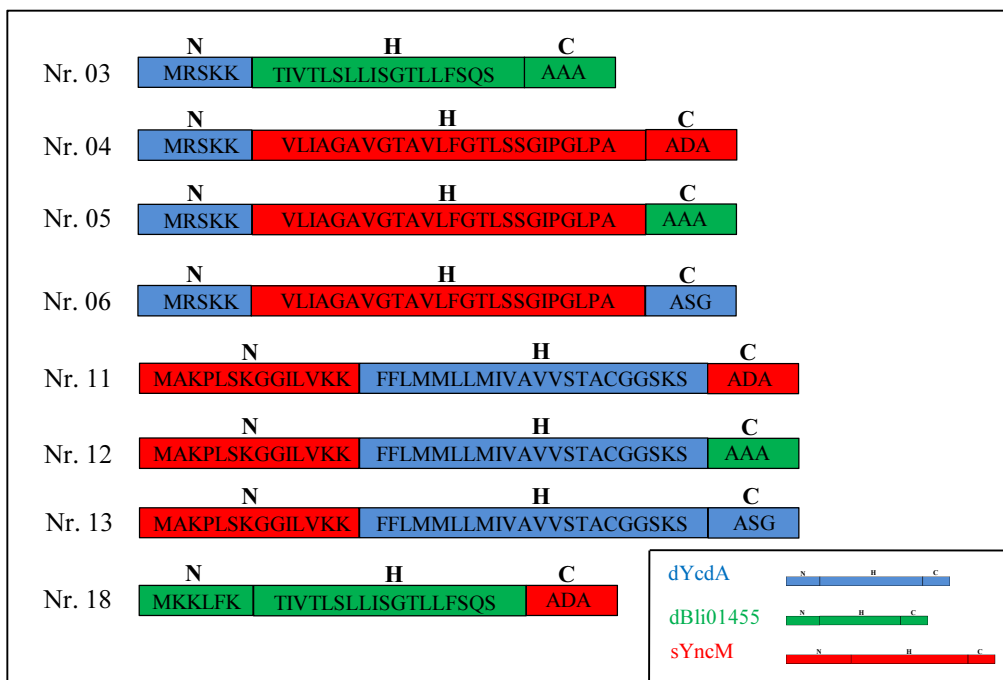


Abb. 27: Schematische Übersicht über einige der künstlich konstruierten SP mit jeweils unterschiedlichen Domänen der nativen Ausgangssignalpeptide. Dargestellt ist jeweils schematisch die Domänenstruktur der konstruierten Varianten (über ein Farbschema den nativen SP zugeordnet) unter Angabe der Proteinsequenz im Ein-Buchstabencode.

Einerseits scheint die C-Domäne also in vielen Fällen nur einen schwachen Einfluss auf die Exporteffizienz zu haben, andererseits zeigt das Beispiel von Variante Nr. 18, dass dies nicht generell der Fall zu sein scheint.

Insgesamt konnte somit am Beispiel von Protease B gezeigt werden, dass sich mit Hilfe der, über den Austausch der funktionellen Domänen künstlich konstruierten SP, die Exportleistungen der im Hochdurchsatz-Screening identifizierten SP noch weiter steigern ließen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich durch den Austausch der funktionalen Domänen von verschiedenen Signalpeptiden untereinander funktionale Signalpeptid-Varianten konstruieren lassen. Auf dieser Basis konnte eine neue Methode entwickelt werden, die eine weitere Optimierung der Exporteffizienz von im Hochdurchsatz-Screening identifizierten Signalpeptiden erlaubt.

4. Diskussion

Neben *E. coli* werden vor allem Gram-positive Organismen der Gattung *Bacillus* seit vielen Jahren für die industrielle Proteinproduktion eingesetzt, da sie in der Lage sind, große Mengen Protein in den Kulturüberstand zu sekretieren (Schallmey *et al.*, 2004). Des Weiteren sind kostengünstige Nährmedien und hoch etablierte Fermentationsprozesse verfügbar, so dass etwa 60 % aller kommerziell vertriebener Enzyme mit *Bacillus*-Spezies produziert werden (Fu *et al.*, 2007). Neben den günstigen Fermentationsverfahren für die Synthese von Proteinen im industriellen Maßstab spielt auch die Aufarbeitung des Proteingemisches eine entscheidende Rolle, um eine wirtschaftliche Produktion zu gewährleisten. Bei der intrazellulären Produktion von Proteinen im oft verwendeten Gram-negativen Wirt *E. coli* liegt das Zielprotein im Cytoplasma vor, weshalb ein aufwändiger Aufschluss der Bakterienzellen erforderlich ist. Bei der Sekretion von Proteinen in den Kulturüberstand mit *Bacillus* entfällt dieser Schritt und es muss lediglich eine Fest-Flüssigtrennung durchgeführt werden, um die Zellen aus der Fermentationsbrühe zu entfernen. Die Mechanismen der Sekretion und das Verhalten in Hochzelldichte-Fermentationen wurden intensiv im oft verwendeten Modellorganismus *B. subtilis* untersucht. Neben *B. subtilis* spielen jedoch weitere *Bacilli* eine wichtige Rolle in der extrazellulären Produktion von Proteinen im industriellen Maßstab. So wird der nah verwandte Organismus *B. licheniformis* vor allem für die Produktion von hydrolytischen Enzymen wie Serinproteasen des Subtilisin Typs als Wasch- und Reinigungsmittelzusatz eingesetzt (Rao *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie sich die Proteinsekretion von verschiedenen *Bacilli* weiter verbessern lässt. Dafür wurde jeweils der Typstamm von *B. subtilis* und *B. licheniformis*, sowie ein auf maximale Sekretionsleistung optimierter *B. licheniformis*-Stamm mit industrieller Relevanz ausgewählt.

4.1 Die an der Sekretion beteiligten Komponenten von *Bacillus subtilis* und *Bacillus licheniformis* weisen sehr unterschiedliche Homologien auf

Die vollständige Genomsequenz von *B. subtilis* 168 wurde 1997 aufgeklärt und 2009 mit moderneren Methoden der Genomsequenzierung nochmals präzisiert (Kunst *et al.*, 1997; Barbe *et al.*, 2009). 2004 wurde dann auch das Genom des nahe verwandten Organismus *B. licheniformis* DSM13 vollständig entschlüsselt und annotiert (Rey *et al.*, 2004; Veith *et al.*, 2004). In Tab. 14 sind die Eigenschaften der Genome beider Organismen dargestellt. Dabei wird deutlich, dass sich die Organismen in Genomgröße, GC-Gehalt, Anzahl der ORF (*open reading frames*) und Anzahl der gesamten potentiellen SP wie erwartet sehr stark ähneln.

Tab. 14: Tabellarischer Vergleich der Genome von *B. subtilis* 168 und *B. licheniformis* DSM13 (Kunst *et al.*, 1997; Veith *et al.*, 2004).

	<i>B. subtilis</i> 168	<i>B. licheniformis</i> DSM13
Genom-Größe	4.214.810 Bp	4.222.748 Bp
kodierender Anteil	87,0 %	87,9 %
ORF`s	4.112	4.286
GC-Gehalt	43,5 %	46,2 %
rRNA Operons	10	7
tRNA Gene	86	72
potentielle SP	297	296

Da in dieser Arbeit u.a. die Fragestellung untersucht werden sollte, ob sich die Proteinexport-Effizienzen einer Fusion von dem Zielprotein mit verschiedenen SP in *B. subtilis* und *B. licheniformis* ähneln, wurden die Aminosäuresequenzen der an der Sekretion beteiligten Komponenten beider Organismen miteinander verglichen und so der Grad der Homologie untersucht. Zuvor wurde bereits beschrieben, dass bis auf eine der fünf Signalpeptidasen von *B. subtilis* alle Komponenten des Sec-Apparates in beiden Organismen homolog vorhanden sind (Rey *et al.*, 2004; Veith *et al.*, 2004). Im Rahmen der Homologie-Untersuchungen wurde deutlich, dass die cytoplasmatischen und membranständigen Komponenten des Sec-Apparates von beiden Organismen mit durchschnittlich 84 % sehr hohe Homologien aufweisen. Verschiedene Komponenten des Sec-Apparates interagieren direkt mit dem SP des sekretierten Proteins. Eine dieser Komponenten ist das Ffh-Protein, dessen SP-Bindedomäne sich nur an vier Positionen zwischen *B. subtilis* und *B. licheniformis* unterscheidet (Abb. 5). Daher ist die Wahrscheinlichkeit relativ hoch, dass sich die Eigenschaften der Ffh-Proteine aus *B. subtilis* und *B. licheniformis* in diesem Bereich stark ähneln und die Interaktion zwischen SP und Ffh-Protein in beiden Organismen möglicherweise vergleichbar abläuft. Auch die SecA-Proteine von *B. subtilis* und *B. licheniformis* weisen eine Gesamtidentität von 91 % auf, wobei bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte, welcher Teil von SecA für die Bindung des Signalpeptids zuständig ist (Gelis *et al.*, 2007; Musial-Siwiek *et al.*, 2007; Auclair *et al.*, 2010). Daher war der direkte Vergleich der SP-Bindedomänen von den SecA-Proteinen beider Organismen wie beim Ffh-Protein nicht möglich.

Die post-translokational an der Sekretion beteiligten Komponenten sind deutlich schwächer homolog

Während die cytoplasmatischen Sec-Komponenten von *B. subtilis* und *B. licheniformis* Homologien zwischen 80 % und 90 % aufweisen, wurden für die in der späten Phase der

Translokation aktiven Komponenten deutlich geringere Homologien ermittelt. In *B. subtilis* wurden fünf verschiedene Typ I Signalpeptidasen identifiziert, in *B. licheniformis* allerdings nur vier, da für SipU kein Homologon in *B. licheniformis* nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise wiesen auch die anderen Signalpeptidasen nur Homologien im Bereich von 47-75 % (durchschnittlich 63 %) auf. Daher wäre es möglich, dass sich die Abläufe bei der Prozessierung der SP in *B. subtilis* und *B. licheniformis* stärker unterscheiden als die Abläufe im Cytoplasma.

Die Signalpeptide der homolog vorkommenden, potentiell sekretierten Proteine weisen sehr unterschiedliche Sequenzhomologien auf

Es ist bekannt, dass Signalpeptide prinzipiell kaum Sequenzhomologien untereinander aufweisen, aber dennoch alle die gleiche Funktion erfüllen, was über die Strukturhomologie der verschiedenen funktionellen Domänen gewährleistet wird (von Heijne, 1990). Dennoch wurden in dieser Arbeit die Sequenzhomologien der SP von den homolog in *B. subtilis* und *B. licheniformis* vorkommenden, potentiell sekretierten Proteinen ermittelt. Auf diese Weise sollte untersucht werden, inwieweit sich die SP der homolog vorkommenden Proteine in beiden Organismen in Länge und Sequenzeigenschaften gleichen. Interessanterweise wiesen knapp die Hälfte der 71 homolog in beiden Organismen vorkommenden SP eine Sequenzidentität von mindestens 50 % auf. Darunter waren zehn SP mit einer Homologie von über 70 % und mit bis zu 92 % (Tab. 8). Die Sequenzen der hier diskutierten Signalpeptide wurden alle mit Hilfe von SignalP vorhergesagt (Tjalsma *et al.*, 2000; Voigt *et al.*, 2006) und die Verlässlichkeit der Vorhersagen bisher nicht experimentell überprüft. Anhand einiger Beispiele von verschiedenen SP wie PbpB oder YpmB wurde deutlich, dass sich diese Vorhersagen teilweise auch als problematisch erweisen können (Abb. 6). So wurde z.B. für SP PbpB aus *B. subtilis* eine Länge von 34 Aminosäuren vorhergesagt, während das SP PbpB aus *B. licheniformis* laut Vorhersage 41 Aminosäuren lang ist und über 10 zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus verfügt. Interessanterweise wurden dabei für das SP aus *B. subtilis* die Aminosäuren „RMA“ als Erkennungssequenz für die Signalpeptidasen vorhergesagt, während das SP aus *B. licheniformis* an der gleichen Position über die Sequenz „RFA“ verfügt, die Schnittstelle aber erst sieben Aminosäuren später mit „VNG“ identifiziert wurde (Abb. 6). An diesem Beispiel wird deutlich, dass sich die Vorhersagen für die Sequenzen der einzelnen SP in einigen Fällen als unzuverlässig erweisen könnten und eine experimentelle Untersuchung erforderlich wäre, um die tatsächliche Länge des SP zu ermitteln. Die N-terminale Sequenzierung des reifen Proteins nach erfolgter Translokation und Prozessierung wäre eine Möglichkeit, die tatsächliche Länge des SP zu ermitteln.

Neben dem SP selber hat auch der N-Terminus des reifen Proteins einen direkten Einfluss auf die Sekretionseffizienz eines Proteins (Itoh *et al.*, 1990; Kaderbhai *et al.*, 2004; Choo & Ranganathan, 2008; Harwood & Cranenburgh, 2008; Choo *et al.*, 2008b). Aus den

Untersuchungen zur Häufigkeit verschiedener Aminosäuren an der „+1“-Position wurde deutlich, dass sich nicht nur die Anzahl der potentiell sekretierten Proteine in *B. subtilis* und *B. licheniformis*, sondern auch die N-Termini in Bezug auf die „+1“-Position sehr stark ähneln (Abb. 7).

Bei Betrachtung der Gesamtheit der Erkenntnisse in Bezug auf die in den vorherigen Abschnitten diskutierten Homologien konnten zwar einige Unterschiede zwischen *B. subtilis* und *B. licheniformis* festgestellt werden, insgesamt lässt sich jedoch vermuten, dass die Ähnlichkeiten auf Sequenzebene auch zu einem sehr ähnlichen Ablauf der Sekretion in beiden Organismen führt. Inzwischen wurden von Voigt *et al.* (2009) ausführliche Untersuchungen zum extrazellulären Proteom beider Organismen unter verschiedenen Anzuchtbedingungen durchgeführt. Wie erwartet, wurden dabei hohe Ähnlichkeiten zwischen den Sekretomen beider Organismen festgestellt.

4.2 Optimierung der extrazellulären Proteaseproduktion im Wirt *Bacillus licheniformis* unter Verwendung einer Signalpeptid-Bank aus *Bacillus subtilis*

B. licheniformis wird häufig für die industrielle Produktion von Serinproteasen eingesetzt, die im großen Maßstab als Zusatz für Wasch- und Reinigungsmittel verwendet werden. Dabei werden die Proteasen direkt in den Kulturüberstand sekretiert. Obwohl die dafür eingesetzten Produktionsstämme in den meisten Fällen auf maximale Sekretionsleistung optimiert sind, gibt es dennoch Engpässe, die Einschränkungen in der Proteaseausbeute bewirken können. Einer dieser Engpässe ist die Auswahl des optimalen Signalpeptids für das jeweilige Zielenzym (Harwood & Cranenburgh, 2008; Nijland & Kuipers, 2008). Inzwischen wurde in mehreren Studien gezeigt, dass die Vorhersage über die Effizienz eines Signalpeptids mit einem bestimmten Zielprotein bisher nicht möglich zu sein scheint und daher die Durchmusterung von Signalpeptid-Banken erforderlich ist (Brockmeier *et al.*, 2006; Mathiesen *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2009). Diese bisher veröffentlichten Ansätze für die Durchführung von Signalpeptid-Screenings wurden allerdings mit Stämmen durchgeführt, die molekularbiologisch gut zu handhaben und nicht auf maximale Sekretionsleistung ausgelegt waren. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit die Durchmusterung von Signalpeptid-Banken auch in Hochleistungs-Sekretionsstämmen erfolgreich eingesetzt werden kann. Des Weiteren sollte erstmals untersucht werden, ob sich die Varianz der verfügbaren Signalpeptide für einen Expressionswirt durch den Einsatz wirtsfremder Signalpeptide effizient erhöhen lässt.

Dafür wurden zwei verschiedene Serinproteasen des Subtilisin-Typs aus *B. lentus* und *B. gibsonii* ausgewählt, die anwendungstechnisch interessante Eigenschaften aufweisen. Das Signalpeptid-Screening für die Optimierung des Exports der beiden Proteasen wurde in einem

Hochleistungs-Sekretionsstamm von *B. licheniformis* durchgeführt, um zu untersuchen, inwieweit sich die Methode auch für die Optimierung von anwendungstechnisch relevanten Stämmen eignet.

Für die Durchführung des Signalpeptid-Screenings wurde die jeweilige Protease in den *Bacillus*-Vektor pBSM_{ul}5 kloniert, nachdem die für die Klonierung relevanten Schnittstellen aus beiden Genen durch das Einfügen stiller Mutationen eliminiert worden waren. Durch die gewählte Klonierungsstrategie wurde die spätere Expression von Protease und SP in *Bacillus* durch den starken, konstitutiven HpaII-Promotor gewährleistet (Abb. 8).

Geringe Transformationseffizienz des Hochleistungs-Sekretionsstammes führt zu Einschränkungen im Hochdurchsatz-Screening

Die Durchführung des Signalpeptid-Screenings im Wirt *B. licheniformis* H101/H402 erwies sich als sehr aufwändig. Aufgrund der sehr geringen Transformationseffizienz (teilweise <50 Klone/ μ g Plasmid-DNA) des Hochleistungs-Sekretionsstammes war es erforderlich, die Klonierung der Signalpeptide in den Vektor pBSM_{ul}5A bzw. pBSM_{ul}5L im Wirt *B. subtilis* durchzuführen. Über die Protoplastentransformation konnte *B. subtilis* mit Ligationsansätzen transformiert werden, während *B. licheniformis* H101/H402 ausschließlich mit intakten Plasmiden über Elektroporation transformierbar war. Eine der Ursachen für die geringe Transformationseffizienz von *B. licheniformis* ist das Vorhandensein eines Restriktions-Modifikationssystems, welches wirtsfremde DNA effektiv degradiert. Wie von Waschkuo *et al.* (2008) gezeigt werden konnte, kann die Deletion des Restriktions-Modifikationssystems zu Stammvarianten von *B. licheniformis* führen, die stark verbesserte Sekretionseffizienzen aufweisen. Die Grundvoraussetzung dafür ist allerdings die Verfügbarkeit der Genomsequenz des entsprechenden Stammes, um über Homologie-Untersuchungen die Gene zu identifizieren, die für Komponenten des Restriktions-Modifikationssystems kodieren. Da die Genomsequenz von industriell relevanten Stämmen jedoch meist nicht verfügbar ist, erweist sich die Optimierung der Stämme in Hinsicht auf die Transformationseffizienz durch das Einfügen von gezielten Deletionen oft als nicht praktikabel. In dieser Arbeit wurde daher die Klonierung der Signalpeptid-Bank in den jeweiligen Vektor im Wirt *B. subtilis* durchgeführt, die erhaltenen Transformanten von den Agarplatten abgeschwemmt, die Plasmid-DNA dieser Klone isoliert und *B. licheniformis* damit transformiert.

Optimierung des Proteaseexports im Wirt *Bacillus licheniformis* mit wirtsfremden Signalpeptiden

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich die Signalpeptid-Bank mit 173 Signalpeptiden aus *B. subtilis* im homologen Wirt erfolgreich für die Optimierung des Exports von

unterschiedlichen Zielproteinen einsetzen ließ (Brockmeier *et al.*, 2006), sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob sich diese Strategie auch im heterologen Wirt *B. licheniformis* anwenden lässt. Zwar wurden wirtsfremde Signalpeptide vereinzelt erfolgreich für die Optimierung des Exports eines bestimmten Zielenzym eingesetzt (Tab. 1), allerdings wurde bisher keine Studie veröffentlicht, bei der eine Signalpeptid-Bank mit einer Vielzahl von wirtsfremden SP durchmustert wurde. Des Weiteren sollte die Methode erstmals in einem Stamm mit industrieller Relevanz angewendet werden, der für die extrazelluläre Produktion von Proteinen optimiert wurde. Als Modellenzyme wurden dafür zwei verschiedene Proteasen aus *B. lentus* und *B. gibsonii* mit anwendungstechnisch interessanten Eigenschaften ausgewählt.

Für die Ermittlung der Export-Effizienz verschiedener Signalpeptide wurde die Lysehof-Bildung der *B. licheniformis* Klone auf Skim-Milk-Agarplatten untersucht. Nachdem an verschiedenen Beispielen gezeigt werden konnte, dass Klone ohne Lysehof nur sehr geringe extrazelluläre proteolytische Aktivität aufwiesen, wurden für die Kultivierung in DW-MTP und die Durchmusterung der Signalpeptid-Bank nur Klone ausgewählt, die zuvor eine deutliche Lysehof-Bildung gezeigt hatten. Für das Screening wurde ein Gemisch aller 173 Signalpeptide verwendet, die Klone mit der höchsten proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand vereinzelt und die ermittelten Werte in mehreren voneinander unabhängigen Anzuchten verifiziert. Anhand der extrazellulären proteolytischen Aktivität wurde so die Export-Effizienz der verschiedenen Signalpeptide für beide Proteasen in Relation zum Benchmark-Konstrukt bestimmt und zusätzlich die Proteinmenge im Kulturüberstand anhand von SDS-PAGE Analysen untersucht. Als Benchmark-Signalpeptid wurde für beide Proteasen das SP SubC aus *B. licheniformis* verwendet, wobei es sich um ein für die Sekretion von Protease A und L etabliertes SP handelt. Im Screening wurden mehrere Klone von *B. licheniformis* identifiziert, die Konstrukte mit verschiedenen Signalpeptiden aus *B. subtilis* enthielten und den Export von Protease A in den DW-MTP Anzuchten um 200 % steigern konnten. Für Protease L wurden Steigerungen von etwa 80 % erreicht. Diese anhand der proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand ermittelten Werte korrelierten mit den in SDS-PAGE Analysen nachgewiesenen Proteinmengen (Abb. 9).

Es wurden jeweils nur die Proteinmenge und die proteolytische Aktivität im Kulturüberstand untersucht. Daher lässt sich nicht ausschließen, dass es durch die Fusion verschiedener Signalpeptide mit der entsprechenden Protease auch zu Transkriptions- oder Translationseffekten kommen kann. Wenn die Eigenschaften der mRNA von den verschiedenen Fusionen beeinflusst werden, ist es möglich, dass das Transkript beispielsweise stabiler ist oder die Translation generell begünstigt wird und somit eine erhöhte Translation der entsprechenden Fusion stattfinden kann (Gu *et al.*, 2010). Dies würde zu einer erhöhten Menge Substratprotein führen und könnte somit auch eine der Ursachen für einen verstärkten Proteaseexport sein. Insbesondere am Beispiel der mRNA des Gens der extrazellulären Protease AprE wurde gezeigt, dass große Unterschiede in der Stabilität verschiedener mRNAs

auftreten und dass das Transkript von *aprE* besonders stabil ist (Resnekov *et al.*, 1990; Hambreus *et al.*, 2000). Nach Hambreus *et al.* ist die Ursache für die lange Lebensdauer der mRNA von *aprE* die Ausbildung einer Sekundärstruktur in der 5'-Region des Transkripts (Hambreus *et al.*, 2002). Während die Ursachen für die von Hambreus *et al.* beschriebenen Effekte jedoch in der 5'-Region der mRNA zu finden sind, blieb diese Region in der in dieser Arbeit gewählten Klonierungsstrategie für die verschiedenen Fusionen aus Protease und unterschiedlichen SP unverändert. Dennoch lässt sich nicht ausschließen, dass durch Variation der Sequenz des Signalpeptids die Stabilität der mRNA der jeweiligen Fusion beeinflusst werden kann. Zusätzlich zu den beschriebenen denkbaren Stabilitätseffekten könnten Expressionseffekte auch durch unterschiedliche Codon-Nutzung zustande kommen. So wurde von Zalucki *et al.* (2009) gezeigt, dass selten genutzte Codons in Signalpeptiden gehäuft vorkommen. Neben den Sekretions-Effekten kann also nicht ausgeschlossen werden, dass auch Expressions-Effekte zu einem erhöhten Proteaseexport geführt haben können. Zusammenfassend konnte die Proteaseausbeute im Wirt *B. licheniformis* H402 durch das Screening wirtsfremder Signalpeptide reproduzierbar verdoppelt und mit SP sYncM im Falle von Protease A verdreifacht werden.

Der N-Terminus des Substratproteins hat einen hohen Einfluss auf die Export-Effizienz mit verschiedenen Signalpeptiden

Es ist bekannt, dass der N-Terminus des sekretierten Substratproteins einen Einfluss auf die Sekretionseffizienz hat (Hemilae & Sibakov, 1991; Choo & Ranganathan, 2008) und wie von Kouwen *et al.* (2010) gezeigt wurde, kann das Anfügen einer zusätzlichen Peptidkette an den N-Terminus des sekretierten Proteins PhoA aus *E. coli* im Wirt *B. subtilis* eine verbesserte Exporteffizienz bewirken. In der vorliegenden Arbeit wurden Konstrukte von Protease A und Protease L verwendet, die über das gleiche Propeptid verfügen (siehe Anhang). Somit wurden beide Proteasen mit dem gleichen N-Terminus synthetisiert und nur die SP variiert. Um den Einfluss des N-Terminus von sekretierten Proteinen näher zu untersuchen, sollten in dieser Arbeit gezielt verschiedene Signalpeptide mit potentiell unterschiedlich guten Exportleistungen vor Protease A und L kloniert werden. Dafür wurden sowohl wirtsfremde Signalpeptide aus *B. subtilis*, als auch SP aus dem Wirt *B. licheniformis* DSM13 verwendet und die Exporteffizienz der verschiedenen Fusionen in Relation zum Benchmark-Konstrukt mit dem Signalpeptid SubC im Wirt *B. licheniformis* H402 untersucht (Abb. 10). Insgesamt wurden vier verschiedene Signalpeptide aus *B. subtilis* und fünf SP aus *B. licheniformis* vor beide Proteasen kloniert. Die Untersuchung der proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand der jeweiligen Klone in mehreren voneinander unabhängigen DW-MTP Kultivierungen ergab, dass die Export-Effizienzen der verschiedenen Signalpeptide für beide Proteasen sehr ähnlich waren. Während die Signalpeptide sYwmC und sYraJ beispielsweise eine Steigerung des Protease-Exports für beide Proteasen bewirkten, wurden mit den SP dBli01882 und dPelB

jeweils schwächere Exportleistungen ermittelt. Mit SP dBli01595 aus *B. licheniformis* DSM13 wurden beide Proteasen nur sehr schlecht exportiert und die proteolytische Aktivität im Kulturüberstand war sehr gering (Abb. 10). Brockmeier *et al.* (2006) konnten zeigen, dass Signalpeptide, die mit einem Substratprotein gute Sekretionsleistungen aufwiesen, nicht unbedingt auch ähnlich hohe Sekretionseffizienzen mit anderen Substratproteinen bewirken, was auch von Mathiesen *et al.* (2009) bestätigt werden konnte. Die hier diskutierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass der N-Terminus der beiden untersuchten Proteasen einen starken Einfluss auf die Export-Effizienz im Zusammenspiel mit dem jeweiligen Signalpeptid zu haben scheint, da unterschiedliche Signalpeptide sehr ähnliche Export-Effizienzen von zwei verschiedenen Proteasen mit dem gleichen Propeptid bewirkt haben. Für eine Fortführung der Untersuchungen zum Einfluss des N-Terminus von Substratproteinen auf die Export-Effizienz mit verschiedenen Signalpeptiden wäre es interessant, diesen Effekt mit weiteren Zielproteinen zu studieren. Dazu könnten beispielsweise weitere Proteasen mit identischen Propeptiden fusioniert und hinzu genommen werden. Falls sich der starke Einfluss des N-Terminus des sekretierten Proteins in zukünftigen Untersuchungen bestätigen sollte, wäre es außerdem hilfreich, ein Modellkonstrukt zu entwickeln, bei dem der wildtypische N-Terminus gezielt modifiziert werden kann. So könnten beispielsweise gezielt N-terminale Peptidketten in unterschiedlichen Längen als Standard-Domäne vor das entsprechende Modellprotein kloniert werden. Dabei müsste allerdings zuvor sichergestellt werden, dass die spezifische Aktivität aller Varianten des so konstruierten Enzyms identisch ist und nicht durch das Anfügen der Peptidketten beeinflusst wurde. Auf diese Weise könnte untersucht werden, ob es relevant ist, wie lang die Standard-Domäne am N-Terminus des sekretierten Proteins sein muss, um mit verschiedenen Signalpeptiden ähnliche Sekretionseffizienzen zu erreichen.

Erhöhung der Diversität von Signalpeptid-Banken durch Verwendung wirtsfremder Signalpeptide

Nachdem in den vorherigen Abschnitten gezeigt werden konnte, dass sich Signalpeptide aus *B. subtilis* auch für die Optimierung des Protease-Exports im Wirt *B. licheniformis* einsetzen lassen, sollte in dieser Arbeit die Diversität der verfügbaren Signalpeptid-Banken für *Bacillus* durch den Einsatz wirtsfremder Signalpeptide aus verwandten *Bacilli* erhöht werden. Dafür wurden 220 Signalpeptide aus *B. licheniformis* DSM13 mittels PCR amplifiziert, aufgereinigt und auf Größe und Konzentration kontrolliert. Es sind diverse Studien bekannt, in denen wirtsfremde Signalpeptide vereinzelt einen erfolgreichen Export des Zielproteins bewirken konnten (Tab. 1). Dabei konnte sogar gezeigt werden, dass ein pflanzliches Signalpeptid erfolgreich für die Sekretion in *B. subtilis* und ein bakterielles Signalpeptid wiederum erfolgreich für die Sekretion in Pflanzen eingesetzt wurde (Ribbe & Nagarajan, 1992; Moeller

et al., 2009). Die Strategie, eine große Signalpeptid-Bank mit wirtsfremden Signalpeptiden zu durchmustern und in den direkten Vergleich zu wirtseigenen Signalpeptiden zu stellen, ist jedoch neu. Nach einer Studie von Li *et al.* (2009) unterliegen Signalpeptide einer deutlich schnelleren evolutionären Veränderung als deren reife Proteine. Daher scheint die Strategie der künstlichen Erhöhung der Diversität durch Verwendung wirtsfremder Signalpeptide sehr vielversprechend. Für die Amplifikation der Signalpeptide aus *B. licheniformis* wurden die Vorhersagen von Voigt *et al.* (2006) verwendet und ausschließlich Signalpeptide amplifiziert, die über Schnittstellen für Typ I Signalpeptidasen verfügten. Dabei wurden auch alle Signalpeptide mit potentiellen Erkennungssequenzen für die Sekretion über den Tat-Weg erfasst und amplifiziert, da sich in *B. subtilis* herausgestellt hatte, dass die eindeutige Zuweisung eines SP zur Tat-abhängigen Sekretion meist schwierig war und bisher nur für zwei Proteine eine strikt Tat-abhängige Translokation nachgewiesen werden konnte (Jongbloed *et al.*, 2002; Jongbloed *et al.*, 2004). Des Weiteren scheint nicht immer allein das Signalpeptid ausreichend zu sein, um eine Tat-abhängige Sekretion des Zielproteins zu bewirken, da beispielsweise das Signalpeptid des Tat-abhängig sekretierten Proteins YwbN vor ein anderes Protein kloniert wurde und dennoch keine ausschließlich Tat-abhängige Sekretion des Konstruktes nachgewiesen werden konnte (Kolkman *et al.*, 2008). Daher wurden für die Konstruktion der Signalpeptid-Bank aus *B. licheniformis* DSM13 in dieser Arbeit auch die 19 Signalpeptide mit potentiell dem Tat-Motiv amplifiziert. Falls Signalpeptide mit Tat-Motiv einen besonders hohen Protease-Export zeigen sollten, wäre im Bedarfsfall der Nachweis zu erbringen, ob das Substratprotein über den Sec- oder den Tat-Weg sekretiert wird. Eine Möglichkeit dafür wäre die Inhibierung der Sec-abhängigen Sekretion mittels Natriumazid (Fortin *et al.*, 1990). Sollte das Substratprotein trotz Natriumazid-Zugabe weiterhin unverändert sekretiert werden, deutet dies auf eine Tat-abhängige Sekretion hin. Die 220 neu amplifizierten Signalpeptide aus *B. licheniformis* DSM13 wurden alle äquimolar gemischt und für die Klonierung in den *Bacillus*-Vektor pBSMu5 mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Um zu ermitteln, wie viele Klone für die vollständige Abdeckung der Signalpeptid-Bank gescreent werden müssen, wurde außerdem die Religationsrate ermittelt, indem von 30 zufällig ausgewählten Klonen die Plasmid-DNA isoliert und die Klonierung überprüft wurde. In weniger als 10 % der Fälle war die Klonierung nicht erfolgreich. Bei der Durchmusterung der Signalpeptid-Bank ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich in Einzelfällen Signalpeptide nur schwer vor ein bestimmtes Zielgen klonieren lassen und die konstitutive Expression des pBSMu5-Vektors sich nachteilig auf die Klonierung einiger Konstrukte in *B. subtilis* auswirken kann, die dann im Screening auf verbesserte enzymatische Aktivität nicht erkannt werden.

4.3 Direkter Vergleich der Export-Effizienzen von wirtseigenen und wirtsfremden Signalpeptiden

In Abschnitt 3.2 konnte gezeigt werden, dass der Protease-Export in *B. licheniformis* durch die Durchmusterung einer Signalpeptid-Bank aus *B. subtilis* erfolgreich optimiert wurde. Für den direkten Vergleich der Export-Effizienzen von wirtseigenen und wirtsfremden Signalpeptiden sollten die neu konstruierte SP-Bank mit 220 *B. licheniformis* Signalpeptiden und die Bank mit 173 Signalpeptiden aus *B. subtilis* vor das gleiche Zielenzym kloniert und so die Export-Effizienzen miteinander verglichen werden. Als Modell-Protein wurde dafür das Subtilisin BPN[‘] aus *B. amyloliquefaciens* ausgewählt und das wildtypische Signalpeptid von Subtilisin BPN[‘] als Benchmark-Signalpeptid verwendet.

Die Kupplung zwischen Signalpeptid und BPN[‘] verringert den Proteaseexport

Am Beispiel von BPN[‘] sollte außerdem der Einfluss der für die Klonierung der Signalpeptide notwendigen Kupplung (Abb. 8) untersucht werden. Dafür wurde BPN[‘] mitsamt dem wildtypischen Signalpeptid und ohne Kupplung amplifiziert und so pBSMul5BPN_wtSPkk konstruiert. Bei dem Vergleich der proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand von den Stämmen mit den Fusionen aus Subtilisin BPN[‘] mit und ohne Kupplung konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass die Kupplung einen starken Einfluss auf den Export von BPN[‘] in *B. subtilis* zu haben scheint. Die proteolytische Aktivität im Kulturüberstand des Stammes mit dem Konstrukt ohne Kupplung war im Vergleich zum Konstrukt mit Kupplung um den Faktor 4 erhöht (Abb. 12). Durch die im Screening verwendete Kupplung wird der N-Terminus des Substratproteins modifiziert und drei Aminosäuren verbleiben nach der Translokation am Propeptid der jeweiligen Protease. Da das Propeptid nach der Translokation autokatalytisch abgespalten wird, bleibt die reife Protease jedoch unmodifiziert. Dass es dennoch zu einer stark veränderten proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand kommt, kann mehrere Ursachen haben. Es ist bekannt, dass sich die Modifikation des Propeptids letztendlich auf die Konformation der reifen Protease auswirken kann, da das Propeptid unter anderem als Faltungshelfer fungiert und bei Fehlfunktion auch die reife Protease fehlgefaltet werden kann (Shinde *et al.*, 1997). Dies würde bedeuten, dass die spezifische Aktivität der Protease verändert wurde und eine verringerte proteolytische Aktivität bei gleicher Proteinmenge detektiert würde. Mittels SDS-PAGE und Western-Blot Analysen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Proteinmenge von BPN[‘] in etwa mit der jeweiligen proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand der beiden Stämme korreliert (Abb. 12). Somit kann eine massive Veränderung der spezifischen Aktivität durch das Anfügen der drei zusätzlichen Aminosäuren der Kupplung weitgehend ausgeschlossen werden. Daher ist der beobachtete Effekt vermutlich auf einen verschlechterten Export von

BPN⁺ zurückzuführen. Allerdings kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht bestimmt werden, ob die Kupplung einen negativen Einfluss auf die Bindung des Vorläuferproteins an die Komponenten der Sekretionsmaschinerie, die Translokation über die Membran oder aber auf die Prozessierung durch die Signalpeptidasen an der Außenseite der Cytoplasmamembran hat. Für zukünftige Projekte wäre eine Untersuchung dieses Effekts mittels Pulse-Chase Experimenten, um einen Einblick in den Ablauf der Prozessierungs-Geschwindigkeit von beiden Konstrukten zu erhalten, ein interessanter Ansatz (Caspers *et al.*, 2010). Für das weitere Vorgehen wurde die Klonierungsstrategie beibehalten und die Kupplung weiterhin unverändert eingesetzt, um die Vergleichbarkeit der Signalpeptid-Bank von *B. subtilis* mit der in dieser Arbeit konstruierten Bank aus *B. licheniformis* aufrecht zu erhalten. Da auf diese Weise alle Signalpeptide über die gleiche Strategie kloniert wurden, ist davon auszugehen, dass der beschriebene Effekt der Kupplung alle Konstrukte gleichermaßen betrifft.

Exporteffizienzen von wirtseigenen und wirtsfremden Signalpeptiden im direkten Vergleich

Um erstmals die Exporteffizienzen von wirtseigenen und wirtsfremden Signalpeptiden im direkten Vergleich zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die Signalpeptid-Bank aus *B. subtilis* und außerdem die 220 Signalpeptide aus *B. licheniformis* durchmustert und die Effizienz der Signalpeptide für den Export von Subtilisin BPN⁺ im Wirt *B. subtilis* ermittelt. Da jeweils ein Gemisch aller Signalpeptide aus einem Organismus vor Subtilisin BPN⁺ kloniert wurde, sollte eine entsprechend hohe Anzahl an Klonen untersucht werden, um soweit möglich sicherzustellen, dass alle SP mit guten Export-Effizienzen identifiziert werden. Dafür wurden beide Signalpeptid-Banken mit den entsprechenden Klonzahlen etwa 4-5x auf Skim-Milk Agarplatten für den qualitativen Nachweis von proteolytischer Aktivität abgebildet. Für die quantitative Ermittlung der Export-Effizienzen der verschiedenen SP wurden dann ausschließlich Klone ausgewählt, die eine deutliche Lysehofbildung aufwiesen und somit Konstrukte ausgeschlossen, die keinen signifikanten Export von Subtilisin BPN⁺ bewirken konnten. Mit den Klonen, die einen eindeutigen BPN⁺-Export aufwiesen, wurde die jeweilige Signalpeptid-Bank dann jeweils noch 2x im Flüssigaktivitätstest abgedeckt. Aus diesem Grund wurde für die meisten Klone eine signifikante proteolytische Aktivität im Kulturüberstand detektiert (Abb. 13). Interessanterweise wiesen die meisten der im Flüssigaktivitätstest untersuchten Fusionen aus verschiedenen SP und BPN⁺ eine bessere Export-Effizienz im Vergleich zum wildtypischen Signalpeptid „wtSP“ von BPN⁺ auf, welches als Benchmark-Konstrukt verwendet wurde. Dies deutet darauf hin, dass das wildtypische Signalpeptid von Subtilisin BPN⁺ im Wirt *B. subtilis* relativ schlechte Export-Effizienzen aufwies und dass durch die Vorauswahl von hofbildenden Klonen, Konstrukte mit sehr schlechten Sekretionseffizienzen von vornherein ausgeschlossen werden konnten. Sowohl in *B. subtilis*, als auch in *Lactobacillus plantarum* wurde gezeigt, dass nicht alle

nativen Signalpeptide die Sekretion des Zielenzym bewirken konnten (Brockmeier *et al.*, 2006; Mathiesen *et al.*, 2009) und je nachdem, welches Signalpeptid als Benchmark verwendet wurde, waren die relativen Steigerungen der Exportleistungen teilweise entsprechend sehr hoch (Watanabe *et al.*, 2009). Es ist daher davon auszugehen, dass dieser Effekt auch bei der in dieser Arbeit erstellten Signalpeptid-Bank mit 220 Signalpeptiden aus *B. licheniformis* auftritt. Da die Signalpeptide in dieser Arbeit jedoch im Gemisch kloniert wurden, konnten im Screening direkt die Signalpeptide mit den besten Export-Effizienzen identifiziert werden. Die proteolytischen Aktivitäten im Kulturüberstand der Stämme mit den acht effizientesten Signalpeptiden für den Export von Subtilisin BPN⁺ im Wirt *B. subtilis* sind in Abb. 14 dargestellt. Dabei wurden sowohl wirtseigene, als auch wirtsfremde Signalpeptide identifiziert und im Vergleich zum Konstrukt mit dem Benchmark-Signalpeptid maximal eine siebenfache Steigerung des BPN⁺-Exports mit dem Signalpeptid dBli00338 aus *B. licheniformis* und sYbdN aus *B. subtilis* erreicht. Die detektierten extrazellulären proteolytischen Aktivitäten korrelierten in etwa mit den Proteinmengen, die im Kulturüberstand mittels SDS-PAGE und Western-Blot Analysen ermittelt wurden (Abb. 15). Interessanterweise wurden sowohl wirtseigene, als auch wirtsfremde Signalpeptide identifiziert, die die höchsten Exporteffizienzen von Subtilisin BPN⁺ aufwiesen. Es scheint somit nicht zielführend zu sein, dass ausschließlich wirtseigene Signalpeptide für die Identifikation des besten Signalpeptids für die Sekretion eines bestimmten Zielproteins durchmustert werden. Als neue Strategie sollten zukünftige Projekte dieser Art deshalb mit Signalpeptid-Banken durchgeführt werden, die eine möglichst hohe Diversität aus wirtseigenen und auch wirtsfremden Signalpeptiden beinhalten.

Die Suche nach den Ursachen für die unterschiedlichen Exporteffizienzen

Um der Frage nachzugehen, was die Ursachen dafür sein könnten, dass die in Abb. 14 dargestellten Signalpeptide deutlich bessere Export-Leistungen aufwiesen als die übrigen, wie z.B. dMntA oder dResA, wurde untersucht, inwieweit sich BPN⁺ intrazellulär nachweisen ließ. Dafür wurden die Zellen verschiedener Stämme mit unterschiedlichen Fusionen aus Signalpeptiden und BPN⁺ aufgeschlossen und in einer Western-Blot Analyse versucht, BPN⁺ intrazellulär zu detektieren (Abb. 16). Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob sich bei Stämmen mit deutlich niedrigerem BPN⁺-Export (wie z.B. mit SP dResA) eine erhöhte Konzentration von BPN⁺ intrazellulär detektieren lässt. Zwar wurde dabei festgestellt, dass bei einem der effizientesten SP (dBli00338) kein Signal auf Höhe von BPN⁺ mit Signal- und Propeptid auftrat; allerdings war dies bei einem anderen SP mit einer ähnlich guten Export-Effizienz (sYbdN) anders. Insgesamt erwiesen sich diese Untersuchungen als nicht aussagekräftig, da nicht eindeutig geklärt werden konnte, warum auch der Leervektorstamm ein schwaches Signal auf der Höhe von BPN⁺ mit Propeptid und Signalpeptid (ca. 34 kDa)

und ohne Propeptid (ca. 27 kDa) zeigte (Abb. 16). Da das Propeptid erst nach der Translokation abgespalten wird, wäre intrazellulär ausschließlich BPN‘ mit Propeptid und mit Signalpeptid zu erwarten gewesen. Zusammenfassend können keine eindeutigen Aussagen aus den dargestellten Untersuchungen formuliert werden und für aussagekräftige Ergebnisse wären weiterführende Experimente mit eindeutigen Kontrollen des Zellaufschlusses erforderlich, um Kontaminationen durch andere Zellfraktionen ausschließen zu können. Außerdem müsste untersucht werden, ob die verwendeten Antikörper andere intrazelluläre Proteine detektieren, was einer der Gründe für die beobachteten Western-Blot Signale sein könnte.

Die Exporteffizienzen verschiedener Signalpeptide lassen sich nicht vorhersagen

Es gibt inzwischen zahlreiche Methoden, um Proteinsequenzen zu analysieren und mit verschiedenen Modellen die Wahrscheinlichkeit vorherzusagen, dass es sich dabei um ein Signalpeptid handelt (Bendtsen *et al.*, 2004; Frank & Sippl, 2008; Bagos *et al.*, 2009; Zhang & Li, 2009). Die am häufigsten angewendete Methode, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, ist SignalP (Bendtsen *et al.*, 2004). Die Methoden für die Identifikation von Signalpeptiden sind inzwischen relativ zuverlässig. Allerdings gibt es bisher keine Möglichkeit, eine Vorhersage über die Effizienz eines Signalpeptids für den Export eines bestimmten Zielproteins zu treffen. In Studien zur Zusammensetzung des extrazellulären Proteoms wurden diverse wildtypische Proteine von *Bacillus* identifiziert, die unter verschiedenen Bedingungen besonders stark sekretiert werden (Tjalsma *et al.*, 2004; Voigt *et al.*, 2006). Wie in der vorliegenden Arbeit und auch von Brockmeier *et al.* (2006) gezeigt werden konnte, lassen sich daraus jedoch keine generellen Vorhersagen über die Effizienz eines Signalpeptids treffen. Wenn die Signalpeptide der besonders stark sekretierten wildtypischen Proteine für den Export von heterologen Proteinen eingesetzt wurden, zeigen diese nicht notwendigerweise auch wieder eine gute Sekretionsleistung. Oft waren es Signalpeptide von unbekanntem oder nur schwach sekretierten wildtypischen Proteinen, die dann mit einem bestimmten Zielprotein dennoch die besten Exporteffizienzen aufwiesen (siehe Tab. 10 und Brockmeier *et al.*, 2006).

Die in dieser Arbeit identifizierten Signalpeptide mit den besten Exporteffizienzen wurden hinsichtlich der Länge, der Sequenzeigenschaften, der Ladung, der Hydrophobizität und des über SignalP ermittelten D-Scores untersucht. Dabei zeigten die acht effizientesten Signalpeptide in Bezug auf diese Eigenschaften keine erkennbaren signifikanten Muster, die eine Vorhersage darüber zulassen würden, warum das spezielle Signalpeptid einen besonders guten Export von Subtilisin BPN‘ bewirkt. In anderen Studien wurde teilweise vermutet, dass die Hydrophobizität der H-Domäne des jeweiligen Signalpeptids einen kritischen Einfluss auf die Sekretionseffizienz hat (Borchert & Nagarajan, 1991; Hikita & Mizushima, 1992; Zanen *et al.*, 2005). In einer Studie von Mathiesen *et al.* (2009), bei der eine Signalpeptid-Bank aus

Lactobacillus plantarum verwendet und im homologen Wirt durchmustert wurde, konnte ebenfalls ermittelt werden, dass die Hydrophobizität der H-Domäne bei den Signalpeptiden mit den besten Exporteffizienzen ein kritischer Punkt war. Wie in Tab. 11 erkennbar, konnte dies im Falle der Untersuchungen zum Export von Subtilisin BPN[‘] nicht festgestellt werden. Auch in einer Studie von Fu *et al.* (2008) wurde berichtet, dass eine Erhöhung der Hydrophobizität eines Signalpeptids zu einem verschlechtertem Export des Zielproteins führen kann. Zusammenfassend sind in der Literatur sehr unterschiedliche Aussagen über die Auswirkung von Hydrophobizität-Modifikationen in Signalpeptiden zu finden und bisher lassen sich daraus keine generellen Schlüsse ziehen, die eine Vorhersage über den Einfluss dieser Modifikationen auf die Exporteffizienz erlauben würde.

Für eine effiziente Translokation ist die Prozessierung des Vorläuferproteins über eine Signalpeptidase von entscheidender Bedeutung. Die Sequenz der in dieser Arbeit verwendeten Signalpeptide wurde auf Basis der Wahrscheinlichkeitsberechnungen mittels SignalP vorhergesagt und die Signalpeptide anhand dieser Vorhersagen amplifiziert. Daher ist davon auszugehen, dass nicht bei allen der 220 Signalpeptide aus *B. licheniformis* die Schnittstelle der Signalpeptidasen korrekt vorhergesagt wurde. Um zu beweisen, dass die vorhergesagten C-Domänen der Signalpeptide auch tatsächlich in allen Fällen zutreffen, wäre es erforderlich, die wildtypischen sekretorischen Proteine N-terminal zu sequenzieren und so die tatsächliche „+1“-Position des jeweiligen Proteins und damit die genaue Schnittstelle der Signalpeptidasen zu ermitteln. Da dies aufgrund des großen Aufwands jedoch bisher nie gemacht wurde, ist davon auszugehen, dass einige der Vorhersagen fehlerhaft sein werden. Daher sind vermutlich Signalpeptide in der Bank enthalten, die sich nicht effizient prozessieren lassen, da die tatsächliche Schnittstelle der Signalpeptidase beispielsweise gar nicht im amplifizierten Konstrukt enthalten ist. So ist es zum Beispiel unwahrscheinlich, dass die Prozessierung des Signalpeptids dMntA tatsächlich an der vorhergesagten Sequenz „SSS“ stattfinden wird, da es sich dabei um eine sehr ungewöhnliche Erkennungssequenz handelt (Tab. 11). Daher ist es denkbar, dass es durch die Prozessierung zu einer Modifikation der Kupplung bzw. des Propeptids kommen kann. Dass ein unwahrscheinliches Sequenzmotiv in der C-Domäne eines Signalpeptids jedoch nicht der einzige Grund für eine ineffiziente Translokation sein muss, zeigt das Beispiel des wildtypischen Signalpeptids von BPN[‘]. Die Erkennungssequenz des wildtypischen SP wurde als „AQA“ vorhergesagt. Dabei handelt es sich um eine relativ häufig vorkommende Erkennungssequenz für Typ I Signalpeptidasen. Dennoch konnte mit dem Konstrukt aus BPN[‘] und dem wtSP nur ein relativ schwacher Export von BPN[‘] erreicht werden.

Neben den bisher beschriebenen Eigenschaften der Signalpeptide ist bekannt, dass auch die Ausbildung von Sekundärstrukturen für die Funktionalität von Signalpeptiden entscheidend sein kann (Nakamura *et al.*, 1989; Saunders *et al.*, 1991; Sakakibara *et al.*, 1993; van Roosmalen *et al.*, 2004). Die Ausbildung von α -helicalen Strukturen im Bereich der H-Domäne des Signalpeptids ist ein wichtiger Faktor für die Einlagerung in die Phospholipid-

Doppelschicht. Daher wurden in dieser Arbeit die potentiellen Sekundärstrukturen der Signalpeptide mit den besten Exporteffizienzen und von weniger effizienten Signalpeptiden mit Hilfe von PsiPred vorhergesagt (Abb. 17). Auch bei diesen Untersuchungen ließen sich wiederum keine signifikanten Muster erkennen, die es erlauben würden Ursachen zu benennen, warum ein Signalpeptid besonders hohe oder besonders niedrige Exporteffizienzen aufwies.

Die im Hochdurchsatz-Screening ermittelten Exporteffizienzen unterschiedlicher Signalpeptide lassen sich in Hochzelldichte-Fermentationen reproduzieren

Um zu untersuchen, ob die im Hochdurchsatz-Screening identifizierten Exporteffizienzen der verschiedenen Signalpeptide vom MTP-Maßstab auf Kultivierungsbedingungen mit anwendungstechnisch interessantem Maßstab übertragbar sind, wurden ausgewählte Stämme im Schüttelkolben und in Hochzelldichte-Fermentationen kultiviert. Für die Schüttelkolbenanzuchten wurden vier verschiedene Stämme mit unterschiedlichen Fusionen von BPN⁺ und Signalpeptiden ausgewählt. Dabei konnten die im Mikrotiterplatten-Format ermittelten Exporteffizienzen auch in der Kolbenanzucht bestätigt werden (Abb. 18).

Für die industrielle Produktion von Proteinen werden meist Hochzelldichte-Fermentation durchgeführt. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit sich die im Schüttelkolben und in der MTP ermittelten Exporteffizienzen auf einen industriell relevanten Prozess übertragen lassen. Zu diesem Zweck wurde ein Medium für die Hochzelldichte-Fermentation von *B. subtilis* nach Park *et al.* (1992) verwendet und ein entsprechender Prozess in einem 5 Liter Fermenter etabliert. Neben dem *B. subtilis* Stamm mit dem Konstrukt aus BPN⁺ und dem Benchmark-Signalpeptid „wtSP“ wurde außerdem der Stamm mit der Fusion aus dem im Hochdurchsatz-Screening identifizierten SP dBli00338 und BPN⁺ für die Hochzelldichte-Fermentationen ausgewählt. Beide Konstrukte wurden jeweils in zwei voneinander unabhängigen Fermentationen kultiviert und die Zelldichte sowie die proteolytische Aktivität im Überstand über den Prozessverlauf verfolgt (Abb. 19). Dabei wurde der Fermentations-Prozess dahingehend optimiert, dass für die Erhöhung der maximal erreichbaren Zelldichte im jeweils zweiten Prozess (Prozess B) eine modifizierte Feed-Lösung eingesetzt (Tab. 12) und Hefeextrakt neben Pepton eingesetzt wurde. Wie auch von Voulanto *et al.* (2001) beschrieben, konnte die maximale Zelldichte um etwa 35 % auf eine OD von ca. 100 gesteigert werden. Aus bisher unbekanntem Ursachen konnte die extrazelluläre proteolytische Aktivität im Gegensatz zur Zelldichte in Prozess B jedoch überraschenderweise nicht gesteigert werden. Die maximale Zelldichte und auch die maximale proteolytische Aktivität im Überstand der Fermentationsbrühe wurde jeweils nach 48 h erreicht. Mit Signalpeptid dBli00338 konnten im Mikrotiterplatten-Maßstab und im Schüttelkolben Steigerungen der Exportleistungen von BPN⁺ im Vergleich zum Benchmark in einem Bereich von 7x-10x erreicht werden. Wie durch die Bestimmung der proteolytischen

Aktivität im Kulturüberstand und die Ermittlung der Proteinmenge durch SDS-PAGE und Western-Blot Analysen (Abb. 20) gezeigt werden konnte, war dies interessanterweise auch in den Hochzelldichte-Fermentationen möglich.

Die in Abschnitt 3.3.4.2 durchgeführten Hochzelldichte-Fermentationen wurden mit einem in der Literatur beschriebenen Fermentationsmedium für *B. subtilis* durchgeführt. Für eine weitere Überprüfung der Anwendbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit wurden außerdem externe Fermentationen im 2 Liter Maßstab unter nicht näher genannten Prozessbedingungen mit einem industriell relevanten Fermentationsmedium, das eine kostengünstige komplexe Stickstoffquelle enthält, durchgeführt. Für diese externen Fermentationen wurden Fusionen aus einer Variante von Subtilisin BPN' und den in der vorliegenden Arbeit identifizierten Signalpeptiden dBli00338 und sYbdN mit stark verbesserten Exporteffizienzen verwendet. Als Expressionssystem diente ein nicht näher definiertes Vektorsystem und ein industriell relevanter *B. licheniformis* Stamm.

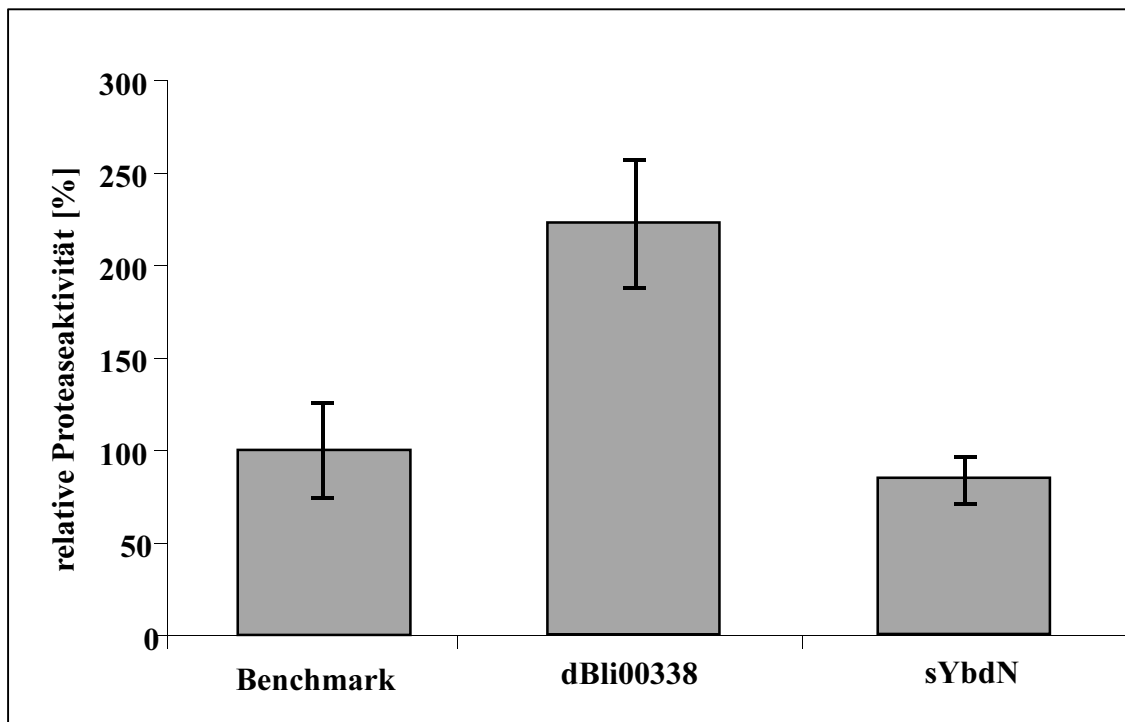


Abb. 28: Überprüfung der Anwendbarkeit von in dieser Arbeit identifizierten Signalpeptiden mit gesteigerten Exportleistungen in einem industriell relevanten Fermentationsprozess unter Verwendung eines Vektorsystems mit hohen Expressionsleistungen und einem *B. licheniformis* Stamm mit anwendungstechnisch interessanten Eigenschaften. Dargestellt ist jeweils die nach Abschluss des Prozesses ermittelte relative proteolytische Aktivität im Überstand der Fermentationsbrühe mit AAPF als Substrat. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von den in mindestens zwei voneinander unabhängigen Fermentationsprozessen ermittelten Werten an. Als Benchmark diente ein nicht näher genanntes Signalpeptid. Bei dBli00338 und sYbdN handelt es sich um die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Signalpeptide in Fusion mit der Variante von BPN' in einem leistungsfähigen Vektorsystem.

Die Prozessbedingungen, das Kultivierungsmedium, das Vektorsystem und der verwendete Expressionsstamm der extern durchgeführten Fermentationen weichen massiv von den in Abschnitt 3.3.4.2 durchgeführten Hochzelldichte-Fermentationen ab. Es wurde außerdem eine Variante von Subtilisin BPN⁺ verwendet, die nicht identisch mit dem in dieser Arbeit verwendeten BPN⁺ ist. Weiterhin wurde als Benchmark-Konstrukt nicht die Fusion aus dem wildtypischen Signalpeptid und BPN⁺, sondern ein anderes, nicht näher benanntes Signalpeptid verwendet. Aus den oben genannten Gründen, lassen sich die Ergebnisse aus den externen Fermentationen nicht direkt mit denen aus der vorliegenden Arbeit vergleichen. Die Ermittlung der Ursachen dafür, dass mit Signalpeptid sYbdN deutlich schwächere Exportleistungen der BPN⁺-Variante im Vergleich zu dBli00338 erreicht wurden, ist daher schwierig. Dass dieser Effekt jedoch vermutlich nicht darauf zurückzuführen ist, dass es sich um ein wirtsfremdes Signalpeptid aus *B. subtilis* handelt, welches im Wirt *B. licheniformis* verwendet wurde, konnte in den Untersuchungen zur Exporteffizienz unterschiedlicher Signalpeptide in verschiedenen *Bacillus*-Wirten gezeigt werden (wie in Abschnitt 3.3.5 detailliert dargestellt). Die Exportleistungen für das wildtypische Subtilisin BPN⁺, welches in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, waren im Gegensatz zu den in Abb. 28 gezeigten Ergebnissen mit diesen beiden Signalpeptiden in mehreren *Bacillus*-Wirten sehr ähnlich. Für eine nähere Untersuchung dieses Effekts wäre es interessant, ausführliche Fermentations-Experimente unter identischen Prozessbedingungen mit den Signalpeptiden sYbdN und dBli00338 in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Expressionssystem durchzuführen. Zusammenfassend konnten die in Abb. 28 dargestellten Ergebnisse der extern durchgeführten Versuche jedoch zeigen, dass zumindest mit Signalpeptid dBli00338 auch die Exportleistungen der BPN⁺-Variante um mehr als 100 % im Vergleich zum Benchmark gesteigert werden konnten, obwohl die Bedingungen des Expressionssystems massiv verändert wurden.

Somit konnte am Beispiel der beiden ausgewählten Signalpeptide demonstriert werden, dass sich die im Hochdurchsatz-Screening ermittelten Exporteffizienzen teilweise auf verschiedene, anwendungstechnisch interessante Hochzelldichte-Fermentationen von *Bacillus* übertragen ließen.

Untersuchung der Exporteffizienzen verschiedener Signalpeptide in unterschiedlichen *Bacillus*-Wirten

In 3.1 wurden Untersuchungen zur Homologie von *B. subtilis* und *B. licheniformis* durchgeführt und auf die Unterschiede und die Gemeinsamkeiten in Bezug auf den Sekretionsapparat eingegangen. Daraus ergab sich die interessante Fragestellung, inwieweit sich die Abläufe des Proteinexports in beiden Organismen tatsächlich ähneln. Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, konnten wirtsfremde Signalpeptide erfolgreich für die Optimierung des Exports von verschiedenen Zielproteinen eingesetzt werden. Dabei wurden

sowohl SP aus *B. subtilis* im Wirt *B. licheniformis* verwendet als auch die Exporteffizienzen von Subtilisin BPN' mit wirtseigenen und auch wirtsfremden Signalpeptiden im Wirt *B. subtilis* direkt miteinander verglichen.

Für weiterführende Untersuchungen wurden, wie in Abschnitt 3.3.5 beschrieben, zehn verschiedene Konstrukte mit Fusionen aus dem wildtypischen Subtilisin BPN' und Signalpeptiden mit unterschiedlichen Exporteffizienzen ausgewählt und *B. licheniformis* MW3, sowie *B. licheniformis* H402 damit transformiert. Auf diese Weise sollte untersucht werden, inwieweit die im Screening-Wirt *B. subtilis* ermittelten Exporteffizienzen auf die Variante des *B. licheniformis* Typstammes (MW3) und den auf Sekretionsleistung optimierten *B. licheniformis* H402 übertragbar waren (Abb. 21). Dafür wurde die Exporteffizienz des jeweiligen *Bacillus*-Stammes mit dem Benchmark-Konstrukt aus der Fusion von BPN' und dem wildtypischen SP („wtSP“) als 100 % definiert und so jeweils die Exporteffizienzen in den drei verschiedenen Wirten ermittelt (Abb. 23). In Abb. 24 wurden dann die Abweichungen der in den beiden *B. licheniformis* Stämmen ermittelten Exporteffizienzen zu denen aus *B. subtilis* dargestellt. Dabei wurde deutlich, dass ein Großteil der untersuchten Konstrukte in allen drei Wirten sehr ähnliche Exporteffizienzen aufwiesen und die Abweichung unter 20 % lag (Abb. 24). Eine Ausnahme stellte hierbei die Fusion aus Subtilisin BPN' und dem Signalpeptid dYdhT dar. Für diesen Stamm wurde interessanterweise in beiden *B. licheniformis*-Wirten eine deutlich verringerte Exporteffizienz im Vergleich zu der in *B. subtilis* ermittelten Effizienz detektiert (Abb. 23). Während die in Abschnitt 3.1 dargestellten Unterschiede zwischen den Sekretionsapparaten von *B. subtilis* und *B. licheniformis* also auf die meisten der untersuchten SP-BPN'-Fusionen keinen gravierenden Effekt zu haben schienen, war dies für die Fusion mit SP dYdhT offensichtlich anders. Wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, weisen vor allem die Signalpeptidasen die größten Unterschiede zwischen *B. subtilis* und *B. licheniformis* auf. Daher wäre eine denkbare Erklärung für die unterschiedlichen Exporteffizienzen der Fusion aus dYdhT und BPN', dass sich die Region der Erkennungssequenz („SYA“ laut Vorhersage für dYdhT) so verändert hat, dass die Prozessierung durch die Signalpeptidasen in *B. subtilis* und *B. licheniformis* unterschiedlich effizient abläuft, wie an anderen Beispielen gezeigt wurde (Sakakibara *et al.*, 1993; Carlos *et al.*, 2000).

Für neun von zehn Konstrukten wurden jedoch auffallend ähnliche Exporteffizienzen ermittelt. Es ist bekannt, dass die Interaktion zwischen reifem Protein und Signalpeptid einen Einfluss auf die Exporteffizienz hat (Itoh *et al.*, 1990; Kaderbhai *et al.*, 2004; Harwood & Cranenburgh, 2008; Choo *et al.*, 2008b). Die Erkenntnisse aus den Studien zum BPN'-Export in verschiedenen *Bacillus*-Wirten lassen den hypothetischen Schluss zu, dass diese Interaktion in den meisten Fällen einen stärkeren Einfluss auf die Exporteffizienz zu haben scheint als die Interaktion zwischen Signalpeptid und Sekretionsmaschinerie des jeweiligen Wirts, wie in Abb. 29 schematisiert dargestellt.

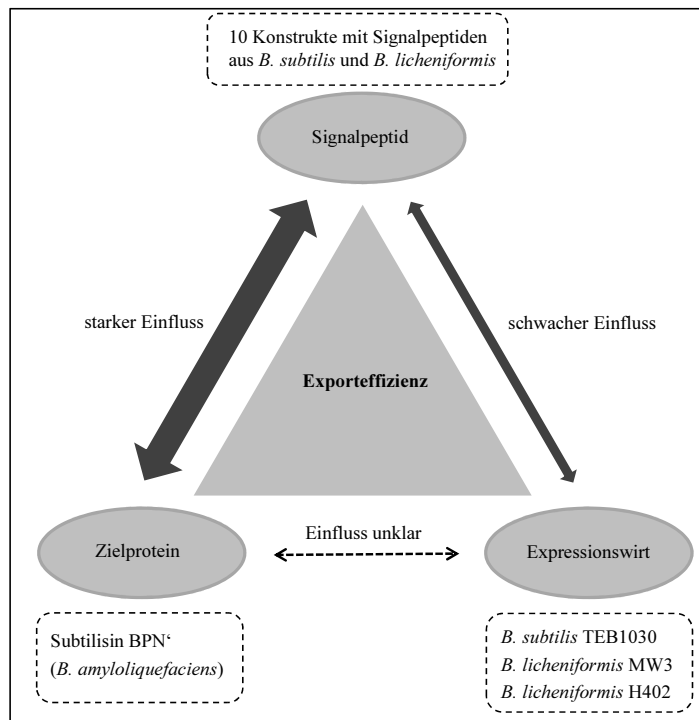


Abb. 29: Relevanz der potentiellen Interaktionen zwischen Zielprotein, Signalpeptid und Expressionswirt und deren Einfluss auf die Exporteffizienz. Aufgrund der Exportstudien in drei verschiedenen *Bacillus*-Wirten mit Fusionen aus Subtilisin BPN* und unterschiedlichen Signalpeptiden wurde postuliert, dass die Interaktion zwischen Signalpeptid und Zielprotein in den meisten Fällen einen stärkeren Einfluss auf die Exporteffizienz hat als die Interaktion zwischen Signalpeptid und Translokationsmaschinerie des jeweiligen *Bacillus*-Wirtes.

4.4 Neue Methode zur Weiterentwicklung der im Screening identifizierten Signalpeptide durch Konstruktion künstlicher Varianten

In der vorliegenden Arbeit konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Auswahl eines effizienten Signalpeptids für den optimalen Export eines bestimmten Zielproteins ein entscheidender Faktor ist. Dafür wurden neben wirtseigenen Signalpeptiden erstmals auch wirtsfremde Signalpeptide im großen Maßstab erfolgreich eingesetzt und so die Diversität der verfügbaren Signalpeptid-Banken deutlich erhöht. Neben dieser Strategie, bei der native Signalpeptide von verschiedenen Wirten zur Optimierung des Proteinexports eingesetzt wurden, gibt es zahlreiche Ansätze, die Diversität von Signalpeptiden durch verschiedene gerichtete und ungerichtete Strategien zu erhöhen und Varianten zu konstruieren (Nakamura *et al.*, 1989; Chen & Nagarajan, 1994; Ravn *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2008; Caspers *et al.*, 2010). Dabei wurden jedoch bisher keine Signalpeptide ausgewählt, die bereits in der nativen Form gute oder sehr gute Exportleistungen zeigten und in einem Signalpeptid-Screening identifiziert wurden.

In dieser Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, die auf den in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Methoden zur Identifikation der effizientesten Signalpeptide aufbaut und so eine Weiterentwicklung dieser Signalpeptide ermöglicht. Diese Methode basiert auf dem bekannten Aspekt, dass sich Signalpeptide generell in ihrem Aufbau, nämlich den drei funktionalen Domänen, gleichen (von Heijne, 1990). Daher sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob sich die Domänen auch beliebig untereinander austauschen

lassen und auf diese Weise künstliche, funktionale Signalpeptide mit möglicherweise verbesserten Eigenschaften konstruiert werden können. Die grundlegende Idee dabei war, dass die im Screening identifizierten Signalpeptide alle über Eigenschaften zu verfügen scheinen, die einen verbesserten Export bewirken. Durch die Durchmischung der funktionalen Domänen sollte untersucht werden, ob sich diese Eigenschaften dadurch ebenfalls durchmischen und so noch weiter optimierte, künstliche Signalpeptide konstruieren lassen. Diese Strategie sollte auf die Optimierung des Proteinexports in *B. licheniformis* H402 angewendet und auf ihr Potential hin untersucht werden.

Als Modellprotein wurde dafür eine Variante der Protease A aus *B. lentus* verwendet, die als Protease B bezeichnet wurde. Für die Identifikation der Signalpeptide mit den höchsten Exportleistungen wurde zuerst ein Signalpeptid-Screening mit den 220 Signalpeptiden aus *B. licheniformis* DSM13 durchgeführt. Aufgrund der Erkenntnisse aus den vorangegangenen Untersuchungen in dieser Arbeit (siehe 3.3.5) wurde als Wirt für das Signalpeptid-Screening *B. subtilis* verwendet und die Konstrukte mit den höchsten Exportleistungen auf *B. licheniformis* H402 übertragen. Da sich Protease A und B nur in wenigen Aminosäurepositionen unterscheiden, wurden neben den im Screening identifizierten Signalpeptiden aus *B. licheniformis* zusätzlich das Signalpeptid sYncM aus *B. subtilis* gezielt vor Protease B kloniert und die Exportleistung anhand der proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand ermittelt. Die Signalpeptide mit den höchsten Proteaseexport-Leistungen waren somit dYcdA und dBli01455 aus *B. licheniformis* und sYncM aus *B. subtilis*. Für die Entwicklung der künstlichen Varianten wurden daher diese drei Signalpeptide ausgewählt und die funktionellen Domänen jeweils untereinander in allen möglichen Kombinationen - unter Beibehaltung der funktionellen Reihenfolge N, H, C - ausgetauscht (Abb. 25). Daraus resultierten 24 künstliche Varianten der drei Signalpeptide, die in Kombination aus synthetisch hergestellter DNA und entsprechenden PCR-Reaktionen konstruiert und als Nr. 01-24 bezeichnet wurden (siehe Anhang, Tab. 18). Diese Signalpeptid-Varianten wurden in den Vektor pBSMu5 mit Protease B kloniert und *B. licheniformis* H402 damit transformiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich die in der vorliegenden Arbeit neu entwickelte Methode zur Optimierung von Signalpeptiden eignet, um funktionelle künstliche Signalpeptid-Varianten mit unterschiedlichen guten Exportleistungen zu konstruieren (Abb. 26).

Insgesamt wurde deutlich, dass sich die Exporteffizienzen der künstlichen Varianten durch das Durchmischen der funktionalen Domänen sehr stark verändern, obwohl die drei nativen Signalpeptide alle sehr gute Exportleistungen aufwiesen. Während einige der Varianten kaum veränderte Exporteffizienzen im Vergleich zu den nativen Signalpeptiden zeigten, wurden einige Varianten in ihrer Funktion offensichtlich sehr stark eingeschränkt wie z.B. Variante Nr. 04. Mit dem künstlichen Signalpeptid, das als Nr. 18 bezeichnet wurde (Abb. 27) und sich aus der N- und H-Domäne des wildtypischen dBli01455 in Kombination mit der C-Domäne von sYncM zusammensetzt, wurde jedoch außerdem eine Variante identifiziert, die eine signifikante Steigerung des Proteaseexports bewirken konnte. Dies zeigt, dass die neu

entwickelte Methode erfolgreich angewendet werden konnte und aus einer Bank mit nur 24 verschiedenen Varianten ein Signalpeptid identifiziert wurde, das die Exportleistung von Protease B in *B. licheniformis* H402 noch weiter steigern konnte.

Einfluss der funktionalen Domänen: Die Suche nach dem Muster

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich durch den Austausch der Domänen verschiedener Signalpeptide funktionale Varianten mit sehr unterschiedlichen Exporteffizienzen konstruieren lassen. Um zu untersuchen, welchen Einfluss die einzelnen Domänen eines Signalpeptids auf die Exporteffizienz mit einem bestimmten Zielprotein haben, sollte versucht werden, Muster oder Zusammenhänge zwischen den Domänen-Austauschen und Exporteffizienzen der verschiedenen Varianten zu erkennen.

Varianten Nr. 01, 16 und 18 verfügten alle über die C-Domäne des nativen Signalpeptids sYncM (siehe Anhang, Tab. 18). Wenn man die Exporteffizienzen dieser Varianten mit den entsprechenden Signalpeptiden verglich, bei denen jeweils eine C-Domäne der anderen beiden nativen Signalpeptide vorlag, wurde deutlich, dass durch das Einfügen der C-Domäne von sYncM offensichtlich eine Steigerung der Exporteffizienz für Nr. 01, 16 und 18 erreicht wurde (Abb. 26). Dieser positive Einfluss der C-Domäne von sYncM war besonders an Beispiel Nr. 16 deutlich, wo die Exporteffizienz durch das Austauschen der C-Domäne um den Faktor vier gesteigert wurde. Allerdings ließ sich dieser Effekt nicht generalisieren, wie die folgenden Beispiele zeigen. Bei den Varianten Nr. 11, 12 und 13 schien der Austausch der C-Domäne keinen signifikanten Effekt auf die Exporteffizienz zu haben, genau wie auch bei den Varianten Nr. 22, 23 und 24 wie in Abb. 26 erkennbar. Darüberhinaus wurde bei Betrachtung der Exportleistungen der Varianten Nr. 04, 05 und 06 deutlich, dass sich das Einfügen der C-Domäne von sYncM im Fall von Variante Nr. 04 sogar nachteilig auf die Exporteffizienz ausgewirkt hatte. Eine Vorhersage zum Effekt der C-Domäne von sYncM im Zusammenspiel mit verschiedenen Signalpeptid-Varianten war daher nicht möglich. Auch durch Untersuchung der Häufigkeit der Erkennungssequenzen aller in *B. licheniformis* potentiell über den Sec-Weg sekretierten Proteine (ohne Lipoproteine; nach Voigt *et al.*, 2006) konnten keine Rückschlüsse auf die beobachteten Ergebnisse gezogen werden. Während die beiden häufigsten Erkennungssequenzen „ASA“ und „AEA“ 14x und 11x vorkamen, wurde die Sequenz „AAA“ von dBli01455 am dritthäufigsten mit 7x identifiziert. Die Erkennungssequenzen von sYncM und dYcdA „ADA“ und „ASG“ kamen hingegen jeweils nur 2x vor und waren somit relativ selten.

Wenn man die Exporteffizienzen von den Varianten Nr. 01, 09 und 16 betrachtet, fällt auf, dass diese jeweils in etwa auf dem Niveau des entsprechenden nativen Signalpeptids lagen, dessen H-Domäne in den Varianten eingebaut wurde (Abb. 26). Daher wäre denkbar, dass die H-Domäne einen besonders starken Effekt auf die Exporteffizienz eines Signalpeptids hat. Allerdings scheint sich auch hier wieder keine generelle Aussage formulieren zu lassen. So verfügten die Varianten Nr. 22, 23 und 24 alle über die H-Domäne von sYncM, zeigten aber

eine wesentlich verschlechterte Exporteffizienz gegenüber dem nativen sYncM-Signalpeptid. Des Weiteren schien auch der Austausch der C-Domäne bei diesen drei Varianten kaum einen Einfluss zu haben. Daher ist davon auszugehen, dass die verschlechterte Exporteffizienz auf das Einfügen der N-Domäne von dBli01455 zurückzuführen sein muss. Ein ähnlicher Effekt war bei Variante Nr. 04 zu beobachten. Hier wurde nur die N-Domäne von sYncM durch die N-Domäne von dYcdA ausgetauscht. Dieser Austausch führte erstaunlicherweise zu einem vollständigen Einbruch der Exporteffizienz, obwohl mit dem nativen SP sYncM sehr gute Exportleistungen erreicht wurden (Abb. 26).

Auf Basis der Sekundärstrukturvorhersagen von den Varianten Nr. 01, 04, 09, 16, 18 und 22 ließen sich ebenfalls keine Rückschlüsse auf die Ursachen für die verbesserten oder verschlechterten Exporteffizienzen ziehen. Zwar wurden in Variante Nr. 04 keine potentiellen α -helicalen Strukturen identifiziert, dies traf für Variante Nr. 09 allerdings ebenfalls zu.

Insgesamt scheinen sich keine allgemeinen Schlussfolgerungen treffen zu lassen, die Vorhersagen über den Effekt der funktionalen Domänen auf die Exporteffizienz erlauben würden. Das komplexe Zusammenspiel der unterschiedlichen Domänen konnte bisher nicht entschlüsselt werden. In jedem Fall wäre es für zukünftige Projekte interessant, neben den drei bisher verwendeten Signalpeptiden noch weitere native Signalpeptide mit einzubeziehen und so die Anzahl der verfügbaren Varianten zu erhöhen.

Eine hocheffiziente Methode mit Potential

Mit der in dieser Arbeit neu entwickelten Methode konnte gezeigt werden, dass der Austausch der Domänen von verschiedenen Signalpeptiden, die sich in Länge, Ladung und Hydrophobizität unterscheiden, zu funktionalen Signalpeptid-Varianten führen kann. Zum einen wurde damit eine Methode etabliert, mit der sich durch die Konstruktion von einer sehr geringen Anzahl an Signalpeptid-Varianten (in dieser Arbeit 24 verschiedene) die im Hochdurchsatz-Screening identifizierten Signalpeptide noch weiter für den Proteinexport optimieren lassen. Zum anderen wurde der Grundstein gelegt, um in zukünftigen Untersuchungen mehr über den Einfluss der verschiedenen funktionalen Domänen auf die Exporteffizienz eines Signalpeptids zu verstehen.

5. Zusammenfassung

Gram-positive Bakterien der Gattung *Bacillus* werden im großen Maßstab für die industrielle Produktion von Proteinen eingesetzt, da sie in der Lage sind, große Mengen des Zielproteins in den Kulturüberstand zu sekretieren. Neben dem Vorteil, dass ein Zellaufschluss zur Gewinnung des Proteins dadurch überflüssig wird, haben auch die seit Jahrzehnten optimierten, kostengünstigen Fermentationsprozesse dazu beigetragen, dass vor allem *B. subtilis* und *B. licheniformis* bevorzugt für die industrielle Proteinproduktion eingesetzt werden. Allerdings gibt es weiterhin zahlreiche Engpässe im Sekretionsablauf, so dass vor allem bei der extrazellulären Produktion von heterologen Proteinen mit *Bacillus*-Wirten oft nur geringe Ausbeuten erzielt werden können. Ein entscheidendes Kriterium für die Optimierung der Prozessausbeuten ist die Auswahl eines für die Sekretion des Zielproteins effizienten Signalpeptids. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten bereits zu diesem Zweck beschriebene Methoden für die Durchmusterung von Signalpeptid-Banken weiterentwickelt und außerdem erstmals die Exporteffizienzen unterschiedlicher Signalpeptide in verschiedenen anwendungstechnisch interessanten *Bacillus*-Wirten miteinander verglichen werden.

Anhand der Genomsequenzen von *B. subtilis* und *B. licheniformis* wurden Homologie-Untersuchungen mit den an der Sekretion beteiligten Komponenten durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass die Translokationsmaschinerie von beiden Organismen sehr ähnlich ist, soweit dies auf Basis der Sequenzähnlichkeiten vorhersagbar war. Allerdings konnte ebenso gezeigt werden, dass es auch signifikante Unterschiede zu geben scheint, wie vor allem am Beispiel der an der Prozessierung der Signalpeptide beteiligten Signalpeptidasen deutlich wurde.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die Methode des Signalpeptid-Screenings auch in industriell relevanten Bakterienstämmen, die bereits auf eine maximale Sekretion optimiert wurden, anwenden lässt. Dafür wurde eine Signalpeptid-Bank aus *B. subtilis* für die Optimierung des Exports von zwei heterologen Proteasen in einem anwendungstechnisch interessanten *B. licheniformis*-Wirt eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Proteinausbeuten im Kulturüberstand um das Dreifache im Vergleich zu einem, für die Sekretion der Proteasen etablierten, Signalpeptid steigern ließen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde außerdem erstmals nachgewiesen, dass die Durchmusterung von wirtsfremden Signalpeptiden einen vielversprechenden Ansatz für die Optimierung des Proteinexports darstellt.

Für die Erhöhung der Diversität der verfügbaren Signalpeptide wurde daher in der vorliegenden Arbeit eine Signalpeptid-Bank mit 220 Sec-Signalpeptiden aus *B. licheniformis* konstruiert, um erstmals im Screening den direkten Vergleich der Effizienz von wirtseigenen und wirtsfremden Signalpeptiden zu ermöglichen. Dafür wurde das Modell-Protein Subtilisin BPN⁺ aus *B. amyloliquefaciens* ausgewählt und für die Sekretionsoptimierung im Wirt

B. subtilis sowohl alle Signalpeptide aus *B. subtilis*, als auch 220 wirtsfremde Signalpeptide aus *B. licheniformis* durchmustert. Die höchsten Exporteffizienzen für Subtilisin BPN⁺ wurden dabei unter anderem mit wirtsfremden Signalpeptiden erreicht. Die im Hochdurchsatz-Screening ermittelten Steigerungen der Exportleistungen konnten außerdem beispielhaft auf anwendungstechnisch interessante Hochzelldichte-Fermentationen von *B. subtilis* übertragen werden.

Um zu untersuchen, inwieweit sich die in *B. subtilis* ermittelten Exportleistungen der verschiedenen Signalpeptide auf andere *Bacillus*-Wirte übertragen lassen, wurden die Exporteffizienzen unterschiedlicher Konstrukte in mehreren *Bacillus*-Wirten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Signalpeptid und Zielprotein in den meisten Fällen einen höheren Einfluss auf die Exporteffizienz zu haben schien, als die Interaktion zwischen Signalpeptid und Translokationsmaschinerie des jeweiligen Wirts.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem erstmals gezeigt, dass sich durch die Durchmischung der funktionalen Domänen von unterschiedlichen Signalpeptiden funktionstüchtige Signalpeptid-Varianten konstruieren lassen. Auf der Grundlage dieser Erkenntnis wurde eine neue Methode entwickelt, mit der sich die Exportleistungen der im Signalpeptid-Screening identifizierten Signalpeptide durch die Konstruktion von künstlichen Signalpeptid-Varianten noch weiter steigern ließen.

6. Summary

Gram-positive bacteria of the species *Bacillus* are frequently used for the industrial production of proteins, because of their ability to secrete large amounts of target protein into the culture supernatant. Beside the advantage that the laborious lysis of the cells for the purification of the target protein gets dispensable in that way, the cheap and effective methods for fermentation processes have contributed to the fact that, in particular *B. subtilis* and *B. licheniformis* have become preferred hosts for the industrial production of proteins for many decades. Nevertheless there are still several bottlenecks especially with regard to the extracellular production of heterologous proteins, that often lead to decreased yields in *Bacillus* hosts. A critical aspect for the optimization of the process yields is the choice of an efficient signal peptide. The aim of the present study was to optimize existing signal peptide screening methods and to investigate the export efficiencies of different signal peptides in distinct *Bacillus* hosts.

By analysis of the sequence homologies of *B. subtilis* and *B. licheniformis*, it was predicted that both organisms have quite similar translocation machineries. Nevertheless there were also significant differences, especially concerning the signal peptidases.

In the current study it was investigated if the method of screening a set of signal peptides is also applicable to industrially relevant strains, which have been optimized for high level secretion already. For that purpose a collection of *B. subtilis* signal peptides was used for the secretion optimization of two heterologous proteases in an industrial relevant *B. licheniformis* expression host. It could be demonstrated that the most efficient signal peptide, originating from *B. subtilis*, increased the export efficiency about threefold in the *B. licheniformis* host. Therefore the screening of heterologous signal peptides was proven to be a promising strategy for optimization of protein export.

In the current study a set of 220 signal peptides originating from *B. licheniformis* were amplified to increase the diversity of available signal peptide collections for a distinct host and to allow the simultaneous comparison of the efficiencies of homologous and heterologous signal peptides for the first time in a large-scale setting. The protease Subtilisin BPN' from *B. amyloliquefaciens* was chosen as a model protein and all signal peptides from *B. subtilis* as well as 220 heterologous signal peptides originating from *B. licheniformis* were used for the secretion optimization in the *B. subtilis* host. Interestingly, some of the most efficient constructs contained heterologous signal peptides. The export efficiencies detected in the high throughput screening could be verified exemplarily in industrially relevant high cell density cultivations of *B. subtilis*.

To investigate the possibility of transferring the export efficiencies detected for different signal peptides in *B. subtilis* to other *Bacillus* hosts, the export capacity of various fusions was compared in different *Bacillus* hosts. It could be shown that the interaction between the signal peptide and the target protein seemed to have a stronger effect on the secretion efficiency in

most cases than the interaction between the signal peptide and the translocation machinery of the particular expression host.

Furthermore, the present study showed for the first time that it is possible to construct functional signal peptide variants by swapping the structural domains of different signal peptides. On this basis a new method was developed which allowed to further increase the export efficiencies of the most efficient signal peptides detected in the screening, by constructing artificial signal peptide variants.

7. Literatur

- Ahn, T., J. H. Ko, E. Y. Cho & C. H. Yun (2009). Conformational change of *Escherichia coli* signal recognition particle Ffh is affected by the functionality of signal peptides of ribose-binding protein. *Mol. Cells* **27**: 681-687.
- Akimaru, J., S. Matsuyama, H. Tokuda & S. Mizushima (1991). Reconstitution of a protein translocation system containing purified SecY, SecE, and SecA from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 6545-6549.
- Akita, M., S. Sasaki, S. Matsuyama & S. Mizushima (1990). SecA interacts with secretory proteins by recognizing the positive charge at the amino terminus of the signal peptide in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**: 8164-8169.
- Althoff, S., D. Selinger & J. A. Wise (1994). Molecular evolution of SRP cycle components: functional implications. *Nucleic Acids Res.* **22**: 1933-1947.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaeffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D. J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Anagnostopoulos, C. & J. Spizizen (1961). Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **81**: 741-746.
- Auclair, S. M., J. P. Moses, M. Musial-Siwiek, D. A. Kendall, D. B. Oliver & I. Mukerji (2010). Mapping of the signal peptide-binding domain of *Escherichia coli* SecA using Forster resonance energy transfer. *Biochemistry* **49**: 782-792.
- Bagos, P. G., K. D. Tsirigos, S. K. Plessas, T. D. Liakopoulos & S. J. Hamodrakas (2009). Prediction of signal peptides in archaea. *Protein Eng. Des. Sel.* **22**: 27-35.
- Barbe, V., S. Cruveiller, F. Kunst, P. Lenoble, G. Meurice, A. Sekowska, D. Vallenet, T. Wang, I. Moszer, C. Médigue, *et al.* (2009). From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* **155**: 1758-1775.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne & S. Brunak (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**: 783-795.
- Bogsch, E. G., F. Sargent, N. R. Stanley, B. C. Berks, C. Robinson & T. Palmer (1998). An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J. Biol. Chem.* **273**: 18003-18006.
- Bolhuis, A., C. P. Broekhuizen, A. Sorokin, M. L. van Roosmalen, G. Venema, S. Bron, W. J. Quax & J. M. van Dijl (1998). SecDF of *Bacillus subtilis*, a molecular Siamese twin required for the efficient secretion of proteins. *J. Biol. Chem.* **273**: 21217-21224.
- Bolhuis, A., A. Matzen, H. L. Hyrylaeinen, V. P. Kontinen, R. Meima, J. Chapuis, G. Venema, S. Bron, R. Freudl & J. M. van Dijl (1999). Signal peptide peptidase- and ClpP-like proteins of *Bacillus subtilis* required for efficient translocation and processing of secretory proteins. *J. Biol. Chem.* **274**: 24585-24592.

- Bolhuis, A., H. Tjalsma, H. E. Smith, A. de Jong, R. Meima, G. Venema, S. Bron & J. M. van Dijl (1999b).** Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2934-2941.
- Borchert, T. V. & V. Nagarajan (1991).** Effect of signal sequence alterations on export of levansucrase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**: 276-282.
- Bordusa, F. (2002).** Proteases in organic synthesis. *Chem. Rev.* **102**: 4817-4868.
- 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.
- Briggs, M. S., D. G. Cornell, R. A. Dluhy & L. M. Gierasch (1986).** Conformations of signal peptides induced by lipids suggest initial steps in protein export. *Science* **233**: 206-208.
- Brigidi, P., E. De Rossi, G. Riccardi & D. Matteuzzi (1991).** A highly efficient electroporation system for transformation of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Techniques* **5**: 5-8.
- Brockmeier, U., M. Caspers, R. Freudl, A. Jockwer, T. Noll & T. Eggert (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.
- Carlos, J. L., M. Paetzel, G. Brubaker, A. Karla, C. M. Ashwell, M. O. Lively, G. Cao, P. Bullinger & R. E. Dalbey (2000).** The role of the membrane-spanning domain of type I signal peptidases in substrate cleavage site selection. *J. Biol. Chem.* **275**: 38813-38822.
- Caspers, M., U. Brockmeier, C. Degering, T. Eggert & R. Freudl (2010).** Improvement of Sec-dependent secretion of a heterologous model protein in *Bacillus subtilis* by saturation mutagenesis of the N-domain of the AmyE signal peptide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**: 1877-1885.
- Chang, S. & S. N. Cohen (1979).** High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* **168**: 111-115.
- Chen, M. & V. Nagarajan (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, Z., C. Heng, Z. Li, X. Liang & S. Xinchen (2007).** Expression and secretion of a single-chain sweet protein monellin in *Bacillus subtilis* by *sacB* promoter and signal peptide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**: 1377-1381.
- Choi, J. H. & S. Y. Lee (2004).** Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **64**: 625-635.
- Choo, K. H. & S. Ranganathan (2008).** Flanking signal and mature peptide residues influence signal peptide cleavage. *BMC Bioinformatics* **9**: S15.
- Choo, K. H., J. C. Tong & S. Ranganathan (2008b).** Modeling *Escherichia coli* signal peptidase complex with bound substrate: determinants in the mature peptide influencing signal peptide cleavage. *BMC Bioinformatics* **9**: S15.

- Chung, Y. S., F. Breidt & D. Dubnau (1998).** Cell surface localization and processing of the ComG proteins, required for DNA binding during transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **29**: 905-913.
- Dalbey, R. E. & C. Robinson (1999).** Protein translocation into and across the bacterial plasma membrane and the plant thylakoid membrane. *Trends Biochem Sci* **24**: 17-22.
- DelMar, E. G., C. Largman, J. W. Brodrick & M. C. Geokas (1979).** A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal. Biochem.* **99**: 316-320.
- den Blaauwen, T. & A. J. Driessen (1996).** Sec-dependent preprotein translocation in bacteria. *Arch. Microbiol.* **165**: 1-8.
- Diamond, D. L. & L. L. Randall (1997).** Kinetic partitioning - Poising SecB to favor association with a rapidly folding ligand. *J. Biol. Chem.* **272**: 28994-28998.
- Donahue, J. P., D. A. Israel, R. M. Peek, M. J. Blaser & G. G. Miller (2000).** Overcoming the restriction barrier to plasmid transformation of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **37**: 1066-1074.
- Driessen, A. J. (1994).** How proteins cross the bacterial cytoplasmic membrane. *J. Membr. Biol.* **142**: 145-159.
- Driessen, A. J., P. Fekkes & J. P. van der Wolk (1998).** The Sec system. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**: 216-222.
- Dubnau, D. (1997).** Binding and transport of transforming DNA by *Bacillus subtilis*: The role of type-IV pilin-like proteins - A review. *Gene* **192**: 191-198.
- Dunn, S. D. (1986).** Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* **157**: 144-153.
- Duong, F. & W. Wickner (1997).** The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J.* **16**: 4871-4879.
- Economou, A., J. A. Pogliano, J. Beckwith, D. B. Oliver & W. Wickner (1995).** SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell* **83**: 1171-1181.
- Eggert, T., U. Brockmeier, M. J. Droge, W. J. Quax & K. E. Jaeger (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.
- Farmery, M., B. Macao, T. Larsson & T. Samuelsson (1998).** Binding of GTP and GDP induces a significant conformational change in the GTPase domain of Ffh, a bacterial homologue of the SRP 54 kDa subunit. *Biochim. Biophys. Acta.* **1385**: 61-68.
- Fekkes, P., C. van der Does & A. J. M. Driessen (1997).** The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J.* **16**: 6105-6113.
- Ferreira, L. C., R. C. Ferreira & W. Schumann (2005).** *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. *An. Acad. Bras. Cienc.* **77**: 113-124.
- Fortin, Y., P. Phoenix & G. R. Drapeau (1990).** Mutations conferring resistance to azide in *Escherichia coli* occur primarily in the *secA* gene. *J. Bacteriol.* **172**: 6607-6610.

- Frank, K. & M. J. Sippl (2008).** High-performance signal peptide prediction based on sequence alignment techniques. *Bioinformatics* **24**: 2172-2476.
- Fu, L. L., Z. R. Xu, W. Li, J. B. Shuai, P. Lu & C. X. Hu (2007).** Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: implication for optimization of heterologous protein secretion. *Biotechnol. Adv.* **25**: 1-12.
- Fu, L. L., Z. R. Xu, J. B. Shuai, C. X. Hu, W. Dai & W. F. Li (2008).** High-level secretion of a chimeric thermostable lichenase from *Bacillus subtilis* by screening of site-mutated signal peptides with structural alterations. *Curr. Microbiol.* **56**: 287-292.
- Gelis, I., A. M. Bonvin, D. Keramisanou, M. Koukaki, G. Gouridis, S. Karamanou, A. Economou & C. G. Kalodimos (2007).** Structural basis for signal-sequence recognition by the translocase motor SecA as determined by NMR. *Cell* **131**: 756-769.
- Goffeau, A., R. , M. L. Aert, A. Agostini-Carbone, M. Ahmed, L. Aigle, K. Alberghina, M. Albermann, M. Albers, D. Aldea, Alexandraki, *et al.* (1997).** The yeast genome directory. *Nature* **387**: 5-105.
- Graumann, K. & A. Premstaller (2006).** Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol. J.* **1**: 164-186.
- Gu, W., T. Zhou & C. O. Wilke (2010).** A universal trend of reduced mRNA stability near the translation-initiation site in prokaryotes and eukaryotes. *PLoS Comput. Biol.* **6**: e1000664.
- Gupta, R., Q. K. Beg & P. Lorenz (2002).** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 15-32.
- Haki, G. D. & S. K. Rakshit (2003).** Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour. Technol.* **89**: 17-34.
- Hall, T. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Hambraeus, G., M. Persson & B. Rutberg (2000).** The *aprE* leader is a determinant of extreme mRNA stability in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **146**: 3051-3059.
- Hambraeus, G., K. Karhumaa & B. Rutberg (2002).** A 5' stem-loop and ribosome binding but not translation are important for the stability of *Bacillus subtilis aprE* leader mRNA. *Microbiology* **148**: 1795-1803.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Harwood, C. R. & R. Cranenburgh (2008).** *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends Microbiol.* **16**: 73-79.
- Hemilae, H. & M. Sibakov (1991).** Production of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*: the effect of the joint between signal sequence and mature protein on yield. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 61-64.

- Heng, C., Z. J. Chen, L. X. Du & F. P. Lu (2005).** Expression and secretion of an acid-stable alpha-amylase gene in *Bacillus subtilis* by SacB promoter and signal peptide. *Biotechnol. Lett.* **27**: 1731-1736.
- Hikita, C. & S. Mizushima (1992).** Effects of total hydrophobicity and length of the hydrophobic domain of a signal peptide on invitro translocation efficiency. *J. Biol. Chem.* **267**: 4882-4888.
- Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen & L. R. Pease (1989).** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59.
- Itoh, Y., K. Kanoh, K. Nakamura, K. Takase & K. Yamane (1990).** Artificial insertion of peptides between signal peptide and mature protein - effect on secretion and processing of hybrid thermostable alpha-amylases in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* cells. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1551-1558.
- Jeong, S. M., H. Yoshikawa & H. Takahashi (1993).** Isolation and characterization of the *secE* homologue gene of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **10**: 133-142.
- Jones, D. T. (1999).** Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **292**: 195-202.
- Jongbloed, J. D., H. Antelmann, M. Hecker, R. Nijland, S. Bron, U. Airaksinen, F. Pries, W. J. Quax, J. M. van Dijl & P. G. Braun (2002).** Selective contribution of the twin-arginine translocation pathway to protein secretion in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **277**: 44068-44078.
- Jongbloed, J. D. H., U. Grieger, H. Antelmann, M. Hecker, R. Nijland, S. Bron & J. M. van Dijl (2004).** Two minimal Tat translocases in *Bacillus*. *Mol. Microbiol.* **54**: 1319-1325.
- Kaderbhai, M. A., H. M. Davey & N. N. Kaderbhai (2004).** A directed evolution strategy for optimized export of recombinant proteins reveals critical determinants for preprotein discharge. *Protein Sci.* **13**: 2458-2469.
- Kakeshita, H., A. Oguro, R. Amikura, K. Nakamura & K. Yamane (2000).** Expression of the *ftsY* gene, encoding a homologue of the alpha subunit of mammalian signal recognition particle receptor, is controlled by different promoters in vegetative and sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **146**: 2595-2603.
- Kang, I. S., J. J. Wang, J. C. Shih & T. C. Lanier (2004).** Extracellular production of a functional soy cystatin by *Bacillus subtilis*. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 5052-5056.
- Kim, J. H., I. S. Park & B. G. Kim (2005).** Development and characterization of membrane surface display system using molecular chaperon, *prsA*, of *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**: 1248-1253.
- Kim, A. C., D. C. Oliver & M. Paetzel (2008).** Crystal structure of a bacterial signal peptide peptidase. *J. Mol. Biol.* **376**: 352-366.
- Kojima, S., T. Minagawa & K. Miura (1998).** Tertiary structure formation in the propeptide of subtilisin BPN' by successive amino acid replacements and its close relation to function. *J. Mol. Biol.* **277**: 1007-1013.

Kolkman, M. A., R. van der Ploeg, M. Bertels, M. van Dijk, J. van der Laan, J. M. van Dijk & E. Ferrari (2008). The twin-arginine signal peptide of *Bacillus subtilis* YwbN can direct either Tat- or Sec-dependent secretion of different cargo proteins: secretion of active subtilisin via the *Bacillus subtilis* Tat pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 7507-7513.

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

Kontinen, V. P. & M. Sarvas (1993). The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high-level secretion. *Mol. Microbiol.* **8**: 727-737.

Kouwen, T. R. H. M., R. van der Ploeg, H. Antelmann, M. Hecker, G. Homuth, U. Mader & J. M. van Dijk (2009). Overflow of a hyper-produced secretory protein from the *Bacillus* Sec pathway into the Tat pathway for protein secretion as revealed by proteogenomics. *Proteomics* **9**: 1018-1032.

Kumamoto, C. A. & O. Francetic (1993). Highly selective binding of nascent polypeptides by an *Escherichia coli* chaperone protein *in vivo*. *J. Bacteriol.* **175**: 2184-2188.

Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, *et al.* (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.

Kurita, K., K. Honda, S. Suzuma, H. Takamatsu, K. Nakamura & K. Yamane (1996). Identification of a region of *Bacillus subtilis* Ffh, a homologue of mammalian SRP54 protein, that is

essential for binding to small cytoplasmic RNA. *J Biol Chem* **271**: 13140-13146.

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

Lageiro, M. M., M. J. Moura, A. Reis & M. J. Costa-Ferreira (2007). Microbial proteases application in leather industry. *J. Biotechnol.* **131**: 239-240.

Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.

Li, W., X. Zhou & P. Lu (2004). Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Res. Microbiol.* **155**: 605-610.

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

Macao, B., J. Luirink & T. Samuelsson (1997). Ffh and FtsY in a *Mycoplasma mycoides* signal-recognition particle pathway: SRP RNA and M domain of Ffh are not required for stimulation of GTPase activity *in vitro*. *Mol. Microbiol.* **24**: 523-534.

Manting, E. H., C. van der Does, H. Remigy, A. Engel & A. J. Driessen (2000). SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *EMBO J.* **19**: 852-861.

- Mathiesen, G., A. Sveen, M. B. Brurberg, L. Fredriksen, L. Axelsson & V. G. Eijsink (2009).** Genome-wide analysis of signal peptide functionality in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *BMC Genomics* **10**: 425.
- Matos, C. F., A. Di Cola & C. Robinson (2009).** TatD is a central component of a Tat translocon-initiated quality control system for exported FeS proteins in *Escherichia coli*. *EMBO Rep.* **10**: 474-479.
- Maurer, K. H. (2004).** Detergent proteases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 330-334.
- Meyer, T. H., J. F. Menetret, R. Breitling, K. R. Miller, C. W. Akey & T. A. Rapoport (1999).** The bacterial SecY/E translocation complex forms channel-like structures similar to those of the eukaryotic Sec61p complex. *J. Mol. Biol.* **285**: 1789-1800.
- Moeller, L., Q. L. Gan & K. Wang (2009).** A bacterial signal peptide is functional in plants and directs proteins to the secretory pathway. *J. Exp. Bot.* **60**: 3337-3352.
- Mueller, J. P., S. Bron, G. Venema & J. M. van Dijl (2000).** Chaperone-like activities of the CsaA protein of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **146** (Pt 1): 77-88.
- Mueller, J. P., J. Ozegowski, S. Vettermann, J. Swaving, K. H. M. van Wely & A. J. M. Driessen (2000b).** Interaction of *Bacillus subtilis* CsaA with SecA and precursor proteins. *Biochem. J.* **348**: 367-373.
- Musial-Siwiek, M., S. L. Rusch & D. A. Kendall (2007).** Selective photoaffinity labeling identifies the signal peptide binding domain on SecA. *J. Mol. Biol.* **365**: 637-648.
- Nakamura, K., Y. Fujita, Y. Itoh & K. Yamane (1989).** Modification of length, hydrophobic properties and electric charge of *Bacillus subtilis* alpha-amylase signal peptide and their different effects on the production of secretory proteins in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* cells. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 1-9.
- Nakamura, K., H. Takamatsu, Y. Akiyama, K. Ito & K. Yamane (1990).** Complementation of the protein transport defect of an *Escherichia coli* *secY* mutant (*secY24*) by *Bacillus subtilis* *secY* homologue. *FEBS Lett.* **273**: 75-78.
- Nakamura, K., M. Nishiguchi, K. Honda & K. Yamane (1994).** The *Bacillus subtilis* SRP54 homologue, Ffh, has an intrinsic GTPase activity and forms a ribonucleoprotein complex with small cytoplasmic RNA *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**: 1394-1399.
- Nakano, M. M. & P. Zuber (1990).** Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10**: 223-240.
- Ni, Y. & R. Chen (2009).** Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **31**: 1661-1670.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak & G. von Heijne (1997).** Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**: 1-6.
- Nijland, R. & O. P. Kuipers (2008).** Optimization of protein secretion by *Bacillus subtilis*. *Recent Pat. Biotechnol.* **2**: 79-87.
- Nishiyama, K., S. Mizushima & H. Tokuda (1993).** A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **12**: 3409-3415.

- Nishiyama, K., M. Hanada & H. Tokuda (1994).** Disruption of the gene encoding p12 (SecE) reveals the direct involvement and important function of SecE in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J.* **13**: 3272-3277.
- Nouwen, N. & A. J. Driessen (2002).** SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC. *Mol. Microbiol.* **44**: 1397-1405.
- Oguro, A., H. Kakeshita, K. Honda, H. Takamatsu, K. Nakamura & K. Yamane (1995).** *srb*: a *Bacillus subtilis* gene encoding a homologue of the alpha-subunit of the mammalian signal recognition particle receptor. *DNA Res.* **2**: 95-100.
- Olempska-Beer, Z. S., R. I. Merker, M. D. Ditto & M. J. DiNovi (2006).** Food-processing enzymes from recombinant microorganisms - a review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **45**: 144-158.
- Olmos-Soto, J. & R. Contreras-Flores (2003).** Genetic system constructed to overproduce and secrete proinsulin in *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**: 369-373.
- Or, E., D. Boyd, S. Gon, J. Beckwith & T. Rapoport (2005).** The bacterial ATPase SecE functions as a monomer in protein translocation. *J. Biol. Chem.* **280**: 9097-9105.
- Özdamar, T. H., B. Senturk, O. D. Yilmaz, G. Calik, E. Celik & P. Calik (2009).** Expression system for recombinant human growth hormone production from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Prog* **25**: 75-84.
- Paetzel, M., R. E. Dalbey & N. C. Strynadka (1998).** Crystal structure of a bacterial signal peptidase in complex with a beta-lactam inhibitor. *Nature* **396**: 186-190.
- Paik, S. H., A. Chakicherla & J. N. Hansen (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.
- Park, S., G. Liu, T. B. Topping, W. H. Cover & L. L. Randall (1988).** Modulation of folding pathways of exported proteins by the leader sequence. *Science* **239**: 1033-1035.
- Park, S., K. Kai, S. Iijima & T. Kobayashi (1992).** Enhanced beta-galactosidase production by high cell-density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 686-696.
- Peterson, G. L. (1977).** A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**: 346-356.
- Phan, T. T., H. D. Nguyen & W. Schumann (2006).** Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Protein Expr. Purif.* **46**: 189-195.
- Pop, O., U. Martin, C. Abel & J. P. Mueller (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.
- Powers, T. & P. Walter (1995).** Reciprocal stimulation of GTP hydrolysis by two directly interacting GTPases. *Science* **269**: 1422-1424.

- Pragai, Z., H. Tjalsma, A. Bolhuis, J. M. vanDijl, G. Venema & S. Bron (1997). The signal peptidase II (*lsp*) gene of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **143**: 1327-1333.
- Rahfeld, J. U., K. P. Ruecknagel, B. Schelbert, B. Ludwig, J. Hacker, K. Mann & G. Fischer (1994). Confirmation of the existence of a 3rd family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases - amino acid-sequence and recombinant production of Parvulin. *FEBS Lett.* **352**: 180-184.
- Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge & V. V. Deshpande (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 597-635.
- Ravn, P., J. Arnau, S. M. Madsen, A. Vrang & H. Israelsen (2003). Optimization of signal peptide SP310 for heterologous protein production in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* **149**: 2193-2201.
- Resnekov, O., L. Rutberg & A. von Gabain (1990). Changes in the stability of specific mRNA species in response to growth stage in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 8355-8359.
- Rey, M. W., P. Ramaiya, B. A. Nelson, S. D. Brody-Karpin, E. J. Zaretsky, M. Tang, A. Lopez de Leon, H. Xiang, V. Gusti, I. G. Clausen, *et al.* (2004). Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* **5**: R77.
- Ribbe, J. & V. Nagarajan (1992). Characterization of the secretion efficiency of a plant signal peptide in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **235**: 333-339.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis & H. A. Erlich (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sakakibara, Y., K. Tsutsumi, K. Nakamura & K. Yamane (1993). Structural requirements of *Bacillus subtilis* alpha-amylase signal peptide for efficient processing: *in vivo* pulse-chase experiments with mutant signal peptides. *J. Bacteriol.* **175**: 4203-4212.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York
- Samuelson, J. C., M. Chen, F. Jiang, I. Moeller, M. Wiedmann, A. Kuhn, G. J. Phillips & R. E. Dalbey (2000). YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* **406**: 637-641.
- Saunders, C. W., J. A. Pedroni & P. M. Monahan (1991). Optimization of the signal-sequence cleavage site for secretion from *Bacillus subtilis* of a 34-amino acid fragment of human parathyroid hormone. *Gene* **102**: 277-282.
- Schallmeyer, M., A. Singh & O. P. Ward (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* **50**: 1-17.
- Settles, A. M., A. Yonetani, A. Baron, D. R. Bush, K. Cline & R. Martienssen (1997). Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science* **278**: 1467-1470.
- Shapova, Y. A. & M. Paetzel (2007). Crystallographic analysis of *Bacillus subtilis* CsaA. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **63**: 478-485.

Shinde, U., Y. Li, S. Chatterjee & M. Inouye (1993). Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 6924-6928.

Shinde, U. P., J. J. Liu & M. Inouye (1997). Protein memory through altered folding mediated by intramolecular chaperones. *Nature* **389**: 520-522.

Smith, D. R., L. A. Doucette-Stamm, C. Deloughery, H. M. Lee, J. Dubois, T. Aldredge, R. Bashirzadeh, D. Blakely, R. Cook, K. Gilbert, et al. (1997). Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* Delta H: Functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* **179**: 7135-7155.

Sommer, B., K. Friehs & E. Flaschel (2010). Efficient production of extracellular proteins with *Escherichia coli* by means of optimized coexpression of bacteriocin release proteins. *J. Biotechnol.* **145**: 350-358.

Sorensen, H. P. & K. K. Mortensen (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **115**: 113-128.

Struck, J. C., D. W. Vogel, N. Ulbrich & V. A. Erdmann (1988). The *Bacillus subtilis* scRNA is related to the 4.5S RNA from *Escherichia coli*. *Nucleic. Acids. Res.* **16**: 2719.

Takagi, H. & M. Takahashi (2003). A new approach for alteration of protease functions: pro-sequence engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 1-9.

Takamatsu, H., K. Bunai, T. Horinaka, A. Oguro, K. Nakamura, K. Watabe & K. Yamane (1997). Identification of a region required for binding to presecretory protein in *Bacillus subtilis* Ffh, a homologue of the 54-kDa subunit of

mammalian signal recognition particle. *Eur. J. Biochem.* **248**: 575-582.

Tjalsma, H., J. van den Dolder, W. J. J. Meijer, G. Venema, S. Bron & J. M. van Dijl (1999). The plasmid-encoded signal peptidase SipP can functionally replace the major signal peptidases SipS and SipT of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**: 2448-2454.

Tjalsma, H., A. Bolhuis, J. D. Jongbloed, S. Bron & J. M. van Dijl (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., H. Antelmann, J. D. H. Jongbloed, P. G. Braun, E. Darmon, R. Dorenbos, J. Y. F. Dubois, H. Westers, G. Zanen, W. J. Quax, et al. (2004). Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 207-232.

Valent, Q. A., D. A. Kendall, S. High, R. Kusters, B. Oudega & J. Luirink (1995). Early events in pre-protein recognition in *Escherichia coli*: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides. *EMBO J.* **14**.

Valent, Q. A., J. W. L. de Gier, G. von Heijne, D. A. Kendall, C. M. ten Hagen-Jongman, B. Oudega & J. Luirink (1997). Nascent membrane and presecretory proteins synthesized in *Escherichia coli* associate with signal recognition particle and trigger factor. *Mol. Microbiol.* **25**: 53-64.

Valent, Q. A., P. A. Scotti, S. High, J. W. L. de Gier, G. von Heijne, G. Lentzen, W. Wintermeyer, B. Oudega & J. Luirink (1998). The *Escherichia coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon. *EMBO J.* **17**: 2504-2512.

- van Roosmalen, M. L., N. Geukens, J. D. Jongbloed, H. Tjalsma, J. Y. Dubois, S. Bron, J. M. van Dijk & J. Anne (2004). Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**: 279-297.
- van Wely, K. H. M., J. Swaving, C. P. Broekhuizen, M. Rose, W. J. Quax & A. J. Driessen (1999). Functional identification of the product of the *Bacillus subtilis yvaL* gene as a SecE homologue. *J. Bacteriol.* **181**: 1786-1792.
- van Wely, K. H. M., J. Swaving, R. Freudl & A. J. M. Driessen (2001). Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 437-454.
- Vehmaanperae, J. (1989). Transformation of *Bacillus amyloliquefaciens* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **52**: 165-169.
- Veith, B., C. Herzberg, S. Steckel, J. Feesche, K. H. Maurer, P. Ehrenreich, S. Baeumer, A. Henne, H. Liesegang, R. Merkl, *et al.* (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 204-211.
- Vitikainen, M., I. Lappalainen, R. Seppala, H. Antelmann, H. Boer, S. Taira, H. Savilahti, M. Hecker, M. Vihinen, M. Sarvas, *et al.* (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., H. L. Hyyrylaeinen, A. Kivimaeki, V. P. Kontinen & M. Sarvas (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.
- Voigt, B., T. Schweder, M. J. Sibbald, D. Albrecht, A. Ehrenreich, J. Bernhardt, J. Feesche, K. H. Maurer, G. Gottschalk, J. M. van Dijk, *et al.* (2006). The extracellular proteome of *Bacillus licheniformis* grown in different media and under different nutrient starvation conditions. *Proteomics* **6**: 268-281.
- Voigt, B., H. Antelmann, D. Albrecht, A. Ehrenreich, K. H. Maurer, S. Evers, G. Gottschalk, J. M. van Dijk, T. Schweder & M. Hecker (2009). Cell physiology and protein secretion of *Bacillus licheniformis* compared to *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 53-68.
- von Heijne, G. (1990). The signal peptide. *J. Membr. Biol.* **15**: 195-201.
- Wang, L. F., A. Kortt & D. Stewart (1993). Use of a Gram-negative signal peptide for protein secretion by Gram-positive hosts: basic protease of *Dichelobacter nodosus* is produced and secreted by *Bacillus subtilis*. *Gene* **131**: 97-102.
- Wanker, E., A. Huber & H. Schwab (1995). Purification and characterization of the *Bacillus subtilis* levanase produced in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1953-1958.
- Waschkau, B., J. Waldeck, S. Wieland, R. Eichstaedt & F. Meinhardt (2008). Generation of readily transformable *Bacillus licheniformis* mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**: 181-188.
- Watanabe, K., Y. Tsuchida, N. Okibe, H. Teramoto, N. Suzuki, M. Inui & H. Yukawa (2009). Scanning the *Corynebacterium glutamicum* R genome for high-efficiency secretion signal sequences. *Microbiology* **155**: 741-750.

Westers, L., H. Westers & W. J. Quax (2004). *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**: 299-310.

Westers, L., D. S. Dijkstra, H. Westers, J. M. van Dijl & W. J. Quax (2006). Secretion of functional human interleukin-3 from *Bacillus subtilis*. *J. Biotechnol.* **123**: 211-224.

Wexler, M., F. Sargent, R. L. Jack, N. R. Stanley, E. G. Bogsch, C. Robinson, B. C. Berks & T. Palmer (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.

Wong, S. L. (1995). Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**: 517-522.

Woodcock, D. M., P. J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S. S. Smith, M. Z. Michael & M. W. Graham (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3469-3478.

Young, F. E. & J. Spizizen (1961). Physiological and genetic factors affecting transformation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **81**: 823-829.

Yuan, J., J. C. Zweers, J. M. van Dijl & R. E. Dalbey (2010). Protein transport across and into cell membranes in bacteria and archaea. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**: 179-199.

Zalucki, Y. M., I. R. Beacham & M. P. Jennings (2009). Biased codon usage in signal peptides: a role in protein export. *Trends Microbiol.* **17**: 146-150.

Zanen, G., E. Houben, R. Meima, H. Tjalsma, J. D. H. Jongbloed, H. Westers, B. Oudega, J. Luirink, J. M. van Dijl & W. J. Quax (2005). Signal peptide hydrophobicity is critical for early stages in protein export by *Bacillus subtilis*. *FEBS J.* **272**: 4617-4630.

Zhang, X. H. & Y. D. Li (2009). Evaluating signal peptide prediction methods for Gram-positive bacteria. *Biologia* **64**: 655-659.

Zhang, X. Z., Z. L. Cui, Q. Hong & S. P. Li (2005). High-level expression and secretion of methyl parathion hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4101-4103.

Zimmer, J., W. Li & T. A. Rapoport (2006). A novel dimer interface and conformational changes revealed by an X-ray structure of *Bacillus subtilis* SecA. *J. Mol. Biol.* **364**: 259-265.

Zweers, J. C., I. Barák, D. Becher, A. J. Driessen, M. Hecker, V. P. Kontinen, M. J. Saller, L. Vavrová & J. M. van Dijl (2008). Towards the development of *Bacillus subtilis* as a cell factory for membrane proteins and protein complexes. *Microb. Cell Fact.* **7**: 10.

8. Anhang

Tab. 15: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Signalpeptide aus *B. licheniformis* DSM13

Name	Sequenz	Name	Sequenz
dAbnA	MLKTSKFERRTTVAKTIISGFILFLLIFSAA	dPbpD	MRSFFGWIFLLMLIPFVFTLMSGREA
dBli01109	MMRKKSFWLGMLTALMLVFMFSDSASA	dPbpX	MARTYRTRIKKRKKQKTKRRLIIFSFLVVCGLIYLALPSGMR
dAraN	MKRFLSSIFMVTVAVCLLLSGCKASPASDQ	dPel	MKRFFSVIILGALLLGTSAPIEA
dAspB	MNLAKRVYALTPSALTATAKA	dPelB	MKLIKNASFIHFLAAAGIYFLLGTVAASA
dBdbD	MKKKQSPMKFVIMTVVVVFLIGALVVINNQTN	dPhoB	MGLRNRIVGITLAGAVALGSAGTGSAAMETAKK
dBglC	MAAEKVFISKNKIGGRMSYMKRSISVFIACFMVAALGISGIAPKAAA	dPhoD	MKLLSEESLKDNTFDRRRFIQAGKIAGLSGLAIAQSMGAMEVNA
dBli00338	MLINKSKFFVFFSIFVMMLSLFSVNGEVAKA	dPhy	MNFYKTLALSTLAASLLSPWSILPRAEA
dBli00339	MKKAASSFLSCMLLLALFIPNRQISA	dPonA	MSDQFNSROERRKAQOGKSRNSNTHSKPKKPKKAGLFFKILLSILIGVIGLIAGGVTFVAVMV
dBli00411	MKCLYISAVLGLLFFVVGKTIHA	dPqqa	MKKKWASIAFTMMLGIGITICYLFFEHSKLE
dBli00439	MKLLVYAVMLCLFFLYVYDYSRGDKAGS	dPurN	MKKFAVFASGSGTNFEA
dBli00478	MKRTVLFLLIWLWLAGCASAQEAEE	dQcrA	MKMSEKRHRVSRQFLNLTGVGGFMAAGMLMPMVRFA
dBli00514	MERVVRVVRPKPKRKRRIKRLFTLLVIIAA	dResA	MKKKRFYIRTGILLVLLAALGYTLYSVAVFQNTESV
dBli00654	MKKAAMAILGFLVLTASLFIINKGTSQINA	dSacB	MNKNIAKASALVAAAALLAGGAPQTF
dBli00656	MKQKRLYARLLPLFALIFLPHSAAAAA	SacC	MKKRMQMGIIIGAMMPFEAFSA
dBli00668	MKKSAPLILMALSLLPFAQEAAGSKGASGVKA	dSleB	MKSKGSPCLNVILCTIMATSLPFSQKSAAFS
dBli00669	MKSKLISLAAAMLLAVPLSGCSSSA	dSpoIIAB	MLKLLGAVLILAAAATWTGFEMA
dBli00784	MKIQRVQALLATSAMEAGLMLSDAVY	dSpoIIAH	MMIKKQTVVLLTMLSLVVVLSVYYIMSPEGE
dBli00837	MKMKVLYSVLIVLWVSVLAAYNAFNGN	dSpoIIQ	MKEEEKNRTSKITKQFRKRKRVVFPAYLTSAVVVLTAVLWYQSASN
dBli00866	MKCLLCLLVLFVFSAGCTQOKAST	dSpoIIR	MGMKKSNIACMYIFLLIGALANLTTEETA
dBli00967	MTIILTIAAVVIIGLVVFNVRSSAS	dSppA	MNAKRWIALVIALGVFALSVMVLSLLA
dBli00976	MFRRRSGIHPAVLVLIGSAAALTAAFS	dTasA	MGTKKKGLGVASAALGLALVGGGTWA
dBli01138	MITLTATLLIISGFSGFASSVSA	dVpr	MRKSIVRVYVMAFILLFALSTFTLTVGVQA
dBli01150	MKLRFGLLFVMLVFALPLAACQNSGSG	dYbbC	MGKKAIVWLAGMVFVSTLTAATAA
dBli01299	MMVMKWLGKSLVASSLLAGILAVSGSPMHVQA	dYbbD	MKRFLQCALIALLSSLAIQPAAREA
dBli01309	MKKTMSLAAAAAAMSATAFGATASA	dYbbE	MISAAASLLLTCCFPLPSTAQT
dBli01455	MKCLFKTIVTLISLISGTLFSSQASAA	dYbdN	MKKSFLFVFSFLMMAIPAFS
dBli01536	MKKYIILLLLIIAGGGLFMKHQYDVK	dYedA	MRSKFFLMLLMIVAVVSTACGGSKSASG
dBli01539	MNKTKLLTALGLSLAGNAALGIYA	dYekD	MMRKLVCVLLVIPLSCTAVMPSAYG
dBli01566	MRKLFISLVIMLFLSVNNGVCSNVDA	dYdaJ	MKAPVRYIWGMILCFLSVSLAVGCICA
dBli01585	MKKYIILLALVIITSGGIFMKQNNNR	dYdaN	MKYIICLASFLITATGQAAAA
dBli01595	MSMFAFVSVVPAEA	dYdhM	MKILLACSSGMSTSLVTKMQEYA
dBli01622	MKNVWSSLLCALAAALVFFCADFAKA	dYdhT	MKNIVCSIFALLLAFVVSQPSYA
dBli01747	MKKKPLFRIFMCAALIGSLLAPVAQA	dYdjM	MKKILFSVFLVLAGSLLAFNFAGEASA
dBli01880	MKQKAFLLMKCALCLLAVIFMSIASFSEKTRA	dYdjN	MKKSIVVLLAAVILAAAGAF
dBli01882	MREKWLALCLKSIIIFVIMGTVLLSAPVKAAG	dYerB	MVNRYVRVLLCFASLLLASCQSQQEQ
dBli01883	MMTKKGLTLVMPFLLLSAIIQGNRPALA	dYesW	MKKGKRWKNNLAASSLLITLVTFSEQAEA
dBli02027	MNEKQPKKNNKNTLLGGIIVAAALIGGFTASLFIK	dYfjS	MMKRICAICCGFLTLAFSGNAEA
dBli02100	MMFLFIIFIIILAAAALLFINLHPVFG	dYfkD	MKLLCFTLTAFLSFFFAVQEADA
dBli02101	MENMYTDNIWLEVDNMNIGKLSKVFSLAIALATILSFHAVSANA	dYfIP	MKNFAIIMICLLILMSGDERQSSAPRPPGVPVEIVVPA
dBli02165	MMNKHKWLAAIAIAILAVIGYFTVRHLEPEYA	dYhaH	MSKGRSLAAGLIVGGVIGVAAALLTAPTS
dBli02166	MKLSIVLVIFICALVSIHWLNA	dYhcP	MTGEMKAAFLVIMAGALSALLAIFVVS
dBli02210	MLMSAFVLVLAACQADPKGSGYA	dYhcR	MVNVSRSRFMAGLTIITFMIIASFITPFADVTHA
dBli02447	MKCLRHLQNFLEAIAWLSGLALFVNAPGSEA	dYhcS	MKVKMLSFLLMIAGLATFA
dBli02450	MKNVILFVLAIVLTIIVGVSVSYG	dYheN	MROVSKTAPSVAYLLTKAACFFVLCLILVYWDLSQSSA
dBli02451	MSNSPEKDHKLSALGKLVGLMIVFGVITLLCSWNAAGPKQEPKENS	dYhjA	MKKAAGLLSAGLIGFSWAGDVAEA
dBli02479	MKSKLLTAAASVAGLSLASAALMTQTDGVKV	dYkvT	MKSKFAALAAFLICMLPAARIEH
dBli02506	MKILLVCAAGMSTSLVSRMKKHAEA	dYkvV	MRRISLIYLLIFLITGLVFPQASA
dBli02527	MAYIAKRMIPIIFILFASCSAGGAGSAGK	dYkvD	MKKAFLLSAAAATLFTFSGVQHADA
dBli02543	MKKAIFGFSLSAALLVPSSFAAA	dYlaJ	MRIFFLIQTVMLLSACGIQNNARN
dBli02544	MFQNKIKKAVGAVAFAGALLVSLGPVSA	dYlbL	MLKKRIIRIALLVIVAAALSFKLPPYITPEGEA
dBli02820	MRMKRLRMKHLIIAVCTLALLSSPIVSDA	dYlxW	MKRHTVNLASLMLVLGFLLSFSYQFARE
dBli02833	MRLFICASCLFGLIVPSFETKALT	dYlxX	MKKNRNFISLIMLIFGIMLSVQFNLSK
dBli02844	MTKKQYSYIFTLAFAVFLSGCQSGQKQAS	dYndA	MKFSKIGALLTLACLILPFSSATAAG
dBli02850	MNKRIVKSSIVFLAALIFGQLPKTMAAE	dYndF	MKKTNTIRYLTSVLLFLTLTGCWSSHE
dBli02979	MKLLGLGAVITVFLTIGLNTFTQGA	dYneA	MKKSFLFVSLFATVISCCLFVVSFAGK
dBli03010	MKSIKWITLICTALAFSLFIFFNKANFTEA	dYneN	MMKKVLAFAAFLLVLAGLAVVN
dBli03029	MKNVLRKMSLAAALIFGLLSFSMPESG	dYoaJ	MKKKISILITAMFLTILCFSPQASA
dBli03095	MSKGRLLMIINMIGHIATLAVAVCG	dYoaR	MLKIWMITGLLLAQAPAGHS
dBli03262	MKKVLLAVFVLGTVFSFSFANHAPEAA	dYoaW	MKKIVCLMVFSIMTAFGIHQPAEA
dBli03304	MKNNHLLKSLIWLWAGAVIIVLAGPLSAFA	dYocH	MKKTMSFVAVAAALSSTAFGASASA
dBli03343	MKRKAFFVSLFCSLFAFAGAFMINREMTRE	dYocB	MKLLIVCLLAVLILPAGASLA
dBli03371	MKLVLLMLVLLVYPVHSK	dYojL	MKKKIAAGLAASAVVGTSLAASPVEA
dBli03405	MKKMIAVALTAVFASLVVLSFSSQPKGDA	dYogH	MMALLRSLAISFVILPAAAAAYA
dBli03433	MKKKRFGLFVLVLLFNNTASQA	dYpcP	MNKKLLLVDMGALLFRSFFATA
dBli03540	MKKSCLMIVCLAFILAFS	dYpjB	MIRKVLICMMLAVFPAAGLKA
dBli03544	MLKTVRIIILGAMCTILSAAAGFDPQPAASQA	dYpjP	MKMWMRKALVALFTIATFGLVSPPALMA
dBli03670	MKLLFMVILSVLTVFGSSSVSFA	dYpmB	MGKKTILIFIFGIFLITALLAGA
dBli03719	MKILSTLALGFVLAAGFLAGNLTSSAEG	dYpmQ	MKNVFGIFLAGLITVFLSSCGTSK
dBli03739	MKFFKTLFFIFFVAVLMTAVLILFSKDALPLAEMLHS	dYpmS	MKKWKSLLIILAAVNMVILAGIFILISLPGGQ
dBli03767	MKRKLMITGLTAVLIGSSAVLIPKLS	dYpuD	MGKIKFKLTVLLVLAALVADGGFYVYKNGSVQDVSTALSQTVSS
dBli03981	MKRSRFLSLLSVSLIPGVTAGA	dYqfZ	MKRIVLFSILLALFIVYDYLKSGTIPQNALPASTMAAE
dBli04029	MNLIKWLFVSIFAFQPPAPAALL	dYqiL	MKLLISFVLLFSPMAAFPAFA
dBli04124	MKRIYIFLLCFVALLPVGGKTAQA	dYqxA	MASFMGKCLACAVMFFGVLLGMQQANN
dBli04129	MKLLISIFIFVFGVGSLLTAAVSAEA	dYqxM	MERLSRTRRCRKRAGKNIIIVFOTLLIIVLIGLGSQLSQ
dBli04156	MSALFKKMLSSLIGVSGSALFAPNAGA	dYqzC	MTRQSVQAFAGGMILATAVLAGAFYLDNGKA
dBli04166	MKRRKIVVALGGNAIQTDGASA	dYqzG	MLKNVILCSFLLSSIGPLNAHA
dBli04182	MKRWLFGIFSLLMFAMWGCNSKNSANS	dYrkA1	MTAINLIIFAVLIALTAFFVATEFAI
dBli04185	MNKTIVFKAFGMLMTGVLFFALYSAAALPSAHA	dYrrL	MFEDQTKKPFIKRLLKHKIKFWLTVVAVLLITAGAVSLYVKS
dBli04206	MMMFILLTMAVYLFYSFSKDNRP	dYrrR	MKWQKRMKWSVSIISAAALLLIRLA
dBli04272	MKTRAGGLIAAVLIAVGVFIQK	dYrvJ1	MKRAVLIISMMLAAQAAFYTSSTASA
dBli04294	MVFKPKPVFAAVALFALSFAGTAAAYA	dYtcQ	MGKKWLPFIFVLLAGLGLGCSNSGADQA
dBli04306	MKSTTKIIGVVIIGLLAVGTIAFLNGWITVSR	dYteS	MKNFAFSVLLIAAVLLTSCG
dBli04308	MKNHLYEKKRKRPLTRTIKATLAVLTMISIALVGGATVPSFA	dYtdA	MKRFFFTILSFIMMLFILASCG

Fortsetzung Tab. 15:

dBofC	MYSRSKFKIGLLIGSLLAALSFHLEALA	dVtzB	MKLRHFLIGAGIGIAAA
dBpr	MKRRLRKKAFSTILSGLLIGSLFMPAVSDA	dYuiC	MFRRLMTVLFVLFAMFTTFFAVSGVEA
dCtpA	MKQQKLFLAVLITAVAASALTLYLVGKSGGSVYS	dYunA	MKAVLSVLILLILLIOPCALA
dCwID	MKKKIKWLGFLLGFVLLCLFQYQFNN	dYurL	MNRKCVIPFILMSAMCAPAQNAEA
dDacA	MKSKRLKQIMLIVAFVTVGAFSPMSTAKA	dYutC	MNKKILLAGLVALPLAGCQTALN
dDacB	MRFFLKQAAAAIMICSLSCSSYETAQA	dYvaG	MMNLDLRGKRALVTGSTSGIGKAIA
dDacF	MKRHLKLLIFTIIMTAPSALAKESA	dYvcE	MKKKVYTFGLASILGTASLFTPFMNTASA
dDetB	MRNMLSVFFVCALIFGMLTGCKSSDVG	dYveB	MKKAVYKRISILTVCLGIFIMIFLSVRETEKK
dEpr	MKKLWKIIVSAAMFVGFANSPIRQA	dYvFO	MKNVLAFFVVLVFLVGFAGTSGPAEA
dFhlL	MNKKLLGIMTIIIAIAVLGTAFFVIKGS	dYvgL	MKKAILTVIAVLTSVVLVFGCQAEKGG
dGerAC	MKKKGMLAALSLLLLTGWCWDSR	dYvgO	MKKMFAFFTALMLGLTCLPYLSEA
dGgt	MRRLAFVVAFLAVGCFSPVSKA	dYvhJ	MAERIKVVRKKNKRRILKRFVLMMLLAVGGVGIYKIINTISA
dGlpQ	MKRLVRSIFLITAAIAAFGFSGHAEA	dYvjB	MNQKIVRLIHALSLLCLVLTGAGPIPLHDVSKASA
dGpsA	MTKVSILGAGSWGTLALVLA	dYvnB	MKKYRNQTLILLAAVLLFALQIPISA
dIicB	MNILLACAAGMSTSLLVTKMEKS	dYvpA	MMKRLAGTVILSGLLVCGFQALPEKALA
dLip	MRRHSLSILLICMLSVVSVFSPSAASA	dYwaD	MKRKMMFGLALSIIAGGVVADGTGNAQA
dLybT	MKKMKLLSSVTAALMFTQSAQA	dYweA	MLKRFKFIGKIGVLLTSAALFSLFTEEA
dLytc	MRVFLKAVPMLLGGFFLVPNVFA	dYwmB	MKTQTVNALIFIVLVLIVHVFQSEEA
dLytd	MKNIRKTVIFAAILLVHTAVPAIPALA	dYwmC	MKKKMTLGILTAMVLSLGSFAFA
dLyte	MKKQVITASAASVVLGSLTFAGAASA	dYwmD	MTFTMLLSLAPAAFA
dLytr	MRAEKRRKKKILITIIALIGIFVLTGSY	dYwoF	MRKWYFILLSACILVSVIIAFAYDKTGA
dMntA	MKWKQTLAALAAAILLAAAGCSSKSS	dYwtB	MKKQLNFQEKLLKTKQEKKNKHNHFVFLPVIFCLMFVTVWVGS
dMoaD	MIKILLFAQLAEQA	dYwtC	MKFVRAIWPVGLVLIIFMSAFKY
dNpr	MVSKSVKRLITIGLIGISYLSGMHPAQA	dYwtD	MIKKAANKLVLFCGIAVLWMSLFLTNHNDVRA
dNadB	MSHQTIIVVAGAAALSFAASIPSEYEVVMTKASV	dYwtF	MLRSQRTKRRKRLKRWKYSLFFIALLTATAAAGGYAYYKANA
dNucB	MKKWAVHLLFSALVLLGLSGGAAYSPOHAFG	dYxeA	MKKTISLITAAALVCIGAFLLIHN
dPbpB	MPKKNKFMNRGAALISCFALFFVIVGRFAFIQATGKVN	dYxia	MNMRKCFIQVLLALFIIAACFAPNQASA

Tab. 16: Sequenz der Benchmark-Signalpeptide

Name	Sequenz
wtSP	MRGKKVWISLLFALALIFTMAFGSTSSAQA
SubC	MMRKKSFVLGMLTAFMLVFTMAFSDSASA

Tab. 17: Liste der Oligos die für die Amplifikation der Signalpeptide aus *B. licheniformis* DSM13 verwendet wurden. Restriktionsschnittstellen wurden fett markiert.

Name	Sequenz	Name	Sequenz
dAbnA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGttaaagacategaaattt	dPbpX dn	atataaattcagcTCGCATACCGCTTGGAAAGTGC
dAbnA dn	atataaattcagcACCCGCCGAGAAAATAAGCAG	dPel up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagatttttagtga
dAprE up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGatgaggaagaaagattt	dPel dn	atataaattcagcCGTTCGATTGGCCGAGATGT
dAprE dn	atataaattcagcAGCAGACGCGGAATCGCTGAA	dPelB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgatcaaaaagca
dAraN up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaagttcccttc	dPelB dn	atataaattcagcCGCAGAAGCAGCGACTGTACC
dAraN dn	atataaattcagcTGTATCGGAGGACGAGACTCGC	dPhoB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGggtttctacgcaacaga
dAspB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaatctagctaaaagagta	dPhoB dn	atataaattcagcTTTTTTCGCTGTTCCATTGC
dAspB dn	atataaattcagcTGCITTTGCGATGATTGCCAA	dPhoDup	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaactgagcaagaa
dBdbDup	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaacacagcagta	dPhoDdn	atataaattcagcTGCATTGACTTCCATTGCC
dBdbDdn	atataaattcagcATTITGGGTTGATITGTTGAT	dPhy up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGacttttcaaaaagctc
dBglC up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGctgctggaagaaagattt	dPhy dn	atataaattcagcAGCTTCGGCAGCGGGGAGAA
dBglC dn	atataaattcagcGGCAGCGCTTTCGGTGCAT	dPonA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGcaagcaatttaacagc
dBli00338 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGttgatcaaaaagcaaa	dPonA dn	atataaattcagcTACCATCACCGCAAAAAGTGAC
dBli00338 dn	atataaattcagcGGCTTTTGAACCTTCCCCATT	dPqqA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaagaatggattgca
dBli00339 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaacccgcttcatc	dPqqA dn	atataaattcagcTTCGCTCAGTTTTCCTATTTC
dBli00339 dn	atataaattcagcTGCGGAAATCTGCCGGTTCGG	dPurN up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaactgctgcttatt
dBli00411 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaactttatagtt	dPurN dn	atataaattcagcTGTCTCAAAATTCGTTCCCTC
dBli00411 dn	atataaattcagcAGCATGTATTTTGTTCACC	dQerA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaatgagcgaaaaaga
dBli00439 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaactgttagttt	dQerA dn	atataaattcagcCGCAAGCGAACCATTAGGCAT
dBli00439 dn	atataaattcagcAGAACCCTTTATCGCCCGC	dResA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaactgctttttac
dBli00478 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaactgcaacagttta	dResA dn	atataaattcagcCACACTTCCGCTTTTGAAA
dBli00478 dn	atataaattcagcTTCCTCAGCTCTTGGGCGCT	dSacB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaatcaaaaaactgct
dBli00514 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGgagagggttagagtaaga	dSacB dn	atataaattcagcTGC AAAAGGTTTGGCCGCCACC
dBli00514 dn	atataaattcagcTGCTGCTATGATAACCAGCAA	dSacC up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaagagaatgattcag
dBli00654 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaactgcatgctatt	dSacC dn	atataaattcagcTCCGAAAAGGCTTCCGGGAA
dBli00654 dn	atataaattcagcAGCGTTTATTTGAGATGTTCC	dSleB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaatcgaagattctttt
dBli00656 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaacaacaaaagcctt	dSleB dn	atataaattcagcAGAAAAGGCAGCGCTTTTITG
dBli00656 dn	atataaattcagcTGCCCGCTGCTGCAGAATG	dSpolIAB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGctgaaActtttagtgcc
dBli00668 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaactgctctct	dSpolIAB dn	atataaattcagcCGCCATTCAAACTCTGTCCA
dBli00668 dn	atataaattcagcAGCTTACCCTCCGATGCTCC	dSpolIIAH up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGatctgaaaaacaacag
dBli00669 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaactgaaactgac	dSpolIIAH dn	atataaattcagcTTCCTTCCGGCCGACATAAT
dBli00669 dn	atataaattcagcAGCGGATGATGAACATCTCTGA	dSpolIQ up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagagaagaaaagaa
dBli00784 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactcaaaaagggtcca	dSpolIQ dn	atataaattcagcGTTAGAACCCGATTATACCA
dBli00784 dn	atataaattcagcAGCGGATGATGAACATCTCTGA	dSpolIR up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGggaaaatgaaagaatca
dBli00837 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGatgaaaagaagttctg	dSpolIR dn	atataaattcagcGGCAGTCTCTTCCGCTGAG
dBli00837 dn	atataaattcagcATTITCCGTTGAAGCGCTTGTGA	dSppA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaatcgaaaagattgac
dBli00866 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaactgtatgctcgt	dSppA dn	atataaattcagcTGCAAGCAAAAAGGCTCATCAC
dBli00866 dn	atataaattcagcCGTTGATGCTTTTGTCTGAGT	dTasA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGggtcaaaaagaacta
dBli00967 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaccattactgaccatc	dTasA dn	atataaattcagcAGCCAAAGTTCCTCTCTAC

Fortsetzung Tab. 17:

dBli00967 dn	atatgaattcagcAGAAAGCCGACCCGCACATT	dVpr up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGAGAAAAAGTATCGTGCCG
dBli00976 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGttgaagaagatctgce	dVpr dn	ATATGAATTCAGCTGCTGCCTCCGGTGAGGAA
dBli00976 dn	atatgaattcagcAGAAAAAGCCGGTTAATGTC	dYbbC up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGgaaaaaagaacatcteg
dBli01138 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGataacctacgcccaca	dYbbC dn	atatgaattcagcGGCAGCTGCTGCGGTTAGTGT
dBli01138 dn	atatgaattcagcGGCTGAGACAGATGATGCGAA	dYbbDup	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaagattcttcaatgc
dBli01150 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaattgagactggttta	dYbbDdn	atatgaattcagcTGCTTCGCGAGCCGCGCTG
dBli01150 dn	atatgaattcagcTCCCGAGCCGAATTTGGCA	dYbbe up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGatcagtcggccgctec
dBli01299 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGatggttaagtgttta	dYbbe dn	atatgaattcagcAGCTGTGCTGTGGACGGAAG
dBli01299 dn	atatgaattcagcGGCCCTGTACATGTCATGGGAC	dYbdN up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaagtgtttctg
dBli01309 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaacaatcatctcc	dYbdN dn	atatgaattcagcCGAAAATGCTGGAATCGCCAT
dBli01309 dn	atatgaattcagcTGCTGAGGCAGTCCGCTCCGAA	dYcdA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGcgaatgaaaagtgtttt
dBli01455 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaactattcaaaacc	dYcdA dn	atatgaattcagcTCCGCTCGCTTGTGCTGCTC
dBli01455 dn	atatgaattcagcAGCCGCCGAGATTGTGAGAA	dYckDup	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGatgagcaactgtcgtt
dBli01536 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaatacattattac	dYckDdn	atatgaattcagcCCCTAGGCAGAGGCGATGAC
dBli01536 dn	atatgaattcagcTTTCACATCTACTGATGCTT	dYdaJ up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaccctgtgaggtat
dBli01539 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaacgaagcttta	dYdaJ dn	atatgaattcagcAGCTTTGATCGACGCCAGCCGC
dBli01539 dn	atatgaattcagcGGCTGATAGTTCCGAGAGCCGC	dYdaN up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaatatacatcatatctctegcG
dBli01566 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGagaataattttttata	dYdaN dn	atatgaattcagcGGCTGCAGCCGCTTGTCCCTG
dBli01566 dn	atatgaattcagcAGCATCGACCTGCTACACCC	dYdhM up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGcgaataattttactcgc
dBli01585 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaatacataattatc	dYdhM dn	atatgaattcagcCGCGTATTCTCGATCTTGGT
dBli01585 dn	atatgaattcagcTCTGTTATTATTTGTTGCTT	dYdhT up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaacactgtttgt
dBli01595 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGtcgatgttctttgtc	dYdhT dn	atatgaattcagcTGCTAGCTCGGCTGCGAAAC
dBli01595 dn	atatgaattcagcCGCCTCAGCCTGCGGTTACTAC	dYdjM up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagagactttttct
dBli01622 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagactgtttgtctac	dYdjM dn	atatgaattcagcAGCATCGCTCACCAGCAGAA
dBli01622 dn	atatgaattcagcGGCTTTGGCAAAAATCCCGCA	dYdjN up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaagtctcgttt
dBli01747 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaagccattatc	dYdjN dn	atatgaattcagcCGAAAATGCGCTGCGGCTAA
dBli01747 dn	atatgaattcagcAGCTGCACAGCAACCCGAGC	dYerB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGtgaactgatgtaaga
dBli01880 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaacagaagcatttta	dYerB dn	atatgaattcagcCTGCTGCTGCTGCACTGCGCA
dBli01880 dn	atatgaattcagcTGACCGGCTCTTTCTGAAAA	dYesW up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaagaaagaaagg
dBli01882 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGagagaaaaagtgttagcc	dYesW dn	atatgaattcagcTGCCTCAGTGTGCTCCGAGAA
dBli01882 dn	atatgaattcagcTCCCGAGGCTTGGAACTGC	dYfsJ up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagcaactctgtgccc
dBli01883 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGatgagcaaaaaggttta	dYfsJ dn	atatgaattcagcCGTTCAGCATTCGCCCTGAA
dBli01883 dn	atatgaattcagcGGCTAGTCAGGCCGGGGATT	dYfjDup	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaActttgtgtttt
dBli02027 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaatgaaaaacaacaag	dYfjDdn	atatgaattcagcTGCCTCAGCTTCTGTACAGC
dBli02027 dn	atatgaattcagcTTTCCTGATGAACAGGGAGCC	dYfjP up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagacttgcgattatc
dBli02100 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGatgtttttattcatttt	dYfjP dn	atatgaattcagcAGCCGGTACAGCATTTCAAC
dBli02100 dn	atatgaattcagcTCCAACACAGGATGTAATAAT	dYhaH up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGcaaaaagccgatcttta
dBli02101 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGgaaataatgtactacg	dYhaH dn	atatgaattcagcTCTGAAGTCCGCGCTGCTCAG
dBli02101 dn	atatgaattcagcAGCATTTCAGAAAACCGCATG	dYhcP up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGacggggagatgaaagca
dBli02165 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGatgaaataacaatagtg	dYhcP dn	atatgaattcagcGCTGAACACGACAAAAATGGC
dBli02165 dn	atatgaattcagcGGCATTATCCGGTTCAAGGTG	dYhcR up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGcgaactgtgtaagagc
dBli02166 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaagctaaagcattgta	dYhcR dn	atatgaattcagcAGCTGTGCTTACGTCCGCAAA
dBli02166 dn	atatgaattcagcGGCATTTCAGCCATATGATGAA	dYhcS up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagctcaagatgtatcg
dBli02210 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGctgatctcagctttgtt	dYhcS dn	atatgaattcagcTGCAAAAAGTGGCAACCCCGC
dBli02210 dn	atatgaattcagcTGCGTAAGATCCTTTTGGATC	dYheN up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGcccaagctatcaaaaaa
dBli02447 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaactcagacatcaa	dYheN dn	atatgaattcagcGGCAGGAGGATATTATGAAAGCTG
dBli02447 dn	atatgaattcagcGGCTTCCGACCCCGGGGCAAT	dYhjA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaataagcagcgggt
dBli02450 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaatgtgatgtttt	dYhjA dn	atatgaattcagcTGCTTCTGCCACATCGCCGCG
dBli02450 dn	atatgaattcagcCCCGTATTCAGCCACACTGCC	dYkV up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGtgaactgaaatgtctct
dBli02451 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGcaaatcaccacaaagaa	dYkV dn	atatgaattcagcATGCTCGATTCTTCCGCGCGG
dBli02451 dn	atatgaattcagcCGCGGAATTTTCTTTATCGG	dYkV up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGcgaagactcagctcatt
dBli02479 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactaaactgtttgta	dYkV dn	atatgaattcagcTGCAGATGCTGCGGCTGAAA
dBli02479 dn	atatgaattcagcGACCTTCACACCATCTGTTTTG	dYkV up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaGctttctttta
dBli02506 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaatattattggtt	dYkV dn	atatgaattcagcAGCGTTCGCTGCTGACAGCC
dBli02506 dn	atatgaattcagcCGCTCTGCATGCTTTTTCAT	dYlaJ up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGcgaatcttttttgatc
dBli02527 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGctttacatagcaaaaccg	dYlaJ dn	atatgaattcagcATTTCGGCATTATTTTGAAT
dBli02527 dn	atatgaattcagcCCCTTTCGCTGAGCCAGCCGC	dYlBl up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGtgaactgaaatgattata
dBli02543 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaagcattgtaggg	dYlBl dn	atatgaattcagcCGCTTCGCCAGGTTCCGGTAT
dBli02543 dn	atatgaattcagcAGCCCGCAGCGAATGAGGATGG	dYlW up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagcagcaaacatct
dBli02544 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGttcaaaacaacaaatcaa	dYlW dn	atatgaattcagcTTCCTGGCAATTTGATAGGA
dBli02544 dn	atatgaattcagcCGCATTACGGGCAATCCAGA	dYlX up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaataatgctttc
dBli02820 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGagaaatgaaagattaaag	dYlX dn	atatgaattcagcCTTCAGCGAATTTGAATCGAC
dBli02820 dn	atatgaattcagcCGCATCGCTTACAATCGGGGA	dYndA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagcagcaaacatct
dBli02833 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGcggatttcatatgtca	dYndA dn	atatgaattcagcACCTGCTGACGATGCTCCGGAAT
dBli02833 dn	atatgaattcagcCGTCAGCGCTTTCGTTTCAA	dYndF up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaactaacaccate
dBli02844 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGacgaaaaagcaatattct	dYndF dn	atatgaattcagcTTCGCTGCTCCTCCAGCATCC
dBli02844 dn	atatgaattcagcTGATGACCGCTGTTTCTGGCC	dYneA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaagaactgattgatt
dBli02850 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaacaaagcagctgtaaa	dYneA dn	atatgaattcagcCTTACCAGCAAAAAGACACAAA
dBli02850 dn	atatgaattcagcTTCGGCTGCCATTGTCTTCGG	dYneN up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGatgaaaaaagtctgact
dBli02979 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaacttcttaggt	dYneN dn	atatgaattcagcATTCCAAAACCCGCAAGCCCGC
dBli02979 dn	atatgaattcagcAGCTTTCTCTTGAAGTAA	dYoaJ up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaagaactcagata
dBli03010 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGcaaaaaataaaatggate	dYoaJ dn	atatgaattcagcAGCGGAAGCCTGAGGCGAAAA
dBli03010 dn	atatgaattcagcGGCTCTGTAAAGTTCCGCTT	dYoaR up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGtgaatgattgagact
dBli03029 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaatgtgtgaggaa	dYoaR dn	atatgaattcagcAGAAATGCCCCCGGGCTGCGC
dBli03029 dn	atatgaattcagcGCCTGATTACGGCATCGAAAA	dYoaW up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaactgattgttg
dBli03095 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGatgaaagcattgtgatg	dYoaW dn	atatgaattcagcAGCTTACAGCAGGATTTGATGTG
dBli03095 dn	atatgaattcagcTCCCGATACAGCGCAAAAGCCG	dYoch up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGagaagactgttatgccc
dBli03262 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGatgaaaaaagtgtttt	dYoch dn	atatgaattcagcTGCAGAGGCACTCGCTCCGAA
dBli03262 dn	atatgaattcagcAGCCGCTTCAGGAGCGTGTATT	dYoeB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaagttaactgtttg
dBli03304 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaacacacttctcta	dYoeB dn	atatgaattcagcTGCGAGGAGGATATTATGaaagaccctcagc
dBli03304 dn	atatgaattcagcGGCAAAATGCTGAGAGCGGCC	dYojL up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaagaatgagcaga
dBli03343 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaagaaGcctttgtc	dYojL dn	atatgaattcagcGGCTTCGACCGGTGACGCCGC
dBli03343 dn	atatgaattcagcTTCAGCGGATTTCCCTGTT	dYojH up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGatgcaactctgagaagt
dBli03371 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaactgtgtctgctc	dYojH dn	atatgaattcagcTGCTAGGCCGCTGCGCCAGG
dBli03371 dn	atatgaattcagcTTTCGATACATGCGGATACAC	dYpeP up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaagaactgctgctt
dBli03405 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaatgattgctggtt	dYpeP dn	atatgaattcagcCGAGCTGCAAAAAAAGACCCG
dBli03405 dn	atatgaattcagcGGCATTCTCCCTTCGGCTGAGA	dYpJ up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGatacgaaggtgatcctt
dBli03433 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaagcgttccgga	dYpJ dn	atatgaattcagcCGCTTTCAAAACCCGCGCAGC
dBli03433 dn	atatgaattcagcCGCTTGTGAAGCTGATTTAAA	dYpJ up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaatgattgtagagaaaa
dBli03540 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaactgtgtctgatg	dYpJ dn	atatgaattcagcCGCAATCAATGCCAGCAGGAG
dBli03540 dn	atatgaattcagcGAAAAAGCAAGAAGAAAGGC	dYpMB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGgcaaaaaaacattatt

Fortsetzung Tab. 17:

dBli03544 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGctgaaacgtccgcate	dYpmB dn	atagaattcagcCGCTCCCGCAAGAAGTGTGTT
dBli03544 dn	atagaattcagcAGCTTGGCTTTTAGCGGCTGC	dYpmQ up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaacgttttggcatt
dBli03670 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaactctgtttatg	dYpmQ dn	atagaattcagcCTTGTAGTTTCCCGAGGACCA
dBli03670 dn	atagaattcagcCGCAAACTACGGACGATGA	dYpmS up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaatggaagagccta
dBli03719 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaattatcaact	dYpmS dn	atagaattcagcTTGTCCCGCGGCAAGGAAAT
dBli03719 dn	atagaattcagcCCCTCAGCTGAGCTTGTAAT	dYpuDup	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGggaaaaataaattcaag
dBli03739 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGAAATTTTCAAAACTCTT	dYpuDdn	atagaattcagcAGATGAGACGGTTTGGCTGAG
dBli03739 dn	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGAAACTTTCGGCTAA	dYqIZ up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctattgtctg
dBli03767 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaaaActttagcagc	dYqIZ dn	atagaattcagcTCCCGCTGCCATGGTTGAAGC
dBli03767 dn	atagaattcagcGCTTTTAAAGGGATCAGCAC	dYqil up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgttaataaagagt
dBli03981 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaactctcttctt	dYqil dn	atagaattcagcCGCAAAAGCAGCTGGAAAAGC
dBli03981 dn	atagaattcagcGGCACCAGCGCTCACACCCGGG	dYqxA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGcttctttttgggaaaa
dBli04029 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtcaaatggaft	dYqxA dn	atagaattcagcGTTGTTCGCTGCTGCATGCC
dBli04029 dn	atagaattcagcTAATAGAGCGGCTGGTGCCTGG	dYqXM up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGtccgattatctcgaact
dBli04124 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaatataatatttt	dYqXM dn	atagaattcagcCTGTGACAGCTGACTCCCAAA
dBli04124 dn	atagaattcagcTGCTTTCAGCCGCTTTCCCGCC	dYqZC up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtcaaatgtaaca
dBli04129 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaatataatcagc	dYqZC dn	atagaattcagcAGCTTTTCCGTTATCCGCTGAA
dBli04129 dn	atagaattcagcTGCTTTCGCGAAACCCCGCC	dYqZG up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGctgaaaaatgtcatatta
dBli04156 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGtcaacttttcaaaaa	dYqZG dn	atagaattcagcCGCATGGCATTGAGCGGCC
dBli04156 dn	atagaattcagcTGCACCCGCTTTCGGTGCAAA	dYrkA1 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGacagccatataattt
dBli04166 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaaaaaagaaanaattg	dYrkA1 dn	atagaattcagcGATCGCAAATCCGTTGCAAC
dBli04166 dn	atagaattcagcTGCCCTGCGATCTCCGGTTTG	dYrRL up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGttgaaatcagacaag
dBli04182 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagtgtgctcttggga	dYrRL dn	atagaattcagcCGATTAACGTAGAGCGAAAC
dBli04182 dn	atagaattcagcGCTATTGTGACTTTTGCTATT	dYrR up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaatggcaaaagcgtatg
dBli04185 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaacaaaaaacagctgtt	dYrR dn	atagaattcagcAGCCAGCTGATCAGCAGAAA
dBli04185 dn	atagaattcagcCGCTGTGTCAGAAAGGAAGTGC	dYrV1 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaacaaagcagctattg
dBli04206 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGatgatgtttatctgtatt	dYrV1 dn	atagaattcagcTGCAGAAGCTGTGTTTGACGA
dBli04206 dn	atagaattcagcGGCCGGCCGGTGTGCTTGTCT	dYteQ up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGgggaaaaatggctgatc
dBli04272 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGctgtttaaaaaaccaaaa	dYteQ dn	atagaattcagcAGCCTGGTGTCTCCGCTGTT
dBli04272 dn	atagaattcagcCGCATATGACAGCCGCTCCCGCC	dYteS up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaacaaactctctctcc
dBli04294 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaataaccacgaagatc	dYteS dn	atagaattcagcTCCCGATGAGGTAAGAAGAAAG
dBli04294 dn	atagaattcagcTCTTGACACTGTGATCCATCC	dYtIA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtttttttacc
dBli04306 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaataaccacgaagatc	dYtIA dn	atagaattcagcCGCCATGAAGCGAGGATAAA
dBli04306 dn	atagaattcagcTCTTGACACTGTGATCCATCC	dYtIB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dBli04308 up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaanaactttgtatgag	dYtIB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dBli04308 dn	atagaattcagcTGCAAAAGGAGCACCCTGAGC	dYtIC up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGtccggcgtttctgatg
dBpr up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGAAAGAAAGCTGAGAAAA	dYtIC dn	atagaattcagcTGCCTCCAGCCTGCTGCTGCT
dBpr dn	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGAAAGAAAGCTGAGAAAA	dYtIA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtttttttacc
dBoFC up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtIA dn	atagaattcagcCGCCATGAAGCGAGGATAAA
dBoFC dn	atagaattcagcGGCCAGGCTCCAGGTTGAAA	dYtIB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dCtpA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGAAACAGCAGTTGAAACTC	dYtIB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dCtpA dn	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGAAACAGCAGTTGAAACTC	dYtIC up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGtccggcgtttctgatg
dCwlDup	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaanaataatagg	dYtIC dn	atagaattcagcTGCCTCCAGCCTGCTGCTGCT
dCwlDdn	atagaattcagcATTGTGAATGATAATTGAAA	dYtIS up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dDacA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaacaagpattaaag	dYtIS dn	atagaattcagcTCCCGATGAGGTAAGAAGAAAG
dDacA dn	atagaattcagcAGCTTTTGCAGTTGACATAGG	dYtIA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtttttttacc
dDacB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGctctttttcttaaaaa	dYtIA dn	atagaattcagcCGCCATGAAGCGAGGATAAA
dDacB dn	atagaattcagcTGCTTTCAGCCGCTTTCGTATGAv	dYtIB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dDacF up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtIB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dDacF dn	atagaattcagcTGCCGCTCTCTTTTGCAGCGCC	dYtIC up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGtccggcgtttctgatg
dDetB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtIC dn	atagaattcagcTGCCTCCAGCCTGCTGCTGCT
dEpr up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGAAAGAAAGTATGGAATAATC	dYtIO up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dEpr dn	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGAAAGAAAGTATGGAATAATC	dYtIO dn	atagaattcagcGGCTTCCCGCGGACCCGCTGT
dDetB dn	atagaattcagcGCTATTACATCGCTGCTTTT	dYtY up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dFHL up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtY dn	atagaattcagcCGCTTCCGATGATGTTGTTGAT
dFHL dn	atagaattcagcTGCCGCTTCCCTTGATGACAAA	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dGerAC up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaagaanaaggaatgta	dYtYB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dGerAC dn	atagaattcagcCCTGCTGCTCCAGCAGCCTGT	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dGgt up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGagagctgattcttctta	dYtYB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dGgt dn	atagaattcagcTGCTTTCGACACCGGACTGAA	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dGlpQ up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGAAAGAAAGTATGGAATAATC	dYtYB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dGlpQ dn	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGAAAGAAAGTATGGAATAATC	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dGpsA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtYB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dGpsA dn	atagaattcagcCGCAAAAGCAGCGCAAGGC	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dLicB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtYB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dLicB dn	atagaattcagcACTTTTTTCCATTTTCGTCAC	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dLip up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGTCTGCTATCATTITTA	dYtYB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dLip dn	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dLytB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtYB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dLytB dn	atagaattcagcAGCTTGGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dLytC up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtYB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dLytC dn	atagaattcagcCGCAAAATACATTAGCCACAAA	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dLytDup	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtYB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dLytDdn	atagaattcagcTGCTTAAAGCAGGAATTGCGCG	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dLytE up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtYB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dLytE dn	atagaattcagcCGCGGAAGCGGCTCCCGCAAA	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dLytR up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGagagctgaaagaggaag	dYtYB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dLytR dn	atagaattcagcATAACTGCTGTGCTGAGAAC	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dMntA up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtYB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dMntA dn	atagaattcagcGCTGCTGCTTTTCGAGGAGCA	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dMoADup	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtYB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dMoADdn	atagaattcagcCGCAGCCGCTTGTTCGCAAG	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dMpr up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtYB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dMpr dn	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dNadB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGctctcagacgattatt	dYtYB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dNadB dn	atagaattcagcTACAGCTCTTTTGTATCAC	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dNucB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtYB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dPbpDup	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGctctcagacgattatt	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt
dPbpDdn	atagaattcagcAGCTTCCCGCGGAGGCCAT	dYtYB dn	atagaattcagcGGCCGGCAATGCGCATGCC
dPbpX up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt	dYtYB up	ATATAAGCTTAAGGAGGATATTATGaaactgtctcaacttctt

DNA-Sequenz von Subtilisin BPN^o ohne Signalpeptid aus *B. amyloliquefaciens* ATCC 23844 (NCBI Accession Number: K02496.1):

gcagggaaatcaaacggggaagaaatattgtcgggttaaacagacaatgagcacgatgagcgcgctaagaagaagatgtcatttctgaaaaagcggg
 aaagtgcaaaagcaattcaaatatgtagacgcagcttcagctacattaaacgaaaagctgtaaaagaattgaaaaagaccggagcgtcgttacgttgaagaag
 atcacgtagcacatgcgtacgcgcagtcctgctcctacggcgtatcacaataaagccctgctcgcactcaaggctacactggatcaaatgtaaaagtagcgg
 ttatcgacagcggatcgtattcttctcatcctgatttaaaaggtagcagggcggagccagcatggttctctgaaacaaatctttcaagacaacaactctcacggaact
 cacgttccggcagcagttcggctcttaataactcaatcgggtgtattaggcgttgcgccaagcgcacatcttacgctgtaaaagtctcgggtgctgacgggtccggcc
 aatacagctggatcattaacggaatcgagtgggcgtatgcaaacaaatggacgttataaacatgagcctcggcggaccttctggttctgctgcttataaaagcggcag
 ttgataaagccgttgcacccggcgtcgtgagcgttgcggcagccggttaacgaagcacttccggcagctcaagcacagtgggctaccctgtaataaccttctgtc
 attgcagtaggcgctgttgacagcagcaaccaaaagagcatcttctcaagcgtaggacctgagcttgatgcatggcacctggcgtatctatcaaaagcacgcttct
 ggaaacaaatagcggcggtacacgggtacgtcaatggcatctccgcagcttgcgggagcggctgctttgattcttctaaagcaccgaaactggacaacactcaagt
 ccgcagcagtttagaaaacaccactacaacacttgggtattcttactatggaaaagggtgatcaacgtacagggcagctcagtaa

DNA-Sequenz Protease A ohne Signalpeptid aus *B. lentus*:

gctgaggaagcaaaagaaaaatatttaattggccttaatgagcaggaagctgtcagtgagttgtagaacaagtagaggcaaatgacaggtcgcattctctctgag
 gaagaggaagtcgaaatgaattgcttcatgagttgaaacgattctctgtttatccggtgagtaagccagaaagatgtggacgcgcttgaactgatccagcagattct
 tatattgaagaggtgcagaagtaacgacatggcgcgcaacaatcccttgggaattagccgtgtgcaagccccggctgccataaccgtggattgacaggttctg
 gtgtaaaagtgtcgtctctgatacaggtatttccactcatccagacttaaatattcgtgtggcgtagctttgtaccaggggaaacctccactcaagtggaatgg
 gcatggcacgcatgtggccgggacgattgctgctttaaacaattcattggcgttcttggcgtagcgcctagctcggaaactatacgtgttaaagttaggagccga
 cggtagaggtgcaatcagctcattcccaagggtggaatggcagggcaacaatggcatgcagctgtaattgagtttaggaagcccttcccaagtgccaca
 cttagcaagctgtaataagcgcgactctagaggcgttctgtgtgtagcggcatctggaaatcaggtgcaagctcaatcagctatccggccggttatgcaagcga
 tggcagtcggagctactgacaaaacaacaaccgcccagctttcacagtatggccggcgttgacattatggcaccaggggtaaacattcagagcacataccc
 aggtcaacgtatgccagcagcaacgggtacatcgtgctactctcatgttgacaggtgcagcagccctgttaaaacaaagaacctcttggccaatgtacaat
 ccgcaacctctaaagaatcggcaacgagcttaggaagcacgaactgtatggaagcggactgtcaatgcagaagcggcaacacgctaa

DNA-Sequenz von Protease L ohne Signalpeptid aus *B. gibsonii*:

gctgaggaagcaaaagaaaaatatttaattggccttaatgagcaggaagctgtcagtgagttgtagaacaagtagaggcaaatgacaggtcgcattctctctgag
 gaagaggaagtcgaaatgaattgcttcatgagttgaaacgattctctgtttatccggtgagtaagccagaaagatgtggacgcgcttgaactgatccagcagattct
 tatattgaagaggtgcagaagtaacgacaatgcaacaacagttccatgggtattacagctgtacaagctccactgtgcataatcgtggaataacaggatctgg
 agtaaaagtgcgtatactgtatcaggtatagctcagcatagtgatttaaccattcgtgggggagccagctttgtaccaggagagtaacaacagcgtgatcfaatgtg
 catggtactcagcttgcggaacagtgccgctcttaataatcaattggtgtatcgggtgtggcacaagtgtgacctatacgtgtaaaaggtattaggagcaaatg
 gtagaggaagcgtgagtggtgattgctcaaggtctagagtggtgcaacgaataacatgcatattgcaaacatgagctcgttagtgatgacactagcactacatta
 gagcgtgcagtaactatgcgacaagccgtggagttctcgtatcggcgtactgtaacaatggtactggttcattggctaccagctcgttatgcaaacgcaatg
 gctgtaggagcgtgacaaaacaacagacgtgcgagctttctcaaatatggcacaggaattgatattgtgcacctggtgttggcattcaaaagcacatacctaaata
 atagctatgctagatgcttggaaacatcaatggctacacctatgttctgtagtagctgcgctttaaacaacaaatccatcttggaaatgcgactcaaatcgtaat
 atttgaaaaactgcgacgaatcaggaactcatcatttggtagtgactagttaatgcagatgcagcaacgcgctaa

Tab. 18: DNA-Sequenz der künstlich konstruierten Signalpeptid-Varianten Nr. 01-24 und Sequenz der synthetisch hergestellten DNA-Fragmente für die Klonierung der Varianten (B_3_4_11 und B_14_19_23). Die jeweils angefügten Sequenzen mit *Hind*III-Schnittstelle, RBS und Spacer am N-Terminus und die Sequenzen für das „+1“-Ala und die *Eco*RI-Schnittstelle sind jeweils fett markiert. Die funktionalen Domänen wurden farblich markiert (siehe Abb. 27).

Name	Sequenz
Nr. 01	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGTTTTCCTGATGATGCTTTTGATGATTGTAGCAGTC GTGTCAACAGCCTGCGGAGGCAGCAAAAGCGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 02	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGTTTTCCTGATGATGCTTTTGATGATTGTAGCAGTC GTGTCAACAGCCTGCGGAGGCAGCAAAAGCGCGGCGCTGCTGAATTC
Nr. 03	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACACTGTCACTCTTGTATTCTGGAAC GCTTTTATTCTCACAATCTGCGGGCGCTGCTGAATTC
Nr. 04	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGGTATTGATTGCAGGTGCAGTAGGAACAGCAGTTCT TTTCGGAACCCCTTTCATCAGGTATACCAGGTTACCCGCGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 05	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGGTATTGATTGCAGGTGCAGTAGGAACAGCAGTTCT TTTCGGAACCCCTTTCATCAGGTATACCAGGTTACCCGCGCGCGGCGCTGCTGAATTC
Nr. 06	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGGTATTGATTGCAGGTGCAGTAGGAACAGCAGTTCT TTTCGGAACCCCTTTCATCAGGTATACCAGGTTACCCGCGCGAGCGGAGCTGAATTC

Fortsetzung Tab. 18:

Nr. 07	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 08	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 09	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 10	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 11	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 12	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 13	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 14	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 15	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 16	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 17	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 18	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 19	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 20	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 21	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 22	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 23	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
Nr. 24	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAGACCATTGTTACTGTACTCTTGATTCTGGAACGCTTTTATTCTCACAATCTGCAGACGCTGCTGAATTC
B_3_4_11	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTatgcgaaagtaaaagaccattgttacactgtcactcttgattctggaacgctttattctcacaatctgcgaggctGCTGAATTCACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTatgcgaaagtaaaagcattgattgcaggtgcagtaggaacagcagctcttttcggaaccctttcatcagggtataaccaggtttaccgcgccagacgctGCTGAATTCACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTatgcgaaaccactatcaaaaggggaattttggtgaaaaatctttctgatgatctttgatgattgtagcagctgtcaacagcctgaggcagcaaaagcagacgctGCTGAATTCACTGAT
B_14_19_23	ACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTatgcgaaaccactatcaaaaggggaattttggtgaaaaaccattgttacactgtcactcttgattctggaacgctttattctcacaatctgcgaggctGCTGAATTCACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTatgaaaaactattcaaaatctttctgatgatctttgatgattgtagcagctgtcaacagcctgaggcagcaaaagcagcggcgctGC TGAATTCACTGATAAGCTTAAGGAGGATATTatgaaaaactattcaaaatctttctgatgatctttgatgattgtagcagctgtcaacagcctgaggcagcaaaagcagcggcgctGC TGAATTCACTGAT

Tab. 19: Liste der für die Konstruktion der Signalpeptid-Varianten verwendeten Oligos.

Name	Sequenz
sB_dYcdA_up	TGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAG
sB_dBli01455_up	TGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGAAAAAATCTATTCAAA
sB_YncM_up	TGATAAGCTTAAGGAGGATATTATGCGAAGTAAAAAG
01B_dn	AGATGAATTCAGCAGCGTCTGCGCTTTTGCTGCCTCCGCA
02B_dn	AGATGAATTCAGCAGCCGCCGCGCTTTTGCTGCCTCCGCA

Fortsetzung Tab. 19:

05B_dn	AGATGAATTCAGCAGCCGCCGCGGGTAAACCTGGTAT
06B_dn	AGATGAATTCAGCTCCGCTCGCCGCGGGTAAACCTGGTAT
07B_dn	AGATGAATTCAGCAGCGTCTGCAGATTGTGAGAATAAAAAG
08B_dn	AGATGAATTCAGCTCCGCTCGCAGATTGTGAGAATAAAAAG
09B_dn	AGATGAATTCAGCTCCGCTCGCCGCGGGTAAACCTGGTAT
10B_dn	AGATGAATTCAGCAGCCGCCGCGGGTAAACCTGGTAT
12B_dn	AGATGAATTCAGCAGCCGCCGCGCTTTTGCTGCCTCCGCA
13B_dn	AGATGAATTCAGCTCCGCTCGCGCTTTTGCTGCCTCCGCA
15B_dn	AGATGAATTCAGCAGCCGCCGCGAGATTGTGAGAATAAAAAG
16B_dn	AGATGAATTCAGCAGCGTCTGCAGATTGTGAGAATAAAAAG
17B_dn	AGATGAATTCAGCTCCGCTCGCAGATTGTGAGAATAAAAAG
18B_dn	AGATGAATTCAGCAGCGTCTGCAGATTGTGAGAATAAAAAG
20B_dn	AGATGAATTCAGCAGCGTCTGCGCTTTTGCTGCCTCCGCA
21B_dn	AGATGAATTCAGCTCCGCTCGCGCTTTTGCTGCCTCCGCA
22B_dn	AGATGAATTCAGCAGCGTCTGCCGCGGGTAAACCTGGTAT
24B_dn	AGATGAATTCAGCAGCCGCCGCGGGTAAACCTGGTAT

Tab. 20: Strategie zur Konstruktion der Signalpeptid-Varianten unter Verwendung verschiedener Kombinationen aus Primerpaaren und template-DNA. Bei „B_3_4_11“ und „B_14_19_23“ handelt es sich um die synthetisch hergestellten Konstrukte und bei dYcdA, sYncM und dBli01455 jeweils um die DNA des nativen Signalpeptids.

Name	Primer 1	Primer 2	Template-DNA
Nr. 01	1B_dn	sB_dYcdA_up	dYcdA
Nr. 02	2B_dn	sB_dYcdA_up	dYcdA
Nr. 05	5B_dn	sB_dYcdA_up	B_3_4_11
Nr. 06	6B_dn	sB_dYcdA_up	B_3_4_11
Nr. 07	7B_dn	sB_dYcdA_up	B_3_4_11
Nr. 08	8B_dn	sB_dYcdA_up	B_3_4_11
Nr. 09	9B_dn	sB_sYncM_up	sYncM
Nr. 10	10B_dn	sB_sYncM_up	sYncM
Nr. 12	12B_dn	sB_sYncM_up	B_3_4_11
Nr. 13	13B_dn	sB_sYncM_up	B_3_4_11
Nr. 15	15B_dn	sB_sYncM_up	B_14_19_23
Nr. 16	16B_dn	sB_sYncM_up	B_14_19_23
Nr. 17	17B_dn	sb_dBli01455_up	dBli01455
Nr. 18	18B_dn	sb_dBli01455_up	dBli01455
Nr. 19	19B_dn	sb_dBli01455_up	B_14_19_23
Nr. 20	20B_dn	sb_dBli01455_up	B_14_19_23
Nr. 21	21B_dn	sb_dBli01455_up	B_14_19_23
Nr. 22	22B_dn	sb_dBli01455_up	B_14_19_23
Nr. 24	24B_dn	sb_dBli01455_up	B_14_19_23

#0 pO2.sp=45 Stirrer.sp=350 Mass_Flow.sp=3 Feedpump.sp=0 Feedpump.bv=Feedpump.sp gas_mix.sp=0 pH.sp=7 temp.sp=37 IF(pO2.v<=pO2.sp-15){seq=1}	#1 pO2.sp=45 Stirrer.sp=550 Mass_Flow.sp=3 Feedpump.sp=0 Feedpump.bv=Feedpump.sp gas_mix.sp=0 pH.sp=7 temp.sp=37 Feedpump.sp=0 Feedpump.bv=Feedpump.sp IF(pO2.v<=pO2.sp-15){seq=2}	#2 pO2.sp=45 IF(pO2.v<=pO2.sp-20){stirrer.sp=850} Mass_Flow.sp=3 Feedpump.sp=0 Feedpump.bv=Feedpump.sp gas_mix.sp=0 pH.sp=7 temp.sp=37 Feedpump.sp=0 Feedpump.bv=Feedpump.sp IF(pO2.v>pO2.sp+35){seq=3}
#3 Stirrer.sp=990 po2.sp=45 IF (pO2.v<45){Mass_Flow.sp=Mass_Flow.sp+0.5} ELSE {Mass_Flow.sp=5.0} IF (Mass_Flow.sp>6.5){Mass_Flow.sp=6.0} IF (pO2.v>50){Mass_Flow.sp=5.0} IF (feedpump.sp>10){feedpump.sp=9} IF(pO2.v > 48.0){feedpump.sp=feedpump.sp+1;Seq=4} IF(pO2.v < 42.0){feedpump.sp=feedpump.sp-1;Seq=4}		
#4 IF(seq_time > 60){seq=3} Stirrer.sp=990 IF (pO2.v<45){Mass_Flow.sp=Mass_Flow.sp+0.5} ELSE {Mass_Flow.sp=5.0} IF (Mass_Flow.sp>6.5){Mass_Flow.sp=6.0} IF (pO2.v>50){Mass_Flow.sp=5.0}		

Abb. 30: Kontrollsequenz zur Regulation der Fermentationsprozesse

Name: Degering
Vorname: Christian
Familienstand: ledig
Geburtsdatum: 09.10.1980
Geburtsort: Haan, Rheinland

Schulische Ausbildung:

1987 - 1991 Gemeinschaftsgrundschule Gruitzen
1991 - 2000 Konrad-Heresbach-Gymnasium, Mettmann
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:

08/2000 - 06/2001 Zivildienst

Wissenschaftliche Ausbildung:

10/2001 - 01/2006 Biologie - Studium an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
01/2006 Studienabschluss: Diplom Biologie
Diplomarbeit im Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungs-
zentrum Jülich
**Thema: „Optimierung der Sekretion von *Bacillus subtilis*
durch Überexpression und *in vitro* Evolution von
Komponenten des Sec-Apparates“**

seit 04/2007 Doktorarbeit bei der evocatal GmbH Düsseldorf unter der
Anleitung von Prof. Dr. Karl-Erich Jäger (Institut für
Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich)
**Thema: „Optimierung heterologer Proteinsekretion in
Bacillus unter Verwendung wirtsfremder und
künstlicher Signalpeptide“**

Praktika:

04/2006 - 03/2007 Betriebspraktikum in der biologischen Forschung der Firma
Henkel AG & Co. KGaA Düsseldorf

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger, Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, danke ich für die Überlassung der interessanten und aktuellen Thematik im Rahmen des BMBF-Projektes „Genomic Design“ und die wissenschaftliche Unterstützung. Darüberhinaus möchte ich mich für das stetige Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die mir gewährte Selbstständigkeit bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Roland Freudl, Institut für Biotechnologie 1 im Forschungszentrum Jülich, bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. Thorsten Eggert und Dr. Michael Puls für die Bereitstellung des Laborplatzes bei der evocatal GmbH, Düsseldorf und für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Darüber hinaus bedanke ich mich herzlich für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen während meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der evocatal GmbH Düsseldorf, für die stets sehr angenehme Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft im Labor, sowie bei allen Mitgliedern des Institutes für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich und im speziellen bei Herrn Dr. Ulf Brockmeier für die Bereitstellung der *B. subtilis* Signalpeptidbank.

Bei Herrn Dr. Christian Leggewie und Frau Dr. Andrea Weckbecker möchte ich mich für die stetige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung in den letzten Jahren bedanken.

Ich danke der Firma Henkel AG & Co. KGaA und vor allem den Mitarbeitern der Abteilung „Global R&D Laundry and Homecare - Biotechnology“ für die Gastfreundschaft und angenehme Atmosphäre während meiner Laborarbeiten dort. Bei Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Maurer, Herrn Dr. Johannes Bongaerts, sowie bei Herrn Stefan Evers bedanke ich mich sehr für die wissenschaftliche Unterstützung während meiner Arbeit.

Bei Herrn Dr. Sascha Hausmann und Herrn Dr. Simon Eßer möchte ich mich herzlich für die kritische Durchsicht des Manuskripts, sowie die Unterstützung und die anregenden Diskussionen im Rahmen meiner Arbeit bedanken.

Abschließend möchte ich mich herzlich bei meiner Familie für die Unterstützung und die Ablenkung während meiner Arbeit bedanken. Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Verlobten Sara, die jederzeit für mich da war und mir durch Ihre stetige Aufmunterung sehr geholfen hat, diese Arbeit zu vollenden.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 06.05.2010

Christian Degering
