

**Mechanismen der Qualitätskontrolle
bei der Sec-abhängigen Proteintranslokation
in
Gram-positiven Bakterien**

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

vorgelegt von
Oliver Köberling
aus Duisburg

Referent: Prof. R. Freudl

Korreferent: Prof. J. F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 2003

Abstract

Translocation of proteins across the bacterial cytoplasmic membrane is catalyzed by the Sec-translocase consisting of the SecA ATPase and the transmembrane proteins SecY, SecE and SecG. SecA mediates the stepwise translocation of the export protein by ATP dependent cycles of insertion and deinsertion into the SecYEG channel. Initiation of translocation requires the formation of functional interactions between at least SecA, SecY and the precursor protein. This proofreading mechanism ensures that among the homologous proteins only those designated for export are translocated. During the secretion of heterologous proteins this quality control step can cause a severe bottleneck.

To investigate the molecular mechanisms underlying the quality control *in vivo* a *Bacillus subtilis* SecA replacement mutant (RMA) containing a clean chromosomal replacement of the *B. subtilis* *secA* gene by the *secA* gene of *Staphylococcus carnosus* was used as a genetic tool. This gene replacement results in an artificially increased proofreading activity of the hybrid translocase resulting in a conditional growth defect at 25 °C due to pleiotropic export defects at low temperature. In contrast, the heterologous outer membrane protein A (OmpA) of *Escherichia coli* is selectively excluded from export even at the permissive temperature (37 °C). Furthermore the RMA shows defects in sporulation and development of genetic competence.

In this work spontaneous mutants of the RMA were selected for suppression of the cold sensitive growth and the sporulation defect, respectively. Interestingly, all suppressor mutants now also showed an improved OmpA export suggesting a reduced quality control activity compared to the RMA. The identification of the mutations of seven mutants showed that the suppressors contained single amino acid exchanges in the SecA of *S. carnosus*. Surprisingly, the positions of four mutations correspond exactly to the positions of known mutations in the SecA of *E. coli* resulting in a pre-activation of the SecA protein by elevation of the basal ATPase activity („super-active“ SecA). Therefore it is very likely that the respective mutations of the suppressor mutants restore the OmpA export by super-activation of the *S. carnosus* SecA protein. This strongly suggests that in the RMA a non optimal activation of the SecA ATPase activity by the heterologous OmpA protein is the limiting step during translocation. Another mutation was located in a region of the *S. carnosus* SecA which, as identified in the SecA of *E. coli*, interacts with SecY. This strongly suggests that in this mutant the activation of the SecA ATPase by the OmpA is restored by optimized interactions between the SecA of *S. carnosus* and the SecY of *B. subtilis*.

Since the RMA is an artificial genetic system, five single mutations were transferred independently into the corresponding positions of the SecA of *B. subtilis*. Expression of three mutated SecA proteins in the homologous background indeed resulted in a more than 3-fold improved export of a variant on the *B. subtilis* alkaline phosphatase PhoB which is only poorly exported in the *B. subtilis* wildtype. This suggests a conserved function of the respective amino acid residues in the regulation of the ATPase activity in the *B. subtilis* and *S. carnosus* SecA. The results obtained in this study show for the first time that the efficiency of translocation of a heterologous protein is dependent on its ability to activate the SecA ATPase. A non optimal activation can be bypassed either by optimizing interactions between SecA, SecY and the export protein or by pre-activating SecA.

Since the SecY protein is another important component of the translocation initiation complex several mutations which result in a reduction of the proofreading activity when present in the transmembrane segment 10 of the *E. coli* SecY were introduced into the corresponding positions of the *B. subtilis* SecY. Indeed, in two cases the export of the PhoB variant was significantly improved, clearly showing that SecA and SecY are essential components of the quality control system of the *B. subtilis* translocase and variations in either of the subunits can improve the translocation of proteins which are only poorly exported in a *B. subtilis* wildtype strain.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Der generelle Sekretionsweg (Sec-Weg)	1
1.1.1. Das Signalpeptid und das „Targeting“ der Proteine	2
1.1.2. Die Komponenten der Sec-Translokase	4
1.1.3. Ein Vergleich der Untereinheiten der Translokase von <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	7
1.2. Ein Modell zur Sec-abhängigen Proteintranslokation	8
1.3. Die Regulation der SecA ATPase-Aktivität	9
1.4. Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten der Translokase im Hinblick auf die Qualitätskontrolle bei der Proteintranslokation	11
1.5. Verwendung Gram-positiver Bakterien für die sekretorische Gewinnung von Proteinen	14
1.6. Eine <i>B. subtilis</i> SecA-Austauschmutante als genetisches System zur <i>in vivo</i> Charakterisierung der Qualitätskontrolle bei der Proteintranslokation	15
1.7. Zielsetzung der Arbeit	17
2. Material und Methoden	18
2.1. Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide	19
2.2. Chemikalien und Enzyme	23
2.3. Medien und Lösungen	23
2.4. Mikrobiologische Methoden	25
2.4.1. Kultivierung von Bakterien	25
2.4.2. Stammhaltung	25
2.4.3. Transformation von Bakterien	25
2.4.3.1. Transformation von <i>E. coli</i> Stämmen	25
2.4.3.2. Transformation von <i>B. subtilis</i> Stämmen	26
2.4.4. <i>B. subtilis</i> Sporulationstest	26
2.5. Gentechnische Methoden	27
2.5.1. Allgemeine gentechnische Methoden	27
2.5.2. Präparation von DNA	30
2.5.2.1. Präparation chromosomaler DNA von <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	30
2.5.2.2. Präparation von Plasmid-DNA	31
2.5.2.3. Fällung von Plasmid DNA	32
2.6. Proteinchemische Methoden	32
2.6.1. Induktion der Genexpression	32
2.6.2. Isolierung von Proteinen aus Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen von <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	32
2.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.6.4. Immunologischer Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern	34
2.6.5. Analyse des <i>in vivo</i> Proteinexports im Pulse-Chase Experiment mit <i>B. subtilis</i>	35

3. Ergebnisse	37
3.1. Isolierung und Charakterisierung von Suppressormutanten der <i>B. subtilis</i> SecA-Austauschmutante (RMA)	37
3.1.1. Zusammenfassung der Charakterisierung bisher isolierter Suppressormutanten der RMA	37
3.1.2. Selektion von Suppressormutanten der RMA auf verbesserte Sporulationsfähigkeit	38
3.1.3. Die Suppressormutanten der RMA zeigen eine verbesserte Sporulationsfähigkeit	39
3.1.4. Die Suppressormutanten der RMA haben Veränderungen im <i>secA</i> Gen von <i>S. carnosus</i>	40
3.1.5. Identifizierung der Mutationsorte in den <i>secA</i> Genen der Suppressormutanten	42
3.1.6. Vergleich der SecA Proteine von <i>E. coli</i> , <i>S. carnosus</i> und <i>B. subtilis</i>	43
3.1.7. Die supprimierenden Mutationen treten in drei unterschiedlichen Bereichen des <i>S. carnosus</i> SecA Proteins auf	47
3.1.8. Ein Vergleich der Mutationen im <i>S. carnosus</i> SecA mit bekannten Mutationen im <i>E. coli</i> SecA	48
3.2. Die Charakterisierung der Suppressormutanten der RMA	49
3.2.1. Die supprimierenden Mutationen im <i>S. carnosus</i> SecA führen zu einem vollständig wiederhergestellten Wachstum bei 25 °C	50
3.2.2. Der kältesensitive Proteinexport wird durch die Mutationen im <i>S. carnosus</i> SecA supprimiert	51
3.2.3. Die Mutationen im <i>S. carnosus</i> SecA führen zu einer Suppression des OmpA Exportdefektes der RMA	54
3.2.4. Analyse der Sporulation und der Kompetenz der Suppressormutanten der RMA	59
3.2.4.1. Die Mutationen im <i>S. carnosus</i> SecA führen zur Suppression des Sporulationsdefektes der RMA	59
3.2.4.2. Die Fähigkeit zur Ausbildung natürlicher Kompetenz ist in den Suppressormutanten aufgrund der SecA Mutationen partiell wiederhergestellt	61
3.2.5. Einige Mutationen im <i>S. carnosus</i> SecA erhöhen die Azidsensitivität der Suppressormutanten	62
3.2.6. Die <i>S. carnosus</i> <i>secA</i> Suppressorallele sind dominant über das <i>S. carnosus</i> Wildtyp <i>secA</i> Gen	64
3.2.7. In der Suppressormutante RS 7 ist nur die Mutation im IRA 2 für den supprimierenden Phänotyp verantwortlich	66
3.2.8. Die Stärke der Suppression der Defekte der RMA ist nicht nur von der SecA Mutation, sondern auch vom Vorläuferprotein abhängig	68
3.3. Charakterisierung von Mutationen im SecA von <i>B. subtilis</i>	70
3.3.1. Transfer supprimierender Mutationen aus dem <i>S. carnosus</i> SecA in das <i>B. subtilis</i> SecA	70
3.3.2. Die mutierten <i>B. subtilis</i> SecA Proteine sind translokationsaktiv	72
3.3.3. Die mutierten <i>B. subtilis</i> SecA Proteine stellen den Translokationsdefekt eines Vorläuferproteins mit defekter Signalsequenz wieder her	73

3.3.4. Kombination von Mutationen im <i>B. subtilis</i> SecA	75
3.3.5. Die SecA Proteine mit den Doppelmutationen sind translokationsaktiv	76
3.3.6. Die <i>B. subtilis</i> SecA Proteine mit den Doppelmutationen sind stabil	77
3.3.7. Die Kombination von Mutationen im <i>B. subtilis</i> SecA führt zu keiner weiteren Verbesserung des Exports eines defekten Vorläuferproteins	78
3.4. Charakterisierung von Mutationen im SecY von <i>B. subtilis</i>	80
3.4.1. Daten zur <i>in vitro</i> Charakterisierung von Mutationen im SecY von <i>B. subtilis</i>	80
3.4.2. Die veränderten SecY Proteine führen <i>in vivo</i> zu keiner Verbesserung der Translokation des OmpA Proteins	82
3.4.3. Die veränderten <i>B. subtilis</i> SecY Proteine erlauben eine verbesserte Translokation eines Vorläuferproteins mit defekter Signalsequenz	83
4. Diskussion	85
4.1. Der limitierende Schritt bei der Translokation heterologer Proteine liegt in der schlechten Aktivierung der SecA ATPase	86
4.1.1. Die Wirkungsweise der supprimierenden <i>S. carnosus</i> SecA Mutationen	87
4.1.2. Ein Modell zur Herabsetzung der Qualitätskontrolle der Translokase durch IRA Mutationen	94
4.2. Die Charakterisierung der Suppressormutanten der RMA	97
4.2.1. Der Proteinexportdefekt der RMA bei niedriger Temperatur wird durch Mutationen im <i>S. carnosus</i> SecA supprimiert	97
4.2.2. Der OmpA Exportdefekt der RMA bei 37 °C wird durch Mutationen im <i>S. carnosus</i> SecA supprimiert	98
4.2.3. Durch Mutationen im <i>S. carnosus</i> SecA wird die Sporulationsfähigkeit und die Kompetenz der Suppressormutanten im Vergleich zur RMA verbessert	100
4.2.4. Die Azidsensitivität einiger Suppressormutanten ist aufgrund der SecA Mutation erhöht	101
4.2.5. Die Stärke der Suppression der Defekte der RMA ist von der Art der Mutation und der Art des Vorläuferproteins abhängig	102
4.3. Mutationen im <i>B. subtilis</i> SecA setzen die Qualitätskontrolle der <i>B. subtilis</i> Translokase herab	103
4.4. Mutationen im <i>B. subtilis</i> SecY setzen die Qualitätskontrolle der <i>B. subtilis</i> Translokase herab	106
5. Zusammenfassung	109
6. Literaturverzeichnis	111

Abkürzungen

Abb	Abbildung
amp	Ampicillin
APS	Amoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AS	Aminosäure(n)
BCIP	5-Brom-4-Chloro-2-Indolyl-Phosphat (X-Phosphat)
BSA	Rinderserumalbumin
Bp	Basenpaar
cfu	colony forming units
Ci	Curie
cm	Chloramphenicol
cpm	counts per minute
dNTP	Desoxy- Nukleosid-Triphosphat (N steht für eines der Nukleoside A: Adenosin, C: Cytidin, G: Guanosin, T: Thymidin)
ddNTP	Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)N,N,N',N'-Tetraacetat
ery	Erythromycin
GuHCl	Guanidium-Hydrochlorid
h	Stunden
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	molar
mA	Milliampere
min	Minuten
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µl/ml	Mikroliter pro Milliliter
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tet	Tetrazyklin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ü.N.	über Nacht
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
V	Volt
W	Watt
WT	Wildtyp

Drei- und Ein-Buchstabencode der Aminosäuren:

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

1. Einleitung

Die Translokation von Proteinen über eine Membran ist ein essentieller Vorgang in allen lebenden Zellen. Membranen grenzen Reaktionsräume ab und führen zur Kompartimentierung der Zelle. Eine prokaryotische Zelle kann in mindestens drei Kompartimente unterteilt werden. Diese sind in Gram-positiven Bakterien das Cytosol, die Cytoplasmamembran, sowie der extracytoplasmatische Raum. In Gram-negativen Bakterien kommen als weitere Kompartimente die zweite äußere Membran, sowie der dadurch entstehende Intermembranbereich, das Periplasma, hinzu. Jedes Kompartiment enthält einen bestimmten Proteinsatz. Da die Proteinbiosynthese im Cytosol stattfindet, müssen die Proteine, die nicht für das Cytosol bestimmt sind, zur Erfüllung ihrer Funktion an ihren Zielort transportiert werden. In Bakterien vermitteln im Wesentlichen zwei Wege den Transport der Proteine aus dem Cytosol in ein anderes Kompartiment. Diese sind der generelle Sekretionsweg (Sec-Weg) und der Zwillings-Arginin Weg (TAT-Weg). Zudem vermitteln einige spezielle Wege den Transport von Proteinen über die äußere Membran Gram-negativer Bakterien. Die Translokation von allen Proteinen über eine Membran wird durch Multiproteinkomplexe (Translokasen) katalysiert. Im Folgenden soll auf die Proteintranslokation über den bakteriellen Sec-Weg eingegangen werden.

1.1. Der generelle Sekretionsweg (Sec-Weg)

Der Großteil der nicht cytoplasmatischen Proteine wird über den Sec-Weg aus dem Cytoplasma exportiert (Tjalsma *et al.*, 2000). Für den Export bestimmte Proteine werden als Vorläuferproteine („Precursor“) mit einem N-terminalen Signalpeptid synthetisiert, durch cytosolische Chaperone in einer locker gefalteten Form, die eine Voraussetzung für den Export der Proteine über den Sec-Weg ist, gehalten und zur membranständigen Sec-Translokase geleitet („Targeting“). Diese besteht in Bakterien aus mehreren Sec-Proteinen, welche die Funktion haben

- die Translokation zu energetisieren (SecA)
- einen Translokationskanal in der Membran bereitzustellen (SecY, SecE)
- die Translokation zu unterstützen (SecG, SecD, SecF)

(Reviews: Manting und Driessen, 2000; Driessen *et al.*, 2001; van Wely *et al.*, 2001)

1.1.1. Das Signalpeptid und das „Targeting“ der Proteine

Das N-terminale Signalpeptid dient als Exportsignal und unterscheidet Exportproteine von cytosolischen Proteinen. Die Funktion des Signalpeptids ist, das sekretorische Protein in den Exportweg einzuschleusen. Während oder kurz nach der Translokation wird das Signalpeptid von einer Signalpeptidase abgespalten (Prozessierung) und das reife Protein von der Membran freigesetzt (Dalbey und von Heijne, 1992). Nach der Abspaltung werden Signalpeptide sowohl von membrangebundenen als auch von cytosolischen Peptidasen abgebaut (Ichihara *et al.*, 1984; Suzuki *et al.*, 1987; Novak *et al.*, 1988).

Signalpeptide von Sec-abhängigen Vorläuferproteinen tragen keine Konsensussequenz, lassen sich aber aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften in drei Bereiche einteilen (von Heijne, 1985, 1990). Diese sind die zentrale hydrophobe H-Domäne, welche N-terminal von der positiv geladenen N-Domäne und C-terminal von der polaren C-Domäne flankiert wird. Die C-Domäne enthält die Erkennungssequenz für die Signalpeptidase. Diese liegt an Position -1 und -3 relativ zur Spaltstelle, wobei an diesen Positionen Aminosäuren mit kleinen Seitengruppen, bevorzugt Alanin, auftreten. Während Signalpeptide Gram-negativer Bakterien im Durchschnitt 24 Aminosäuren umfassen, sind Signalpeptide Gram-positiver Bakterien durchschnittlich 7 Aminosäuren länger. Dennoch können prinzipiell Signalpeptide Gram-negativer Bakterien den Export von Proteinen in Gram-positiven Bakterien vermitteln und umgekehrt (Sarvas 1986; Meens *et al.*, 1993).

Zwei Klassen von Signalpeptidasen katalysieren die Abspaltung des Signalpeptids. Während Typ II Signalpeptidasen das Signalpeptid von Lipoproteinen abspalten, katalysieren Typ I Signalpeptidasen die Abspaltung des Signalpeptids aller anderen Proteine (Yamada *et al.*, 1984; Dalbey *et al.*, 1997).

In Bakterien vermitteln zwei unterschiedliche Wege das „Targeting“, d. h. den Transport von Sec-abhängigen Vorläuferproteinen zur Translokase. Diese sind zum einen der SecB-abhängige Weg, sowie der Signalerkennungspartikel abhängige Weg (SRP-Weg). Wie in *E. coli* detailliert untersucht, werden die meisten periplasmatischen Proteine und Proteine der äußeren Membran post-translational mit Hilfe des exportspezifischen Chaperons SecB an die Cytoplasmamembran geleitet (Abb. 1A). Hierzu bindet SecB an Bereiche innerhalb des reifen Teils des ungefalteten Exportproteins (Randall *et al.*, 1990), wodurch das Vorläuferprotein in einer exportkompetenten Konformation gehalten wird, somit die vorzeitige Faltung in eine stabile Tertiärstruktur bzw. die Aggregation verhindert wird. Das Signalpeptid selbst wird nicht von SecB gebunden. Indirekt trägt es jedoch zur Bindung von SecB an das Exportprotein bei, indem es die Faltung des Vorläuferproteins verzögert (Park *et al.*, 1988). Demnach entgehen schnell faltende cytosolische Proteine der SecB Bindung, während durch eine verlangsamte Faltung die SecB Bindung ermöglicht wird (Randall und Hardy, 1995). Der Komplex aus Vorläuferprotein und SecB wird über die hohe Affinität von SecB zu SecA an den Translokationsapparat geleitet (Hartl *et al.*, 1990). Bei der Initiation der

Translokation wird SecB wieder in das Cytosol freigesetzt (Fekkes *et al.*, 1997) (Abschnitt 1.2.).

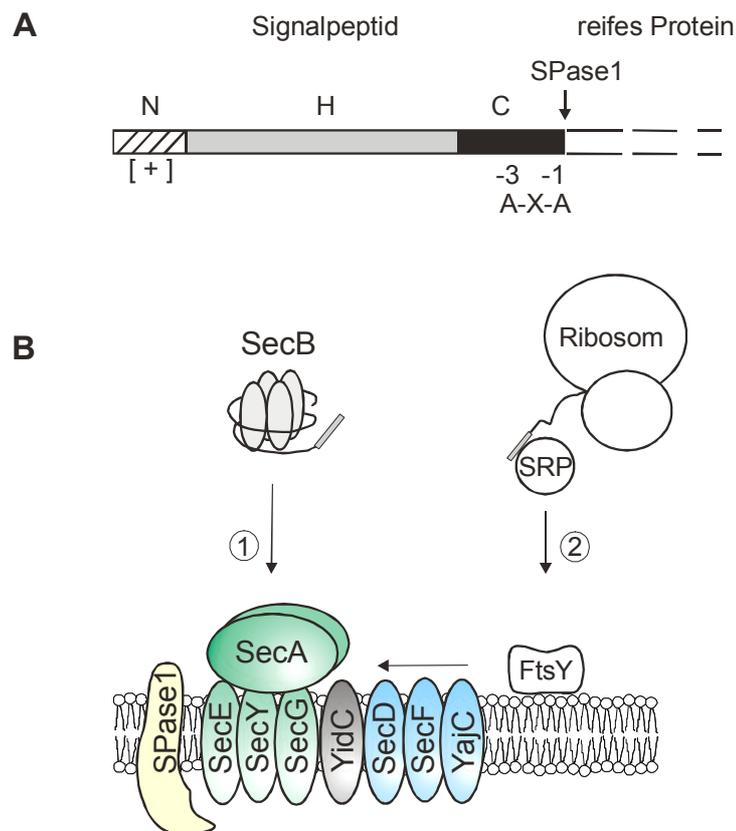


ABBILDUNG 1. A. Aufbau eines Sec-abhängigen Signalpeptids. N: positiv geladene N-Region. H: zentrale hydrophobe H-Region. C: polare C-Region, welche die Erkennungssequenz (A-X-A, X steht für eine beliebige Aminosäure) für die Signalpeptidase 1 enthält. Der Pfeil deutet die Spaltstelle für die Signalpeptidase 1 (SPase1) an. **B.** Das „Targeting“ von Exportproteinen bzw. integralen Cytoplasmamembranproteinen. (1) post-translationales „Targeting“ von Exportproteinen über den SecB-abhängigen Weg. (2) Co-translationales „Targeting“ von integralen Cytoplasmamembranproteinen über den SRP-abhängigen Weg.

Die meisten integralen Cytoplasmamembranproteine werden co-translationally über den bakteriellen SRP-Weg an die Membran geleitet (Abb. 1 B). Das bakterielle SRP ist homolog zum eukaryotischen SRP, jedoch weniger komplex aufgebaut (Rapoport *et al.*, 1996; Johnson und van Waes, 1999). In *E. coli* besteht das SRP aus dem Ffh Protein, dem Homolog zur 54 kDa Untereinheit des eukaryotischen SRP, sowie einer 4.5 S RNA (Bernstein *et al.*, 1989; Poritz *et al.*, 1990). Als SRP Rezeptor dient das membranständige Protein FtsY (Luirink *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1994). Dieses ist homolog zur α -Untereinheit des eukaryotischen SRP Rezeptors. Das SRP bindet an besonders hydrophobe Signalpeptide bzw. an das erste Transmembransegment von integralen Cytoplasmamembranproteinen des am Ribosom entstehenden Polypeptids (De Gier *et al.*, 1997;

Ulbrandt *et al.*, 1997). Der Komplex aus dem Ribosom, dem Vorläuferprotein und SRP wird über die Affinität zu FtsY zur Cytoplasmamembran geleitet (Powers und Walter, 1997). Die beiden „Targeting“ Wege treffen an der Sec-Translokase zusammen, die sowohl die Translokation von Exportproteinen, als auch die Insertion von Membranproteinen katalysiert (Valent *et al.*, 1998).

1.1.2. Die Komponenten der Sec-Translokase

Die Komponenten der Sec-Translokase wurden zuerst im Gram-negativen Modellorganismus *E. coli* identifiziert und eingehend genetisch und biochemisch charakterisiert. Das Translokase Holoenzym besteht aus dem membranassoziierten Protein SecA, sowie zwei heterotrimeren Proteinkomplexen. Diese setzen sich aus den Membranproteinen SecY, SecE und SecG bzw. SecD, SecF und YajC zusammen. Eine weitere Untereinheit der Translokase ist das Membranprotein YidC.

Zwei gegensätzliche genetische Selektionen führten zur Identifizierung der an der Proteintranslokation beteiligten Komponenten. Der erste Ansatz lieferte konditional letale Mutanten, die ein normalerweise toxisches Fusionsprotein nicht mehr in den Sekretionsweg einschleusen konnten. Diese Mutanten zeigten einen generellen Sekretionsdefekt unter den jeweiligen nicht-permissiven Bedingungen und wurden als *sec*-Mutanten bezeichnet. Der zweite Ansatz führte zur Isolierung von Mutanten, die ein Exportprotein mit einer defekten Signalsequenz, welches im Wildtyp nicht transloziert wurde, wieder in den Exportweg einschleusen konnten. Diese Mutanten wurden als *prl*-Mutanten bezeichnet. Es zeigte sich, dass *prl* und *sec* Mutationen in vier Fällen Allele derselben Strukturgene darstellten. Diese kodieren für SecA (PrID) (Oliver und Beckwith, 1981; Fikes und Bassford, 1989), SecY (PrIA) (Emr *et al.*, 1981; Ito *et al.*, 1983), SecE (PrIG) (Stader *et al.*, 1989; Riggs *et al.*, 1988) und SecG (PrIH) (Bost und Belin, 1997). Über den erstgenannten Ansatz wurden weiterhin das bereits erwähnte SecB (Kumamoto und Beckwith, 1983), sowie SecD und SecF (Gardel *et al.*, 1987) identifiziert. Mit *in vitro* Translokationssystemen und durch Rekonstitution der Proteine in Proteoliposomen wurde bestätigt, dass die identifizierten Proteine Bestandteile der Translokase sind (Cabelli *et al.*, 1988; Lill *et al.*, 1989; Brundage *et al.*, 1990; Akimaru *et al.*, 1991; Nishiyama *et al.*, 1993; Hanada *et al.*, 1994; Economou *et al.*, 1995).

Das SecA Protein

Das SecA Protein ist eine essentielle und zentrale Komponente der Translokase. In *E. coli* hat SecA eine molekulare Masse von 102 kDa und ist als Homodimer aktiv (Akita *et al.*, 1991; Driessen, 1993). Es liegt löslich im Cytosol vor, kann allerdings auch mit niedriger Affinität unspezifisch an saure Phospholipide der Cytoplasmamembran (Cabelli *et al.*, 1991), sowie mit hoher Affinität an den SecYEG Komplex binden (Hartl *et al.*, 1990). Außerdem bindet SecA die Signalsequenz und den reifen Teil eines Vorläuferproteins (Kimura *et al.*,

1991). Weiterhin stellt der C-Terminus von SecA eine Bindestelle für SecB dar (Hartl *et al.*, 1990). SecA ist eine ATPase und nutzt die Energie aus ATP Bindung und Hydrolyse zum Antreiben der Translokation der Exportproteine (Lill *et al.*, 1989). Hierzu durchläuft SecA Zyklen von Membraninsertion und -deinsertion (Economou *et al.*, 1995) (Abschnitt 1.2.).

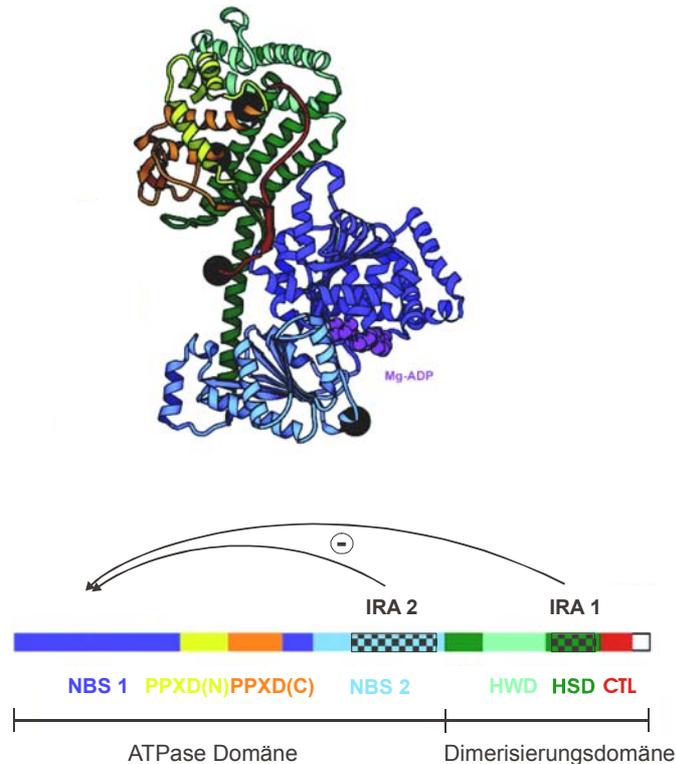


ABBILDUNG 2. Kristallstruktur des SecA Proteins von *B. subtilis*. **A.** Dreidimensionale Struktur des SecA Protomers mit gebundenem Mg-ADP [PDB Nr. 1M74]. **B.** Lineare Darstellung des SecA Proteins. Die Farben stellen funktionell verschiedene Bereiche des Proteins dar. IRA 1 und IRA 2 regulieren die ATPase Aktivität im nicht translokationsaktiven SecA herab. NBS 1 und NBS 2: Nukleotidbindestelle 1 und 2; PPXD(N)/(C): Preproteinbindedomäne, N- bzw. C-Terminus; HWD: helikale Flügeldomäne; HSD: helikale Gerüstdomäne; CTL: Carboxy-terminaler Linker; IRA 1 und IRA 2: Intramolekularer Regulator der ATP Hydrolyse 1 und 2 (kariert dargestellt) (Verändert nach Hunt *et al.*, 2002).

Strukturell kann das SecA Protein in zwei Domänen unterteilt werden. Diese sind die N-terminale 68 kDa ATPase Domäne und die C-terminale 34 kDa Dimerisierungsdomäne (Karamanou *et al.*, 1999). Es wurde lange Zeit angenommen, dass die ATPase Domäne zwei Nukleotidbindestellen (NBS), eine hoch affine NBS 1 und eine niedrig affine NBS 2, enthält (Mitchell und Oliver, 1993; Economou *et al.*, 1995). Die hoch affine NBS 1 liegt im N-terminalen Bereich der ATPase Domäne und ist für den SecA Zyklus erforderlich (Economou *et al.*, 1995). Sie enthält die für ATP Bindestellen charakteristischen Walker-Motive A und B (Walker *et al.*, 1982). Die postulierte NBS 2 liegt im C-terminalen Bereich der 68 kDa Domäne. Die Funktion der NBS 2 war lange uneindeutig, da eine direkte ATP-Hydrolyse an dieser niedrig affinen Bindestelle nicht gezeigt wurde. Neuere Untersuchungen deuten

darauf hin, dass der Bereich, der die NBS 2 enthält, für die Regulation der ATP Hydrolyse an der NBS 1 essentiell ist (Matsumoto *et al.*, 2000; Sianidis *et al.*, 2001). Deshalb wird dieser Bereich auch als intramolekularer Regulator der ATP Hydrolyse 2 (IRA 2) bezeichnet. Neben IRA 2 enthält das SecA Protein noch einen weiteren Bereich, der an der Regulation der ATP Hydrolyse an der NBS 1 beteiligt ist. Dieses als IRA 1 bezeichnete Element befindet sich innerhalb der C-terminalen Domäne des SecA Proteins (Karamanou *et al.*, 1999) (Abb. 2). Auf die Regulation der ATP-Hydrolyse wird detailliert unter Abschnitt 1.3. eingegangen.

Einen entscheidenden Schritt für das Verständnis der Organisation der funktionell unterschiedlichen Bereiche innerhalb des SecA Protomers lieferte die Auflösung der Kristallstruktur des SecA Proteins aus *B. subtilis* (Hunt *et al.* 2002). Die lösliche, dem cytosolisch vorliegenden SecA entsprechende Form, wurde mit einer Auflösung von 3,0 bzw. 2,7 Angström bestimmt (Abb. 2). Demnach liegt die NBS 1 direkt assoziiert mit der NBS 2 vor. Der N- bzw. C-Terminus der Vorläuferbindedomäne (PPXD(N) und PPXD(C)) liegt an der Oberfläche des SecA Dimers. Die C-terminale 34 kDa Domäne wird in zwei α -helikale Domänen unterteilt. Die α -helikale Gerüstdomäne (HSD) hat eine konformationsbestimmende Funktion, da sie das SecA Protein über die gesamte Länge durchspannt, die relative Position der Vorläuferproteinbindestelle zur NBS 1 determiniert und eine Kontaktstelle zwischen zwei SecA Protomeren bereitstellt. Die helikale Flügeldomäne (HWD) könnte an der Bindung von SecA an SecYEG beteiligt sein.

SecY, SecE und SecG

Der SecYEG Komplex bildet die Grundlage für die Translokationspore aus und stellt eine hoch affine Bindestelle für SecA an der Membran dar (Hartl *et al.*, 1990, Hendrick und Wickner, 1991). SecY und SecE bilden den Kern der Translokationspore (Duong und Wickner 1997) und sind für die Proteintranslokation sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Brundage *et al.*, 1990; Akimaru *et al.*, 1991) essentiell. Die beiden Proteine bilden einen stabilen Komplex, der *in vivo* nicht dissoziiert (Joly *et al.*, 1994). SecY, welches nicht mit SecE komplexiert ist, wird durch FtsH, eine membrangebundene Protease, abgebaut (Kihara *et al.*, 1995).

SecY hat eine molekulare Masse von 48 kDa und durchspannt die Membran mit 10 Transmembransegmenten. SecE ist mit einer molekularen Masse von 13,5 kDa deutlich kleiner und durchspannt die Membran dreimal, wobei nur das Transmembransegment 3 für die Funktion von SecE essentiell ist (Schatz *et al.*, 1991; Murphy und Beckwith, 1994). Die Rekonstitution von gereinigtem SecY und SecE in Proteoliposomen erlaubte eine *in vitro* Translokation von OmpA in Gegenwart von SecA und ATP (Brundage *et al.*, 1990; Akimaru *et al.*, 1991). Somit sind SecA, SecY und SecE sowie ATP im Prinzip ausreichend, um eine Proteintranslokation zu ermöglichen. Diese wird jedoch deutlich in Gegenwart von SecG stimuliert (Hanada *et al.*, 1994). SecG hat eine molekulare Masse von 12 kDa und durchspannt die Membran zweimal (Brundage *et al.*, 1990). SecG ist nicht essentiell und die

Deletion von *secG* bewirkt nur in bestimmten *E. coli* Stämmen ein kältesensitives Wachstum und Translokationsdefekte (Nishiyama *et al.*, 1994; Flower *et al.*, 2000).

Während der Translokation ist das Vorläuferprotein vollständig von Phospholipiden abgeschirmt, was vermuten lässt, dass die Translokation durch einen Proteinkanal, der aus SecYEG gebildet wird, verläuft (Joly und Wickner, 1993). Tatsächlich zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen von SecYEG Komplexen aus *E. coli* eine ringförmige Struktur. Weitere Untersuchungen deuteten darauf hin, dass zwei SecYEG Heterotrimeren von membrangebundenem SecA zu einem Komplex aus vier SecYEG Heterotrimeren, welcher der translokationsaktiven Form entspricht, zusammengebracht werden (Manting *et al.*, 2000).

SecD, SecF, YajC und YidC

SecD, SecF und YajC bilden den zweiten heterotrimeren Komplex in der Membran, der unter schonenden Bedingungen mit SecYEG aufgereinigt werden kann (Duong und Wickner, 1997a). Der Komplex scheint die Proteintranslokation nach erfolgter Initiation zu unterstützen, indem SecD und SecF die membraninsertierte Konformation von SecA stabilisieren (Economou *et al.*, 1995; Duong und Wickner, 1997 a,b) und nach der Translokation an der Freisetzung des Proteins von der Membran beteiligt sind (Matsuyama *et al.*, 1993). YajC dient vermutlich als Bindeglied zwischen dem SecDF und dem SecYEG Komplex (Nouwen und Driessen, 2002).

Als weitere Untereinheit der Translokase wurde das YidC Protein identifiziert, welches essentiell ist (Samuelson *et al.*, 2000) und einen stabilen Komplex mit SecDFyajC bilden kann (Nouwen und Driessen, 2002). YidC hat eine Funktion bei der Insertion von Proteinen der inneren Membran, indem es am lateralen Transport von Transmembransegmenten von der Translokase in die Phospholipidschicht beteiligt ist (Scotti *et al.*, 2000; Urbanus *et al.*, 2001; Beck *et al.*, 2001).

1.1.3. Ein Vergleich der Untereinheiten der Translokase von *E. coli* und *B. subtilis*

Genetische Ansätze, sowie die vollständige Sequenzierung des *B. subtilis* Genoms (Kunst *et al.*, 1997) führten zur Identifizierung der Komponenten der Sec-Translokase von *B. subtilis*, die den gut charakterisierten Komponenten der Sec-Translokase von *E. coli* entsprechen (Suh *et al.*, 1990; Sadaie *et al.*, 1991; Overhoff *et al.*, 1991; van Wely *et al.*, 1999). Daraus wird deutlich, dass der Translokation von Exportproteinen über die Cytoplasmamembran in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien ein konservierter Mechanismus zugrunde liegt. Im Gegensatz zu *E. coli* besitzt *B. subtilis* jedoch kein SecB Homolog, so dass das „Targeting“ von Vorläuferproteinen vermutlich nur über den SRP vermittelten Weg erfolgt (Bunai *et al.*, 1999). Alternativ könnte auch das zeitweise cytosolisch vorliegende SecA die Chaperonfunktion von SecB übernehmen (Herbort *et al.*, 1999). Trotz der großen

Ähnlichkeiten sind Komponenten der Translokase zwischen den Bakterien nicht immer frei austauschbar. So kann z. B. das SecA von *E. coli* das SecA von *B. subtilis* funktionell nicht ersetzen (Takamatsu *et al.*, 1992; Klein *et al.*, 1995), während umgekehrt das *B. subtilis* SecA in *E. coli* unter Bedingungen niedriger Expression funktionell ist (Klose *et al.*, 1993). Das SecY von *B. subtilis* kann das Wachstum einer temperatursensitiven *secY* Mutante von *E. coli* nicht wiederherstellen (Nakamura *et al.*, 1990). Das SecE Protein von *B. subtilis* komplementiert das kältesensitive Wachstum einer *E. coli* *secE* Mutante (Jeong *et al.*, 1993), während SecG und SecDF von *B. subtilis* die entsprechenden Proteine von *E. coli* funktionell nicht ersetzen können (Bolhuis *et al.*, 1998; van Wely *et al.*, 1999). Diese Beobachtungen zeigen deutlich, dass die Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten der Translokase zum Teil organismusspezifisch optimal aufeinander abgestimmt sind.

1.2. Ein Modell zur Sec-abhängigen Proteintranslokation

Die eingehende biochemische Charakterisierung der Komponenten der Translokase führte zur Aufstellung eines Modells, wie die Energie aus ATP Bindung und Hydrolyse am SecA Protein an die Translokation eines Polypeptids über die Cytoplasmamembran gekoppelt ist (Abb. 3).

Zur Initiation der Translokation bindet SecA mit hoher Affinität an den SecYEG Komplex. Diese Bindung wird zumindest partiell durch direkte Wechselwirkungen zwischen SecA und SecY hergestellt (Manting *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 1997). Das SecYEG gebundene SecA hat eine hohe Affinität zu SecB, sowie zu der Signalsequenz und dem reifen Teil des Exportproteins (zur Vereinfachung wurde SecB in Abb. 3 nicht dargestellt) (Cunningham und Wickner, 1989; Lill *et al.*, 1990). Die Übergabe des Vorläuferproteins von SecB auf SecA (Schritt 1) führt zu einer Aktivierung des SecA Proteins, so dass ADP gegen ATP ausgetauscht wird (Brundage *et al.*, 1990). In Folge der ATP Bindung ändert SecA seine Konformation (den Blaauwen *et al.*, 1996), wobei SecB freigesetzt wird (Fekkes *et al.*, 1997) und SecA zumindest partiell in die Cytoplasmamembran inseriert (Economou und Wickner, 1994). Dieser Schritt wird durch eine Inversion der Membrantopologie von SecG unterstützt (Nishiyama *et al.*, 1996). Durch die Co-Insertion des Vorläuferproteins wird die Translokation der Signalsequenz sowie eines Teils des reifen Proteins initiiert und somit der Translokations-Initiationskomplex ausgebildet (Schritt 2). Dabei wird die Spaltstelle zwischen dem Signalpeptid und dem reifen Protein auf der *trans* Seite der Membran für die Signalpeptidase zugänglich (Schiebel *et al.*, 1991). Die Hydrolyse von ATP resultiert nachfolgend in einer Membraneinsertion von SecA, sowie zum Ablösen von SecA von der Polypeptidkette (Schritt 3). Die erneute Bindung von SecA an das partiell translozierte Protein (Schritt 4), sowie wiederholte Zyklen von Membraninsertion und –deinsertion (zurück zu Schritt 2), ermöglichen eine schrittweise Translokation des Vorläuferproteins. Der

Protonengradient unterstützt als zusätzliche Energiequelle die Translokation (Driessen, 1992).

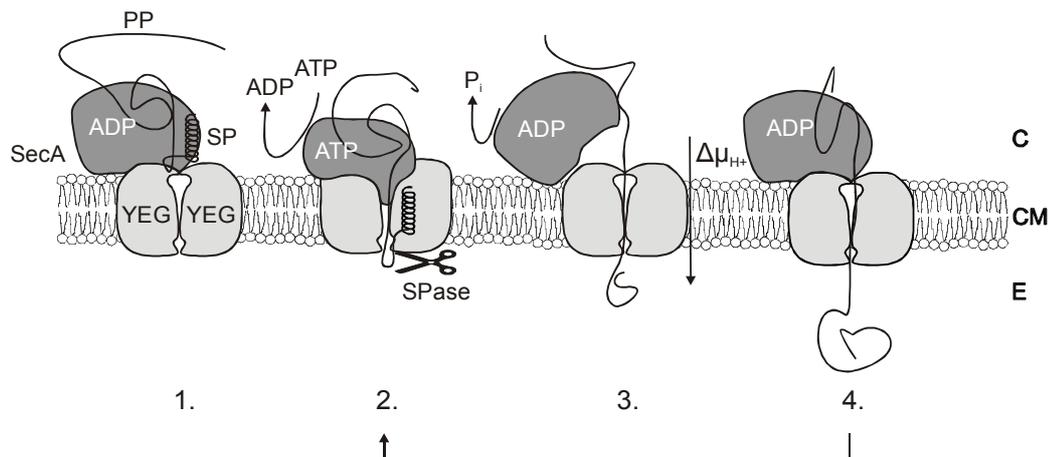


ABBILDUNG 3. Die Initiation der Proteintranslokation. Modell zum ATP-abhängigen Membraninsertions- und -deinsertionszyklus von SecA, an welchen die Proteintranslokation gekoppelt ist. PP: Vorläuferprotein; SP: Signalpeptid; Spase: Signalpeptidase; $\Delta\mu_{H^+}$: Protonengradient; C: Cytosol; CM: Cytoplasmamembran; E: extracytoplasmatischer Raum

Anhand von Strukturdaten, welche aus der Kristallstruktur des *Mycobacterium tuberculosis* SecA Proteins erhalten wurden, ist ein alternativer SecA Mechanismus vorgeschlagen worden, der den SecA Insertions-Deinsertionszyklus in Frage stellt. Demnach bildet das SecA Dimer eine zentrale Pore aus. Zur Translokation bindet das SecA Dimer derart an den SecYEG Kanal, dass SecA im Komplex mit SecYEG eine gemeinsame Translokationspore ausbildet. Geringfügige ATP abhängige Konformationsänderungen innerhalb der Motordomäne von SecA, die aus den Nukleotidbindestellen 1 und 2, bzw. IRA 2, besteht, werden auf die Translokationsdomäne übertragen. Diese besteht aus der Preproteinbindedomäne und der C-terminalen Domäne. Es wird vermutet, dass relativ geringe Bewegungen von zwei α - Helices, welche Bestandteil der Translokationsdomäne sind, das Exportprotein durch den Translokationskanal, bestehend aus SecA und SecYEG, schieben (Sharma *et al.*, 2003).

1.3. Die Regulation der SecA ATPase Aktivität

Die Verteilung des SecA Proteins im Cytosol und an der Membran zeigt, dass SecA nicht ständig translokationsaktiv ist. Dementsprechend unterliegt die ATPase Aktivität von SecA einer strikten Regulation. SecA besitzt im Cytosol eine geringe basale ATPase-Aktivität, die bei Bindung an Phospholipide leicht erhöht ist und dann als Lipid-ATPase-Aktivität

bezeichnet wird. Erst die funktionellen Wechselwirkungen zwischen dem Vorläuferprotein, dem SecA Protein und dem SecYEG Komplex führen zu einer deutlichen Aktivierung der ATPase Aktivität, die in diesem Fall als Translokations-ATPase-Aktivität bezeichnet wird (Lill *et al.*, 1990).

Die bereits in Abschnitt 1.1.3. erwähnten intramolekularen Regulatoren der ATP Hydrolyse 1 und 2 (IRA 1 und IRA 2) stellen innerhalb des SecA Proteins zwei unabhängige regulatorische Bereiche der SecA ATPase Aktivität dar. Einem Modell zur Regulation der ATP Hydrolyse entsprechend, wird durch intramolekulare Wechselwirkungen von IRA 1 bzw. IRA 2 mit der NBS 1 die ATPase Aktivität im cytosolisch vorliegenden SecA herabreguliert. Wechselwirkungen zwischen dem Exportprotein und SecA am SecYEG Komplex führen zu einer Entfernung der beiden IRA Elemente von der NBS 1, wodurch die IRA vermittelte Herabregulierung der ATPase Aktivität aufgehoben wird. Die Folge dieser Konformationsänderung ist die Aktivierung der Translokations-ATPase-Aktivität (Karamanou *et al.*, 1999; Nakatogawa *et al.*, 2000; Sianidis *et al.*, 2001).

Ein funktionelles SecY Protein ist essentiell für die Aktivierung der Translokations-ATPase-Aktivität (Taura *et al.*, 1997). Eine Mutation in der cytoplasmatischen Domäne 6 des SecY Proteins (kodiert von *secY205*) beeinträchtigt die produktive ATP- und Vorläuferprotein-abhängige Membraninsertion von SecA, was zu einem Translokationsdefekt bei niedriger Temperatur führt (Matsumoto *et al.*, 1997). Vermutlich wird durch diese Mutation die Konformation der Translokase derart verändert, dass SecA mit dem Vorläuferprotein nicht mehr als Wechselwirkungspartner akzeptiert wird (Matsumoto *et al.*, 1997). Der Translokationsdefekt kann jedoch durch Mutationen im IRA 2 Element von SecA supprimiert werden. Diese Mutationen führten zu einer Erhöhung der ATPase Aktivität von SecA, auch wenn dieses nicht mit dem Vorläuferprotein an SecYEG gebunden war („super-aktives“ SecA). Daher wurde postuliert, dass durch die Mutationen innerhalb des IRA 2 Elementes die Wechselwirkungen zwischen dem IRA 2 und der NBS 1 so beeinträchtigt wurden, dass die IRA 2 vermittelte Herabregulierung der ATPase Aktivität aufgehoben wurde. Infolgedessen wurde der kritische Aktivierungsschritt der SecA ATPase umgangen, so dass das mutierte SecA auch in Kombination mit dem defekten SecY, welches die ATPase im Wildtyp SecA nur schlecht aktiviert, funktionell ist (Nakatogawa *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2000).

Wird die C-terminale Domäne von SecA proteolytisch entfernt oder auch nur eine Aminosäure im IRA 1 Element verändert, steigt die basale ATPase Aktivität von SecA ebenfalls deutlich an (Karamanou *et al.*, 1999; Baud *et al.*, 2002). Diese Beobachtungen zeigten, dass auch Veränderungen in IRA 1 zu einer Deregulierung der SecA ATPase Aktivität führen können.

1.4. Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten der Translokase im Hinblick auf die Qualitätskontrolle bei der Proteintranslokation

Entsprechend des unter Abschnitt 1.2. vorgestellten Modells der Sec-abhängigen Proteintranslokation ist anzunehmen, dass dieser Vorgang sehr dynamisch ist und eine Vielzahl funktioneller Protein-Protein Wechselwirkungen voraussetzt. Obwohl die Translokase eine niedrige Spezifität hat, d. h. die Translokation einer Vielzahl verschiedener Vorläuferproteine katalysiert, kann sie dennoch zwischen cytosolischen Proteinen und Exportproteinen unterscheiden. Sie besitzt somit eine hohe Selektivität. Diese Fähigkeit wird auf die sogenannte Qualitätskontrolle der Translokase zurückgeführt (Osborne und Silhavy, 1993). Dabei handelt es sich um einen Überprüfungsmechanismus, der auf dem Level der Translokations-Initiation entscheidet, ob ein Protein als Exportsubstrat akzeptiert wird oder nicht (van der Wolk *et al.*, 1998). Auf molekularer Ebene sind die für die Qualitätskontrolle entscheidenden Protein-Protein Wechselwirkungen erst in Ansätzen verstanden.

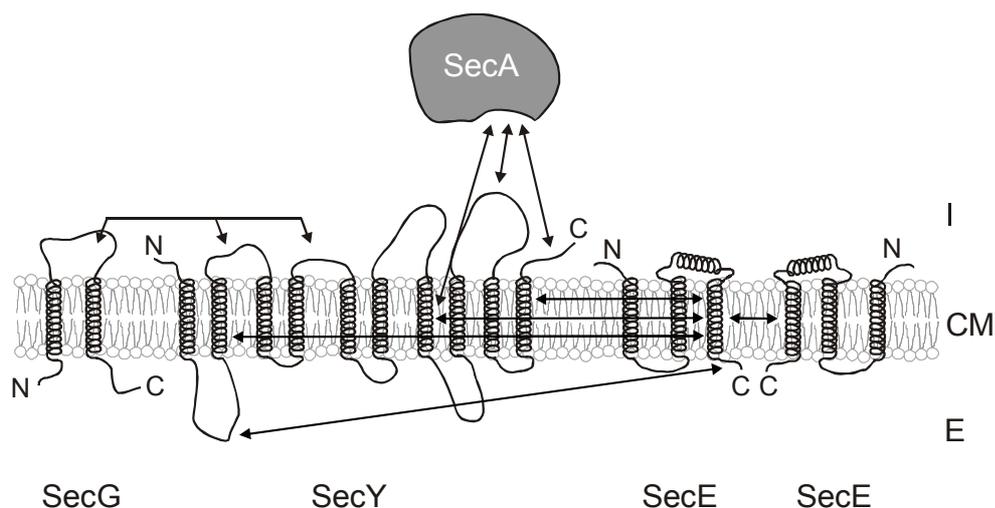


ABBILDUNG 4. Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten der Sec-Translokase. Die Pfeile zeigen Bereiche innerhalb der Proteine an, die miteinander interagieren. N und C geben den jeweiligen N- und C-Terminus der Proteine an. I: intrazellulärer Raum; E: extrazellulärer Raum; CM: Cytoplasmamembran;

Protein-Protein Wechselwirkungen, die für die Qualitätskontrolle verantwortlich sind, wurden durch biochemische Untersuchungen von in *E. coli* identifizierten *prl* Mutationen analysiert. *Prl* Mutationen erlauben die Translokation von Vorläuferproteinen mit defekter Signalsequenz, welche von der Wildtyp Translokase nicht als Exportsubstrat akzeptiert werden. Durch diese Mutationen ist somit der Schritt der Überprüfung des Vorläuferproteins durch die Translokase beeinträchtigt. *Prl* Mutationen zeigen keine Allelspezifität und

ermöglichen sogar den Export von Proteinen ohne Signalsequenz (Derman *et al.*, 1993; Prinz *et al.*, 1996). Daher erklärt sich der wiederhergestellte Export nicht über eine wiederhergestellte Erkennung der defekten Signalsequenz, sondern durch grundlegende Veränderungen der Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten der Translokase.

SecA-SecY Wechselwirkungen

Bei der Selektion von *E. coli* Mutanten, welche die Translokation von Vorläuferproteinen mit defekter Signalsequenz ermöglichen, wurden unter anderem Mutationen im *secY* Gen identifiziert. Von diesen, als *prlA* bezeichneten Mutationen, ist *prlA4* das am besten charakterisierte Allel. Es wurde gezeigt, dass die wiederhergestellte Translokation des defekten Vorläuferproteins die Folge einer erhöhten Affinität von SecA zum *prlA4* SecY Protein ist (van der Wolk *et al.*, 1998). Somit wurde geschlossen, dass ein Protein mit defekter Signalsequenz von der Wildtyptranslokase nicht als Exportsubstrat erkannt wird, weil es die Ausbildung eines funktionellen Komplexes aus SecA und SecYEG nicht ermöglicht. ATP Bindung und Hydrolyse führen demnach zum Auseinanderfallen des Komplexes aus SecA, SecYEG und dem Vorläuferprotein und zum Abbruch der Translokation. Durch Erhöhung der Affinität zwischen dem SecY Protein, welches durch *prlA4* kodiert wird, und SecA verbleibt SecA mit dem Vorläuferprotein länger an der Translokase. Die erhöhte Stabilität des SecA-SecY Komplexes erhöht somit die Wahrscheinlichkeit, dass auch die Translokation eines defekten Vorläuferproteins initiiert werden kann (van der Wolk *et al.*, 1998).

Das SecY Protein, welches durch *prlA4* kodiert wird, enthält zwei Mutationen, eine im Transmembransegment 10 (TMS 10), die zweite im TMS 7. Die Mutation im TMS 10 ist für den *prl* Phänotyp verantwortlich, führt jedoch als Einzelmutation zu einer Destabilisierung des SecYEG Komplexes und einem Verlust der Translokationsaktivität. Die zusätzliche Mutation im TMS 7 kompensiert den destabilisierenden Effekt unter Aufrechterhaltung des *prl* Phänotyps (Duong und Wickner, 1999). Eine andere Mutation im TMS 7, welche nicht der zuvor beschriebenen Sekundärmutation von *prlA4* entspricht, resultiert ebenfalls in einem *prl* Phänotyp durch Stabilisierung des SecA-SecY Komplexes (Manting *et al.*, 1999). Demnach ist die erhöhte Stabilität des SecA/SecY Komplexes ein entscheidender Faktor für eine herabgesetzte Qualitätskontrolle, wobei die TMS 7 und 10 von SecY wichtige Funktionen bei der Stabilisierung der SecA/SecY Wechselwirkungen erfüllen.

Die cytoplasmatischen Bereiche 5 und 6 (C5 und C6) von SecY stellen ebenfalls wichtige Bereiche für die Wechselwirkungen zwischen SecA und SecY dar. Diese Elemente sind entscheidend für die Aktivierung der Translokations-ATPase-Aktivität von SecA und für einen funktionellen SecA Translokationszyklus. Verschiedene Mutationen im C5 und C6 von SecY führen in *E. coli* zu kältesensitivem Wachstum und zu Exportdefekten (Taura *et al.*, 1994; 1997). Das in Abschnitt 1.3. erwähnte *secY* Allel *secY205*, welches für ein SecY Protein mit einer Mutation im C6 kodiert, erlaubt keine funktionelle SecA Membraninsertion in

Anwesenheit des Vorläuferproteins und ATP (Matsumoto *et al.*, 1997). Verschiedene Mutationen im Bereich der NBS 1 und der NBS 2 bzw. dem IRA 2 Element von SecA supprimierten allelspezifisch den Translokationsdefekt der Mutante *secY205*. Daher wurde vermutet, dass funktionelle Wechselwirkungen der Nukleotidbindebereiche von SecA mit C6 von SecY bei der Initiation der Translokation stattfinden müssen, um z. B. den Translokationskanal zu öffnen (Matsumoto *et al.*, 2000).

SecY-SecE Wechselwirkungen

Nach Duong und Wickner (1999) wird die Qualitätskontrolle durch die *prlA4* Mutation herabgesetzt, indem Wechselwirkungen zwischen SecY und SecE geschwächt werden, wodurch die Struktur der Translokationspore aufgelockert wird. Demzufolge würde die Energiebarriere, die zur Öffnung der SecYEG Pore bei der Initiation der Translokation überwunden werden muss, herabgesetzt. Dies hätte eine Reduzierung der Spezifität der Translokase zur Folge, so dass auch Proteine mit defekter Signalsequenz als Exportsubstrat akzeptiert werden.

Neben den *prlA* Mutationen in *secY* wurden *prl* Mutationen auch in *secA* (*prlD*) (Fikes und Bassford, 1989), *secE* (*prlG*) (Stader *et al.*, 1989) und *secG* (*prlH*) (Bost und Belin, 1995) identifiziert, so dass sehr wahrscheinlich alle zentralen Komponenten der Translokase an der Qualitätskontrolle beteiligt sind. Eine Kombination bestimmter *prlA* und *prlG* Allele führte zur synthetischen Letalität (Bieker und Silhavy 1990; Flower *et al.*, 1995). Untersuchungen zeigten, dass durch die Kombinationen dieser Mutationen der SecYEG Komplex instabil wird und auseinander fällt (Duong und Wickner, 1999). Dies wurde als Hinweis angesehen, dass die Aminosäurepositionen dieser *prl* Mutationen Kontaktstellen zwischen SecY und SecE darstellen. Entsprechend dieser Annahme stehen die periplasmatische Schleife 1 (P1) von SecY und die periplasmatische Schleife 2 (P2) von SecE miteinander in Kontakt (Osborne und Silhavy, 1993). Weiterhin bestehen Kontaktbereiche zwischen dem TMS 3 von SecE und dem TMS 2 und TMS 10 von SecY (Flower *et al.*, 1995).

Direkte Kontaktstellen zwischen Proteinen können durch Vernetzungsexperimente („Cross-linking“) identifiziert werden. Mit Hilfe dieser Technik wurde bestätigt, dass P1 von SecY mit P2 von SecE in Kontakt steht (Harris und Silhavy, 1999). Weiterhin wurde gezeigt, dass das TMS 3 von SecE eine Helix ausbildet. Eine Seite der Helix steht in Kontakt mit dem TMS 2 und TMS 7 von SecY, die andere Seite wechselwirkt mit dem TMS 3 eines benachbarten SecE Proteins, so dass zwei SecYEG Heterotrimere über SecE miteinander wechselwirken (Veenendaal *et al.*, 2001). Mit dieser Technik wurden auch Wechselwirkungen zwischen SecY und SecG gezeigt (van der Sluis *et al.*, 2002).

Es wird somit deutlich, dass die Komponenten der Translokase untereinander eine Vielzahl von Wechselwirkungen ausbilden und dass funktionelle Wechselwirkungen für die optimale Translokation von entscheidender Bedeutung sind.

1.5. Verwendung Gram-positiver Bakterien für die sekretorische Gewinnung von Proteinen

Gram-positive Bakterien, wie z. B. *Staphylococcus carnosus* und verschiedene *Bacillus* Arten, stellen attraktive Systeme zur sekretorischen Gewinnung von Proteinen dar. Ein entscheidender Vorteil Gram-positiver Mikroorganismen im Vergleich zu Gram-negativen Bakterien ist das Fehlen der äußeren Membran. Daher werden Proteine, die über die Cytoplasmamembran transloziert werden, nach der Passage durch die Zellwand, direkt in das Kulturmedium freigesetzt. Die Aufreinigung ist entsprechend vereinfacht, da die Renaturierung von „Inclusion bodies“ bzw. eine Trennung des gewünschten Proteins aus einer cytoplasmatischen bzw. periplasmatischen Proteinfraction nach Zellaufschluss entfällt. Ein weiterer Aspekt für die Verwendung dieser Organismen zur sekretorischen Proteingewinnung ist die natürlicherweise hohe Sekretionsleistung. Diese wird schon lange genutzt, um mit verschiedenen *Bacillus* Arten technische Enzyme wie z. B. Amylasen, Lipasen oder Proteasen in großem Maßstab herzustellen (Simonen und Palva, 1993). Nach Tjalsma *et al.* (2000) sind Produktionsstämme in der Lage, das gewünschte Protein in einer Größenordnung von bis zu 20 g/l Kulturmedium auszuschleiden. Solche Industriestämme wurden in der Regel durch wiederholte ungerichtete Mutagenese und Screening auf eine bessere Sekretion des gewünschten Proteins erhalten. Die Gründe für die hohe Sekretionsleistung sind jedoch meist nicht bekannt. Allerdings werden die hohen Erträge bislang nur bei der Gewinnung homologer Proteine, d. h. bei Proteinen, welche natürlicherweise von dem Wirtsorganismus sekretiert werden, erreicht. Diese Proteine sind optimal an den Sekretionsvorgang, der in seiner Gesamtheit das „Targeting“, die Translokation, die Faltung nach der Membranpassage und die Freisetzung in den Kulturüberstand umfasst, angepasst. Versuche, heterologe, d. h. wirtsfremde Proteine in großem Maßstab zu gewinnen, lieferten meist nur sehr geringe Ausbeuten des gewünschten Proteins, was auf mehrere Engpässe während des Sekretionsvorgangs zurückzuführen ist (Simonen und Palva, 1993; Braun *et al.*, 1999; Bolhuis *et al.*, 1999). Einen entscheidenden Engpass kann hierbei die ineffiziente Translokation des Proteins über die Cytoplasmamembran darstellen (Sarvas, 1986; Schein *et al.*, 1986; Chen und Nagarajan, 1993, Wong, 1995), die darauf zurückzuführen ist, dass das heterologe Protein nicht optimal an den Translokationsapparat des Wirtsbakteriums angepasst ist.

Daher ist ein detailliertes Verständnis der Proteintranslokation in Gram-positiven Bakterien im Hinblick auf eine gezielte Verbesserung der Translokation heterologer Proteine von entscheidender Bedeutung.

1.6. Eine *B. subtilis* SecA-Austauschmutante als genetisches System zur *in vivo* Charakterisierung der Qualitätskontrolle bei der Proteintranslokation

Das SecA Protein hat eine zentrale Funktion bei der Proteintranslokation, da es als Motor der Translokation sowohl mit den membranintegrierten Untereinheiten der Translokase als auch mit dem Vorläuferprotein in Wechselwirkung treten muss. Zur Charakterisierung des SecA Proteins aus dem Gram-positiven Bakterium *Staphylococcus carnosus* wurde das *secA* Gen von *B. subtilis* auf dem Chromosom gegen das *secA* Gen von *S. carnosus* ausgetauscht. Daraus resultierte die *B. subtilis* SecA-Austauschmutante RMA („rplacement mutant SecA“).

Untersuchungen der RMA zeigten, dass diese Mutante bei 37 °C wie der *B. subtilis* Wildtyp wachsen kann. Da der Proteinexport für das Wachstum essentiell ist, zeigte dieser Befund, dass das SecA Protein von *S. carnosus* prinzipiell die Funktion des *B. subtilis* SecA übernehmen kann. Bestätigt wurde dies am Beispiel der preproLipase aus *S. hyicus*. Dieses für Gram-positive Bakterien typische Exportprotein wurde in der RMA bei 37 °C effizient exportiert. Bei niedriger Temperatur (25 °C) führte der SecA Austausch jedoch zu einem Wachstumsdefekt der RMA. Der Proteinexport *per se* ist kältesensitiv und geringfügige Verschlechterungen der Wechselwirkungen zwischen Komponenten der Translokase werden überproportional verstärkt und führen häufig zu kältesensitivem Wachstum (Pogliano und Beckwith, 1993). Demnach bestehen in der RMA geringfügige Störungen der Wechselwirkungen zwischen dem *S. carnosus* SecA und dem *B. subtilis* SecY, die sich bei 37 °C nicht negativ auf den Export der Lipase bzw. der für das Wachstum essentiellen Proteine auswirken. Bei niedrigen Temperaturen werden allerdings die geringfügigen Störungen extrem verstärkt, so dass mindestens ein für das Wachstum essentielles Protein nicht mehr an seinen Wirkort exportiert werden kann. Da auch der Export der preproLipase in der RMA kältesensitiv ist, handelt es sich vermutlich um einen generellen Exportdefekt bei niedrigen Temperaturen.

Das heterologe Außenmembranprotein A (OmpA) aus *E. coli*, wird sowohl im *B. subtilis* Wildtyp als auch im *S. carnosus* Wildtyp effizient exportiert (Meens *et al.*, 1993, 1997). Somit kann das OmpA Protein mit den Komponenten der jeweiligen Wildtyptranslokase produktiv wechselwirken. Überraschenderweise wurde aber in der RMA das OmpA, im Gegensatz zur Lipase, auch bei der permissiven Temperatur (37 °C) selektiv vom Export ausgeschlossen. Demnach sind nicht funktionelle Wechselwirkungen zwischen dem *S. carnosus* SecA, dem OmpA und mindestens einer weiteren Untereinheit der *B. subtilis* Translokase ausschlaggebend für den OmpA Exportdefekt. Wird in der RMA zusätzlich das SecY Protein von *S. carnosus* angeboten, kann das OmpA Protein wieder exportiert werden. Das bedeutet, dass zur Initiation der Translokation ein funktioneller Komplex aus mindestens SecA, SecY und dem Vorläuferprotein ausgebildet werden muss, wobei das Vorläuferprotein ein gleichwertiger Partner bei der Komplexbildung ist (Tippe, 2001). Innerhalb des

Komplexes aus dem *S. carnosus* SecA und dem *B. subtilis* SecY ist das heterologe OmpA, im Gegensatz zur preproLipase, ein schlechter Wechselwirkungspartner. Somit haben die geringfügig beeinträchtigten Wechselwirkungen zwischen dem *S. carnosus* SecA, dem *B. subtilis* SecY eine künstliche Erhöhung der Qualitätskontrolle der Translokase zur Folge, so dass bei 37 °C das heterologe OmpA nicht exportiert wird. Demzufolge kann die Qualitätskontrolle bei der Translokation eines heterologen Proteins, welches nicht optimal an die Translokase angepasst ist, den limitierenden Schritt bei der Sekretion darstellen. Es ist bislang jedoch nicht bekannt, welche molekularen Mechanismen entscheidend dafür sind, ob und mit welcher Effizienz Fremdproteine in den Wirtstämmen transloziert werden.

TABELLE 1. Vergleich von *B. subtilis* Wildtyp und der RMA

Phänotyp	<i>B. subtilis</i> Wildtyp	RMA
Wachstum bei 37 °C	ja	ja
Wachstum bei 25 °C	ja	nein
Export der preproLipase bei 37 °C	ja	ja
Export der preproLipase bei 25 °C	ja	nein
OmpA Export bei 37 °C	ja	nein
Sporulation	ja	nein
Kompetenz	ja	nein

Weitere Phänotypen der RMA sind ein Sporulations- und Kompetenzdefekt, die auch schon bei 37 °C auftreten. Für die Initiation der Sporulation und Kompetenz bei *B. subtilis* ist der Export mehrerer Peptide, die am Quorum-sensing beteiligt sind, notwendig (Perego, 1997). Zu dieser Klasse gehören unter anderem mehrere sogenannte Phr Peptide (Phosphatase Regulatoren). Einige dieser Peptide werden als Vorläuferproteine in der Zelle synthetisiert, nach dem Export aus dem Cytoplasma zu Pentapeptiden prozessiert und wieder in die Zelle aufgenommen. Intrazellulär regulieren diese Pentapeptide die Aktivität von spezifischen Phosphatasen (Perego, 1997). Diese sind wiederum an der Regulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription sporulations- und kompetenzspezifischer Gene aktivieren, beteiligt (Sonenshein, 2000). Mehrere Hinweise deuten darauf hin, dass zumindest einige der Peptide Sec-abhängig exportiert werden. Der N-Terminus von drei Phr Peptiden (PhrA, PhrC und PhrE) zeigt den charakteristischen Aufbau eines Sec-abhängigen Signalpeptids und enthält eine typische Spaltstelle für Typ 1 Signalpeptidasen (Lazazzera *et al.*, 1999; Perego und Brannigan, 2001). Zudem führen Mutationen im SecA von *B. subtilis* häufig zu Defekten bei der Sporulation (Sadaie und Kada, 1983, 1985; Asai *et al.*, 1997). Ein funktioneller Proteinexport scheint somit für die Initiation der Sporulation und Kompetenz von essentieller Bedeutung zu sein. Dies wurde weiter durch die Beobachtung unterstützt, dass die extrazelluläre Zugabe des PhrA Pentapeptids den Sporulationsdefekt der RMA partiell

aufheben konnte (M. Klein, persönliche Mitteilung). Daher ist anzunehmen, dass mindestens eines dieser Peptide nicht optimal mit dem SecA von *S. carnosus* und dem SecY von *B. subtilis* bei der Initiation der Translokation wechselwirken und daher in der RMA nicht exportiert werden kann, was zum Sporulations- und Kompetenzdefekt in der RMA führt.

Die Phänotypen der RMA sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Aufgrund der beschriebenen Phänotypen eignet sich die RMA hervorragend als neues genetisches System, um *in vivo* Mechanismen der Qualitätskontrolle bei der Translokation heterologer Proteine zu untersuchen. Die RMA schliesst aufgrund des SecA Austausch ein heterologes Modellprotein (OmpA) selektiv vom Export aus, spiegelt somit die Situation in einem *B. subtilis* Wildtypstamm, welcher ein heterologes Protein nur sehr schlecht bzw. gar nicht transloziert, wieder. Mit dem kältesensitiven Wachstum und dem Sporulationsdefekt bietet die RMA einen geeigneten Selektionsansatz, um Mutanten zu isolieren, die eine herabgesetzte Qualitätskontrolle der Translokase aufweisen.

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Einen entscheidenden Engpass bei der Sekretion heterologer Protein kann die ineffiziente Translokation dieser Proteine über die bakterielle Cytoplasmamembran darstellen. Der Grund hierfür liegt in der Qualitätskontrolle der Sec-Translokase. Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Mechanismen, die der Qualitätskontrolle in Gram-positiven Bakterien zugrunde liegen, um die Proteintranslokation in diesen Bakterien zu optimieren.

Für die Untersuchungen sollten die Phänotypen der *B. subtilis* SecA-Austauschmutante (RMA) genutzt werden, um Suppressormutanten zu isolieren, die eine im Vergleich zur RMA herabgesetzte Qualitätskontrolle zeigen. Durch die Identifizierung der mutierten Gene könnten Komponenten identifiziert werden, welche in der RMA an der Qualitätskontrolle beteiligt sind. Anhand der Lage der Mutationen und einer detaillierten Charakterisierung der Phänotypen der Suppressormutanten sollten Aussagen gemacht werden, welchen Mechanismen die Qualitätskontrolle in der RMA zugrunde liegt.

Da die RMA ein artifizielles genetisches System darstellt, sollte im Weiteren untersucht werden, ob durch eine Übertragung der mutierten Gene aus den Suppressormutanten in den *B. subtilis* Wildtyphintergrund auch ein positiver Effekt auf die Proteintranslokation im *B. subtilis* Wildtyp erreicht werden kann. In dem besonderen Fall, dass sich die Mutationen im SecA von *S. carnosus* befinden, wäre zu untersuchen, ob sich die Mutationen auf die entsprechenden Positionen im SecA von *B. subtilis* übertragen lassen.

Das SecY Protein bildet einen Komplex mit SecA und dem Vorläuferprotein bei der Initiation der Translokation und ist in *E. coli* an der Qualitätskontrolle beteiligt. Daher sollte untersucht werden, ob auch das SecY Protein von *B. subtilis* an der Qualitätskontrolle beteiligt ist und

ob durch gezielte Veränderungen des SecY Proteins ein positiver Effekt auf die Proteintranslokation erreicht werden kann.

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide

TABELLE 2. In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz	
<i>Bacillus subtilis</i>	DB 104	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3</i>	Kawamura & Doi, 1984
	NIG1152	<i>met, his, div341^{ts}</i>	Takamatsu <i>et. al.</i> , 1992
	MKR 3.2.	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3, cat</i>	M. Klein, pers. Mitteilung
	MKR 5.3	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3, cat, ΔsecAB.s.:secAS.c.</i>	M. Klein, pers. Mitteilung
	RK 3	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3, cat, ΔsecAB.s.:secA198</i>	*
	RK 4	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3, cat, ΔsecAB.s.:secA665</i>	*
	RK 18	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3, cat, ΔsecAB.s.:secA474</i>	*
	RS 1	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3, cat, ΔsecAB.s.:secA470</i>	*
	RS 2	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3, cat, ΔsecAB.s.:secA734</i>	*
	RS 3	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3, cat, ΔsecAB.s.:secA493</i>	*
	RS 7	<i>his, nprR2, nprE18, ΔaprA3, cat, ΔsecAB.s.:secA537</i>	*
	168 pMUTIN4-secA	<i>trpC2, ery^R, pMUTIN4secA</i> integriert am <i>secA</i> Locus	R. Williams, pers. Mitteilung
	<i>Escherichia coli</i>	JM 109	<i>recA1, supE44, endA1 hsdR17, gyrA96, relA1, thi-1, Δ(lac-proAB) F⁺[traD36, proAB⁺, lacI^qZ, ΔM15]</i>
XL1-Blue		<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F⁺proAB, lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Stratagene

B. subtilis MKR 3.2. enthält stromaufwärts vom *secA*-Gen das Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (*cat*).

B. subtilis MKR 5.3. (*secA*-Austauschmutante) enthält anstelle des *B. subtilis secA*- Gens das *secA*-Gen aus *S. carnosus* chromosomal kodiert. Stromaufwärts vom *secA* ist das *cat* Gen inseriert.

B. subtilis 168 pMUTIN4-*secA* enthält das chromosomal kodierte *secA*-Gen unter der Kontrolle des P_{spac}-Promotors. Zusätzlich enthält dieser Stamm das Plasmid [pMAP65], welches das *lacI* Gen trägt, sowie einen Kanamycin Resistenzmarker.

Die mit einem Stern gekennzeichneten Stämme wurden in dieser Arbeit erhalten.

TABELLE 3. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
SecAS.c.NBamHI	CGGGATCCCAAAGGAGCGAACAGAA TGGG	Klonierung des <i>secA</i> Gens aus <i>S. carnosus</i>
SecAS.c.CSphI	ACATGCATGCATACAACCTTACTATTTA CCGCAGC	Klonierung des <i>secA</i> Gens aus <i>S. carnosus</i>
SecA464Q_for.	GTGTTAAATGCCAAAACCA AGA ACG TGAAGCGCAGATC	Austausch von His zu Gln an Aminosäureposition 464 im <i>B. subtilis</i> SecA
SecA464Q_rev.	GATCTGCGCTTCACGTTCTTGGTTTT TGCATTTAACAC	„
SecA468V_for.	CCATGAACGTGAAG TTC CAGATCATTG AAGAGGCCGGCC	Austausch von Ala zu Val an Aminosäureposition 468 im <i>B. subtilis</i> SecA
SecA468V_rev.	GGCCGGCCTCTTCAATGATCTG AACT TCACGTTTCATGG	„
SecA487V_for.	CGATTGCGACTAACATGG TTGGG GCG CGGAACGG	Austausch von Ala zu Val an Aminosäureposition 487 im <i>B. subtilis</i> SecA
SecA487V_rev.	CCGTTCCGCGCCCA ACC ATGTTAGT CGCAATCG	„
SecA531A_for.	CCGGACGTCAGGGAG CCCCGGG GA TTACTC	Austausch von Asp zu Ala an Aminosäureposition 531 im <i>B. subtilis</i> SecA
SecA531A_rev.	GAGTAATCCCCGGGG GCTCC CTGACG TCCGG	„
SecA729V_for.	GGATGGATCATATTG TTGCG ATGGAT CAGCTCCGCCAAGGG	Austausch von Asp zu Val an Aminosäureposition 729 im <i>B. subtilis</i> SecA
SecA729V_rev.	CCCTTGGCGGAGCTGATCCATCGCA ACA ATATGATCCATCC	„

Fortsetzung **TABELLE 3.** In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

SecAS.c.H1	IRD800-AACTGCAACGATGCCGAC	Sequenzierung des <i>secA</i> Gens von <i>S. carnosus</i>
SecAS.c.H2	IRD800-GTGCTGATAAAGCTGAACG	
SecAS.c.H3	IRD800-AATTCCAACGAACCGTCC	
SecAS.c.H4	IRD800-GACAAGGTGACCGCGGAG	
SecAS.c.H5	IRD800-AAGGTAAAGATCGTGAGG	
SecAS.c.R5	IRD800-CTGTTCAAGTTCAATCCG	
SecAB.s.H1	IRD800-GTACAGCTAAGACAGAGG	Sequenzierung des <i>secA</i> Gens von <i>B. subtilis</i>
SecAB.s.H2	IRD800-TTGACCGCTTCGGCATGG	
SecAB.s.H3	IRD800-AAGGGATTACCTTCGTGC	
SecAB.s.R1	IRD800-TTTCCTTCCATCGTGCGG	
SecAB.s.R2	IRD800-TTCAGTAAGCTGTACAGC	
SecAB.s.R3	IRD800-TTTCGTC ATGAAGCGCC	

Die unterstrichenen Nukleotide zeigen die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI bzw. *Sph*I an.

Die fett hervorgehobenen Nukleotide zeigen Veränderungen der Basensequenz im Vergleich zur *B. subtilis* Wildtyp *secA* Sequenz an.

Die *S. carnosus secA* Oligonukleotidsequenzen wurden anhand der *S. carnosus secA* Sequenz, die von Klein *et al.* (1995) veröffentlicht wurde bzw. in der EMBL Genbank unter der Nummer X79725 zugänglich ist, abgeleitet

Die *B. subtilis secA* Oligonukleotidsequenzen wurden anhand der *B. subtilis secA* Sequenz, die in der EMBL Genbank unter der Nummer D10279 zugänglich ist, abgeleitet.

S.c.: *S. carnosus*; B.s.: *B. subtilis*

TABELLE 4. In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Beschreibung	Referenz
pWH1520	amp <i>E. coli</i> tet <i>B. subtilis</i>	Shuttle Vector für <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i> , enthält den Xylose induzierbaren Promotor des <i>xylA</i> -Gens und das Repressorgen (<i>xylR</i>) des Xyloseoperons aus <i>Bacillus megaterium</i>	Rygus & Hillen, 1991
pWMKL1	„	pWH1520 mit <i>B.s.</i> Wildtyp <i>secA</i>	Klein, 1995
pWBSA464	„	pWMKL1, <i>B.s.</i> SecA H464Q	*
pWBSA468	„	pWMKL1, <i>B.s.</i> SecA A468V	*
pWBSA487	„	pWMKL1, <i>B.s.</i> SecA A487V	*
pWBSA531	„	pWMKL1, <i>B.s.</i> SecA D531V	*
pWBSA729	„	pWMKL1, <i>B.s.</i> SecA D729V	*
pWBSAA1	„	pWMKL1, <i>B.s.</i> SecA A468V und D531V	*

Fortsetzung **TABELLE 4.** In dieser Arbeit verwendete Plasmide

pWBSAA2	„	pWMKL1, <i>B.s.</i> SecA A468V und D729V	*
pWBSAA3	„	pWMKL1, <i>B.s.</i> SecA D531A und D729V	*
pWA11	„	pWH1520 mit <i>S. c.</i> Wildtyp <i>secA</i>	Klein, 1995
pWSCA474	„	pWA11, <i>S.c.</i> SecA A474V	*
pWSCA198	„	pWA11, <i>S.c.</i> SecA Y198H	*
pWSCA470	„	pWA11, <i>S.c.</i> SecA H470Q	*
pWSCA734	„	pWA11, <i>S.c.</i> SecA D734V	*
pWSCA493	„	pWA11, <i>S.c.</i> SecA A493V	*
pWSCA537	„	pWA11, <i>S.c.</i> SecA A140T und D537A	*
pWSCA537N	„	pWA11, <i>S.c.</i> SecA A140T	*
pWSCA537C	„	pWA11, <i>S.c.</i> SecA D537A	*
pWHS1	„	pWH1520 mit <i>B.s.</i> Wildtyp <i>secYEG</i>	S. Schnicke, pers. Mitteilung
pWHSM2	„	pWHS1, <i>B.s.</i> <i>secY(G399R)EG</i>	S. Schnicke, pers. Mitteilung
pWHSM3	„	pWHS1, <i>B.s.</i> <i>secY(L403R)EG</i>	S. Schnicke, pers. Mitteilung
pWHSM5	„	pWHS1, <i>B.s.</i> <i>secY(I404N)EG</i>	S. Schnicke, pers. Mitteilung
pMKL40	amp	pTRC99A mit <i>B. subtilis</i> Wildtyp <i>secA</i>	Klose <i>et al.</i> , (1993)
pJM20kan (pCU3ompAkan)	amp <i>E. coli</i> kan <i>B. subtilis</i>	Kan ^R -Derivat von pEF1 (Meens <i>et al.</i> , 1993) mit <i>E. coli ompA</i>	M. Klein, pers. Mitteilung
pCU3phoB	amp <i>E. coli</i> cm <i>B. subtilis</i>	pEF1 mit <i>B. subtilis</i> Wildtyp <i>phoB</i>	S. Schnicke, pers. Mitteilung
pCU3phoBL15Q	amp <i>E. coli</i> cm <i>B. subtilis</i>	pEF1 mit <i>B. subtilis phoB(Leu15Gln)</i>	S. Schnicke, pers. Mitteilung
pLipPS1kan	amp <i>E. coli</i> kan <i>B. subtilis</i>	Kan ^R -Derivat von pLipPS1(Liebl und Götz, 1986). Enthält das Gen kodierend für die preproLipase von <i>S. hyicus</i> .	M. Klein, pers. Mitteilung

Kan^R: Kanamycin-Resistenz
 S.c.: *S. carnosus*; B.s.: *B. subtilis*

2.2. Chemikalien und Enzyme

Analysenreine Chemikalien	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe Merck AG, Darmstadt Serva GmbH & Co.KG, Heidelberg Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Biochemikalien, Enzyme incl. Puffer	Roche, Mannheim New England Biolabs, Schwalbach
³⁵ S-L-Methionin	NEN DuPont (Deutschland), Bad Homburg
Fertigmedien, Medienkomponenten	Difco Laboratories, Detroit, USA
Nitrozellulosemembranen	Schleicher & Schüll, Dassel
Oligonukleotide	MWG

2.3. Medien und Lösungen

LB (Luria-Bertani) Medium (Miller, 1972):	pro l:	10	g	Trypton
		5	g	Hefeextrakt
		5	g	NaCl
				pH 7,0
Sporulationsmedium (Schaeffer <i>et al.</i> , 1965):	pro l:	8	g	Nutrient Broth
		1	g	KCl
		0,25	g	MgSO ₄ × 7 H ₂ O
				988 ml ddH ₂ O
getrennt autoklaviert und steril zugesetzt:		10	ml	100 mM Ca(NO ₃) ₂
		1	ml	10 mM MnCl ₂
		1	ml	1 mM FeSO ₄

PAB- Medium: entspricht Difco Antibiotic No. 3.
 PAB ist ein Fertigmedium und wurde wie vom Hersteller angegeben angesetzt und autoklaviert.

Zur Selektion auf Antibiotika-Resistenz des jeweiligen Stammes wurden den Medien Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin	für <i>E. coli</i>	100	µg/ml
Chloramphenicol	für <i>B. subtilis</i>	10	µg/ml
Erythromycin	für <i>B. subtilis</i>	0,3	µg/ml
Kanamycin	für <i>B. subtilis</i>	15	µg/ml
Tetrazyklin	für <i>B. subtilis</i>	10	µg/ml

Zur Herstellung fester Nährböden wurde den Medien 15 g/l Agar zugesetzt.

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

4 × SP-Medium:	pro l:	56 g	K ₂ HPO ₄
		24 g	KH ₂ PO ₄
		8 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
		4 g	Na ₃ Citrat × 7H ₂ O
		4 g	Hefeextrakt
		0,8 g	MgSO ₄ × 7H ₂ O
			pH 7,2
			autoklaviert

Anschließend wurden dem Medium 0,8 g/l Casaminoacids steril zugesetzt.

SPI-Medium:	pro l:	250 ml	4 × SP-Medium
		0,5 mM	CaCl ₂
		2,5 mM	MgCl ₂
		50 µg/ml	Tryptophan
		50 µg/ml	Histidin
		0,5 %	Glukose bzw. eine andere geeignete C-Quelle
			ad 1l Aqua bidest

Das fertige SPI-Medium wurde sterilfiltriert.

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

S7 Minimalmedium:	20 mM	K-Phosphat-Puffer pH 7,0
	20 mM	Na-Glutamat pH 7,0
	10 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	2 mM	MgCl ₂
	0,7 mM	CaCl ₂
	50 µM	MnCl ₂
	5 µM	FeCl ₃
	1 µM	ZnCl ₃
	2 µM	Thiamin
	0,4 µg/ml	Riboflavin
	28 µg/ml	Uridin
	1 %	Ribose

Sämtliche Aminosäuren außer Methionin wurden zu 1 mg/ml eingewogen und in 0,1 M HCl in Lösung gebracht. Dem S7 Medium wurden die Aminosäuren zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt.

Das fertige S7 Medium wurde sterilfiltriert.

Lösungen zur Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli* (variiert nach Hanahan, 1985)

RF1: pro l:	12 g	RbCl
	9,9 g	MnCl ₂
	1,5 g	CaCl ₂ × 2H ₂ O
	2,9 g	Kaliumacetat
	121 ml	Glyzerin (87 %)
		pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt
		sterilfiltriert

RF2: pro l:	2,1 g	MOPS
	1,2 g	RbCl
	11 g	CaCl ₂ × 2 H ₂ O
	121 ml	Glyzerin (87 %)
		pH 6,8
		sterilfiltriert

2.4. Mikrobiologische Methoden

2.4.1. Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung sämtlicher Bakterienstämme erfolgte, soweit nicht anders aufgeführt, in LB-Vollmedium. Die Inkubation der Stämme in Flüssigmedium erfolgte, soweit nicht anders aufgeführt, in einem Volumen von 5 ml in Reagenzgläsern bei 170 rpm. Die Kultivierung in Flüssigmedium ab einem Volumen von 10 ml erfolgte, soweit nicht anders aufgeführt, in Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler bei 130 rpm. Für die Kultivierung von *E. coli* Stämmen wurden Erlenmeyerkolben ohne Schikanen, für die Kultivierung von *B. subtilis* Stämmen Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet.

2.4.2. Stammhaltung

Die Stammhaltung sämtlicher Bakterienstämme erfolgte in Form von Glyzerinkulturen. 800 µl einer ÜNK des jeweiligen Stammes wurden mit 200 µl 87 % Glyzerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C bzw. -70 °C aufbewahrt. Die kurzfristige Haltung erfolgte auf LB-Agarplatten, entsprechend der Resistenz des Bakterienstammes mit Antibiotika supplementiert, bei 4 °C.

2.4.3. Transformation von Bakterien

2.4.3.1. Transformation von *E. coli* Stämmen (Hanahan, 1985)

Der jeweilige Stamm wurde in 100 ml LB-Medium, im Falle von nicht Temperatur sensitiven Stämmen bei 37 °C, im Falle von Temperatur sensitiven Stämmen bei der dem jeweiligen Stamm entsprechenden permissiven Temperatur, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen, 15 min auf Eis abgekühlt und 10 min mit 5.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 17 ml eiskaltem RF1-Puffer gewaschen und nach einem zweiten Zentrifugationsschritt (s. o.) vorsichtig in 4 ml RF2-Puffer resuspendiert. Die so behandelten Zellen wurden in 100 µl Aliquots in vorgekühlten 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Transformation wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, zu 10 - 100 ng Plasmid-DNA, bzw. zu maximal 15 µl eines Ligationsansatzes pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein

Hitzeschock für 90 sek bei 42 °C. Die Zellen wurden 1 min auf Eis abgekühlt, in 1 ml LB-Medium aufgenommen und zur Ausprägung der plasmidkodierte Antibiotika-Resistenz 1 h bei 37 °C und 170 rpm geschüttelt. Nach 10 min Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C wurde das Zellpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und $\frac{1}{10}$ bzw. $\frac{9}{10}$ des Volumens des Transformationsansatzes auf Selektionsagarplatten ausplattiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte über Nacht bei 37 °C, im Falle Temperatur sensibler Stämme bei der für den jeweiligen Stamm permissiven Temperatur.

2.4.3.2. Transformation von *B. subtilis* Stämmen (variiert nach Sadaie & Kada, 1983)

Sämtliche verwendeten Gefäße wurden vor Gebrauch mit Aqua bidest autoklaviert. In einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurden 5-10 ml SPI-Medium, falls notwendig mit entsprechenden Antibiotika und weiteren Supplementen versetzt, mit Zellen aus einer *B. subtilis* ÜNK, welche in PAB Medium angezogen wurde, zu einer OD₆₀₀ von 0,05 beimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C, im Falle des Stammes *B. subtilis* NIG1152 bei 30 °C, mit 160 rpm geschüttelt. Beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase wurden 1 ml der Zellsuspension in ein Reagenzglas übertragen, mit 5 µl EGTA (0,1 M) versetzt und kurz (1 bis 2 min) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde den Zellen je nach Stamm 1 µg bis 10 µg Plasmid-DNA zugesetzt und die Kultur eine Stunde bei 37 °C (30 °C beim Stamm NIG1152) mit 110 rpm geschüttelt. Zur Ausprägung der plasmidkodierte Antibiotika-Resistenz wurden 3 ml LB-Medium zum Transformationsansatz zugegeben und die Stämme eine Stunde bei 37 °C mit 170 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend in 15 ml Falcon Gefäßen 10 min mit 5.000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5810R), in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf Selektionsagarplatten ausplattiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C, im Falle des Stammes *B. subtilis* NIG1152 bei 30 °C, über Nacht.

2.4.4. *B. subtilis* Sporulationstest

Sämtliche verwendeten Gefäße wurden vor Gebrauch mit Aqua bidest autoklaviert. 2 ml einer *B. subtilis* ÜNK wurden im Eppendorf-Reaktionsgefäß 10 min mit 13.000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert, mit 2 ml Sporulationsmedium gewaschen und anschließend in 1 ml Sporulationsmedium resuspendiert. 5 ml Sporulationsmedium wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit der gewaschenen *B. subtilis* Kultur 1:100 beimpft und bei 37 °C mindestens 24 h bei 160 rpm geschüttelt. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl der Kultur wurden geeignete Verdünnungen ($1:10^4$ bis $1:10^6$) in einem Gesamtvolumen von 1 ml hergestellt, je 100 µl auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung der Sporenanzahl in den Kulturen wurden 100 µl der Zellsuspension im 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 100 µl Chloroform versetzt (Eppendorf-Gefäße mit Parafilm sichern!) und im Wasserbad bei 80 °C 30 min erhitzt. Dabei werden die vegetativen Zellen abgetötet. Anschließend wurden 10 µl der oberen wässrigen Phase, welche die Sporen

enthält, entnommen und mehrere geeignete Verdünnungen angesetzt. Für gut sporulierende Stämme (*B. subtilis* DB 104 oder MKR 3.2.) wurden Verdünnungen von $1:10^4$ bis $1:10^6$ in einem Gesamtvolumen von 1 ml hergestellt. Für schlecht sporulierende Stämme (z.B. *B. subtilis* SecA-Austauschmutante) wurden Verdünnungen von 1:10 bis $1:10^4$ in einem Gesamtvolumen von 1 ml hergestellt. Je 100 μ l der Verdünnungen wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die angewachsenen Kolonien wurden ausgezählt und die Anzahl der Zellen bzw. der Sporen pro ml errechnet. Die Sporulationsfrequenz entspricht dem prozentualen Anteil der Sporen an der Gesamtzellzahl.

2.5. Gentechnische Methoden

2.5.1. Allgemeine gentechnische Methoden

Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989)

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe im elektrischen Feld wurden 0,8 %ige Agarosegele, für Fragmente bis 1,5 kb 2 %ige Agarosegele, angefertigt. Hierzu wurde Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf 50 °C-60 °C auf Gelträger gegossen. DNA-Proben wurden mit $\frac{1}{10}$ Volumen $10 \times$ Probenpuffer versetzt und die Elektrophorese in TAE-Puffer je nach Gelgröße bei 60 – 100 mA durchgeführt. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die DNA-Banden 5 min in einer 1 %igen Ethidiumbromidlösung gefärbt und nach 5 min Entfärbung in ddH₂O unter UV-Licht im Image-Master (Pharmacia-Biotech) sichtbar gemacht.

10 \times TAE-Puffer:	pro l:	48,4 g	Tris
		11,42 ml	Essigsäure (96 %)
		7,44 g	EDTA/Na ₂

10 \times Probenpuffer:	0,05 %	Bromphenolblau
	0,05 %	Xylencyanol
	50 %	Glyzerin

Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung von DNA erfolgte mit Restriktionsenzymen und Puffern nach Angaben des Enzymherstellers. Restriktionsansätze wurden mindestens zwei Stunden oder über Nacht bei der für das jeweilige Enzym erforderlichen Temperatur inkubiert.

Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Um die Religation linearisierter Vektoren zu vermeiden, wurden vor dem Ansetzen der Ligation 5'-Phosphatreste des Vektors mit alkalischer Phosphatase entfernt. Die alkalische Phosphatase (shrimp alkaline phosphatase) wurde dabei nach Angaben des Herstellers verwendet.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und Entsalzung von DNA-Lösungen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und die Entsalzung von DNA-Lösungen wurde das Qiaquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA erfolgte stets mit entsalzten DNA Fragmenten bzw. mit DNA Fragmenten, welche im Agarosegel aufgetrennt und anschliessend aus dem Gel eluiert wurden. Im Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von maximal 15 µl wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 eingestellt. Die Ligation erfolgte in Gegenwart von $\frac{1}{10}$ Volumen 10 × Ligationspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,6; 100 mM MgCl₂; 100 mM DTT; 6 mM ATP) und 1,0 Einheiten T4 DNA-Ligase bei 16 °C über Nacht.

Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte im T3 Thermocycler von Biometra. Der Reaktionsansatz (50 µl bzw. 100 µl Gesamtvolumen) enthielt $\frac{1}{10}$ Volumen 10 × PCR-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,3; 15 mM MgCl₂; 500 mM KCl; 1 mg/ml Gelatine; vom Enzymhersteller mitgeliefert), $\frac{1}{10}$ Volumen Nukleotidmix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 2 mM), 0,1 nMol des jeweiligen Primers, 2 mM MgCl₂, entweder 200 ng-300 ng chromosomaler DNA als Template oder 5 ng-10 ng Plasmid-DNA als Template, 2,5 Einheiten Taq DNA-Polymerase (Sigma).

Der PCR- Zyklus erfolgte nach folgendem Profil:

- erste Denaturierung der DNA für 4 min bei 95 °C
- pro Zyklus:
- Denaturierung der DNA für 1 min bei 95 °C
 - Anlagerung der Primer für 1 min bei 50 °C-55 °C
 - DNA- Synthese für 2 min/1000 bp bei 72 °C bzw. 68 °C (je nach Angabe des Enzymherstellers)
 - 35 Reaktionszyklen wurden durchgeführt

Nach Beenden der Amplifikation wurde die DNA mit dem Qiaquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) aufgereinigt. Um die Fehlerrate, welche durch die Amplifikation von DNA mit der Taq-Polymerase auftreten kann, herabzusetzen, wurde zur besonders genauen Amplifikation von DNA das Advantage-HF2 PCR-Kit von Clontech nach Angaben des Herstellers verwendet. In diesem System wird ein Polymerase-Mix aus der Taq DNA-Polymerase und einer „proofreading“ Polymerase verwendet. Diese Polymerase besitzt 3'-5'-Exonukleaseaktivität und entfernt falsch gepaarte Basen, wodurch eine etwa 29 -fach höhere Genauigkeit der DNA-Amplifikation gegenüber der gewöhnlichen Taq-Polymerase erreicht wird.

Zur Bestimmung von DNA Konzentrationen wurden 1-5 µl eines PCR Ansatzes, bzw. eines linearisierten DNA Fragmentes über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Färbung

der DNA wurde die Bandenintensität der zu überprüfenden DNA mit der Intensität der Banden eines DNA Längenstandards, dessen Konzentrationen bekannt sind, verglichen. Alternativ wurde die DNA Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt. Hierbei entspricht ein Extinktionswert von 1 einer DNA Konzentration von 50 µg/ml.

Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid DNA

Zur ortsgerechten Mutagenese von Plasmid DNA wurde das QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass das Gen, in welches eine Mutation eingefügt werden soll, auf einem Plasmid vorliegt, welches in einer PCR Reaktion vollständig amplifiziert wird. Als Primer für die PCR Reaktion werden Oligonukleotide verwendet, die exakt komplementär zueinander sind und den gewünschten Nukleotidaustausch enthalten. Nach erfolgter Amplifikation wird die ursprünglich eingesetzte Plasmid DNA, welche noch Methylgruppen trägt, spezifisch durch *DpnI* verdaut. Im Reaktionsansatz verbleibt somit die neu synthetisierte, nicht methylierte DNA, welche die gewünschte Mutation trägt. Ein Aliquot der DNA wird für die Transformation von *E. coli* XL1-Blue superkompetenten Zellen (vom Hersteller mitgeliefert) eingesetzt. Die PCR Reaktion wurde wie vom Hersteller angegeben angesetzt, wobei als Matrize ca. 50 ng Plasmid DNA, welche aus *E. coli* mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) präpariert wurde, eingesetzt wurde. Die anschließende Durchführung der PCR Reaktion, sowie der *DpnI* Verdau der Plasmid DNA und die Transformation von *E. coli* XL1-Blue superkompetenten Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Durch Sequenzierung unter Verwendung geeigneter Primer wurde überprüft, ob die gewünschte Mutation in das Gen eingefügt wurde.

Nichtradioaktive Sequenzierung von DNA

Die nichtradioaktive Sequenzierung von DNA erfolgte prinzipiell nach der Didesoxymethode, welche auf einer Amplifizierung einer Matrizen-DNA, sowie dem Kettenabbruch durch Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTPs) beruht. Die PCR Reaktion wurde unter Verwendung von Reagenzien des „Thermo Sequenase labeled primer cycle sequencing kit“ (Amersham Pharmacia Biotech, England) durchgeführt. Die für die PCR eingesetzten Oligonukleotide, enthielten am 5'-Ende eine Fluoreszenzmarkierung (IRD800-Markierung). Als Matrizenstrang wurde entweder Plasmid DNA, welche mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) aus *E. coli* oder *B. subtilis* präpariert wurde, oder ein DNA Fragment, welches nach einer erfolgten PCR, sowie der Aufreinigung mit dem Qiaquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) erhalten wurde, eingesetzt. Pro Ansatz wurden ca. 1,5 – 2 µg Plasmid DNA oder 0,3 - 0,5 µg des zu sequenzierenden PCR Produktes verwendet. Die PCR Reaktion erfolgte nach folgendem Protokoll:

- | | | | | |
|----|--------|----|-----|---------------------------------|
| 1. | 95 °C, | 3 | min | |
| 2. | 95 °C, | 15 | sek | |
| 3. | 50 °C, | 30 | sek | |
| 4. | 70 °C, | 40 | sek | zurück zu Schritt 2., 29 Zyklen |
| 5. | 95 °C, | 20 | sek | |
| 6. | 70 °C, | 30 | sek | zurück zu Schritt 5., 14 Zyklen |

Sequenziergel (4,6 %):	4,6 ml	Acrylamid (Long Ranger)
	21 g	Harnstoff
	5 ml	10 × TBE Puffer
	32 ml	Aqua bidest.
	500 µl	DMSO
	50 µl	TEMED
	350 µl	10 % APS

10 × TBE-Puffer:	162 g	Tris
	27,5 g	Borsäure
	9,3 g	EDTA
		ad 1 l Aqua bidest

Nach erfolgter PCR wurde den Proben 3 µl Stop Puffer (vom Hersteller mitgeliefert) zugesetzt und die Proben 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung der DNA Fragmente erfolgte in einem 4,6 %igen, 66 cm langen und 0,25 mm dicken „Long-Ranger“ Polyacrylamidgel in 1 × TBE Laufpuffer. Je 1,5 µl Probe wurde auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese im DNA Sequenziergerät (Licor) der Firma MWG-Biotech bei folgenden Einstellungen durchgeführt: 2200 V; 37 mA; 50 W; 45 °C. Die fluoreszenzmarkierten DNA-Banden wurden mit der Software „Base ImageIR“ digitalisiert sichtbar gemacht und ausgewertet.

2.5.2. Präparation von DNA

2.5.2.1. Präparation chromosomaler DNA von *E. coli* und *B. subtilis*

Verwendete Puffer:

Puffer G3: pro l:	18,61 g	Na ₂ -EDTA × 2H ₂ O
	6,1 g	Tris
	50 ml	10 % Tween 20
	50 ml	10 % TritonX-100
		pH 8,0

Puffer G4: pro l:	286,6 g	GuHCl
	200 ml	10 % Tween 20

Vor Gebrauch wurde dem Puffer G3 RNaseA (Endkonzentration 200 µg/ml) zugefügt. Aus einer ÜNK wurden 100 ml LB-Medium mit 5 ml des entsprechenden Stammes angeimpft und 4-5 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden 10 min bei 8.000 rpm (JA 14-Rotor, Beckmann Zentrifuge, 4 °C) abzentrifugiert und das Pellet in 4 ml Puffer G3 resuspendiert. Es wurden 100 µl Proteinase K (20 mg/ml) und zum enzymatischen Aufschluß von *B. subtilis* Zellen 80 µl Lysozym (100 mg/ml) zugefügt und der Ansatz 40 min bei 37 °C inkubiert. 1,2 ml Puffer G4 wurden zugefügt und der Ansatz gründlich gemischt. Die weitere Präparation der chromosomalen DNA erfolgte mit dem Nucleobond-Kit (Macherey und Nagel) mit Puffern und nach Angaben des Herstellers. Zur Präparation chromosomaler DNA in kleinem

Maßstab (aus 2 ml Kultur) wurde das DNeasy Tissue Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.5.2.2. Präparation von Plasmid-DNA

verwendete Lösungen und Puffer:

Lösung A:	50	mM	Glukose
	10	mM	EDTA
	25	mM	Tris/HCl pH 8
Lösung B:	1	%	SDS
	0,2	M	NaOH
Lösung C:	3	M	Kaliumacetat pH 4,8
TE-Puffer:	10	mM	Tris/HCl pH 8
	1	mM	EDTA

Plasmidpräparation in kleinem Maßstab aus *E. coli* (Birnboim & Doly, 1979) und *B. subtilis*

Die Zellen aus 2 ml einer ÜNK wurden 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge, 4 °C) und in 100 µl Lösung A resuspendiert. Zur Plasmidpräparation aus *B. subtilis* wurde der Lösung A 5 µg/ml Lysozym zugegeben und die Zellen zum Verdau der Zellwand 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung B wurden die Zellen 5 min bei RT lysiert und durch Zugabe von 150 µl kalter Lösung C wurden Proteine und chromosomale DNA 5 min auf Eis gefällt. Das Lysat wurde 15 min zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge, 4 °C, 13.000 rpm) und der plasmidhaltige Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Falls der Überstand noch verunreinigt war, wurde ein zweiter Zentrifugationsschritt angeschlossen. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 1 ml Ethanol (100 %) gefällt, mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 50 µl TE-Puffer gelöst. Als schnellere Variante und im besonderen zur Plasmidisolierung aus *B. subtilis* wurde das Qiaprep Spin Minipräp Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet.

Plasmidisolierung aus *E. coli* und *B. subtilis* im großen Maßstab

Zur Isolierung von Plasmiden im größeren Maßstab aus 50-200 ml Bakterienkultur wurde das Nucleobond-Kit (Macherey und Nagel) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Zellen aus einer ÜNK wurden 10 min bei 8.000 rpm abzentrifugiert (JA 14 Rotor, Beckmann Zentrifuge, 4 °C), in S1-Puffer (Macherey und Nagel) resuspendiert und in JA 20 Zentrifugenbecher überführt. Zur Isolierung von Plasmiden aus *B. subtilis* wurde die Zellwand nach Resuspendierung in S 1 Puffer 30-60 min in Gegenwart von 5 mg/ml Lysozym bei 37 °C verdaut. Nach Zugabe von Puffer S2 und S3 (Macherey und Nagel) wurden nicht lösliche Bestandteile 2 × 30 min bei 15.000 rpm abzentrifugiert (JA 20 Rotor,

Beckmann Zentrifuge, 4 °C). Die weitere Aufreinigung der Plasmid DNA erfolgte über DNA Aufreinigungssäulen AX-500 (Macherey und Nagel) nach Angaben des Herstellers.

2.5.2.3. Fällung von Plasmid DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Fällung von DNA in 70 % Ethanol, 300 mM Kaliumacetat pH 4,8 bei -20 °C für 60 min. Die Lösung wurde 15 min bei 13.000 Upm (Eppendorf Zentrifuge, 4 °C) zentrifugiert, das Pellet mit 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 20 – 50 µl TE Puffer aufgenommen.

2.6. Proteinchemische Methoden

2.6.1. Induktion der Genexpression

Zellen aus 2 ml einer ÜNK wurden 10 min bei 13.000 rpm (Eppendorf Zentrifuge, RT) abzentrifugiert, zweimal mit 1 ml LB-Medium gewaschen und in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Mit der gewaschenen Kultur wurden 5 ml LB-Medium (mit den experimentell erforderlichen Antibiotika bzw. weiteren Supplementen versetzt) zu einer OD₆₀₀ von 0,4 angeimpf. Zur gerichteten Induktion der Expression von Genen, welche unter der Kontrolle regulierbarer Promotoren stand, wurde den Kulturen der geeignete Induktor in der experimentell erforderlichen Konzentration zugesetzt. Die Kulturen wurden 4 h bei der experimentell erforderlichen Temperatur inkubiert.

2.6.2. Isolierung von Proteinen aus Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen von *E. coli* und *B. subtilis*

Herstellung von Gesamtzellextrakten von *E. coli*

2 ml der wie unter 2.6.1. behandelten Kultur wurden 20 min bei 13.000 rpm (Eppendorf Zentrifuge, 4 °C) abzentrifugiert, das Pellet in 100 µl 1 × Laemmli Puffer (5 ml Tris-HCl pH 6,5, 2 g SDS, 11,4 ml Glycerin 87 %, 1,6 g DTT, 0,25 % Bromphenolblau, ad 50 ml Aqua bidest) aufgenommen und die Proben 10 min bei 95 °C aufgeköcht.

Herstellung von Gesamtzellextrakten von *B. subtilis*

2 ml der wie unter 2.6.1. behandelten Kultur wurden 20 min bei 13.000 rpm (Eppendorf Zentrifuge, 4 °C) abzentrifugiert, das Pellet in 50 µl Lysisbuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 25 mM MgCl₂; 200 mM NaCl; 5 mg/ml Lysozym) resuspendiert und der Ansatz 30 min bei 37 °C inkubiert. Es wurden 50 µl 2 × Laemmli Puffer (5 ml Tris-HCl pH 6,5, 2 g SDS, 11,4 ml Glycerin 87 %, 1,6 g DTT, 0,25 % Bromphenolblau, ad 50 ml Aqua bidest) zugegeben und die Proben 10 min bei 95 °C aufgeköcht.

Aufarbeitung von Kulturüberständen von *E. coli* bzw. *B. subtilis*

Die Zellen aus 2 ml der wie unter 2.6.1. behandelten Kultur wurden 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge, 4 °C) die Proteine aus 1,5 ml des Überstandes mit 500 µl TCA (40 %) über Nacht bei 4 °C gefällt. Die Proteine wurden 30 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge, 4 °C) und das Pellet zweimal mit 1 ml Azeton (80 %) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, in 50 µl 1 × Laemmli-Puffer aufgenommen und die Proteine bei 95 °C für 10 min aufgekocht.

2.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli *et al.*, 1970)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Für große Gele (20 x 20 cm) wurde die Elektrophoreseapparatur der Firma Renner verwendet. Für kleine Gele (9 x 9 cm) wurde die Apparatur der Firma Biometra verwendet. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels lag entsprechend der experimentellen Anforderung bei 10 % bzw. 12,5 %. Das Trenngel wurde mit einem 5 %igen Sammelgel überschichtet.

TABELLE 5. Zusammensetzung der Lösungen für SDS-Polyacrylamidgele

	Trenngel 12,5 % [für 30 ml]	Trenngel 10 % [für 30 ml]	Sammelgel 5 % [für 15 ml]
Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)	12,5 ml	10 ml	2,5 ml
ddH ₂ O	6,2 ml	8,7 ml	8,45 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	7,5 ml	7,5 ml	-
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	3,75 ml
10 % SDS	0,3 ml	0,3 ml	0,15 ml
87 % Glycerin	3,2 ml	3,2 ml	-
10 % APS	0,3 ml	0,3 ml	0,15 ml
TEMED	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml

Um vergleichbare Proteinmenge auf das Gel aufzutragen, wurden die Probenvolumina anhand der OD₆₀₀ der Ausgangskulturen normiert. Die aufzutragenden Probenvolumina wurden folgendermaßen berechnet:

$$\text{OD}_{600} \text{ der Ausgangskultur} \times \text{Volumen der entnommenen Kultur [ml]} \div \text{Endvolumen der Probe [\mu l]} = X$$

$$\text{Ziel OD}_{600} \times X = Y \text{ [\mu l] aufzutragendes Probenvolumen}$$

Als Proteinstandard wurde der "Broad Range" Protein Marker 8S (New England Biolabs) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer (pro l: 6,08 g Tris; 28,86 g Glycin; 10 ml SDS 10 %) über Nacht bei 10 mA pro Gel.

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

Um Proteine mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen, wurden die zu untersuchenden Proteinproben im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Für große Acrylamidgele (20 x 20 cm) wurde die Blot-Apparatur von Pharmacia/LKB verwendet, für kleine Acrylamidgele (9 x 9 cm) wurde die Blot Apparatur der Firma Biorad verwendet. Der Aufbau erfolgte nach Angaben der Hersteller. Sämtliche verwendeten Filterpapiere (Whatmann 3MM) sowie die Nitrozellulosemembran wurden vor Gebrauch kurz im Transferpuffer (pro l: 3 g Tris; 14,4 g Glycin; wurde mit der Apparatur von Pharmacia/LKB geblottet, enthielt der Transferpuffer zusätzlich 10 % Methanol) getränkt. Das Acrylamidgel wurde ebenfalls 10 min in Transferpuffer equilibriert. Die Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte bei der Blot Apparatur von Pharmacia/LKB für 1,5 h bei 0,8 mA/cm² Gel, bei der Blot Apparatur der Firma Biorad für 10 min bei 150 mA, anschließend für 30 min bei 350 mA. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen 30 min bei 37 °C in TBST-Puffer/BSA (pro l: 2,42 g Tris; 8 g NaCl; 3,8 ml 1 M HCl; 1 ml Tween 20; 3 g BSA) geschwenkt. Die Membran wurde zweimal mit TBST-Puffer ohne BSA gewaschen und anschließend 1 h mit dem primären, gegen das Zielprotein gerichteten Antikörper, welcher 1:1000 in TBST-Puffer verdünnt wurde, geschwenkt. Zum Entfernen überschüssiger Antikörper wurde die Membran dreimal für 15 min mit TBST Puffer gewaschen. Der Nachweis des primären Antikörpers (aus Kaninchen) erfolgte durch Bindung eines gegen Kaninchen Immunglobulin G gerichteten sekundären Antikörpers, der an ein Phosphatase-Konjugat gekoppelt ist. Der sekundäre Antikörper wurde 1:6.000 in TBST-Puffer verdünnt und die Membran 1 h bei 37 °C in der Lösung inkubiert. Durch erneutes Waschen (s.o.) wurde der überschüssige sekundäre Antikörper entfernt. Anschließend wurde die Membran in Entwicklungspuffer (100 mM Tris/HCL pH 9,0; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂) 10 min equilibriert und zum Starten der Farbreaktion mit 10 ml Entwicklungslösung (10 ml Entwicklungspuffer, 66 µl NBT [50 mg/ml in 70 % Formamid], 66 µl BCIP [25 mg/ml]) überschichtet. Sobald die Proteinbanden ausreichend sichtbar waren, wurde die Reaktion durch Waschen der Membran mit Wasser gestoppt.

Als sensitivere Methode zum Nachweis der Proteine wurde das „ECL Western Blotting Analysis System“ der Firma Amersham Biosciences verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Der primäre Antikörper wurde 1:1.000 in TBST Puffer verdünnt eingesetzt. Der zweite Antikörper wurde 1:10.000 in TBST Puffer verdünnt eingesetzt. Der zweite Antikörper liegt als Konjugat mit einer Peroxidase vor. Nach Starten der Chemilumineszenzreaktion wurde die Membran zur Detektion der Banden für 5 bis 20 min im „Luminiscent Image Analyzer“ (Fuji) exponiert.

2.6.5. Analyse des *in vivo* Proteinexports im Pulse-Chase Experiment mit *B. subtilis* (variiert nach van Dijl, 1991)

a) Radioaktive Markierung der Proteine von *B. subtilis* mit ³⁵S L-Methionin

Zur radioaktiven Markierung von Proteinen aus *B. subtilis* wurde eine ÜNK des jeweiligen Stammes in S7-Medium, unter Zusatz erforderlicher Antibiotika, 50 µg/ml Methionin sowie 1 % Ribose als einziger C- Quelle, angesetzt. 5 ml S7-Medium, mit erforderlichen Antibiotika, 50 µg/ml Methionin sowie 1 % Ribose versetzt, wurden mit der ÜNK zu einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 170 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 geschüttelt. Damit für den eigentlichen Markierungsvorgang die Zelldichte aller Kulturen identisch ist, wurde den Ansätzen ein Volumen entnommen, welches, umgerechnet auf 2,5 ml Medium einer OD₆₀₀ von 0,7 entsprach. Die Zellen wurden in 50 ml Falcon Gefäßen 5 min bei 5.000 rpm und 25 °C (Eppendorf Zentrifuge 5810R) zentrifugiert, zweimal mit 5 ml auf 37 °C vorgewärmten S7-Medium ohne Methionin gewaschen und dann in 2,5 ml S7-Medium ohne Methionin resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend bei experimentell erforderlicher Temperatur (37 °C bzw. 25 °C) und 180 rpm ausgehungert. Zur Untersuchung des OmpA Exports bei 37 °C wurden die Kulturen 45 min ausgehungert und die OmpA Expression vom Plasmid [pCU3ompAkan] 10 min vor der Markierung mit 1 mM IPTG induziert. Zur Untersuchung des OmpA Exports bei 25 °C wurden die Kulturen 35 min ausgehungert und die OmpA Expression 20 min vor der Markierung mit 1 mM IPTG induziert. Zur Untersuchung des Exports der preproLipase, exprimiert von Plasmid [pLipPS1kan], wurden die Kulturen, unabhängig von der experimentell erforderlichen Temperatur, 45 min ausgehungert. Bei einer Versuchstemperatur von 37 °C erfolgte die radioaktive Markierung der Zellen für 1 min mit 100 µCi ³⁵S-Methionin. Bei einer Versuchstemperatur von 25 °C erfolgte die radioaktive Markierung für 1 min mit 150 µCi ³⁵S-Methionin. Um den Einbau des radioaktiv markierten Methionins abzustoppen, wurden 100 µl Chase-Lösung (45 mg/ml nicht radioaktives Methionin, 2,5 mg/ml Puromycin) zugesetzt und zu verschiedenen Zeitpunkten 600 µl Proben entnommen, die sofort in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen mit 150 µl eiskalter TCA (40 %) gemischt wurden. Die Proteine wurden über Nacht bei 4 °C gefällt.

b) Aufarbeitung der Proben

Die Proben wurden 20 min bei 13.000 rpm (Eppendorf Zentrifuge, RT) abzentrifugiert und das Pellet, welches die Zellen, sowie die aus dem Überstand gefällten Proteine enthielt, dreimal mit 500 µl Azeton (80 %) gewaschen. Hierzu wurden die Proben ca. 20 min auf einem Schüttler geschüttelt. Im Falle, dass sich das Pellet nicht gelöst hat, wurde das Pellet mit einer Pipette resuspendiert. Anschließend wurde das Pellet in einer Vakuumzentrifuge 10 min getrocknet und in 100 µl Lysispuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 25 mM MgCl₂; 200 mM NaCl; 5 mg/ml Lysozym) sorgfältig resuspendiert und die Zellwand 30 min bei 37 °C verdaut. Um die Zellen zu lysieren, wurden 10 µl 10 %ige SDS Lösung zugegeben und der Ansatz kurz mit der Pipette gemischt, so dass die Probe klar wurde. Anschließend wurden die Proben 2 min bei 95 °C auf einem Schüttelinkubator erhitzt. Dem Ansatz wurde 1 ml IP-

Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,92 % TritonX-100; 5 mM EDTA) zugegeben, unlösliche Bestandteile durch 20 min Zentrifugation (13.000 rpm, RT) abgetrennt und 1 ml Überstand zur Immunfällung in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 10 µl Antikörper gegen das Zielprotein wurde das Protein 1 h bei 30 °C unter leichtem Schwenken an den Antikörper gebunden. Zur Fällung des Komplexes aus Protein und Antikörper wurden 100 µl Pansorbinzellen (10 %, fixierte *Staphylococcus aureus* Zellen mit exponiertem Protein A; Calbiochem) zugefügt und der Ansatz 30 min bei 30 °C leicht geschwenkt. Anschließend wurden die Pansorbinzellen 3 min bei 11.000 rpm (Eppendorf Zentrifuge, RT) abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet vollständig in Waschlösung 1 (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 M NaCl; 1 % Triton X-100) resuspendiert. Der Vorgang wurde je einmal für Waschlösung 2 (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,5 M LiCl; 0,1 % SDS) und Waschlösung 3 (50 mM Tris/ HCl pH 7,5) wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 50 µl 2 × Laemmli-Probenpuffer resuspendiert und die Proben 10 min bei 95 °C denaturiert. Zur Bestimmung der in den jeweiligen Proben enthaltene Radioaktivität wurden 5 µl der Proben entnommen, in einem Kunststoff-Szintillationsgefäß mit 5 ml Szintillations-Flüssigkeit (Ultima Gold XR, Packard Bioscience) vermischt und die Radioaktivität ausgezählt. Die Probenvolumina wurden auf einen Wert von 8.000 bis max. 16.000 cpm (counts per minute) normiert, auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 2.6.3.)

c) Gelaufarbeitung

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine zunächst 30 min mit 45 % Isopropanol, 10 % Essigsäure im Gel fixiert und das Gel anschließend 30 min mit Enhance (Dupont) unter leichtem Schwenken imprägniert. Das Gel wurde dreimal 20 min mit Wasser gewaschen und dann in einer Vakuum-Trockenapparatur 1 h bei 80 °C auf Filterpapier getrocknet. Der Nachweis der radioaktiv markierten Banden erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms für 3 bis 7 Tage bei -70°C und nachfolgender Entwicklung. Zusätzlich wurde durch Auflegen eines „Screens“ (Fuji BAS-MP Imaging Plate) für 5 bis 24 h und Einlesen der Fotoplatte im Fuji BAS 1800 Bio Image Analysers das markierte Proteinmuster digitalisiert. Die radioaktiv markierten Banden wurden mit der Software AIDA 2.41 quantitativ ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung und Charakterisierung von Suppressormutanten der *B. subtilis* SecA-Austauschmutante (RMA)

Die Qualitätskontrolle der Translokase ist für die Zelle ein notwendiger Überprüfungsmechanismus, um bezüglich des eigenen Proteinbestandes nur die Proteine in den Exportweg einzuschleusen, die für den Export aus dem Cytosol bestimmt sind. Für die sekretorische Gewinnung heterologer Proteine mit Gram-positiven Bakterien kann diese Qualitätskontrolle jedoch einen wesentlichen limitierenden Schritt darstellen. Der Grund hierfür ist die Ausbildung eines nicht funktionellen Translokations-Initiationskomplexes aus dem SecA und dem SecY des Wirtsbakteriums sowie dem heterologen Protein an der Cytoplasmamembran. Demzufolge wird ein Fremdprotein häufig nicht als Exportprotein erkannt und verbleibt im Cytosol. Die molekularen Mechanismen, welche im Detail entscheidend dafür sind, ob und mit welcher Effizienz ein heterologes Protein als Exportsubstrat akzeptiert wird, sind erst in Ansätzen verstanden. Die *B. subtilis* SecA-Austauschmutante (RMA) stellt aufgrund ihrer Phänotypen ein geeignetes neues genetisches System dar, um *in vivo* Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten der Translokase und dem Vorläuferprotein, die für die Qualitätskontrolle bei der Initiation der Translokation entscheidend sind, zu untersuchen. Diese Phänotypen sind

- ein Wachstumsdefekt aufgrund pleiotroper Exportdefekte bei 25 °C
- ein selektiver Ausschluß des heterologen OmpA Proteins von *E. coli* selbst bei der permissiven Temperatur (37 °C)
- ein Sporulationsdefekt, sowie ein Defekt bei der Ausbildung natürlicher Kompetenz bei 37 °C.

Diese Phänotypen sind höchst wahrscheinlich auf die Ausbildung eines nicht funktionellen Translokations-Initiationskomplexes aus dem *S. carnosus* SecA, dem *B. subtilis* SecY und dem heterologen OmpA bzw. mindestens einem für das Wachstum und die Sporulation essentiellen Proteins zurückzuführen.

3.1.1. Zusammenfassung der Charakterisierung bisher isolierter Suppressormutanten der RMA

In einem ersten Ansatz wurden Suppressormutanten der RMA, die wieder bei 25 °C wachsen konnten, selektioniert (Köberling, 2000). Drei Mutanten, die aus unabhängigen Ansätzen stammten (Suppressoren des kältesensitiven Wachstums RK 3, RK 4 und RK 18) wurden detailliert bezüglich des Wachstums bei 25 °C, des Exports der preproLipase aus

S. hyicus und des OmpA Proteins aus *E. coli*, sowie der Sporulationsfähigkeit und der Kompetenz charakterisiert. Die Suppression des Wachstumsdefektes der RMA bei 25 °C war in diesen Mutanten auch von einer partiellen Suppression des Exportdefektes der preproLipase bei 25 °C und sogar von einer partiellen Suppression des OmpA Exportdefektes bei 37 °C begleitet. Zudem war auch die Sporulationsfähigkeit und die Kompetenz der Suppressormutanten im Vergleich zur RMA verbessert. Diese Ergebnisse deuteten auf eine im Vergleich zur RMA wieder herabgesetzte Qualitätskontrolle der Translokase der Suppressormutanten hin. Die Mutationen, welche für den supprimierenden Phänotyp verantwortlich sind, waren bislang nicht bekannt. Die Tatsache, dass die jeweiligen Defekte der RMA von den verschiedenen Mutanten unterschiedlich stark supprimiert wurden, deutete aber darauf hin, dass die Suppressormutanten unterschiedliche Mutationen enthalten. Diese könnten entweder in verschiedenen Genen liegen oder innerhalb eines Gens an unterschiedlichen Positionen.

Diese Arbeit stellt eine Fortführung der bisherigen Arbeiten dar. Dazu wurde in einem neuen Selektionsansatz der Sporulationsdefekt der RMA ausgenutzt, um Suppressormutanten in diesem Fall auf verbesserte Sporulationsfähigkeit zu selektionieren. Durch die Variation des Selektionsdrucks sollten weitere Klassen supprimierender Mutationen erhalten werden.

3.1.2. Selektion von Suppressormutanten der RMA auf verbesserte Sporulationsfähigkeit

Die Isolierung von spontanen Suppressormutanten der RMA, die besser sporulieren können, wurde in vier unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Die RMA wurde hierzu 24 Stunden bei 37 °C in Sporulationsmedium geschüttelt. Sporen wurden isoliert, indem 200 µl des jeweiligen Ansatzes entnommen wurden und die vegetativen Zellen in dieser Probe durch Erhitzen in Gegenwart von 200 µl Chloroform abgetötet wurden (vgl. Material und Methoden 2.4.4.). Dieser erste Selektionsschritt basierte somit darauf, Klone zu isolieren, welche in der Lage sind zu sporulieren. Je 100 µl der so behandelten Kulturen wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert und zum Auskeimen der Sporen 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Je nach Ansatz wurden 10 bis 220 Kolonien erhalten (Tab. 6). Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass ein geringer Anteil der Zellen der RMA Sporen bilden konnte, ohne eine supprimierende Mutation zu enthalten. Um die Kolonien zu isolieren, welche aufgrund einer Mutation aus dem ersten Selektionsschritt hervorgingen, wurden parallel je 100 µl der mit Chloroform behandelten Kulturen der RMA auf LB Agarplatten ausplattiert und 48 Stunden bei 25 °C inkubiert. In diesem Ansatz wurden die Zellen somit auf verbesserte Sporulationsfähigkeit selektioniert und anschließend die Klone isoliert, welche bei 25 °C, der für die RMA nicht permissiven Temperatur, wachsen konnten. Aus diesen Ansätzen wurden

insgesamt sieben Klone erhalten. Diese Suppressoren des Sporulationsdefektes der RMA wurden mit *B. subtilis* RS 1- 7 bezeichnet und für weitere Untersuchungen verwendet.

TABELLE 6. Selektion von Suppressormutanten der RMA auf verbesserte Sporulationsfähigkeit

<i>B. subtilis</i> Stamm	Gesamtzellzahl pro 100 µl Kultur (Wachstum bei 37 °C)	Sporen pro 100 µl Kultur (Wachstum bei 37 °C)	Sporen pro 100 µl Kultur (Wachstum bei 25 °C)
MKR 3.2.	$5,3 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$
RMA Ansatz 1	$7,2 \times 10^7$	220	1
Ansatz 2	$4,9 \times 10^7$	160	1
Ansatz 3	$3,6 \times 10^7$	10	1
Ansatz 4	$4,4 \times 10^7$	60	4

Klone, welche für weitere Untersuchungen verwendet wurden, sind fett gedruckt

3.1.3. Die Suppressormutanten der RMA zeigen eine verbesserte Sporulationsfähigkeit

Um zu testen, ob die erhaltenen Suppressormutanten eine reproduzierbar verbesserte Sporulationsfähigkeit zeigen, wurde die Sporulationsfrequenz der Suppressormutanten im Vergleich zur RMA untersucht. Hierzu wurden mit *B. subtilis* MKR 3.2., der RMA und je einer Suppressormutante aus einem der vier Ansätze ein Sporulationstest durchgeführt. Die Ergebnisse des Sporulationstests sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

TABELLE 7. Sporulation von *B. subtilis* MKR 3.2., der RMA und ausgewählten Suppressormutanten

Stamm	Lebendzellzahl [ml^{-1}]	Sporenanzahl [ml^{-1}]	Sporulationsfrequenz [%]
MKR 3.2.	$6,1 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	49,7
RMA	$2,8 \times 10^8$	$3,0 \times 10^3$	0,001
RS 1	$4,1 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	39,0
RS 2	$2,3 \times 10^8$	$3,2 \times 10^7$	13,6
RS 3	$5,0 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$	4,9
RS 5	$1,9 \times 10^8$	$4,2 \times 10^6$	2,2

Während vom *B. subtilis* MKR 3.2. annähernd 50 % der Zellen Sporen bildeten, konnten nur 0,001 % der Zellen der RMA sporulieren. Im Gegensatz zur RMA zeigten alle getesteten Suppressormutanten mit 2,2 % bis 39 % eine wieder deutlich erhöhte Sporulationsfrequenz.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Suppressormutanten den Sporulationsdefekt der RMA, welcher durch den SecA Austausch verursacht wurde, aufgrund stabiler Mutationen partiell supprimierten. Die bessere Sporulationsfähigkeit deutete auf einen im Vergleich zur RMA wieder verbesserten Export von sporulationsspezifischen Proteinen hin.

3.1.4. Die Suppressormutanten der RMA haben Veränderungen im secA Gen von *S. carnosus*

Zur Bestimmung der Mutationsorte der Suppressormutanten wurden die drei Suppressormutanten, welche auf kälteresistentes Wachstum selektioniert wurden (RK 3, RK 4 und RK 18), sowie die sieben auf verbesserte Sporulation selektionierten Mutanten herangezogen. Die auf kälteresistentes Wachstum selektionierten Mutanten zeigten einen pleiotrop verbesserten Proteinexport. Die Suppression des Sporulationsdefektes der neu isolierten Mutanten deutete auf einen verbesserten Export sporulationsspezifischer Proteine hin. Da für die Initiation der Translokation im Besonderen die Wechselwirkungen zwischen SecA, SecY und dem Vorläuferprotein funktionell sein müssen, lag die Vermutung nahe, dass die supprimierenden Mutationen der zehn Suppressormutanten im *secA* Gen von *S. carnosus* oder im *secY* Gen von *B. subtilis* lokalisiert sind.

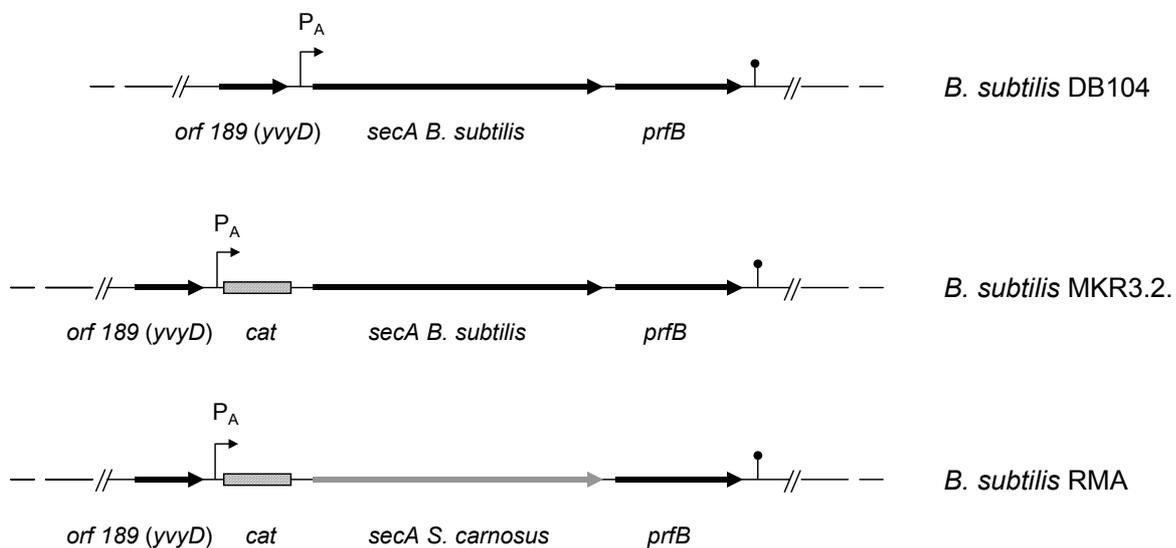


ABBILDUNG 5. Chromosomale Organisation des *secA* Genlocus von *B. subtilis* DB 104, *B. subtilis* MKR 3.2. und der RMA. *cat*: Gen, welches für die Chloramphenicol-Acetyltransferase kodiert. *orf 189 (yvyD)*: Gen mit unbekannter Funktion; *prfB*: Gen, welches für den „protein release factor 2“ kodiert. P_A: vegetativer σ^A abhängiger Promotor; Haarnadelsymbol: möglicher rho-unabhängiger Terminator

Ein erster genetischer Ansatz ermöglichte die Unterscheidung, ob sich die supprimierenden Mutationen im *secA* Gen von *S. carnosus* oder in einem anderen Gen von *B. subtilis* befinden. Zur Veranschaulichung der Vorgehensweise werden zunächst die wesentlichen Merkmale der chromosomalen *secA* Genloci der verwendeten *B. subtilis* Stämme beschrieben (Abb. 5).

Die Transkription des *secA* Gens im Stamm *B. subtilis* DB104, welcher als Ausgangsstamm für die Konstruktion der RMA verwendet wurde, erfolgt ausgehend von einem σ^A abhängigen Promotor P_A , welcher unmittelbar stromaufwärts vom *secA* Gen liegt (Herbort *et al.*, 1999). Zur Konstruktion der RMA wurde das *B. subtilis* *secA* Gen gegen ein DNA Fragment bestehend aus dem *cat* Gen, welches für die Chloramphenicol Acetyltransferase kodiert, und dem *secA* Gen von *S. carnosus* ausgetauscht. Die Transkription vom *S. carnosus* *secA* erfolgt weiterhin vom *B. subtilis* P_A Promotor, der nun vor dem *cat* Gen liegt. Der Stamm *B. subtilis* MKR 3.2. ist der zur RMA isogene Vergleichsstamm, welcher das *cat* Gen stromaufwärts vom *B. subtilis* *secA* Gen enthält.

Der Parentalstamm DB104 wurde mit chromosomaler DNA von *B. subtilis* MKR 3.2., der RMA und der zehn Suppressormutanten transformiert und Chloramphenicol resistente Klone selektioniert. *B. subtilis* verfügt über ein effizientes DNA Aufnahmesystem, sowie die Fähigkeit, DNA durch Rekombination in das Chromosom zu integrieren. Daher wurde erwartet, dass die Chloramphenicol resistenten Klone mit einem DNA Fragment, welches das *cat* Gen zusammen mit dem jeweiligen *secA* Gen (dem *B. subtilis* *secA* von MKR 3.2. bzw. dem *S. carnosus* *secA* Gen der RMA bzw. der Suppressormutanten) enthält, cotransformiert wurde. Nach der DNA Aufnahme sollte das *cat* Gen mit dem jeweiligen *secA* Gen des Donorstammes durch ein doppeltes Rekombinationsereignis in das Chromosom des Rezipientenstammes an den Ort des *B. subtilis* *secA* Gens integriert worden sein. Falls sich die supprimierende Mutation nicht im *S. carnosus* *secA* Gen befindet, würde das *S. carnosus* Wildtyp *secA* in das Chromosom integriert worden sein. Dementsprechend wäre der genetische Zustand der RMA hergestellt und es wäre zu erwarten, dass die Transformanten kältesensitives Wachstum zeigen. Sollte sich allerdings die supprimierende Mutation im *S. carnosus* *secA* Gen befinden, die in den Suppressormutanten zu kälteresistenten Wachstum führt, wäre zu erwarten, dass die Transformanten weiter bei 25 °C wachsen können.

Pro Transformationsansatz wurden etwa 1000 Chloramphenicol resistente Transformanten pro μg chromosomaler DNA des Donorstammes erhalten. Je 25 Transformanten aus jedem Ansatz wurden auf kältesensitives Wachstum getestet. Während die Klone, welche mit der DNA aus dem Stamm MKR 3.2. transformiert wurden, bei 25 °C erwartungsgemäß wachsen konnten, zeigten alle Transformanten nach Einbringen der DNA aus der RMA wie erwartet kein Wachstum bei 25 °C. Der vollständige Austausch des *secA* Gens des Rezipientenstammes gegen das *secA* Gen des Donorstammes wurde mittels PCR unter Verwendung von Primern, welche spezifisch für das *S. carnosus* *secA* bzw. das *B. subtilis*

secA waren, in einer Doppelbestimmung verifiziert. Abbildung 6 zeigt, dass nach Transformation mit chromosomaler DNA aus *B. subtilis* MKR 3.2. nur eine Bande mit den Primern, welche spezifisch für das *B. subtilis secA* waren, erhalten wurde (Spuren 1 und 2). Nach Transformation mit der DNA aus der RMA wurde dagegen ausschließlich ein Signal mit Primern, welche spezifisch für das *S. carnosus secA* waren, erhalten (Spuren 3 und 4).

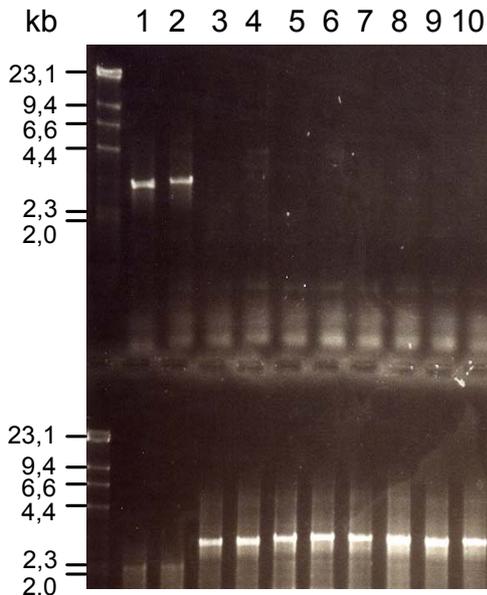


ABBILDUNG 6. Nachweis der *secA* Gene von *B. subtilis* und *S. carnosus* mittels PCR. Nach Transformation von *B. subtilis* DB 104 mit chromosomaler DNA von *B. subtilis* MKR 3.2. (Spuren 1 und 2), der RMA (Spuren 3 und 4) und den Suppressormutanten RS 1 (Spuren 5 und 6), RS 3 (Spuren 7 und 8) und RS 7 (Spuren 9 und 10) wurde die chromosomale DNA Chloramphenicol resistenter Transformanten isoliert und als Matrize für die PCR eingesetzt. Der vollständige Austausch des *secA* Gens des Rezipientenstammes (DB 104) gegen die verschiedenen *secA* Gene der Donorstämme wurde durch Verwendung von spezifischen Primern gegen das *B. subtilis secA* (obere Reihe) bzw. *S. carnosus secA* (untere Reihe) überprüft.

Überraschenderweise konnten alle getesteten Klone nach Transformation mit der DNA aus den Suppressormutanten 1-10 weiterhin bei 25 °C wachsen. Die Überprüfung des *secA* Austausches mittels PCR ergab, dass auch in diesen Stämmen das *B. subtilis secA* Gen des Rezipientenstammes vollständig gegen das jeweilige *S. carnosus secA* Gen der Suppressormutanten ausgetauscht wurde. Abbildung 6 zeigt das Ergebnis der PCR, welches mit den Stämmen RS 1 (Spuren 5 und 6), RS 3 (Spuren 7 und 8) und RS 7 (Spuren 9 und 10) erhalten wurde. Die Wachstumsexperimente, sowie die Untersuchungen auf DNA Ebene deuteten somit stark darauf hin, dass die supprimierenden Mutationen von allen 10 Suppressormutanten im *secA* Gen von *S. carnosus* lokalisiert sind.

3.1.5. Identifizierung der Mutationsorte in den *secA* Genen der Suppressormutanten

Um die genauen Mutationsorte zu identifizieren, wurden die *secA* Gene der 10 Suppressormutanten zunächst mittels PCR unter Verwendung chromosomaler DNA als Matrize vollständig amplifiziert. Hierfür wurden die Primer SecAS.c.NS*phI* und SecAS.c.C*BamHI* verwendet. Die Amplifizierung erfolgte mit dem PCR High Fidelity System

(Boehringer), um eine hohe Genauigkeit bei der Amplifikation zu erreichen. Die erhaltenen 2,56 kb *secA* PCR Produkte wurden anschließend direkt sequenziert.

Die Sequenzierung zeigte, dass die *secA* Gene von neun der zehn Mutanten tatsächlich jeweils einen einzelnen Nukleotidaustausch enthielten, der zu einem Aminosäureaustausch führte. In einer Mutante (RS 7) wurden zwei Nukleotidaustausche identifiziert, die zu zwei Veränderungen auf Aminosäureebene führten. Vier Mutanten (RK 18, RS 4, RS 5 und RS 6) zeigten identische Nukleotidaustausche. Von diesen vier identischen Mutanten wurde eine bei der Selektion auf kälteresistentes Wachstum erhalten (RK 18), während die anderen drei aus der Selektion auf bessere Sporulation hervorgingen (RS 4, RS 5 und RS 6). Die unterschiedlichen Mutationen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

TABELLE 8. Mutationen in den *S. carnosus secA* Genen der Suppressormutanten der RMA

Suppressormutante	<i>S. carnosus secA</i> Allel	Nukleotidaustausch ¹	Aminosäureaustausch
RK 3	<i>secASc198</i>	T 592 C	Tyr 198 His
RK 4	<i>secASc665</i>	T 1994 A	Val 665 Glu
RK 18 RS 4, RS 5, RS 6 ²	<i>secASc474</i>	C 1421 T	Ala 474 Val
RS 1	<i>secASc470</i>	T 1410 A	His 470 Gln
RS 2	<i>secASc734</i>	A 2210 T	Asp 734 Val
RS 3	<i>secASc493</i>	C 1478 T	Ala 493 Val
RS 7	<i>secASc537</i>	G 418 A A 1610 C	Ala 140 Thr Asp 537 Ala

¹Die Nummerierung der Nukleotidaustausche bezieht sich auf das A im ATG des Startkodons von *secA*, welches als Position +1 festgelegt wurde. Die Nummerierung erfolgte entsprechend der *S. carnosus secA* Sequenz, die von Klein *et al.* (1995) veröffentlicht wurde.

² Mutanten mit identischen Nukleotidaustauschen

3.1.6. Vergleich der SecA Proteine von *E. coli*, *S. carnosus* und *B. subtilis*

Die meisten Erkenntnisse zur Funktion des SecA Proteins stammen aus Untersuchungen des SecA Proteins von *E. coli*. Dementsprechend wurde auch die Lage funktionell unterschiedlicher Bereiche, wie z. B. die ATP Bindestelle (NBS 1) oder die beiden intramolekularen Regulatoren der ATP Hydrolyse (IRA 1 und IRA 2), welche für die

Von Sianidis *et al.* (2001) wurden durch Vergleich verschiedener SecA Proteine insgesamt 13 konservierte SecA Familienmotive (siehe Abb. 7, eingerahmte Bereiche) definiert. Das IRA 1 Element umfasst in *E. coli* die Aminosäuren 767 bis 818 innerhalb der C-terminalen 34 kDa Domäne und stellt ein konserviertes Motiv in verschiedenen SecA Proteinen dar (SecA Familienmotiv XIII). Daher wurde dieser Bereich als funktionelle Einheit angesehen (Karamanou *et al.*, 1999). Das IRA 2 Element wurde in *E. coli* als Bereich, bestehend aus zwei konservierten Motiven, definiert (Familienmotive X und XI). IRA 2 erstreckt sich von Aminosäureposition 462 bis 610 in der N-terminalen 68 kDa ATPase Domäne (Sianidis *et al.*, 2001).

Für *S. carnosus* bzw. *B. subtilis* gibt es bisher keine experimentellen Daten, die Rückschlüsse darauf zulassen, welche Bereiche innerhalb der SecA Proteine an der Regulation der ATP Hydrolyse beteiligt sind. Das Alignment der SecA Proteine von *E. coli*, *S. carnosus* und *B. subtilis* zeigt jedoch, dass auf Aminosäureebene die Bereiche von IRA 1 und IRA 2 im *E. coli* SecA Protein eine hohe Ähnlichkeit zu den entsprechenden Sequenzen in den SecA Proteinen von *S. carnosus* und *B. subtilis* aufweisen. Der Anteil der identischen und sehr ähnlichen Aminosäuren zwischen den IRA 1 Elementen vom *E. coli* SecA und dem *S. carnosus* SecA beträgt 71,2 %, zwischen den IRA 1 Elementen vom *E. coli* SecA und dem *B. subtilis* SecA 78,9 %. Im *S. carnosus* SecA erstreckt sich der IRA 1 Bereich von Aminosäureposition 721 bis 772 und im *B. subtilis* SecA von Position 716 bis 767. Das Alignment der IRA 2 Bereiche zeigt eine Lücke von 29 Aminosäuren im *S. carnosus* SecA und im *B. subtilis* SecA im Vergleich zum *E. coli* SecA. Der Anteil der identischen und sehr ähnlichen Aminosäuren beträgt zwischen den IRA 2 Elementen vom *E. coli* SecA und *S. carnosus* SecA 77,5 %, zwischen dem *E. coli* SecA und dem *B. subtilis* SecA 78,3 %. Der IRA 2 Bereich reicht im *S. carnosus* SecA entsprechend des Alignments von Aminosäureposition 448 bis 567, der IRA 2 im *B. subtilis* SecA erstreckt sich von Position 442 bis 561.

Die hohe Ähnlichkeit auf Aminosäureebene lässt auf einen konservierten Mechanismus der Regulation der ATPase Aktivität in diesen Bakterien schließen. Im Weiteren werden daher die Bereiche im SecA von *S. carnosus* und *B. subtilis*, die den Bereichen von IRA 1 und IRA 2 im *E. coli* SecA entsprechen, ebenfalls als IRA 1 und IRA 2 Element bezeichnet.

3.1.7. Die supprimierenden Mutationen treten in drei unterschiedlichen Bereichen des *S. carnosus* SecA Proteins auf

Anhand der Definition der Lage der IRA Elemente, sowie der NBS 1 können die Positionen der supprimierenden Mutationen im *S. carnosus* SecA beschrieben werden. Abbildung 8 zeigt schematisch die Lage der sieben verschiedenen supprimierenden Mutationen im SecA Protein von *S. carnosus*. Die Mutationen wurden aufgrund der Positionen in funktionell unterschiedlichen Bereichen des SecA Proteins in drei Klassen unterteilt.

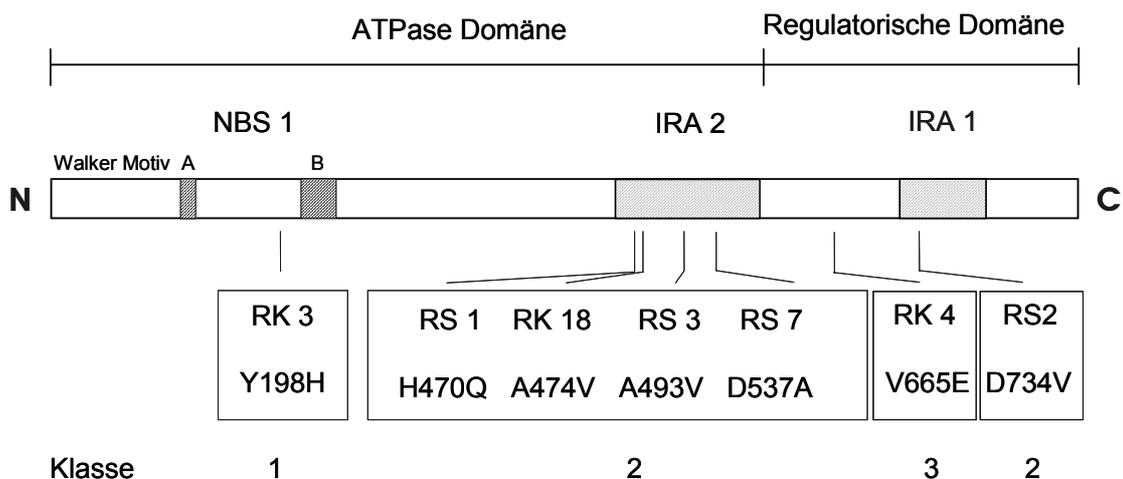


ABBILDUNG 8. Positionen der supprimierenden Mutationen im *S. carnosus* SecA. Die Klassifizierung der Mutationen erfolgte anhand der Positionen in funktionell unterschiedlichen Bereichen des SecA Proteins. Die Mutationen im IRA 1 und IRA 2 wurden aufgrund der gleichen Funktion dieser Elemente bei der Regulation der ATPase Aktivität zu Mutationen der Klasse 2 zusammengefasst. Die Suppressormutante RS 7 hat eine Doppelmutation. Der Austausch A140T ist nicht dargestellt, da der Austausch D537A alleine für den supprimierenden Phänotyp verantwortlich ist (vgl. Abschnitt 3.2.7.). N: N-Terminus; C: C-Terminus

Der Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Histidin an Position 198 in der Mutante RK 3 liegt in unmittelbarer Nähe des Walker-Motivs B der NBS 1. Diese Mutation wird im Weiteren als Mutation der Klasse 1 bezeichnet. Vier Mutationen verändern Aminosäuren im IRA 2 Element (H470Q, A474V, A493V und D537A), eine Mutation (D734V) verändert eine Aminosäure im IRA 1 Element. Aufgrund der gemeinsamen Funktion der IRA Elemente bei der Regulation der ATP Hydrolyse, wurden diese Mutationen zu den Mutationen der Klasse 2 zusammengefasst. Der Austausch V665E liegt im Bereich zwischen IRA 1 und IRA 2, dem bislang keine Funktion zugeordnet werden konnte. Diese Mutation wird im weiteren als Mutation der Klasse 3 bezeichnet.

3.1.8. Ein Vergleich der Mutationen im *S. carnosus* SecA mit bekannten Mutationen im *E. coli* SecA

Das Auftreten der SecA Mutationen in funktionell unterschiedlichen Bereichen des *S. carnosus* SecA Proteins lässt vermuten, dass die Suppression auf unterschiedlichen Mechanismen beruht. Ein Vergleich der identifizierten Mutationen mit bekannten Mutationen im SecA Protein von *E. coli* könnte einen Hinweis darauf liefern, welche Eigenschaften des SecA Proteins von *S. carnosus* durch die unterschiedlichen Mutationen verändert wurden, die zur Suppression führen.

Als hilfreich erwiesen sich Untersuchungen der *E. coli* SecY Mutante *secY205*. In dieser Mutante ist die Membraninsertion von SecA in Abhängigkeit von ATP und dem Vorläuferprotein beeinträchtigt, was zu Wachstums- und Translokationsdefekten bei niedriger Temperatur führt (Taura *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 1997). Die Isolierung von Mutanten, welche diese Phänotypen supprimierten, führte zur Identifizierung von Mutationen im SecA von *E. coli* (Abb. 7, blau unterlegte Aminosäuren). Eine Klasse von Mutationen trat vorwiegend im IRA 2 Element des SecA Proteins von *E. coli* auf. Durch diese Mutationen wurden neben dem Exportdefekt der Ausgangsmutante *secY205* auch die Exportdefekte, welche durch andere *sec* Mutationen verursacht wurden, supprimiert. Diese SecA Proteine zeigten im Vergleich zum Wildtyp SecA eine erhöhte basale ATPase Aktivität („superaktives“ SecA). Daher wurde angenommen, dass die SecA ATPase im Wildtyp SecA durch das partiell defekte SecY nur schlecht aktiviert wurde und der schlechte Aktivierungsschritt durch ein bereits aktiviertes SecA Protein umgangen wurde (Matsumoto *et al.*, 2000; Nakatogawa *et al.*, 2000) (vgl. Einleitung Kapitel 1.3.). Das Alignment der SecA Proteine von *S. carnosus* und *E. coli* zeigte, dass die Positionen der vier isolierten Mutationen im IRA 2 Element des *S. carnosus* SecA mit den Positionen der IRA 2 Mutationen im *E. coli* SecA überraschenderweise exakt übereinstimmen. Diese Beobachtung deutet stark darauf hin, dass, obwohl die supprimierenden Mutationen in zwei völlig unterschiedlichen Selektionsansätzen isoliert wurden, die Mechanismen der Suppression durch die IRA 2 Mutationen im *S. carnosus* und im *E. coli* SecA identisch sind. Demzufolge ist es sehr wahrscheinlich, dass die IRA 2 Mutationen die basale ATPase Aktivität auch im *S. carnosus* SecA Protein erhöhen, wodurch die Suppression in den Suppressormutanten der RMA bewirkt wird. Dies deutet darauf hin, dass in der RMA die Aktivierung der SecA ATPase ein besonders kritischer Schritt bei der Initiation der Translokation ist, der durch IRA 2 Mutationen umgangen wird. Ein Alignment der IRA 2 Bereiche von SecA Proteinen verschiedener Bakterienarten ergab, dass die Aminosäuren, welche durch die Mutationen verändert wurden, hoch konserviert sind (nicht gezeigt). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Aminosäurereste in den SecA Proteinen vieler Bakterien, unter anderem auch in *B. subtilis*, eine wichtige Funktion bei der Regulation der ATPase Aktivität haben.

Die drei anderen Mutationen im *S. carnosus* SecA entsprechen keiner bekannten Mutation im SecA von *E. coli*. Bei der Isolierung von Suppressormutanten der *secY205* Mutante wurde aber eine weitere Gruppe von Mutationen im SecA beschrieben, die vorwiegend im Bereich der Walker Motive A und B der NBS 1 lokalisiert waren. Diese supprimierten allelspezifisch die Defekte der Ausgangsmutante *secY205*. Es wurde daher angenommen, dass durch diese Mutationen spezifische SecA-SecY Wechselwirkungen verändert wurden und der Bereich der NBS 1 möglicherweise eine Kontaktstelle von SecA mit SecY darstellt. Da die isolierte Mutation der Klasse 1 in der Nähe des Walker Motivs B der NBS 1 vom *S. carnosus* SecA lokalisiert ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Suppression durch die Mutation der Klasse 1, analog zu den Mutationen an der NBS 1 im *E. coli* SecA, über optimierte Wechselwirkungen zwischen dem *S. carnosus* SecA und dem *B. subtilis* SecY erfolgt.

Im C-terminalen Bereich von SecA wurden bei der Selektion von Suppressormutanten der *E. coli* Mutante *secY205* keine Mutationen identifiziert. Es ist aber bekannt, dass eine Mutation im IRA 1 Element vom *E. coli* SecA, analog zu den IRA 2 Mutationen, eine Erhöhung der basalen ATPase Aktivität zur Folge hatte (Baud *et al.*, 2002). Es ist daher vorstellbar, dass die Suppression durch die Mutation im IRA 1 Element, analog zu den IRA 2 Mutationen, dadurch erfolgt, dass der kritische Aktivierungsschritt der *S. carnosus* SecA ATPase im Komplex mit dem *B. subtilis* SecY und dem Vorläuferprotein umgangen wird.

Im Bereich zwischen den beiden IRA Elementen, der die Mutation der Klasse drei enthält, wurden bislang keine Mutationen identifiziert. Es wäre denkbar, dass auch durch diese Mutation die Aktivität der SecA ATPase erhöht wird, möglicherweise aber über einen neuen, IRA unabhängigen Mechanismus.

Interessanterweise wurden bei der Selektion von Suppressormutanten der RMA auch im C-terminalen Bereich von SecA Mutationen identifiziert. In diesem Bereich wurden bislang in keinem anderen beschriebenen Selektionssystem Mutationen erhalten. Dies zeigt, dass die RMA ein geeignetes neues System darstellt, um neue Eigenschaften auch des C-terminalen Bereiches bei der SecA Funktion zu analysieren.

3.2. Die Charakterisierung der Suppressormutanten der RMA

Die supprimierenden Mutationen führten zu Aminosäureaustauschen, die in drei funktionell unterschiedlichen Bereichen des *S. carnosus* SecA Proteins auftreten. Mechanistisch erklärt sich die Suppression sehr wahrscheinlich dadurch, dass die basale ATPase Aktivität vom *S. carnosus* SecA erhöht wurde und/oder Wechselwirkungen zwischen dem *S. carnosus* SecA und dem *B. subtilis* SecY optimiert wurden. Um im Weiteren die Spezifität der Suppression durch die verschiedenen SecA Mutationen zu untersuchen, wurden die Suppressormutanten detailliert in Bezug auf das Wachstum, den Export der preproLipase

von *S. hyicus* und des OmpA Proteins von *E. coli*, sowie auf die Sporulationsfähigkeit und die Fähigkeit, natürliche Kompetenz auszubilden, charakterisiert.

3.2.1. Die supprimierenden Mutationen im *S. carnosus* SecA führen zu einem vollständig wiederhergestellten Wachstum bei 25 °C

Die Wachstumseigenschaften der Suppressormutanten wurden in Flüssigkultur bei 25 °C und 37 °C (Abb. 9 A) und auf Festmedium bei 25 °C, 37 °C und 42 °C untersucht (Abb. 9 B).

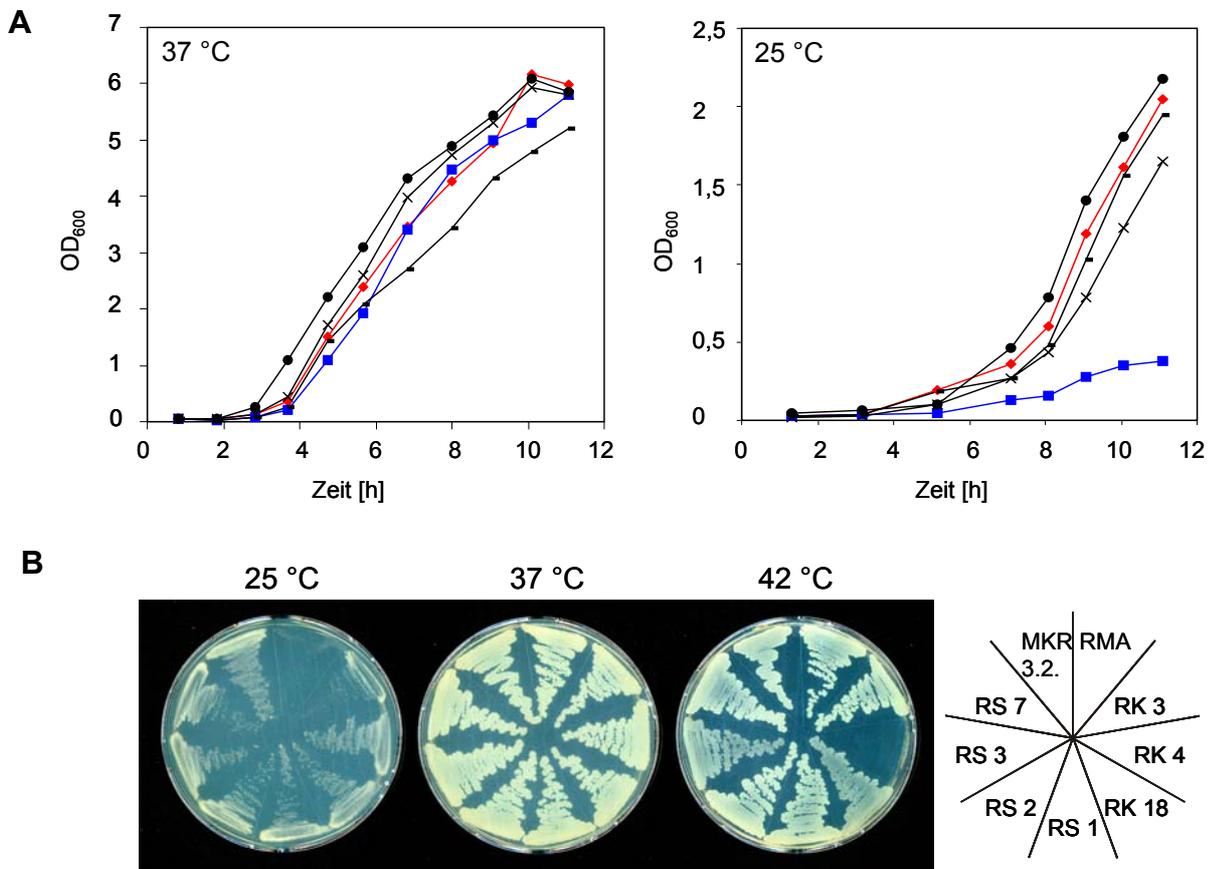


ABBILDUNG 9. Suppression des kältesensitiven Wachstums der RMA. Wachstum von *B. subtilis* MKR 3.2., der RMA und der Suppressormutanten in Flüssigmedium bei 25 °C und 37 °C (A) und auf Agarplatten bei 25 °C, 37 °C und 42 °C (B). WT (♦); RMA (■); RK 3 (×); RS 1 (●); RS 3 (-);

Bei der permissiven Temperatur (37 °C) zeigte die RMA sowohl auf Festmedium als auch in Flüssigkultur ein mit dem Kontrollstamm MKR 3.2. vergleichbares Wachstum. Dies verdeutlicht, dass das SecA von *S. carnosus* das *B. subtilis* SecA funktionell ersetzen kann, d. h. die notwendigen Wechselwirkungen mit SecY und allen essentiellen Vorläuferproteinen

bei der Initiation der Translokation ausbilden kann. Bei 25 °C war das Wachstum der RMA in Flüssigmedium stark beeinträchtigt. Auf Agarplatten bildete der Stamm keine Kolonien. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei niedriger Temperatur die Wechselwirkungen zwischen dem *S. carnosus* SecA, dem *B. subtilis* SecY und zumindest einem essentiellen Vorläuferprotein extrem verschlechtert werden, was zu einem deutlich beeinträchtigten Export dieses Proteins/dieser Proteine führt. In Abbildung 9 A ist exemplarisch das Wachstum der Suppressormutanten RS 3, RS 1 und RK 3 dargestellt. Die Wachstumskurven zeigen, dass die Suppressormutanten in Flüssigkultur wieder vergleichbar mit dem Stamm MKR 3.2. wachsen konnten. Auf Festmedium konnten bei 25 °C sechs Mutanten ebenfalls wie der Stamm MKR 3.2. wachsen, die Mutante RK 3 bildete etwas kleinere Kolonien. Das wiederhergestellte Wachstum bei 25 °C deutet nun stark darauf hin, dass der SecA Aktivierungsschritt, welcher in der RMA bei der Initiation der Translokation beeinträchtigt war, durch die Mutationen im SecA der Suppressormutanten optimiert wurde, so dass die Translokation aller essentiellen Proteine wieder ermöglicht wurde. Das schlechtere Wachstum der Mutante RK 3 deutet auf einen im Vergleich zu den anderen Mutanten schlechteren Export der essentiellen Proteine hin.

Interessanterweise zeigte die Untersuchung des Wachstums bei 42 °C, dass die Mutante RK 4 bei hohen Temperaturen keine Kolonien auf Agarplatten bilden konnte, während alle anderen Stämme unter diesen Bedingungen wachsen konnten. Hohe Temperaturen führen demnach bei dem SecA Protein dieser Mutante zu einem Verlust der Funktionalität, was darauf hindeutet, dass das SecA Protein der Mutante RK 4 durch die Mutation destabilisiert oder deaktiviert wird.

3.2.2. Der kältesensitive Proteinexport wird durch die Mutationen *im S. carnosus* SecA supprimiert

Die RMA zeigt neben dem kältesensitiven Export eines oder mehrerer essentieller Proteine auch einen kältesensitiven Export der Lipase aus *S. hyicus*. Das wiederhergestellte Wachstum der Suppressormutanten bei 25 °C deutet auf einen im Vergleich zur RMA wieder verbesserten Export der essentiellen homologen Proteine bei niedrigen Temperaturen hin. Um diese Vermutung auf der Ebene des Proteinexports zu unterstützen, wurde der Export der Lipase im *B. subtilis* MKR 3.2., der RMA, sowie in den Suppressormutanten RK 3, RS 1 und RS 3 untersucht.

Die Lipase kann als ein Vertreter eines typischen Exportproteins in Gram-positiven Bakterien angesehen werden. Die Signalsequenz (preSequenz) ist mit 38 Aminosäuren deutlich länger als eine typische Signalsequenz von Proteinen Gram-negativer Bakterien, welche zwischen 15 und 30 Aminosäuren umfasst (von Heijne, 1985). An das Signalpeptid schließt sich das aus 207 Aminosäuren bestehende Propeptid an, dem die reife Lipase folgt. Wie in *S. hyicus* wird auch in *B. subtilis* nach der Translokation und der Abspaltung des Signalpeptids

(Prozessierung der preproLipase zur proLipase) das Propeptid durch eine extrazelluläre Protease schrittweise abgebaut und die reife Lipase gebildet (Meens *et al.*, 1993; Ayora *et al.*, 1994).

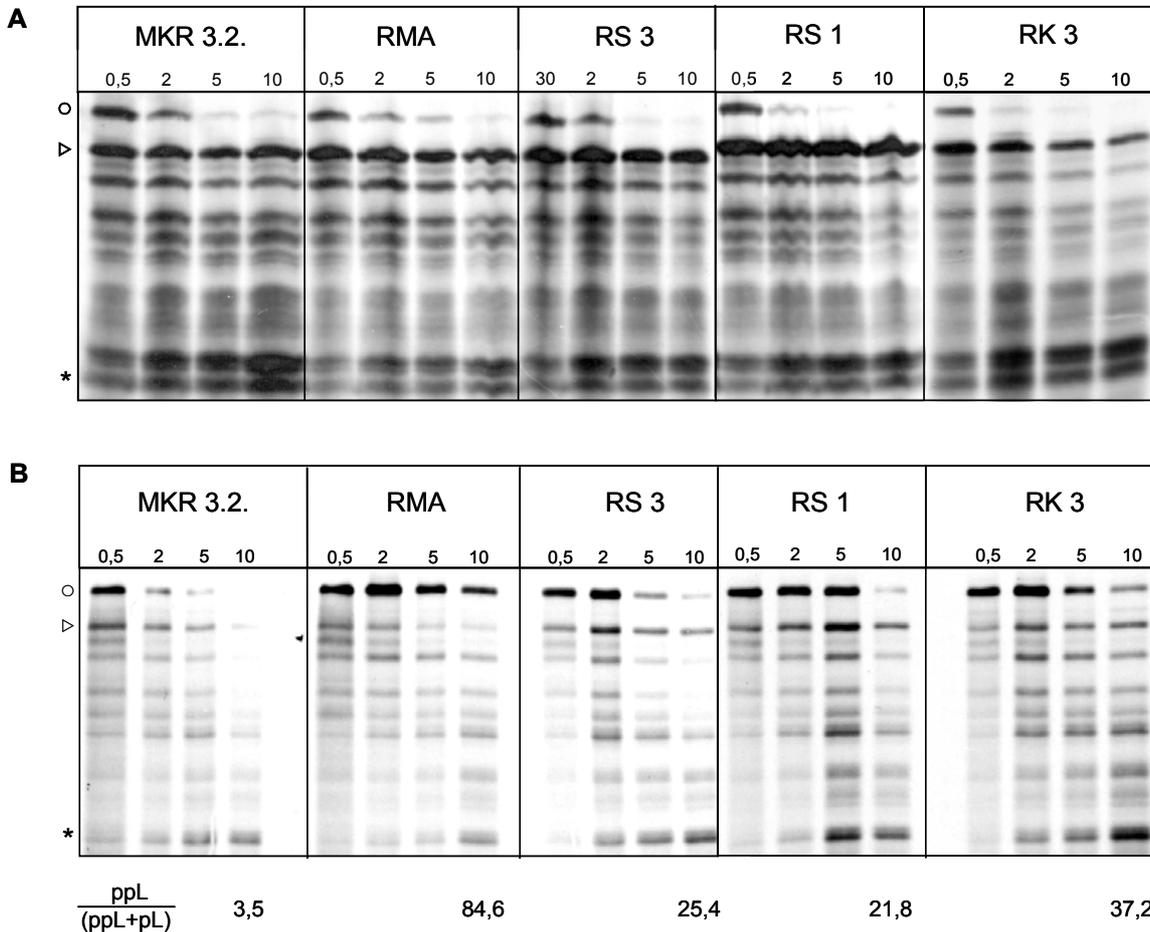


ABBILDUNG 10. Kinetik der Prozessierung der preproLipase in *B. subtilis* MKR 3.2., RMA und Suppressormutanten bei 37 °C (A) und 25 °C (B). Die Expression der preproLipase erfolgte von Plasmid [pLipPS1kan]. Die Markierung der Proteine erfolgte mit 100 µCi ³⁵S-Methionin bei 37 °C bzw. mit 150 µCi bei 25 °C für eine Minute. Nach Zugabe der Chase Lösung wurden Proben der Kulturen nach 30 sek, 2 min, 5 min und 10 min entnommen und wie unter Material und Methoden Kapitel 2.6.5. beschrieben, aufgearbeitet. (○) preproLipase (ppL); (▷) proLipase (pL); (★) reife Lipase. Die Zahlenwerte geben den prozentualen Anteil der preproLipase an der Summe aus preproLipase und proLipase 10 Minuten nach dem Chase an.

Zur Untersuchung des Exports der preproLipase wurden *B. subtilis* MKR 3.2., die RMA und die Suppressormutanten mit dem Plasmid [pLipPS1kan] transformiert. Das Gen, welches für die preproLipase kodiert, wird auf diesem Plasmid konstitutiv exprimiert. Der Export der Lipase wurde in einem Pulse-Chase Experiment bei 37 °C und 25 °C untersucht. Diese

Technik erlaubt es, die Geschwindigkeit der Prozessierung des Vorläuferproteins, welche ein Maß für die Effizienz der Membrantranslokation ist, *in vivo* zu bestimmen. Dazu werden kurzzeitig alle neu synthetisierten Proteine radioaktiv mit ^{35}S -Methionin markiert („Pulse“) und nach Zugabe eines Überschusses an nicht radioaktiv markiertem Methionin („Chase“) zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben der Kultur entnommen. Nach Aufschluß der Zellen wird das Protein von Interesse durch Bindung an einen spezifischen Antikörper abgetrennt. Da dem prozessierten Protein die Signalsequenz fehlt, können exportiertes bzw. nicht exportiertes Protein aufgrund ihres unterschiedlichen Laufverhaltens im SDS-Polyacrylamidgel voneinander unterschieden werden.

Wie in Abbildung 10 A zu erkennen ist, erfolgte bei 37 °C der Export der preproLipase in der RMA mit einer zum Stamm MKR 3.2. vergleichbaren Kinetik. In beiden Stämmen war nach 5 Minuten der Großteil des Vorläuferproteins prozessiert. Das verdeutlicht, dass die Lipase bei 37 °C einen funktionellen Translokations-Initiationskomplex mit dem *S. carnosus* SecA und dem *B. subtilis* SecY ausbilden kann. Die Suppressormutanten zeigten bei 37 °C ebenfalls eine zum Stamm MKR 3.2. vergleichbare Exportkinetik der Lipase.

Bei 25 °C (Abb. 10 B) wurde die preproLipase im Stamm MKR 3.2. ebenfalls effizient prozessiert und nach 10 min war das radioaktiv markierte Vorläuferprotein nicht mehr nachweisbar. In der RMA war der Export im Vergleich zum Stamm MKR 3.2. deutlich verlangsamt, was daran erkennbar ist, dass auch 10 min nach dem Chase noch große Mengen des Vorläuferproteins vorhanden waren. Dagegen zeigten alle Suppressormutanten einen im Vergleich zur RMA wieder schnelleren Export der preproLipase. Allerdings erfolgte der Export nicht so schnell wie im Stamm MKR 3.2.

Um die Effizienz der Prozessierung der preproLipase in den verschiedenen Stämmen bei 25 °C auszuwerten, wurden die Intensitäten der Banden, die der preproLipase bzw. der proLipase entsprechen, mit Hilfe des Programmes AIDA 2.41 quantifiziert. Aus den Daten wurde der prozentuale Anteil des Vorläuferproteins (preproLipase) an der Summe aus der preproLipase und der translozierten proLipase 10 Minuten nach Zugabe der Chase Lösung ermittelt. In *B. subtilis* MKR 3.2. lag der Anteil der preproLipase 10 min nach dem Chase nur noch bei 3,5 %. Dagegen lag in der RMA der Anteil der preproLipase bei 84,6 %. Die Suppressormutanten zeigten im Gegensatz zur RMA einen wieder deutlich beschleunigten Export der Lipase. Der Anteil der preproLipase an der Summe aus preproLipase und proLipase lag in den Mutanten RS 1 und RS 3 bei 21,8 % bzw. 25,4 %. Die Mutante RK 3 zeigte eine im Vergleich zu den anderen Mutanten schwächere Suppression des Exportdefektes der Lipase, was daran erkennbar ist, dass der Anteil der preproLipase in dieser Mutante nach 10 min bei 37,2 % lag.

Diese Ergebnisse zeigen auf Exportebene eindeutig, dass aufgrund der SecA Mutationen die Translokase der Suppressormutanten die preproLipase bei niedrigen Temperaturen wieder als Exportsubstrat akzeptiert. Der langsamere Export der Lipase in der Mutante RK 3

korreliert mit der Beobachtung, dass diese Mutante bei 25 °C auf Agarplatten ein langsames Wachstum zeigte.

3.2.3. Die Mutationen *im S. carnosus SecA* führen zu einer Suppression des OmpA Exportdefektes

Während die Translokase der RMA bei der permissiven Temperatur (37 °C) die Translokation der Lipase, sowie aller für das Wachstum essentiellen Proteine katalysieren kann, zeigten frühere Untersuchungen, dass das heterologe OmpA bei dieser Temperatur selektiv von Export ausgeschlossen wurde. Da die bisherigen Ergebnisse ergaben, dass bei der nicht permissiven Temperatur der pleiotrope Exportdefekt der RMA durch die *secA* Mutationen supprimiert wurde, wurde nun untersucht, ob durch die Mutationen auch der Export des fremden OmpA Proteins im Vergleich zur RMA verbessert wurde.

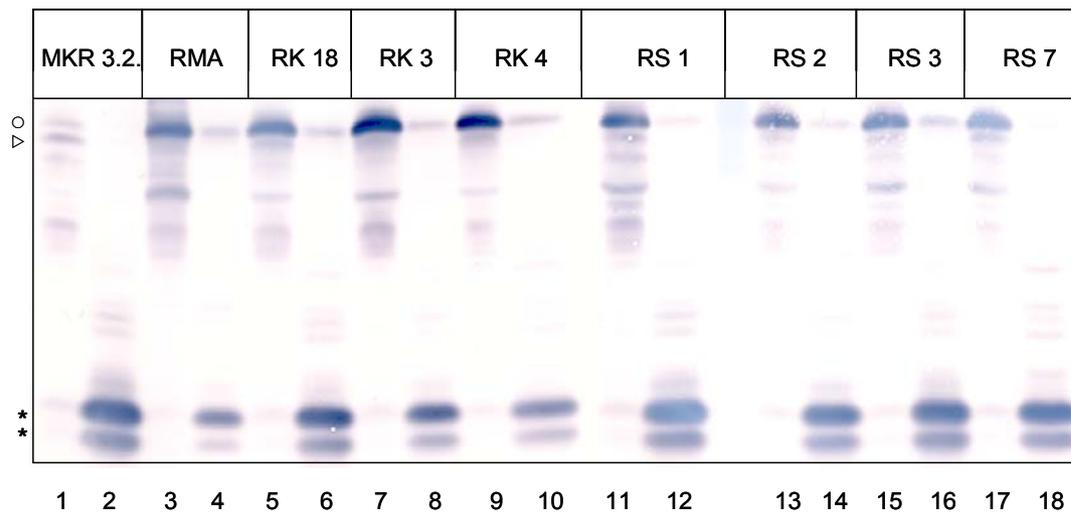


ABBILDUNG 11. Nachweis von *ompA* Genprodukten in Zellen und Kulturüberständen von *B. subtilis* MKR 3.2., der RMA und Suppressormutanten. Die Zellen, welche das Plasmid [pCU3ompAkan] enthielten, wurden in Gegenwart von 0,5 mM IPTG 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Proteine aus Gesamtzellextrakten (Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17) und Kulturüberständen (Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18) wurden im 12,5 % SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und OmpA mittels Western-Blot unter Verwendung OmpA-spezifischer Antikörper nachgewiesen. (○) OmpA Vorläufer; (▷) reifes OmpA; (★) 16 kDa und 18 kDa OmpA Abbauprodukte

Um den Export des OmpA Proteins zu untersuchen, wurden *B. subtilis* MKR 3.2., die RMA und die Suppressormutanten mit dem Plasmid [pCU3ompAkan] transformiert. Dieses Plasmid enthält das *ompA* Gen unter der regulatorischen Kontrolle des mit IPTG induzierbaren Bakteriophagen T5 Promotors P₂₅ und des *lac* Operators. Das OmpA Protein,

welches von diesem Plasmid kodiert wird, trägt das authentische Signalpeptid. Die Verteilung der *ompA* Genprodukte in Zellextrakten und Kulturüberständen wurde bei einer Versuchstemperatur von 37 °C zunächst mittels Western-Blot Analyse untersucht (Abb. 11).

Zum OmpA Export in *B. subtilis* ist zu erwähnen, dass das OmpA Protein nach der Translokation über die Cytoplasmamembran durch zellassoziierte Proteasen partiell abgebaut wird (Meens *et al.*, 1997). Daher ist im Kulturüberstand von *B. subtilis* das intakte reife OmpA Protein praktisch nicht detektierbar. Stattdessen treten zwei OmpA-spezifische Abbauprodukte mit einer molekularen Masse von 16 und 18 kDa auf.

Die Untersuchungen des OmpA Exports zeigten, dass in der Zellfraktion von *B. subtilis* MKR 3.2. geringe Mengen des OmpA Vorläufers, sowie des reifen, vermutlich membran- und/oder zellwandassoziierten Proteins, nachweisbar waren. Im Überstand waren große Mengen der OmpA Abbauprodukte nachweisbar. Dagegen akkumulierten in der Zellfraktion der RMA große Mengen des OmpA Vorläuferproteins und die Menge der Abbauprodukte im Kulturüberstand war im Vergleich zum Stamm MKR 3.2. deutlich geringer. Dies verdeutlicht, dass in der RMA das OmpA auch bei 37 °C nur schlecht exportiert wird. Interessanterweise waren bei allen Suppressormutanten im Vergleich zur RMA nun wieder deutlich erhöhte Mengen der OmpA Abbauprodukte in den Kulturüberständen nachweisbar. Das bedeutet, dass aufgrund der SecA Mutationen auch das fremde OmpA Protein tatsächlich wieder besser exportiert werden kann. Daraus kann geschlossen werden, dass in der RMA der kritische Aktivierungsschritt der SecA ATPase die Initiation der Translokation des heterologen OmpA Proteins beeinträchtigt. Dieser ist in den Suppressormutanten optimiert, so dass das OmpA wieder besser als Exportsubstrat akzeptiert wurde. Die Menge der OmpA Abbauprodukte variierte zum Teil deutlich zwischen den einzelnen Mutanten (vgl. Mutante RK 4, Spur 10 und Mutante RS 1, Spur 12). Das deutet darauf hin, dass der OmpA Exportdefekt in den einzelnen Mutanten unterschiedlich stark supprimiert wird. Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen, wurde der OmpA Export bei 25 °C und bei 37 °C in einem Pulse-Chase Experiment analysiert.

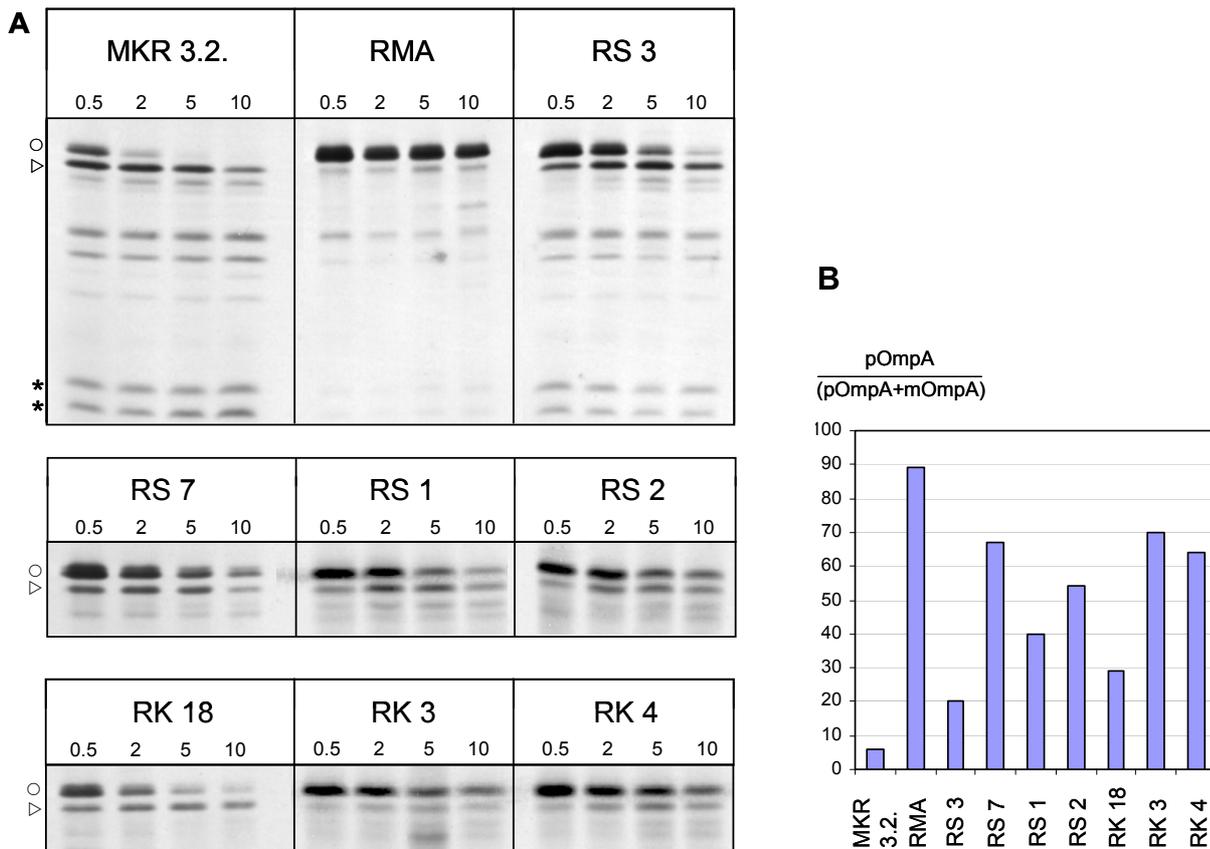


ABBILDUNG 12. A. Kinetik der Prozessierung des OmpA Vorläuferproteins in *B. subtilis* MKR 3.2., der RMA und den Suppressormutanten bei 37 °C. Die Expression des OmpA erfolgte von Plasmid [pCU3ompAkan]. 10 min vor der Markierung wurde die OmpA Expression mit 1 mM IPTG induziert. Die Markierung der Proteine erfolgte mit 100 µCi ³⁵S-Methionin für eine Minute. Nach Zugabe der Chase Lösung wurden Proben der Kulturen nach 30 sek, 2 min, 5 min und 10 min entnommen und wie unter Material und Methoden Kapitel 2.6.5. beschrieben, aufgearbeitet. **B.** Bestimmung der Effizienz der Prozessierung des OmpA Vorläuferproteins. Der prozentuale Anteil des OmpA Vorläuferproteins (pOmpA) an der Summe aus dem pOmpA und dem reifen OmpA (mOmpA) 10 Minuten nach dem Chase wurde durch Quantifizierung der Intensitäten (*int*) der entsprechenden Banden mit dem Programm AIDA 2.41 ermittelt. Der Wert ergab sich aus dem Quotienten aus $int[pOmpA]/(int[pOmpA]+int[mOmpA] \times \frac{6}{5})$. Der Faktor $\frac{6}{5}$ geht als Normierungsfaktor in die Rechnung mit ein, da mOmpA nur fünf der insgesamt sechs im pOmpA enthaltenen Methioninreste enthält. (○) pOmpA; (▷) mOmpA; (★) 16 kDa und 18 kDa OmpA Abbauprodukte

Bei 37 °C, der permissiven Temperatur der RMA, wurde in *B. subtilis* MKR 3.2. der OmpA Vorläufer effizientprozessiert (Abb. 12 A). Das reife exportierte OmpA wurde anschließend zu den 16 und 18 kDa Spaltprodukten abgebaut, wodurch auch die Abnahme des reifen

Proteins zu späteren Zeitpunkten zu erklären ist. In der RMA wurde während des gesamten Beobachtungszeitraumes nur ein geringer Anteil des OmpA Vorläufers prozessiert, was deutlich zeigt, dass die Translokase der RMA das heterologe Protein nicht als Exportsubstrat akzeptiert. Aus dem Pulse Chase Experiment wird nun klar ersichtlich, dass in allen Suppressormutanten das OmpA Protein im Vergleich zur RMA wieder effizienter exportiert wurde, somit von der Translokase wieder besser als Exportsubstrat akzeptiert wurde. Allerdings war der OmpA Export nicht so effizient wie im Stamm MKR 3.2. und es zeigten sich zum Teil deutliche Unterschiede in der OmpA Exporteffizienz zwischen den Mutanten.

Um die Exporteffizienz der einzelnen Stämme miteinander zu vergleichen, wurden die Banden, welche dem OmpA Vorläufer und dem reifen OmpA Protein 10 Minuten nach Zugabe der Chase Lösung entsprechen, quantifiziert. Anhand der Intensität der Banden wurde der prozentuale Anteil des OmpA Vorläufers an der Summe aus dem OmpA Vorläufer und dem reifen OmpA ermittelt (Abb. 12 B). Während der Anteil des OmpA Vorläufers in *B. subtilis* MKR 3.2. bei nur 5,7 % lag, betrug der Anteil des OmpA Vorläufers in der RMA zum gleichen Zeitpunkt noch 89 %. Drei der Mutanten, die eine Mutation im IRA 2 Element enthielten (Mutanten RS 3, RK 18 und RS 1) supprimierten den OmpA Exportdefekt am stärksten. In diesen Mutanten lag der Anteil des OmpA Vorläufers an der Summe aus pOmpA und mOmpA bei 20 %, 29 % bzw. 40 %. Obwohl die Mutante RS 7 aufgrund der Position der Mutation ebenfalls in diese Klasse fällt, lag der Anteil des OmpA Vorläufers in dieser Mutante bei 67 %. Zu den schwächeren Suppressormutanten gehören ebenfalls die Mutanten der Klasse 1 und Klasse 3 (Mutanten RK 3 und RK 4), bei denen der Anteil des OmpA Vorläufers nach 10 Minuten bei 70 % bzw. 64 % lag.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die in der RMA ursprünglich erhöhte Qualitätskontrolle in den Suppressormutanten aufgrund der Mutationen im SecA von *S. carnosus* wieder herabgesetzt wurde. Es zeigte sich auch deutlich, dass die Effizienz, mit der das OmpA wieder in den Sekretionsweg eingeschleust wird, entscheidend von der Art der Mutation im *S. carnosus* SecA abhängig ist, wobei der OmpA Exportdefekt durch Mutationen der Klasse 2 stärker supprimiert wurde, als durch Mutationen der Klasse 1 und Klasse 3.

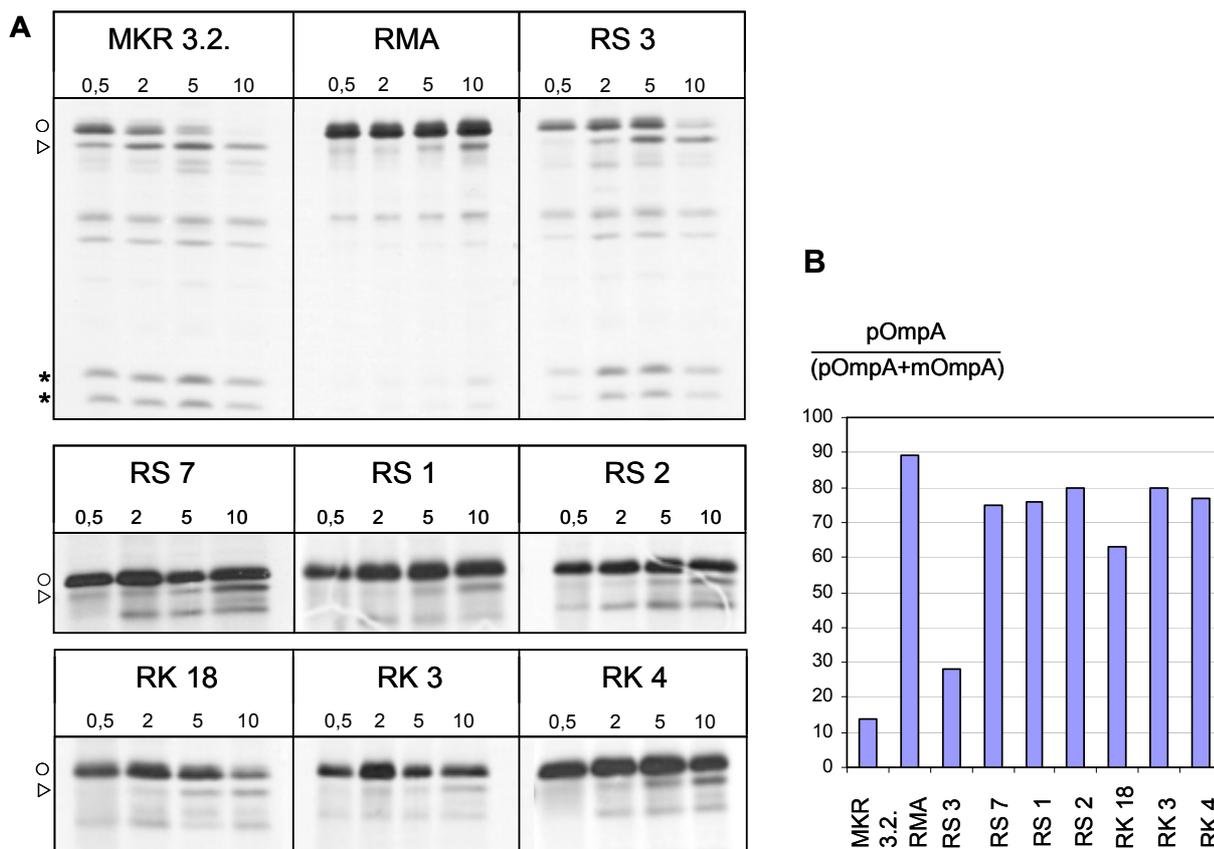


ABBILDUNG 13. A. Kinetik der Prozessierung des OmpA Vorläuferproteins in *B. subtilis* MKR 3.2., RMA und Suppressormutanten bei 25 °C. Die Expression des OmpA erfolgte von Plasmid [pCU3ompAkan]. 10 min vor der Markierung wurde die OmpA Expression mit 1 mM IPTG induziert. Die Markierung der Proteine erfolgte mit 150 μ Ci 35 S-Methionin für eine Minute. Nach Zugabe der Chase Lösung wurden Proben der Kulturen nach 30 sek, 2 min, 5 min und 10 min entnommen und wie unter Material und Methoden Kapitel 2.6.4. beschrieben, bearbeitet. **B.** Bestimmung der Effizienz der Prozessierung des OmpA Vorläuferproteins (vgl. Abb. 12 B). (○) OmpA Vorläuferprotein (pOmpA); (▷) reifes OmpA (mOmpA); (★) 16 kDa und 18 kDa OmpA Abbauprodukte

Die Analyse des OmpA Exports in den Suppressormutanten bei 25 °C zeigte, dass alle Mutanten auch bei der niedrigen Temperatur den OmpA Exportdefekt der RMA zumindest teilweise supprimieren konnten (Abb. 13 A). Der Anteil des OmpA Vorläufers an der Summe aus OmpA Vorläufer und reifem OmpA lag nach 10 Minuten je nach Mutante zwischen 28 % und 80 %, während in der RMA der Anteil des OmpA Vorläufers zum gleichen Zeitpunkt noch 89 % betrug. Wie schon bei 37 °C beobachtet, zeigten auch bei 25 °C die Mutanten RS 3 und RK 18 die stärkste Suppression des OmpA Exportdefektes der RMA (Abb. 13 B).

3.2.4. Analyse der Sporulation und der Kompetenz der Suppressormutanten der RMA

Eine Voraussetzung für die Initiation der Sporulation und der Ausbildung natürlicher Kompetenz ist der Export mehrerer Peptide, welche eine Funktion bei der Regulation dieser Vorgänge haben. Mehrere Hinweise deuten darauf hin, dass drei dieser Peptide (PhrA, PhrC und PhrE) über den Sec-Weg exportiert werden (siehe Einleitung Kapitel 1.6.). Die erhöhte Qualitätskontrolle der Hybridtranslokase der RMA ist sehr wahrscheinlich der Grund dafür, weshalb auch mindestens eines dieser Phr Peptide in der RMA nicht als Exportsubstrat akzeptiert wird, wodurch der Sporulations- und Kompetenzdefekt verursacht wird. Da der verbesserte OmpA Export in den Suppressormutanten auf eine herabgesetzte Qualitätskontrolle hindeutete, wurde untersucht, ob auch der Sporulations- und Kompetenzdefekt supprimiert wurden.

3.2.4.1. Die Mutationen im *S. carnosus* SecA führen zur Suppression des Sporulationsdefektes der RMA

Die Tatsache, dass einige der Suppressormutanten der RMA aufgrund besserer Sporulationsfähigkeit selektioniert werden konnten, deutet darauf hin, dass durch diesen Selektionsdruck eine Klasse von Mutationen erhalten wurde, welche dazu führte, dass die sporulationsspezifischen Peptide wieder besser exportiert wurden. Diese Mutanten könnten sich im Bezug auf die Sporulationsfähigkeit aber von den Mutanten unterscheiden, welche auf den verbesserten Export eines für das Wachstum essentiellen Proteins selektioniert wurden. Daher wurde die Sporulationsfähigkeit der Suppressormutanten im besonderen im Hinblick auf die Unterschiede zwischen den Mutanten, welche auf kälteresistentes Wachstum (*cr*) und den Mutanten, welche auf verbesserte Sporulationsfähigkeit (*spo+*) selektioniert wurden, untersucht.

Die Fähigkeit der verschiedenen Stämme, Sporen zu bilden, wurde bei einer Versuchstemperatur von 37 °C ermittelt. Hierzu wurde der prozentuale Anteil der gebildeten Sporen an der Gesamtzellzahl bestimmt. Die Sporulationsfrequenz des Vergleichsstammes *B. subtilis* MKR 3.2. wurde auf 100 % gesetzt und die Sporulationsfrequenzen der anderen Stämme auf die 100 % des Vergleichsstammes MKR 3.2. bezogen. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 9 gezeigt. Die relative Sporulationseffizienz der RMA lag bei nur 0,006 % der Effizienz des Stammes MKR 3.2. Dagegen war die relative Sporulationsfähigkeit aller Suppressormutanten erhöht. Hierbei waren jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Mutanten erkennbar. Besonders auffällig war, dass alle Mutanten, welche aufgrund besserer Sporulationsfähigkeit selektioniert wurden (Mutanten RS 1, RS 2, RS 3 und RS 7), den Sporulationsdefekt der RMA deutlich besser supprimierten als die Mutanten RK 3 und RK 4, welche auf kälteresistentes Wachstum selektioniert wurden. So lag die Sporulationsfähigkeit bei *spo+* Mutanten zwischen 10,5 % und 74,9 %

bezogen auf die Effizienz des Stammes MKR 3.2., während die Sporulationsfähigkeit der Mutanten RK 3 und RK 4 bei nur 0,02 % bzw. 0,14 % bezogen auf die Effizienz des Vergleichsstammes MKR 3.2. lag. Die Ausnahme bildet die Mutante RK 18, die zwar auf kälteresistentes Wachstum selektioniert wurde, aber eine Sporulationsfähigkeit von 21,4 % in Bezug auf den Vergleichsstamm MKR 3.2. zeigte. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Mutation, welche in der Mutante RK 18 aufgetreten ist, auch bei der Selektion von Mutanten, welche besser sporulieren konnten, identifiziert wurde. Insgesamt bestätigt dieses Ergebnis, dass im Vergleich zu *cr* Mutanten, in *spo+* Mutanten der Selektionsdruck tatsächlich auf einem verbesserten Export sporulationsspezifischer Peptide lag.

TABELLE 9. Vergleich der Sporulationsfähigkeit von *B. subtilis* MKR 3.2., der RMA und der Suppressormutanten

Stamm	relative Sporulationsfähigkeit [%]
MKR 3.2.	100
RMA	0,006
RK 3	0,02
RK 4	0,14
RK 18	21,4
RS 1	74,9
RS 2	11,9
RS 3	10,5
RS 7	25,7

Zur Bestimmung der relativen Sporulationsfähigkeit wurden von den angegebenen Stämmen Sporen isoliert und die Sporulationsfrequenz bestimmt. Die Sporulationsfrequenz von *B. subtilis* MKR 3.2. wurde auf 100 % gesetzt und die Werte der Mutanten auf die 100 % des Stammes MKR 3.2. bezogen. Die Daten stellen die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten dar.

Das Ergebnis des Sporulationstests zeigt somit, dass der Sporulationsdefekt, der durch den SecA Austausch verursacht wurde, durch die Mutationen im *S. carnosus* SecA partiell aufgehoben wurde. Dies deutet darauf hin, dass in den Suppressormutanten durch die herabgesetzte Qualitätskontrolle auch der Export der zur Initiation der Sporulation essentiellen Peptide wieder besser erfolgen kann. Die Unterschiede in der Stärke der Suppression des Sporulationsdefektes deuten darauf hin, dass die Art der SecA Mutation entscheidend dafür ist, mit welcher Effizienz die Translokation der sporulationsspezifischen Proteine erfolgen kann. Hierbei führten Klasse 2 Mutationen im Vergleich zu Klasse 1 und Klasse 3 Mutationen zu einer insgesamt stärkeren Suppression. Dies ist ein weiterer Hinweis

darauf, dass sich der Mechanismus der Suppression durch die IRA Mutationen vom Mechanismus der Suppression durch Mutationen der Klasse 1 bzw. Klasse 3 unterscheidet.

3.2.4.2. Die Fähigkeit zur Ausbildung natürlicher Kompetenz ist in den Suppressormutanten aufgrund der SecA Mutationen partiell wiederhergestellt

Ein Phr Peptid (PhrC) ist sehr wahrscheinlich sowohl an der Regulation der Initiation der Sporulation als auch der Kompetenz beteiligt (Lazazzera *et al.*, 1999). Eine gekoppelte Funktion dieses Peptids bei diesen beiden Vorgängen könnte bestätigt werden, wenn *spo+* Mutanten auch eine im Vergleich zu den *cr* Mutanten bessere Suppression des Kompetenzdefektes der RMA zeigen. Daher wurde die Kompetenz von *B. subtilis* MKR 3.2., der RMA und der Suppressormutanten untersucht (Tab. 10).

TABELLE 10. Vergleich der Kompetenz von *B. subtilis* MKR 3.2., der RMA und der Suppressormutanten

Stamm	relative Kompetenz [%]
MKR 3.2.	100
RMA	0,035
RK 3	0,15
RK 4	0,89
RK 18	3,15
RS 1	12,8
RS 2	3,46
RS 3	7,86
RS 7	6,84

Die Kompetenz wurde bestimmt, indem die Stämme mit 5 µg des Plasmids [pLipPS1kan] transformiert wurden. Die Anzahl der vom Vergleichsstamm MKR 3.2. erhaltenen Transformanten wurde auf 100 % gesetzt und die Anzahl der Transformanten der anderen Stämme auf die 100 % des Stammes MKR 3.2. bezogen. Die Daten stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar.

Die natürliche Kompetenz der untersuchten Stämme wurde bestimmt, indem ermittelt wurde, mit welcher Effizienz ein Plasmid aufgenommen werden konnte. Als Maß hierfür diente die Anzahl der nach Transformation auf Selektionsmedium erhaltenen Kolonien. Die Transformationseffizienz vom Vergleichsstamm *B. subtilis* MKR 3.2. wurde auf 100 % gesetzt und die Transformationseffizienzen der anderen Stämme auf den Stamm MKR 3.2. bezogen. Die RMA zeigte mit 0,035 % in Bezug auf den Vergleichsstamm MKR 3.2. eine

sehr schlechte Transformationsfähigkeit. Dagegen war die Fähigkeit aller Suppressormutanten, DNA aufzunehmen, mit einer relativen Kompetenz zwischen 0,15 % und 12,8 % wieder signifikant höher. Interessanterweise zeigten die Suppressormutanten, welche auf bessere Sporulationsfähigkeit selektioniert wurden, mit 3,15 % bis 12,8 % tatsächlich eine stärkere Suppression des Kompetenzdefektes, als die Mutanten, welche auf kälteresistentes Wachstum selektioniert wurden. Die Transformationseffizienz war bei diesen Mutanten mit 0,15 % (Mutante RK 3) bzw. 0,89 % (Mutante RK 4) bezogen auf die Effizienz des Stammes MKR 3.2. deutlich niedriger.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die SecA Mutationen auch der durch den SecA Austausch hervorgerufene Kompetenzdefekt der RMA supprimiert wurde. Dies deutet darauf hin, dass die in den Suppressormutanten herabgesetzte Qualitätskontrolle der Translokase auch den Export der für die Ausbildung der Kompetenz notwendigen Proteine im Vergleich zur RMA verbessert. Die Korrelation in der Stärke der Suppression des Sporulationsdefektes und des Kompetenzdefektes durch *spo+* und *cr* Mutanten unterstreicht den Befund, dass PhrC eine gekoppelte regulatorische Funktion bei der Sporulation und Kompetenz haben könnte. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass neben PhrC auch der wieder ermöglichte Export anderer Peptide zur Suppression des Kompetenzdefektes der RMA beiträgt.

3.2.5. Einige Mutationen im *S. carnosus* SecA erhöhen die Azidsensitivität der Suppressormutanten

Natrium-Azid ist ein wirksamer Inhibitor verschiedener ATPasen. Untersuchungen in *E. coli* und *B. subtilis* zeigten, dass das SecA Protein in beiden Bakterien diejenige Komponente ist, die besonders sensitiv gegenüber Azid ist (Oliver *et al.*, 1990; Klein *et al.*, 1994) und dass in Gegenwart von Azid die Proteintranslokation wirksam gehemmt ist (Oliver *et al.*, 1990; Meens *et al.*, 1993). Die Wechselwirkungen zwischen Azid und SecA, welche die Inhibition verursachen, sind nicht genau bekannt. Untersuchungen deuten aber darauf hin, dass SecA, welches durch ein Vorläuferprotein aktiviert wurde, durch Azid im membraninserierten Zustand gehalten wird, indem die ATP Hydrolyse gehemmt wird (van der Wolk *et al.*, 1997). Die basale ATPase Aktivität wird nicht durch Azid inhibiert (Oliver *et al.*, 1990). Die Analyse der supprimierenden Mutationen zeigte, dass die Mutationen im IRA 2 Element höchst wahrscheinlich zu einer Erhöhung der basalen ATPase Aktivität führen, somit den Zustand des SecA Proteins nachahmen, welches durch ein Vorläuferprotein aktiviert ist. Daher wurde untersucht, ob in Abhängigkeit der verschiedenen SecA Mutationen Unterschiede in der Azidsensitivität der Suppressormutanten beobachtet werden können, welche eine Aussage über den Zustand der verschiedenen SecA Proteine an der Translokase ermöglichen könnte. Hierzu wurde die maximale Azidkonzentration bestimmt, bei der der *S. carnosus* Wildtyp

bzw. der Stamm *B. subtilis* MKR 3.2., die RMA und die Suppressormutanten auf Agarplatten Kolonien bilden konnten (Abb. 14)

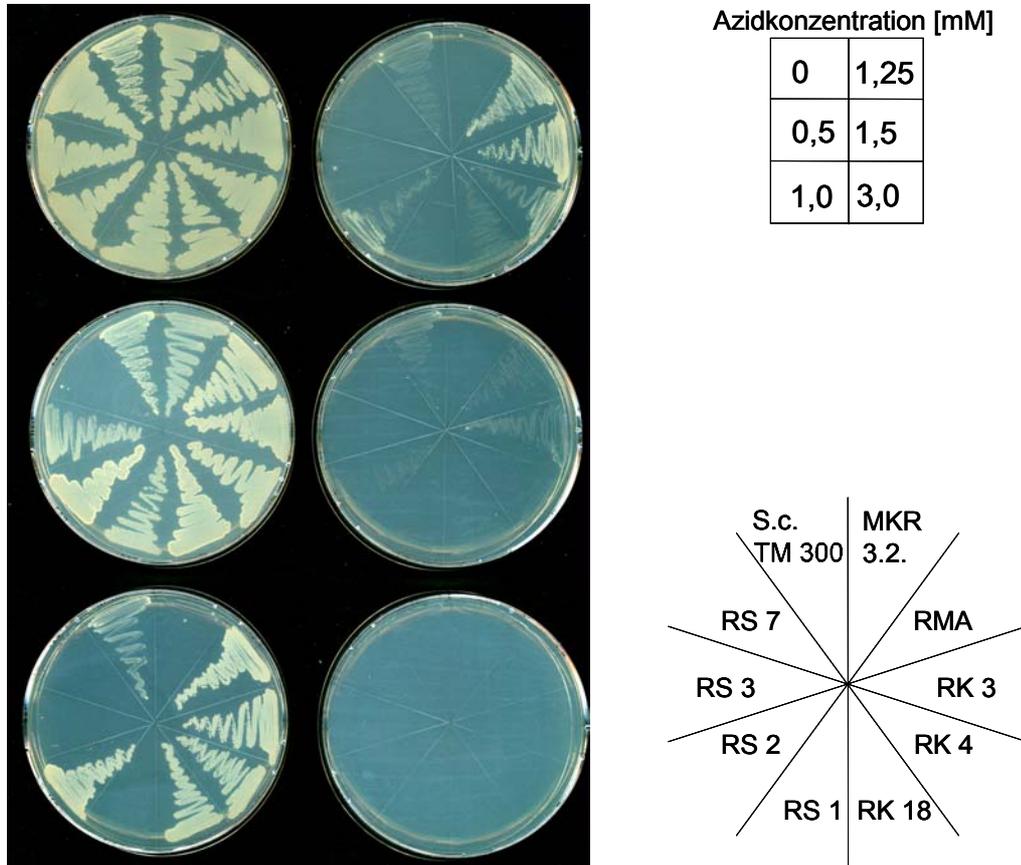


ABBILDUNG 14. Bestimmung der Azidsensitivität von *S. carnosus* Wildtyp TM300, *B. subtilis* MKR 3.2., der RMA und den Suppressormutanten. Eine frische Kolonie des jeweiligen Stammes wurde in LB Medium resuspendiert und 2 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Stämme auf LB Agarplatten mit den angegebenen Azidkonzentrationen ausgestrichen und 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

S. carnosus Wildtyp und die RMA, welche beide das SecA von *S. carnosus* enthalten, zeigten keine Unterschiede in der Azidsensitivität. Beide Stämme konnten bei einer Azidkonzentration von 1,5 mM noch sehr kleine Kolonien bilden. Dagegen war der *B. subtilis* Stamm MKR 3.2., welcher das *B. subtilis* Wildtyp SecA enthält, deutlich sensitiver gegenüber Azid. Bei diesem Stamm war schon bei einer Azidkonzentration von 1 mM kein Wachstum mehr zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass der Unterschied in der Azidsensitivität ausschließlich auf eine intrinsische Eigenschaft der unterschiedlichen SecA Proteine von *S. carnosus* und *B. subtilis* zurückzuführen ist und dass das *S. carnosus* SecA resistenter

gegenüber Azid ist als das *B. subtilis* SecA. Die Suppressormutanten zeigten nun, obwohl sie ebenfalls das *S. carnosus* SecA enthalten, im Vergleich zu *S. carnosus* TM300 bzw. der RMA zum Teil deutliche Unterschiede in der Azidsensitivität. Während die Mutanten RK 3 und RS 2 im Vergleich zur RMA keine veränderte Azidsensitivität zeigten, waren alle anderen Stämme empfindlicher. Eine geringfügig erhöhte Sensitivität war bei den Mutanten RK 4 und RK 18 feststellbar. Diese Mutanten konnten bei einer Azidkonzentration von 1,25 mM noch sehr kleine Kolonien bilden, allerdings bei einer Azidkonzentration von 1,5 mM nicht mehr wachsen. Eine deutlich erhöhte Azidsensitivität war bei den Mutanten RS 1, RS 3 und RS 7 zu beobachten. Während die Mutanten RS 1 und RS 3 bei einer Azidkonzentration von 1 mM nicht mehr wachsen konnten, war bei der Mutante RS 7 schon bei einer Konzentration von 0,5 mM Azid kein Wachstum mehr zu beobachten. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die SecA Proteine der Suppressormutanten, welche eine im Vergleich zur RMA erhöhte Azidsensitivität zeigen, im membraninserierten Zustand am SecYEG Komplex eine andere Konformation einnehmen. Diese führt dazu, dass die Fähigkeit von Azid, das SecA Protein im membraninserierten Zustand zu halten, erhöht ist. Es ist auffällig, dass vor allem die Mutanten mit Mutationen im IRA 2 Element im Vergleich zur RMA besonders sensitiv gegenüber Azid waren.

3.2.6. Die *S. carnosus* secA Suppressorallele sind dominant über das *S. carnosus* Wildtyp secA Gen

Frühere Untersuchungen zeigten, dass der Wachstumsdefekt der RMA durch plasmidkodiertes *B. subtilis* SecA komplementiert werden kann, das authentische *B. subtilis* secA somit dominant über das *S. carnosus* secA ist. Um zu untersuchen, ob auch die *S. carnosus* secA Suppressorallele dominant gegenüber dem *S. carnosus* Wildtyp secA sind, wurden die secA Gene der Suppressormutanten in der RMA exprimiert. Hierzu wurden die secA Gene in den Vektor pWH1520 (Rygus und Hillen, 1991) kloniert. Dieser Vektor repliziert in *E. coli* und *B. subtilis* mit hoher Kopienzahl. In *B. subtilis* erlaubt der Vektor eine regulierbare Genexpression unter der Kontrolle des mit Xylose induzierbaren Promotors P_{xyIA}. Zur Klonierung wurden die secA Gene mit Ribosomenbindestelle ausgehend von chromosomaler DNA der Suppressormutanten mittels PCR amplifiziert. Hierfür wurden die Primer SecAS.c.NBamHI und SecAS.c.CSphI verwendet. Die erhaltenen 2,56 kb secA Fragmente wurden mit dem BamHI und SphI verdauten Vektor pWH1520 ligiert. Die daraus resultierenden Plasmide wurden mit [pWSCA_x] bezeichnet, wobei x die Positionen der Mutationen im *S. carnosus* SecA der Suppressormutanten angibt. Die RMA wurde mit den Plasmiden transformiert und die SecA Expression sowohl unter induzierten als auch reprimierten Bedingungen im Western-Blot untersucht (Abb. 15). Die Analyse der SecA Expression zeigte, dass unter induzierten Bedingungen große Mengen der jeweiligen SecA

Proteine nachweisbar waren, während die SecA Menge unter reprimierten Bedingungen nicht über das Niveau, welches vom chromosomal kodierten SecA stammte, hinausging.

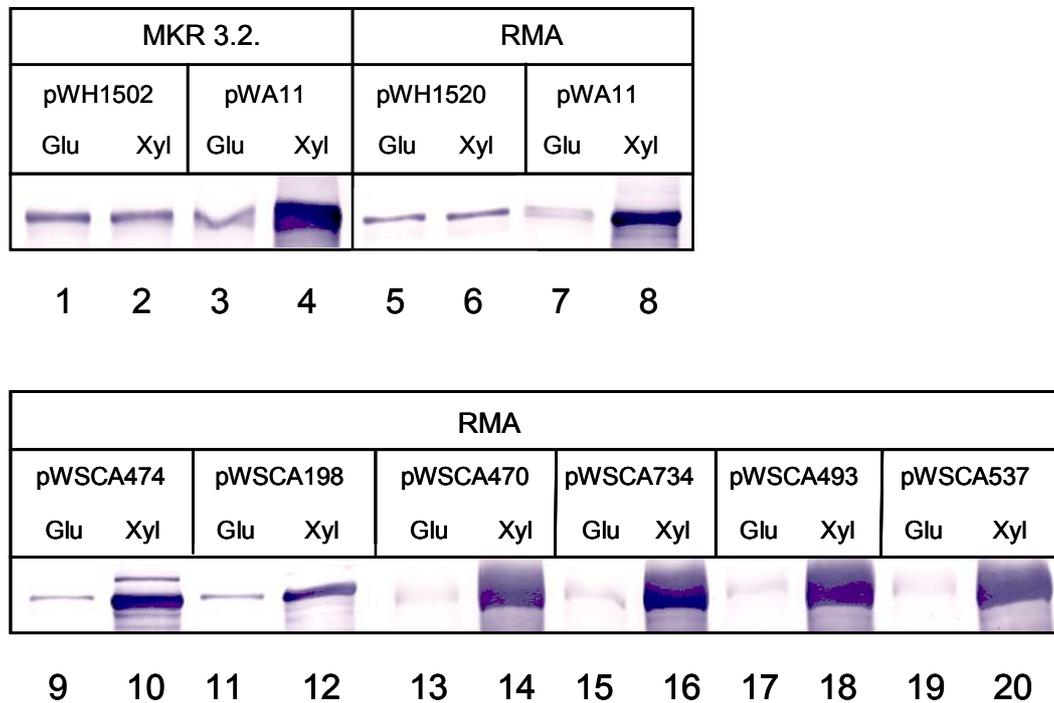


ABBILDUNG 15. Western-Blot zum Nachweis der SecA Expression im *B. subtilis* MKR 3.2. und der RMA. Die Stämme mit dem Leervektor [pWH1502], dem Plasmid [pWA11] (*secA_{S.c.}*) und den Plasmiden [pWSCA_x] (x steht für die Positionen der Mutationen in den SecA Proteinen der Suppressormutanten RK 3, RK 18, RS 1, RS 2, RS 3 bzw. RS 7) wurden 4 Stunden unter induzierten Bedingungen mit 0,5 % Xylose (Xyl) bzw. unter reprimierten Bedingungen mit 0,5 % Glukose (Glu) bei 37 °C kultiviert. Gesamtzellextrakte wurden in einem 10 %igen SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und die SecA Proteine mit anti-*B. subtilis* SecA Antikörpern nachgewiesen. Die aufgetragenen Proteinmengen wurden anhand der OD₆₀₀ der Ausgangskulturen normiert.

Die Wachstumsversuche auf Festmedium zeigten, dass bei der permissiven Temperatur (37 °C) alle Stämme unabhängig von den Induktionsbedingungen vergleichbar wachsen konnten (Abb. 16). Die Überproduktion der jeweiligen SecA Proteine hatte somit keinen Einfluss auf das Wachstum der Stämme. Bei der nicht permissiven Temperatur (25 °C) konnte die RMA mit dem Leervektor erwartungsgemäß nicht wachsen. Auch bei Überproduktion des *S. carnosus* Wildtyp SecA konnte die RMA bei 25 °C keine Kolonien bilden. Diese Beobachtung zeigt, dass eine erhöhte Menge an *S. carnosus* SecA alleine das kältesensitive Wachstum der RMA nicht kompensiert, den Export essentieller Proteine somit nicht verbessert. Enthält das Plasmid jedoch eines der *secA* Gene der Suppressormutanten,

konnte die RMA bei Induktion der *secA* Expression (in Gegenwart von Xylose) und selbst in Gegenwart von Glukose bei 25 °C wieder Kolonien bilden. Dieser Befund ist darauf zurückzuführen, dass auch unter reprimierten Bedingungen eine basale *secA* Expression erfolgt. Eine geringe intrazelluläre Menge der SecA Proteine der Suppressormutanten reicht somit bereits aus, um den Export essentieller Proteine zu ermöglichen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die *S. carnosus* *secA* Suppressorallele dominant über das *S. carnosus* Wildtyp *secA* sind. Das bedeutet, dass das funktionelle SecA der Suppressormutanten das *S. carnosus* Wildtyp SecA von der Translokase verdrängen und den Export aller für das Wachstum essentiellen Proteine katalysieren kann.

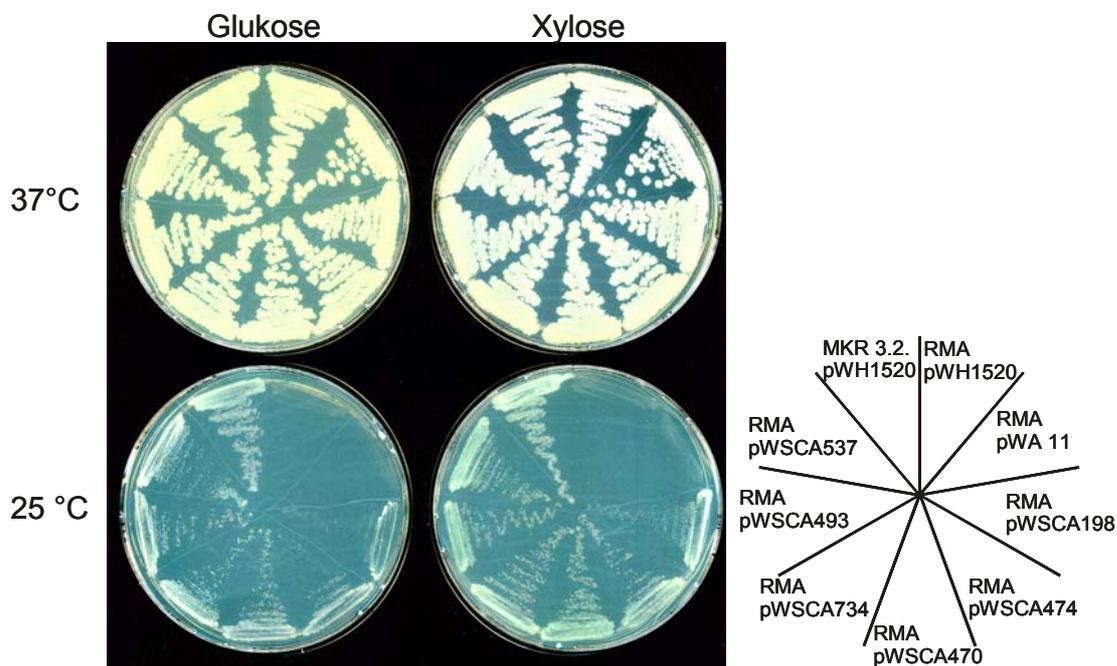


ABBILDUNG 16. Wachstumskomplementation der RMA. LB Medium wurde mit einem frischen Klon des jeweiligen Stammes angeimpft und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Induktion der SecA Expression wurden die Stämme auf LB Agarplatten mit 0,5 % Xylose, zur Repression der SecA Expression auf Agarplatten mit 0,5 % Glukose ausgestrichen. Die Stämme wurden 16 Stunden bei 37 °C bzw. 24 Stunden bei 25 °C inkubiert.

3.2.7. In der Suppressormutante RS 7 ist nur die Mutation im IRA 2 für den supprimierenden Phänotyp verantwortlich

Die Sequenzierung des *secA* Gens der Suppressormutante RS 7 zeigte, dass diese Mutante zwei Nukleotidaustausche enthielt, welche zu zwei Veränderungen auf Aminosäureebene führten. Eine Mutation führte zum Austausch von Alanin zu Threonin an Aminosäureposition 140 im Bereich der NBS 1. Die zweite Mutation führte zum Austausch von Asparaginsäure

zu Alanin an Position 537 im IRA 2 Element. Da in Abschnitt 3.2.6. gezeigt wurde, dass das plasmidkodierte SecA der Mutante RS7, welches beide Mutationen enthält, den Wachstumsdefekt der RMA komplementieren konnte, wurde untersucht, ob beide Mutationen zur Komplementation beitragen. Hierzu wurden Plasmide konstruiert, welche die *secA* Allele mit den jeweiligen Einzelmutationen enthielten. Plasmid pWSCA537 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *StuI* und *partial* mit *Asp718* verdaut. So entstand ein 2,24 kb großes Fragment, auf welchem der Teil des *secA* Gens enthalten war, der für die Mutation A140T kodierte, sowie ein 8,24 kb großes Fragment, auf welchem der Teil des *secA* Gens enthalten war, der für die Mutation D537A kodierte. Das Plasmid pWA11, welches das *S. carnosus* Wildtyp *secA* Gen enthält, wurde ebenfalls mit *StuI* und *Asp718* verdaut. Das 2,24 kb Fragment des Plasmids pWSCA537 wurde mit dem 8,24kb Fragment des Plasmids pWA11 ligiert. So entstand das Plasmid PWSCA537N, welches für das SecA mit der Mutation A140T kodierte. Durch Ligation des 2,24 kb Fragmentes des Plasmids pWA11 mit dem 8,24 kb Fragment des Plasmids pWSCA537 entstand Plasmid pWSCA537C, welches für das SecA mit der Mutation D537A kodierte. Die RMA wurde mit diesen Plasmiden transformiert und die Expression der SecA Proteine unter induzierten Bedingungen im Western-Blot nachgewiesen (nicht gezeigt). Wachstumsversuche auf LB Festmedium zeigten, dass die RMA nur bei Expression des SecA Proteins, welches die Mutation D537A enthielt, bei 25 °C auf Festmedium Kolonien bilden konnte (Tab. 11).

TABELLE 11. Wachstumskomplementation der RMA

Plasmid	25 °C		37 °C	
	Glu	Xyl	Glu	Xyl
pWH1520	-	-	+	+
pWSCA537	(+)	+	+	+
pWSCA537N	-	-	+	+
pWSCA537C	(+)	+	+	+

Zellen der RMA, welche die angegebenen Plasmide enthielten, wurden auf LB Agarplatten mit 0,5 % Glukose zur Repression der *secA* Expression bzw. 0,5 % Xylose zur Induktion der *secA* Expression ausgestrichen und bei der permissiven Temperatur (37 °C) bzw. der nicht permissiven Temperatur (25 °C) inkubiert.

+ Wachstum; - kein Wachstum; (+) eingeschränktes Wachstum

Hierbei waren keine Wachstumsunterschiede zu dem Stamm, welcher das *S. carnosus* SecA mit der Doppelmutation vom Plasmid exprimiert, zu beobachten. Wurde das *S. carnosus* SecA mit der Mutation A140T exprimiert, konnte die RMA unabhängig von den Induktionsbedingungen auf Festmedium keine Kolonien bilden. Diese Ergebnisse zeigen, dass in der Doppelmutante *B. subtilis* RS 7 ausschließlich die Mutation D537A im IRA 2

Element die Suppression des Wachstumsdefektes bewirkt. Die Mutation A140T trägt nicht zur Wiederherstellung des Wachstums der RMA bei 25 °C bei.

3.2.8. Die Stärke der Suppression der Defekte der RMA ist nicht nur von der SecA Mutation, sondern auch vom Vorläuferprotein abhängig

Die Selektion von Suppressormutanten der RMA führte zur Identifizierung von sieben verschiedenen Mutationen im SecA von *S. carnosus*. Die Charakterisierung der Suppressormutanten zeigte, dass alle Phänotypen der RMA von allen Mutanten supprimiert wurden, aber mit zum Teil deutlich unterschiedlicher Stärke. Um einen Vergleich der Suppressormutanten untereinander zu ermöglichen, wurde die Stärke der Suppression des Wachstumsdefektes, des OmpA Exportdefektes, des Sporulations- und Kompetenzdefektes, sowie die Azidsensitivität tabellarisch zusammengefasst (Tab. 12).

TABELLE 12. Die Eigenschaften¹ von *B. subtilis* MKR 3.2., der RMA und der Suppressormutanten

<i>B. subtilis</i> Stamm	Klasse der SecA Mutation	Wachstum bei 25 °C	OmpA- Export ³	Sporulation	Kompetenz	NaN ₃ Sensitivität [mM] ⁴
MKR 3.2.		+	++++++	+++++	+++++	1
RMA		-	-	-	-	1,5 - 3
RK 3	1	+ ²	+	+	+	1,5 - 3
RK 4	3	+	+	+	+	1,25 -1,5
RK 18	2	+	++++	+++	++	1,25 -1,5
RS 1	2	+	+++	++++	++++	1
RS 2	2	+	++	++	++	1,5 - 3
RS 3	2	+	+++++	++	+++	1
RS 7	2	+	+	+++	+++	0,5

¹ (+): Wachstum; zunehmende Anzahl an (+) Zeichen: zunehmend guter OmpA Export, zunehmend gute Sporulationsfähigkeit, zunehmend gute Kompetenz; (-): kein Wachstum, kein OmpA Export, keine Sporulation; keine natürliche Kompetenz

² Auf Festmedium bildete dieser Stamm im Vergleich zu den anderen Stämmen kleinere Kolonien, während sich das Wachstum in Flüssigkultur nicht signifikant unterschied.

³ Die Angaben beziehen sich auf das Pulse-Chase Experiment bei 37 °C (Abb. 12 A). Der Anteil des OmpA Vorläufers an OmpA Vorläufer und reifem OmpA 10 Minuten nach dem Chase diente als Maß für die Effizienz des OmpA Exports.

⁴ minimale Azidkonzentration, bei der die Stämme bei 37 °C auf Festmedium keine Kolonien mehr bildeten.

Das Wachstum der Suppressormutanten bei 25 °C war in allen Fällen, mit Ausnahme der Mutante RK 3, die auf Festmedium etwas kleinere Kolonien bildete, vergleichbar. Bezüglich der anderen Phänotypen zeigten sich zum Teil deutliche Unterschiede. Es ist auffällig, dass die Mutanten RK 3 und RK 4, welche keine Mutationen in den IRA Elementen enthielten, im Vergleich mit den Mutanten, welche Mutationen der Klasse 2 enthielten, alle Phänotypen der RMA am schwächsten supprimierten. Besonders interessant ist jedoch, dass Mutanten, welche einen bestimmten Phänotyp im Vergleich mit anderen Mutanten am stärksten supprimierten, bezüglich eines anderen Phänotyps nicht notwendigerweise auch die stärkste Suppression zeigten. Die Mutante RS 7 ist z. B. ein schwacher Suppressor des OmpA Exportdefektes, zeigt jedoch im Vergleich mit den anderen Mutanten eine relativ starke Suppression des Sporulations- und Kompetenzdefektes. Dagegen supprimiert die Mutante RS 3 im Vergleich mit den anderen Mutanten den OmpA Exportdefekt am stärksten, ist jedoch bezüglich des Sporulationsdefektes nicht der stärkste Suppressor.

Diese Beobachtung zeigt sehr klar, dass nicht nur die Art der SecA Mutation entscheidend für die Stärke der Suppression ist. Auch die Art des Vorläuferproteins trägt in gleichwertiger Weise dazu bei, mit welcher Effizienz eine Membrantranslokation erfolgt. Diese Beobachtung unterstreicht, dass das Vorläuferprotein innerhalb des Translokations-Initiationskomplexes mit SecA und SecY ein gleichberechtigter Wechselwirkungspartner ist.

Die Ergebnisse der Analyse der Phänotypen der Suppressormutanten sind im Folgenden in Bezug auf die verschiedenen SecA Mutationen zusammengefasst.

1. Obwohl die Selektion der Suppressormutanten darauf beruhte, möglicherweise nur ein für das Wachstum bzw. für die Sporulation essentielles Protein besser zu exportieren, führten die Mutationen zu einer generellen Verbesserung des Proteinexports im Vergleich zur RMA, wobei im Besonderen auch das fremde OmpA wieder als Exportsubstrat akzeptiert wurde. Das deutet darauf hin, dass die Qualitätskontrolle, d. h. die ursprünglich hohe Selektivität der Translokase der RMA, aufgrund der Mutationen wieder herabgesetzt wurde.
2. Die verschiedenen Mutationen im SecA von *S. carnosus* bewirken eine unterschiedliche Stärke der Suppression. Es ist die Tendenz erkennbar, dass durch die Mutationen, die im IRA 2 Element lokalisiert sind, die Defekte der RMA am stärksten supprimiert werden.
3. Der Vergleich der Mutationen im *S. carnosus* SecA mit bekannten Mutationen im SecA von *E. coli* deutet stark darauf hin, dass die herabgesetzte Qualitätskontrolle durch eine erhöhte basale ATPase Aktivität des SecA Proteins und/oder durch optimierte SecA-SecY Wechselwirkungen bewirkt wird.

3.3. Charakterisierung von Mutationen im SecA von *B. subtilis*

Im ersten Teil der Arbeit konnte die RMA als artifizielles genetisches System genutzt werden, um Mutationen zu identifizieren, welche die Qualitätskontrolle der Translokase der RMA herabsetzen. Insgesamt wurden sieben verschiedene Mutationen im SecA Protein von *S. carnosus* identifiziert, welche sich positiv auf die Translokation eines heterologen Proteins in den Suppressormutanten auswirkten. Da die RMA ein artifizielles System darstellt, wurde untersucht, ob sich die Mutationen auch auf das SecA Protein von *B. subtilis* übertragen lassen und im homologen Hintergrund, d. h. im *B. subtilis* Wildtyp, ebenfalls einen positiven Effekt auf die Proteintranslokation haben. Dies wäre vor allem unter biotechnologischen Aspekten interessant, da solche veränderten *B. subtilis* Stämme als mögliche Wirtsorganismen für eine verbesserte sekretorische Gewinnung heterologer Problemproteine, welche im *B. subtilis* Wildtyp nur schlecht über die Cytoplasmamembran transportiert werden, einsetzbar wären.

3.3.1. Transfer supprimierender Mutationen aus dem *S. carnosus* SecA in das *B. subtilis* SecA

Zunächst wurde eine Auswahl der Mutationen getroffen, welche für eine Umsetzung besonders geeignet wären. Hierzu wurde anhand des SecA Alignments ermittelt, welche Aminosäurereste, die im *S. carnosus* SecA der Suppressormutanten verändert wurden, an der entsprechenden Position im *B. subtilis* SecA vorhanden sind. Sechs Aminosäuren, welche im SecA Protein der Suppressormutanten verändert wurden, traten auch an den entsprechenden Positionen im SecA Protein von *B. subtilis* auf (siehe Abb. 7). Vier dieser Aminosäuren liegen im IRA 2 Element, eine im Bereich der NBS 1 und eine im IRA 1 Element. Die Mutationen im IRA 2 Element vom *S. carnosus* SecA führten in den Suppressormutanten in den meisten Fällen zu einer starken Suppression der Phänotypen der RMA. Zudem entsprechen die Positionen der Mutationen im *S. carnosus* SecA den Positionen der Mutationen im *E. coli* SecA, welche die Translokationsdefekte der SecY Mutante *secY205* supprimierten. Aus den Untersuchungen der SecA Mutanten von *E. coli* konnte zusätzlich geschlossen werden, dass die IRA 2 Mutationen im *S. carnosus* SecA sehr wahrscheinlich die basale ATPase Aktivität des SecA Proteins erhöhen, d. h. eine grundlegende Eigenschaft des SecA Proteins selbst verändern. Ein vergleichbarer Mechanismus der Suppression wurde auch für die Mutation im IRA 1 Element angenommen. Aus diesen Gründen wurden die Mutationen H470Q, A474V, A493V, D537A (Mutationen im IRA 2 Element) und D734V (Mutation im IRA 1 Element) für die Umsetzung ausgewählt. Die entsprechenden Aminosäureaustausche im *B. subtilis* SecA sind H464Q, A468V, A487V, D531A und D729V (Abb. 17).

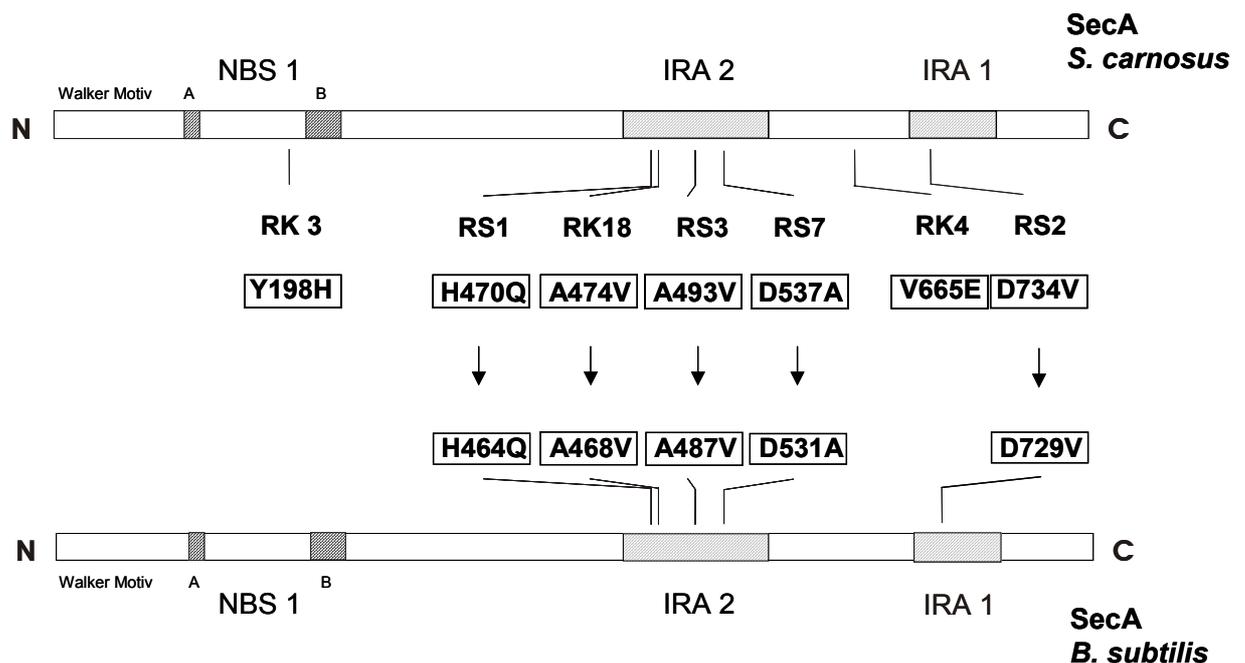


ABBILDUNG 17. Übertragung von supprimierenden Mutationen, welche im *S. carnosus* SecA identifiziert wurden, auf die entsprechenden Positionen im SecA von *B. subtilis*. Die SecA Proteine von *S. carnosus* und *B. subtilis* sind linear dargestellt. Eingezeichnet sind die durch Selektion erhaltenen supprimierenden Mutationen im *S. carnosus* SecA. Mutationen im IRA 1 und IRA 2 Element des *S. carnosus* SecA wurden durch ortsgerechte Mutagenese des *B. subtilis* secA Gens einzeln auf die korrespondierenden Aminosäurepositionen im *B. subtilis* SecA übertragen. N und C geben den N- bzw. C-Terminus der jeweiligen SecA Proteine an.

Die Mutationen wurden wie folgt in das *B. subtilis* secA Gen eingefügt (Abb. 18). Durch ortsgerechte Mutagenese unter Verwendung der entsprechenden Primerpaare (vgl. Material und Methoden Tab. 3) wurden die Mutationen einzeln in das *B. subtilis* secA Gen eingefügt, welches auf dem Plasmid pMKL40 vorlag. Durch Sequenzierung wurde sichergestellt, dass nur die gewünschte Mutation im secA Gen enthalten war. Nach Restriktionsverdau des mutagenisierten Plasmids pMKL40 mit *Sna*BI und *Sph*I wurde ein 1,87 kb großes secA Fragment isoliert, welches die jeweilige gewünschte Mutation enthielt. Das Plasmid pWMKL1, auf welchem das *B. subtilis* Wildtyp secA Gen vorlag, wurde ebenfalls mit *Sna*BI und *Sph*I verdaut und das 1,87 kb Wildtyp secA Fragment gegen das 1,87 kb große secA Fragment, welches die eingefügte Mutation enthielt, ausgetauscht. Durch diesen Fragmentaustausch sollte das sequenzierte secA Fragment in ein Plasmid umgesetzt werden, welches nicht für die PCR Reaktion eingesetzt wurde, um unerwünschte Mutationen, z. B. in regulatorischen Elementen, auszuschließen. Die veränderten *B. subtilis*

secA Allele lagen nun auf den Plasmiden [pWBSA_x] (x steht für die Position der veränderten *B. subtilis* SecA Proteine SecA 464, SecA 468, SecA 487, SecA 531 und *secA* 729) unter der Kontrolle des mit Xylose induzierbaren Promotors P_{xyIA} vor.

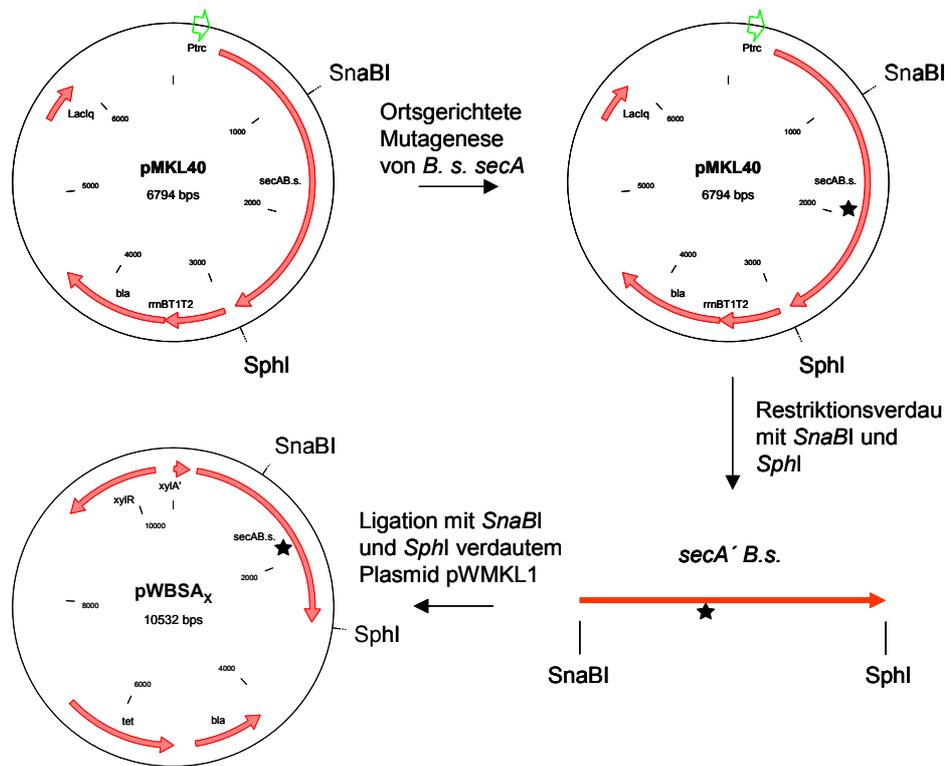


ABBILDUNG 18. Schema der Konstruktion der Plasmide [pWBSA_x]. x steht für eine der Aminosäurepositionen 464, 468, 487, 531, bzw. 729, welche durch ortsgerechte Mutagenese des *B. subtilis* *secA* Gens ausgehend von Plasmid pMKL40 verändert wurden. *bla*: β -Laktamase; *tet*: Tetrazyklin Resistenzgen; *xyIA'*: mit Xylose induzierbarer Promotor der Xylose Isomerase; *xyIR*: Repressorgen des Xylose Operons aus *Bacillus megaterium*; *lacI^q*: lac Repressor; *P_{trc}*: *trc* Promotor/lac Operator; *rrnB*: Transkriptions-Terminator. Der Stern stellt symbolisch die eingefügte Mutation dar.

3.3.2. Die mutierten *B. subtilis* SecA Proteine sind translokationsaktiv

Um zu untersuchen, ob die *B. subtilis* SecA Proteine auch nach Einfügen der Mutationen weiterhin funktionell sind, wurde überprüft, ob durch Expression der veränderten *B. subtilis* *secA* Gene der Wachstumsdefekt der temperatursensitiven *B. subtilis* *secA* Mutante NIG1152 bei der nicht permissiven Temperatur komplementiert werden kann. Die Mutante NIG1152 ist aufgrund eines Aminosäureaustausches von Prolin zu Leucin an Position 431 im

SecA bei 42 °C nicht lebensfähig, da das SecA Protein bei dieser Temperatur sehr schnell abgebaut wird (Takamatsu *et al.*, 1994). Bei 30 °C ist das SecA Protein stabil und ermöglicht das Wachstum dieser Mutante. Wie in Tabelle 13 dargestellt, zeigte die Mutante NIG1152 bei 42 °C in Gegenwart des Leervektors pWH1520 kein Wachstum. Der Wachstumsdefekt wurde durch Induktion der Expression des *B. subtilis* Wildtyp *secA* Gens komplementiert. Auch durch Induktion der Expression aller veränderten *B. subtilis secA Gene* wurde der Wachstumsdefekt der Mutante NIG1152 bei 42 °C komplementiert. Die Beobachtung, dass auch in Gegenwart von Glukose, d. h. bei Repression der *secA* Expression ein Wachstum der Mutante möglich war, ist auf eine basale SecA Expression auch unter nicht induzierten Bedingungen zurückzuführen. Da die Proteintranslokation für das Wachstum essentiell ist, zeigte dieser Versuch, dass alle veränderten *B. subtilis* SecA Proteine weiterhin translokationsaktiv sind. Das bedeutet, dass die veränderten SecA Proteine einen funktionellen Komplex mit SecY und allen essentiellen Vorläuferproteinen an der Cytoplasmamembran ausbilden können.

TABELLE 13. Wachstumskomplementation der *B. subtilis secA* Mutante NIG1152

Plasmid	SecA	30 °C		42 °C	
		Glu	Xyl	Glu	Xyl
pWH1520	-	+	+	-	-
pWMKL1	<i>B.s.</i> WT	+	+	+	+
pWBSA464	H464Q	+	+	+	+
pWBSA468	A468V	+	+	+	+
pWBSA487	A487V	+	+	+	+
pWBSA531	D531A	+	+	+	+
pWBSA729	D729V	+	+	+	+

Zellen von *B. subtilis* NIG1152, welche die angegebenen Plasmide enthielten, wurden auf LB Agarplatten mit 0,5 % Glukose bzw. 0,5 % Xylose ausgestrichen und bei der permissiven Temperatur (30 °C) bzw. der nicht permissiven Temperatur (42 °C) inkubiert. *B.s.* WT: *B. subtilis* Wildtyp

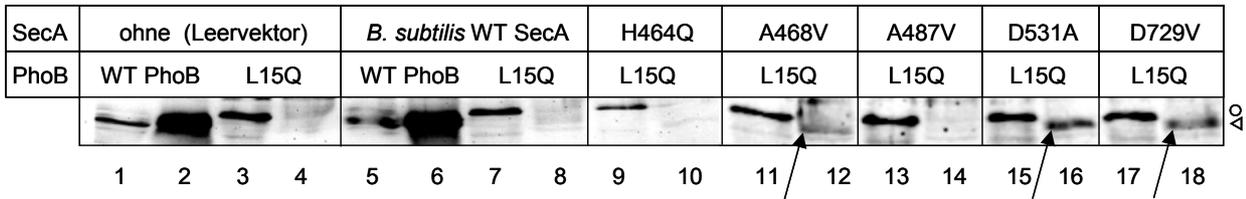
3.3.3. Die veränderten *B. subtilis* SecA Proteine stellen den Translokationsdefekt eines Vorläuferproteins mit defekter Signalsequenz wieder her

Um zu untersuchen, ob durch Expression der veränderten *B. subtilis* SecA Proteine der Export eines Vorläuferproteins verbessert werden kann, wurde als Modellprotein eine Variante der alkalische Phosphatase PhoB von *B. subtilis* verwendet. In dieser Variante (PhoBL15Q) wurde in der Signalsequenz die Aminosäure Leucin an Position –19 relativ zur Spaltstelle der Signalpeptidase gegen Glutamin ausgetauscht. In Folge dieses Austausches wird PhoBL15Q im *B. subtilis* Wildtyp nur noch schlecht über die Membran transloziert.

Zur Untersuchung des PhoB Exports wurde *B. subtilis* Wildtyp DB 104 mit den Plasmiden [pCU3phoB] bzw. [pCU3phoBL15Q] transformiert. Diese enthalten die Gene, welche für das Wildtyp PhoB bzw. PhoBL15Q kodieren, unter der Kontrolle des mit IPTG induzierbaren Bakteriophagen T5 Promotors P_{N25} und des *lac* Operators. Die gleichzeitige Expression der verschiedenen *B. subtilis* SecA Proteine erfolgte von den Plasmiden [pWBSA_x]. Die Stämme wurden in LB Medium in Gegenwart von 0,6 mM KH₂PO₄ kultiviert, um die Expression des chromosomal kodierten PhoB zu reprimieren. Die Expression der plasmidkodierten PhoB Varianten und der verschiedenen SecA Proteine wurde mit 0,5 mM IPTG bzw. 0,2 % Xylose für 4 Stunden co-induziert. Durch Western-Blot Analyse wurde die Verteilung der *phoB* Genprodukte in Zellextrakten und Kulturüberständen in Abhängigkeit von der Expression der verschiedenen SecA Proteine untersucht (Abb. 19).

A

+ Xylose



B

- Xylose

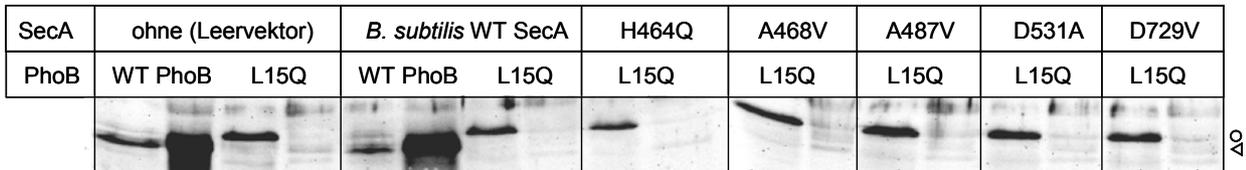


ABBILDUNG 19. Nachweis der *phoB* Genprodukte in Zellextrakten (Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17) und Kulturüberständen (Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18) von *B. subtilis* DB 104 bei Expression der mutierten SecA Proteine. Die Stämme, welche die Plasmide, kodierend für die angegebenen SecA Proteine bzw. die verschiedenen PhoB Proteine enthielten, wurden in LB Medium in Gegenwart von 10 µg/ml Chloramphenicol und 10 µg/ml Tetrazyklin, sowie 0,5 mM IPTG, 0,6 mM KH₂PO₄ vier Stunden bei 37 °C inkubiert. **A.** Zur Induktion der *secA* Expression wurde das Medium zusätzlich mit 0,2 % Xylose versetzt. **B.** Zur Repression der *secA* Expression wurden die Stämme in Abwesenheit von Xylose kultiviert. Die Proteine der Zellextrakte und der Kulturüberstände wurden in einem 12,5 %igen SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und die *phoB* Genprodukte durch Western Blot Analyse unter Verwendung des ECL Western Blotting Analysis Systems (Amersham) mit PhoB spezifischen Antikörpern nachgewiesen. (○) PhoB Vorläuferprotein; (▷) reifes PhoB. Die aufgetragenen Proteinmengen wurden entsprechend der Zellzahl (OD₆₀₀) der Ausgangskulturen normiert. Das Probenvolumen der Zellextrakte entsprach einer OD = 0,1, das Probenvolumen der Kulturüberstände entsprach einer OD = 1.

Wie in Abbildung 19 A gezeigt, waren bei den Stämmen, welche das Wildtyp PhoB exprimierten und zusätzlich den Leervektor [pWH1520] oder das Plasmid [pWMKL1] enthielten, große Mengen des reifen PhoB Proteins im Kulturüberstand nachweisbar. Das Wildtyp PhoB Vorläuferprotein wird somit effizient über die Cytoplasmamembran transloziert und das reife PhoB in den Kulturüberstand sekretiert (Spuren 2 und 6). In den Zellfraktion (Spuren 1 und 5) waren ebenfalls geringe Mengen des reifen PhoB nachweisbar, wobei es sich sehr wahrscheinlich um prozessiertes Protein, welches noch membran- bzw. zellwandassoziiert vorlag, handelte. Dagegen waren bei Expression von PhoBL15Q in dem Stamm, welcher zusätzlich den Leervektor [pWH1520] enthielt, nur sehr geringe Mengen des reifen PhoB im Kulturüberstand nachweisbar, während das Vorläuferprotein in den Zellen akkumulierte (Spuren 3 und 4). Dies verdeutlicht, dass die *B. subtilis* Wildtyptranslokase das veränderte PhoB nur noch sehr schlecht als Exportsubstrat akzeptiert und demzufolge sehr ineffizient transloziert. Auch durch die Überexpression des *B. subtilis* Wildtyp *secA* Gens vom Plasmid [pWMKL1] wurde der Export des defekten Vorläuferproteins nicht verbessert (vgl. Spuren 7 und 8 mit Spuren 3 und 4). Eine erhöhte Menge des SecA Proteins alleine konnte den Exportdefekt von PhoBL15Q somit nicht kompensieren. Die Expression von zwei der fünf veränderten SecA Proteine (SecA H464Q und SecA A487V) führte ebenfalls zu keiner Verbesserung des Exports von PhoBL15Q. Deutlich erhöhte Mengen an reifem PhoB wurden dagegen bei Expression der drei anderen veränderten SecA Proteine (SecA A468V, SecA D531A und SecA D729V) im Kulturüberstand nachgewiesen (Spuren 12, 16 und 18, die entsprechenden Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet). Dieser Effekt ist, wie in Abbildung 19 B gezeigt, von der Induktion der Expression der veränderten *secA* Gene abhängig.

Somit konnten tatsächlich in drei Fällen Mutationen aus dem *S. carnosus* *secA*, welche in den Suppressormutanten der RMA zu einer Herabsetzung der Qualitätskontrolle führen, auf die entsprechenden Positionen im *B. subtilis* SecA übertragen werden, wodurch ein positiver Effekt auf die Proteintranslokation auch im *B. subtilis* Wildtyp erreicht wurde. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Funktion dieser Aminosäuren bei der Qualitätskontrolle durch das SecA Protein von *S. carnosus* und von *B. subtilis* konserviert ist.

3.3.4. Kombination von Mutationen im *B. subtilis* SecA

Die drei Einzelmutationen A468V, D531A und D729V im SecA Protein von *B. subtilis* führten zu einer verbesserten Translokation des defekten Vorläuferproteins PhoBL15Q. Im Weiteren wurde untersucht, ob durch eine Kombination dieser Einzelmutationen im SecA Protein von *B. subtilis* der Export des defekten Vorläuferproteins noch weiter verbessert werden kann (Abb. 20).

Um die Mutationen im SecA Protein zu kombinieren, wurden die Plasmide [pWBSA468] und [pWBSA729] verwendet, welche bereits die *secA* Allele mit der Einzelmutation A468V bzw. D729V enthielten. Durch ortsgerichtete Mutagenese der einfach mutierten *secA* Gene wurde die gewünschte zweite Mutation unter Verwendung der entsprechenden Primer hinzugefügt. So entstanden die Kombinationen SecA A1 (Kombination der Mutationen **A468V** und D531A), SecA A2 (Kombination der Mutationen A468V und **D729V**), sowie SecA A3 (Kombination der Mutationen D531A und **D729V**). Hervorgehoben sind die Austausche, die bereits plasmidkodiert im *B. subtilis* SecA vorlagen. Daraus resultierten die Plasmide pWBSAA1, pWBSAA2 und pWBSAA3, welche die *secA* Allele unter der Kontrolle des mit Xylose induzierbaren Promotors P_{xyIA} enthielten. Alle mutierten *secA* Gene wurden durch Sequenzierung überprüft.

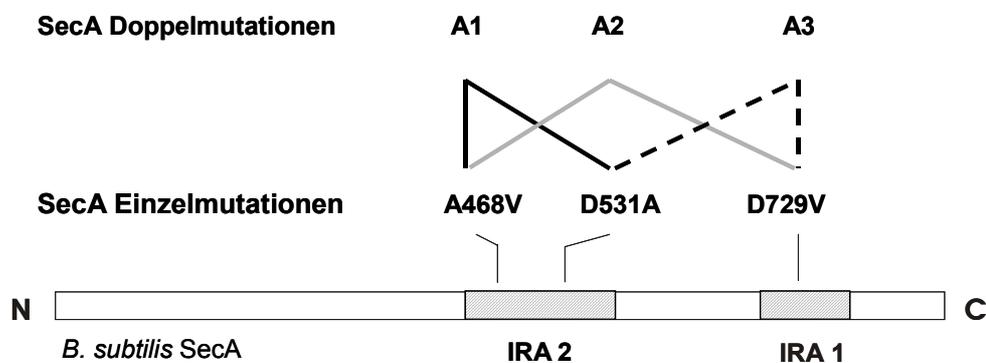


ABBILDUNG 20. Kombination von Mutationen im *B. subtilis* SecA Protein. Die Mutationen, welche als Einzelmutationen den Export von PhoBL15Q im *B. subtilis* Wildtyp verbesserten, wurden systematisch kombiniert.

3.3.5. Die SecA Proteine mit den Doppelmutationen sind translokationsaktiv

Die Translokationsaktivität der doppelt mutierten SecA Proteine wurde in der Mutante *B. subtilis* 168 [pMUTIN4*secA*] [pMAP65] untersucht. In dieser Mutante wurde das chromosomale *secA* Gen mit Hilfe des Integrationsvektors [pMUTIN4] (Vagnet *et al.*, 1998) unter die Kontrolle des mit IPTG induzierbaren P_{spac} Promotors gebracht. Zusätzlich wird in diesem Stamm der *lac* Repressor vom Plasmid [pMAP65] konstitutiv exprimiert. Daher wird in Abwesenheit von IPTG die Expression des chromosomalen *secA* so stark reprimiert, dass ein Wachstum unter diesen Bedingungen nicht möglich ist (R. Williams, persönliche Mitteilung). Die Funktionalität der doppelt mutierten SecA Proteine konnte somit in einem Hintergrund, welcher frei von chromosomal kodiertem SecA ist, charakterisiert werden. *B. subtilis* 186 [pMUTIN4*secA*] [pMAP65] wurde mit den Plasmiden, welche die *secA* Allele

mit den Doppelmutationen enthielten, transformiert. Die Translokationsaktivität der doppelt mutierten SecA Proteine wurde überprüft, indem die Fähigkeit der Stämme, in Abwesenheit von IPTG und bei Expression der plasmidkodierten SecA Proteine auf Agarplatten Kolonien zu bilden, untersucht wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

TABELLE 14. Wachstumskomplementation von *B. subtilis* 168 [pMUTIN4secA]/[pMA65]

Plasmid	SecA	- IPTG		+ IPTG	
		- Xyl	+ Xyl	- Xyl	+ Xyl
pWH1520	-	-	-	+	+
pWMKL1	B. s. WT	-	+	+	+
pWBSAA1	A468V, D531A	-	+	+	+
pWBSAA2	A468V, D729V	-	+	+	+
pWBSAA3	D531A, D729V	-	+	+	+

Zellen von *B. subtilis* 168 [pMUTIN4secA]/[pMAP65], welche die angegebenen Plasmide enthielten, wurden auf LB Agarplatten mit 0,3 µg/ml Erythromycin, 10 µg/ml Tetrazyklin und 15 µg/ml Kanamycin ausplattiert und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Induktion der Expression des chromosomal kodierten SecA erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG. Zur Induktion der Expression der plasmidkodierten SecA Proteine wurde den Agarplatten 0,5 % Xylose zugesetzt. B.s. WT: *B. subtilis* Wildtyp

Die Wachstumsversuche zeigten, dass der Stamm, welcher den Leervektor [pWH1520] enthielt, in Abwesenheit von IPTG nicht wachsen konnte. Das Wachstum wurde aber durch Induktion der Expression des Wildtyp SecA Proteins wiederhergestellt. Auch die Induktion der Expression der doppelt mutierten SecA Proteine führte in allen Fällen zur Wiederherstellung des Wachstum der *B. subtilis* secA Mutante in Abwesenheit von IPTG. Dieser Versuch zeigte somit, dass alle drei *B. subtilis* SecA Proteine auch nach Einfügen der zweiten Mutation translokationsaktiv sind.

3.3.6. Die *B. subtilis* SecA Proteine mit den Doppelmutationen sind stabil

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass durch Einfügen der zweiten Mutation die Stabilität der veränderten *B. subtilis* SecA Proteine beeinträchtigt wurde, was sich möglicherweise negativ auf den Export von PhoB L15Q auswirken könnte, wurde im Western-Blot die Expression sowie die Stabilität der verschiedenen SecA Proteine untersucht (Abb. 21).

Unter nicht induzierten Bedingungen war eine schwache Bande, die dem chromosomal kodierten *B. subtilis* SecA entspricht, nachweisbar. Unter induzierten Bedingungen war die

SecA Menge in allen Stämmen deutlich erhöht. Die Menge der verschiedenen SecA Proteine war zudem in allen Stämmen vergleichbar.

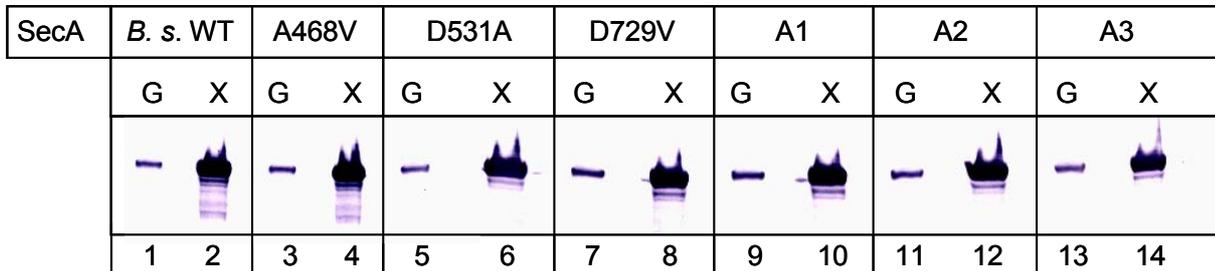


ABBILDUNG 21. Nachweis der Expression der veränderten *B. subtilis* SecA Proteine in *B. subtilis* DB 104. Zur Induktion der SecA Expression wurden die Zellen in Gegenwart von 0,2 % Xylose (X), zur Repression der SecA Expression in Gegenwart von 0,2 % Glukose (G) vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Proteine aus Gesamtzellextrakten wurden im 10 %igen SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und die SecA Proteine durch Western Blot Analyse unter Verwendung von anti-*B. subtilis* SecA Antikörpern nachgewiesen.

Abbildung 21 zeigt deutlich, dass auch nach Einfügen der zweiten Mutationen ausschließlich eine Bande, welche dem vollständigen SecA entsprach, nachgewiesen wurde. Die schwachen Banden unterhalb der Banden, die dem *B. subtilis* Wildtyp SecA (Spur 2) und dem SecA A468V (Spur 4) entsprechen sind höchstwahrscheinlich auf einen geringfügigen proteolytischen Abbau aufgrund der SecA Überproduktion zurückzuführen. Dieses Ergebnis zeigt somit, dass die SecA Stabilität auch nach Einfügen der zweiten Mutationen nicht beeinträchtigt war.

3.3.7. Die Kombination von Mutationen im *B. subtilis* SecA führt zu keiner weiteren Verbesserung des Exports eines defekten Vorläuferproteins

Um zu untersuchen, ob die doppelt mutierten SecA Proteine den Export des defekten Vorläuferproteins PhoB L15Q im Vergleich zu den einfach mutierten SecA Proteinen weiter verbessern können, wurden die Stämme *B. subtilis* DB 104 [pCU3phoB] bzw. [pCU3phoBL15Q] zusätzlich mit den Plasmiden transformiert, welche für die SecA Proteine mit den Doppelmutationen kodierten. Die Fähigkeit der Stämme, die PhoB Varianten zu exportieren, wurde mittels Western-Blot analysiert (Abb. 22).

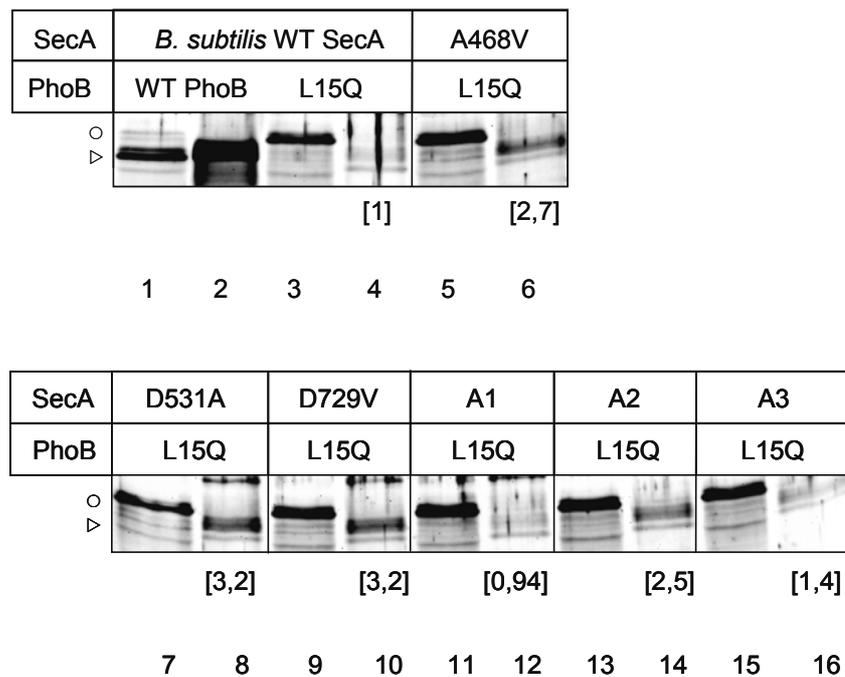


ABBILDUNG 22. Nachweis der *phoB* Genprodukte in Zellextrakten (Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15) und Kulturüberständen (Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16) von *B. subtilis* DB 104 bei Expression der mutierten SecA Proteine. Die Stämme enthielten Plasmide kodierend für die angegebenen SecA Proteine bzw. die verschiedenen PhoB Proteine. Die Stämme wurden in LB Medium in Gegenwart 10 µg/ml Chloramphenicol und 10 µg/ml Tetrazyklin, sowie 0,5 mM IPTG, 0,6 mM KH₂PO₄ und 0,2 % Xylose vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Proteine der Zellextrakte und der Kulturüberstände wurden in einem 12,5 %igen SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und die *phoB* Genprodukte durch Western Blot Analyse unter Verwendung des ECL Western Blotting Analysis Systems (Amersham) mit PhoB spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Werte in Klammern geben die relative Menge des reifen PhoB im Kulturüberstand an. Die aufgetragenen Proteinmengen wurden entsprechend der Zellzahl (OD₆₀₀) der Ausgangskulturen normiert. Die Proteinmenge der Zellextrakte entsprach einer OD = 0,1. Die Proteinmenge der Kulturüberstände entsprach einer OD = 1. (○) PhoB Vorläufer; (▷) reifes PhoB

Wie bereits in Abbildung 19 beobachtet, führte die Überproduktion der SecA Proteine mit den Einzelmutationen (SecA A468V, SecA D531A und SecA D729V) reproduzierbar zu einem deutlich verbesserten Export des defekten Vorläuferproteins PhoBL15Q. Eine Quantifizierung der Intensitäten der Banden, die dem reifen PhoB im Überstand entsprechen, ergab, dass die Menge des sekretierten PhoB bei Überproduktion der einfach mutierten SecA Proteine um den Faktor 2,7 bis 3,2 höher lag als in dem Kontrollstamm, welcher das unveränderte *B. subtilis* Wildtyp SecA Protein enthielt (vgl. Spur 4 mit den Spuren 6, 8 und 10). Die Expression der SecA Proteine mit den Doppelmutationen führte jedoch zu keiner weiteren Erhöhung an reifem PhoB in den Kulturüberständen. In zwei Fällen, bei Expression von SecA A1 und SecA A3, waren sogar wieder deutlich geringere Mengen an reifem PhoB im Vergleich zu den Stämmen, welche die SecA Proteine mit

Einzelmutationen enthielten, vorhanden. Die Expression von SecA A3 führte zu einer 1,4 fachen Erhöhung der PhoB Menge (Spur 16), während bei Expression von SecA A1 die Menge des sekretierten PhoB auf das Niveau des Kontrollstammes zurückging (Spur 12). Bei Expression von SecA A2 war die Menge an reifem PhoB um den Faktor 2,5 erhöht. Bei Repression der SecA Expression ging die PhoB Menge in allen Stämmen nicht über das basale Niveau hinaus (nicht gezeigt). Diese Daten zeigen, dass sich eine Kombination der Einzelmutationen nicht additiv auf den Export des PhoBL15Q auswirkte. Stattdessen führte die Kombination der Einzelmutationen zu SecA Proteinen mit einer schlechteren Aktivität im Vergleich zu den SecA Proteinen mit den jeweiligen Einzelmutationen.

3.4. Charakterisierung von Mutationen im SecY von *B. subtilis*

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass Veränderungen im *B. subtilis* SecA Protein dazu führten, dass ein schlecht exportierbares Vorläuferprotein im *B. subtilis* Wildtyp wieder besser als Exportsubstrat akzeptiert wird. Das SecA Protein ist somit an der Qualitätskontrolle bei der Initiation der Translokation beteiligt. Für eine erfolgreiche Initiation der Translokation sind funktionelle Wechselwirkungen zwischen dem Vorläuferprotein, SecA und SecY erforderlich. Daher ist auch eine Beteiligung des SecY Proteins an der Qualitätskontrolle wahrscheinlich. In diesem Fall sollte das SecY Protein von *B. subtilis* als weiteres „Target“ für Veränderungen geeignet sein, um *B. subtilis* in Bezug auf den Export von schlecht translozierbaren heterologen Proteinen zu optimieren. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von A. Driessen (Universität Groningen) durchgeführt.

3.4.1. Daten zur *in vitro* Charakterisierung von Mutationen im SecY von *B. subtilis*

In der Arbeitsgruppe von A. Driessen wurden durch ortsgerichtete Mutagenese des *secY* Gens von *B. subtilis* Mutationen in das SecY eingefügt und die Fähigkeit der veränderten SecY Proteine, die Modellproteine OmpA und PhoB in Membranvesikel zu translozieren, *in vitro* untersucht. Um die Orte der Mutationen auszuwählen, wurde auf bekannte SecY Mutationen zurückgegriffen, welche bei der Selektion von Suppressormutanten der *B. subtilis* *secA* Mutante *secA12* erhalten wurden (Kobayashi *et al.*, 2000). Die Mutante *B. subtilis* *secA12* ist, vergleichbar mit der RMA, aufgrund einer Mutation im SecA Protein nicht in der Lage zu sporulieren. Suppressormutanten, welche die Fähigkeit zu sporulieren wiedererlangt haben, enthielten Mutationen im *secY* Gen. Die Mutationsorte entsprachen auf Proteinebene in einigen Fällen Orten von Mutationen im SecY von *E. coli*, die einen *prlA* Phänotyp bewirken, d.h. die den Export von Vorläuferproteinen mit defekter Signalsequenz wieder

ermöglichen. Aufgrund dieser Daten wurden in der Arbeitsgruppe von A. Driessen sechs der aus *B. subtilis* und *E. coli* bekannten Mutationen einzeln in das *secY* Gen von *B. subtilis* eingefügt. Die so veränderten SecY Proteine wurden mit SecE und SecG von *B. subtilis* in *E. coli* überproduziert und die *in vitro* Proteintranslokation in Vesikel der inneren Membran dieser Stämme untersucht. Drei SecY Mutationen waren für weitere Untersuchungen interessant, da diese die Translokationseigenschaften im Vergleich zu den Vesikeln, welche das *B. subtilis* Wildtyp SecYEG enthielten, veränderten. Diese drei Mutationen (G399R, L403R und I404N) veränderten Aminosäuren in der Transmembranhelix 10 des SecY Proteins (Abb. 23).

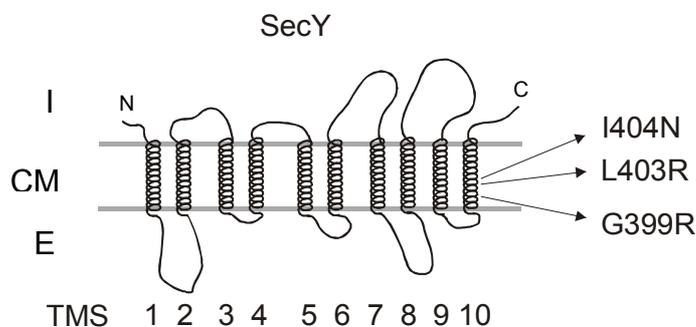


ABBILDUNG 23. Darstellung des SecY Proteins von *B. subtilis*. Angegeben sind die Aminosäureaustausche im Transmembransegment 10, welche durch ortsgerechte Mutagenese des *secY* Gens eingefügt wurden. I: intrazellulärer Raum; CM: Cytoplasmamembran; E: extrazellulärer Raum; TMS: Transmembransegment. N und C geben den N- bzw. den C- Terminus von SecY an.

Die Mutation L403R führte zu einem Austausch von Leucin zu Arginin an Position 403 und resultierte in einem inaktiven SecY Protein, welches *in vitro* keine Translokationsaktivität zeigte. Die Mutationen G399R und I404N, welche zu den Austauschen von Glycin zu Arginin an Position 399 bzw. von Isoleucin zu Asparagin an Position 404 führten, resultierten dagegen in einem verbesserten Transport des homologen PhoB Proteins in die Membranvesikel. Die Mutation G399R führte auch zu einer verbesserten *in vitro* Translokation des OmpA Proteins von *E. coli* (J. Swaving, persönliche Mitteilung). Demnach war es wahrscheinlich, dass es sich bei den Mutationen G399R und I404N um *prlA* Mutationen im SecY von *B. subtilis* handelte.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob durch Expression der veränderten SecY Proteine *in vivo* ein positiver Effekt auf die Proteintranslokation im *B. subtilis* Wildtyp erzielt werden kann.

3.4.2. Die veränderten SecY Proteine führen *in vivo* zu keiner Verbesserung der Translokation des OmpA Proteins.

Während in *E. coli* das OmpA Protein sehr schnell über die Cytoplasmamembran transloziert wird, verläuft die Membrantranslokation des OmpA Proteins in *B. subtilis* langsamer. Ein Grund hierfür könnte eine im Vergleich zu *E. coli* ineffizientere Initiation der Translokation des OmpA Proteins sein. Da die *in vitro* Untersuchungen der mutierten SecY Proteine von *B. subtilis* zeigten, dass die Mutation G399R zu einer erhöhten Translokationseffizienz des OmpA Proteins führte, wurde untersucht, ob auch *in vivo* die Translokation von OmpA in Gegenwart der SecY Proteine von *B. subtilis*, welche die möglichen *prfA* Mutationen enthielten, verbessert wurde.

Hierzu wurden die verschiedenen *secY* Allele, welche für das *B. subtilis* Wildtyp SecY bzw. SecY G399R, SecY L403R und SecY I404N kodierten, im Operon mit *secE* und *secG* von *B. subtilis* in den Expressionsvektor pWH1520 kloniert. Daraus resultierten die Plasmide pWHS1 (kodiert für das SecYEG von *B. subtilis* Wildtyp), pWHSM2 (kodiert für SecY^{G399R}EG), pWHSM3 (kodiert für SecY^{L403R}EG) und pWHSM5 (kodiert für SecY^{I404N}EG). Wachstumsversuche im *B. subtilis* Wildtypstamm DB 104 zeigten, dass die Synthese der Membranproteine unter Bedingungen niedriger Expressionsrate (Induktion der *secYEG* Expression mit 0,06 % Xylose) keinen toxischen Effekt auf das Wachstum hatte. In einem Pulse-Chase Experiment wurde der Export des OmpA Proteins, welches ebenfalls vom Plasmid exprimiert wurde, bei Coexpression der verschiedenen SecYEG Varianten untersucht (Abb. 24).

Die Untersuchungen zeigten, dass sowohl bei Coexpression des Wildtyp SecYEG als auch bei Coexpression der veränderten SecY Proteine die Prozessierung des OmpA Proteins mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit verläuft. In allen Stämmen lag der Anteil des OmpA Vorläuferproteins an der Summe aus dem OmpA Vorläufer und dem reifen OmpA 60 Sekunden nach Zugabe der Chase Lösung bei etwa 20 %. Nach drei Minuten war der OmpA Vorläufer in allen Stämmen nahezu vollständig prozessiert. Die mutierten SecY Protein hatten somit keinen Effekt auf den Export des OmpA Proteins *in vivo*. Das Ergebnis deutete darauf hin, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim OmpA Export nicht auf der Stufe der Initiation der Translokations liegt. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass das Wildtyp OmpA Protein als Modellprotein für die Untersuchung nicht optimal geeignet ist, da es in *B. subtilis* bereits relativ effizient über die Membran transloziert

wird. Demnach wäre das System nicht sensitiv genug, um eine möglicherweise geringe Verbesserung des Exports nachzuweisen. Daher wurde als zweites Modellprotein PhoBL15Q verwendet, welches im *B. subtilis* Wildtyp nur sehr schlecht exportiert wird.

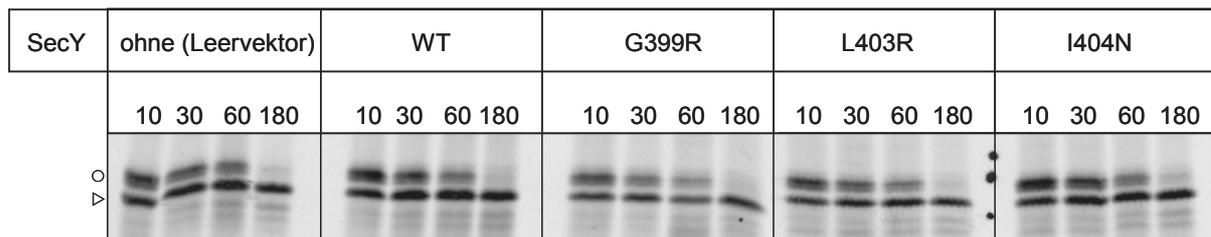


ABBILDUNG 24. Kinetik der Prozessierung des OmpA Vorläuferproteins in *B. subtilis* DB104 bei Expression der veränderten SecY Proteine. Die Stämme, welche das Plasmid [pCU3ompAkan] enthielten, wurden zusätzlich mit Plasmiden, auf denen die verschiedenen secY Allele im Operon mit secE und secG vorlagen, transformiert. Die Induktion der SecYEG Expression erfolgte bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,2 mit 0,06 % Xylose. 10 min vor der radioaktiven Markierung wurde die OmpA Expression mit 1 mM IPTG induziert. Die Markierung der Proteine erfolgte mit 100 µCi ³⁵S-Methionin für eine Minute. Nach Zugabe der Chase Lösung wurden Proben der Kulturen nach 10 sek., 30 sek., 60 sek. und 180 sek. entnommen und wie unter Material und Methoden Kapitel 2.6.5. beschrieben, bearbeitet. (○) OmpA Vorläufer; (▷) reifes OmpA

3.4.3. Die veränderten *B. subtilis* SecY Proteine erlauben eine verbesserte Translokation eines Vorläuferproteins mit defekter Signalsequenz.

Der Export von PhoBL15Q in *B. subtilis* wurde bei Coexpression von SecY G399R, SecY L403R und SecY I404N untersucht. Proteine aus den Kulturüberständen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das reife PhoB in durch Western-Blot Analyse nachgewiesen (Abb. 25).

Bei Expression des Wildtyp PhoB wurden in dem Stamm, welcher zusätzlich den Leervektor [pWH1520] enthielt bzw. in welchem das *B. subtilis* Wildtyp SecY coexprimiert wurde, große Mengen des reifen PhoB Proteins im Kulturüberstand nachgewiesen (Spuren 1 und 3). Dagegen wurden bei Expression von PhoBL15Q in Gegenwart des Leervektors [pWH1520] erwartungsgemäß nur geringe Mengen des reifen Proteins detektiert (Spur 2). Die Coexpression des *B. subtilis* Wildtyp SecYEG führte zu keiner Verbesserung des Exports

des mutierten Vorläuferproteins (Spur 4). Dieser Befund zeigt, dass alleine die Erhöhung der Anzahl der SecYEG Komplexe den Exportdefekt von PhoBL15Q nicht kompensiert. Bei Coexpression von SecY L403R, welches *in vitro* keine Translokationsaktivität zeigte, war die Menge des reifen PhoB im Kulturüberstand im Vergleich zum Kontrollstamm unverändert (vgl. Spuren 4 und 6). Im Gegensatz dazu führte die Coexpression von SecY G399R und SecY I404N tatsächlich zu signifikant erhöhten Mengen des reifen PhoB im Kulturüberstand im Vergleich zum Kontrollstamm, in welchem das *B. subtilis* Wildtyp SecY coexprimiert wurde (vgl. Spuren 5 und 7 mit Spur 4).

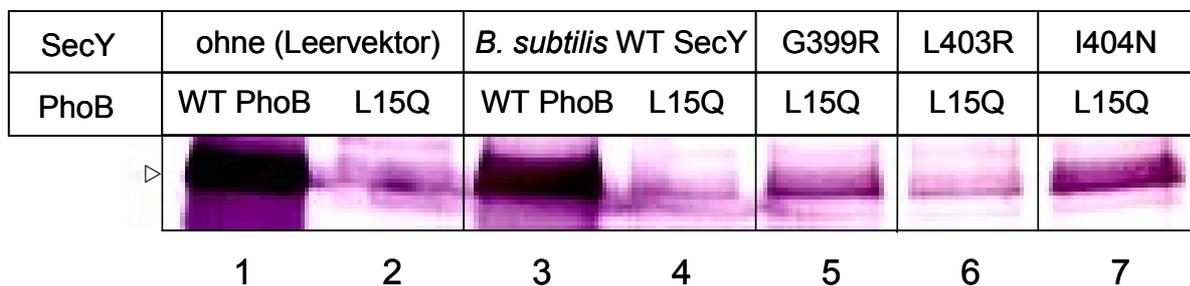


ABBILDUNG 25. Nachweis der *phoB* Genprodukte in Kulturüberständen von *B. subtilis* DB 104 in Gegenwart der verschiedenen SecY Proteine. Die Stämme, welche die Plasmid [pCU3phoB] bzw. [pCU3phoBL15Q] enthielten, wurden zusätzlich mit Plasmiden, auf denen die verschiedenen *secY* Allele im Operon mit *secE* und *secG* vorlagen, transformiert. Die Stämme wurden in LB Medium in Gegenwart von 10 µg/ml Chloramphenicol und 10 µg/ml Tetrazyklin, sowie 0,5 mM IPTG, 0,6 mM KH₂PO₄ und 0,06 % Xylose vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Proteine aus den Kulturüberständen wurden in einem 12,5 %igen SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und die *phoB* Genprodukte durch Western-Blot Analyse unter Verwendung PhoB spezifischer Antikörper nachgewiesen. Die aufgetragenen Proteinmengen wurden entsprechend der Zellzahl (OD₆₀₀) der Ausgangskulturen auf eine OD = 1 normiert. (▷) reifes PhoB

Die Untersuchungen zeigten somit, dass auch durch Veränderungen im SecY Protein von *B. subtilis* der Export eines schlecht translozierbaren Vorläuferproteins verbessert werden kann. Die Daten lassen daher den Schluss zu, dass auch das SecY Protein von *B. subtilis* an der Qualitätskontrolle bei der Proteintranslokation beteiligt ist und, wie auch beim SecA beobachtet, Veränderungen in dieser Komponente dazu führen können, dass die Selektivität der Translokase herabgesetzt wird.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine *B. subtilis* SecA-Austauschmutante (RMA) als neues genetisches System genutzt, um Mechanismen zu identifizieren, welche der Qualitätskontrolle durch die bakterielle Sec-Translokase bei der Proteintranslokation unterliegen. In der RMA wurde das *secA* Gen von *B. subtilis* auf dem Chromosom gegen das *secA* Gen von *S. carnosus* ausgetauscht. In Folge dieses SecA Austausches zeigt die RMA pleiotrope Exportdefekte. Diese resultieren in einem Wachstumsdefekt bei niedriger Temperatur, sowie in Defekten bei der Sporenbildung und der Ausbildung natürlicher Kompetenz. Zudem wird in der RMA ein heterologes Protein (das OmpA Protein von *E. coli*) selbst bei der für die RMA permissiven Temperatur selektiv vom Export ausgeschlossen. Zurückzuführen sind diese Defekte auf eine, durch den SecA Austausch ausgelöste, erhöhte Qualitätskontrolle der Translokase der RMA, die im Besonderen dazu führt, dass ein heterologes Protein nicht mehr als Exportsubstrat akzeptiert wird.

Unter Ausnutzung der Phänotypen der RMA wurden Mutationen im SecA Protein von *S. carnosus* identifiziert, welche die Qualitätskontrolle der Translokase herabsetzen. Das kältesensitive Wachstum der RMA wurde genutzt, um Mutanten zu selektionieren, die wieder bei niedriger Temperatur wachsen konnten. Weiterhin wurde der Sporulationsdefekt der RMA ausgenutzt, um Mutanten mit verbesserter Sporulationsfähigkeit zu selektionieren.

Die Charakterisierung von sieben unterschiedlichen Suppressormutanten zeigte, dass durch die *secA* Mutationen nicht nur der jeweilige Phänotyp (das kältesensitive Wachstum bzw. der Sporulationsdefekt), auf dessen Wiederherstellung selektioniert wurde, supprimiert wurde, sondern auch die jeweiligen anderen Defekte der RMA. Die Mutanten zeigten eine Suppression des Kompetenzdefektes, des Exportdefektes der preproLipase bei 25 °C und sogar eine Suppression des OmpA Exportdefektes bei 37 °C. Die Suppression basierte somit nicht auf einer spezifischen Wiederherstellung des Exports von für das Wachstum bzw. für die Sporulation essentiellen Vorläuferproteinen, sondern auf einer generell herabgesetzten Selektivität der Translokase. Diese führte dazu, dass selbst das heterologe OmpA Protein wieder als Exportsubstrat akzeptiert wurde.

Sieben verschiedene Allele des *S. carnosus secA* Gens wurden identifiziert, die zu einem supprimierenden Phänotyp führten. Die Mutationen wurden aufgrund ihrer Position in funktionell unterschiedlichen Bereichen des SecA Proteins in drei Klassen unterteilt. Zur Klasse 1 wurde eine Mutation im Bereich des Walker-Motivs B der Nukleotidbindestelle 1 (NBS 1) gezählt. Insgesamt fünf Mutationen wurden in den Bereichen der intramolekularen

Regulatoren der ATP Hydrolyse 1 und 2 (IRA 1 und IRA 2) identifiziert, wobei vier dieser Mutationen im IRA 2 Element auftraten. Die Mutationen in den beiden IRA Elementen wurden zu den Mutationen der Klasse 2 zusammengefasst. Eine Mutation lag im Bereich zwischen den beiden IRA Elementen und wurde als Mutation der Klasse drei bezeichnet.

4.1. Der limitierende Schritt bei der Translokation heterologer Proteine liegt in der schlechten Aktivierung der SecA ATPase

Um den Mechanismus zu verstehen, der hinter der Wiederherstellung des OmpA Exports in den Suppressormutanten steht, können Vergleiche mit Mutanten, welche das kältesensitive Wachstum der *E. coli* *secY* Mutante *secY205* supprimierten, gezogen werden. In dieser Mutante ist die ATP- und Vorläuferprotein abhängige Membraninsertion von SecA beeinträchtigt, was zu kältesensitivem Wachstum, sowie zu Exportdefekten führt (Matsumoto *et al.*, 1997). Mutationen im IRA 2 Element des SecA Proteins von *E. coli* führten zur Suppression des kältesensitiven Wachstums und der Exportdefekte. Eine biochemische Charakterisierung der veränderten SecA Proteine zeigte, dass diese im Vergleich zum *E. coli* Wildtyp SecA eine ca. 8-fach höhere basale ATPase Aktivität zeigten („super-aktives“ SecA) (Nakatogawa *et al.*, 2000). Aus dieser Beobachtung schlossen die Autoren, dass im Wildtyp SecA der Aktivierungsschritt der SecA ATPase an der Cytoplasmamembran aufgrund des partiell defekten SecY Proteins (kodiert von *secY205*) beeinträchtigt ist. Ein mutiertes SecA Protein, welches eine erhöhte basale ATPase Aktivität zeigt, würde demnach den kritischen Aktivierungsschritt umgehen, da es sich bereits in einem partiell aktivierten Zustand befindet. Demzufolge ermöglichen die „super-aktiven“ SecA Proteine auch in Kombination mit dem defekten SecY Protein, welches die SecA ATPase nur schlecht aktiviert, eine funktionelle Proteintranslokation.

Überraschenderweise zeigte sich nun, dass, obwohl die Suppressormutanten der RMA einem ganz anderen Selektionsansatz entstammten, vier Mutationen im IRA 2 Element des *S. carnosus* SecA exakt den Mutationsorten im IRA 2 des *E. coli* SecA Proteins entsprachen, die zu einem „super-aktiven“ SecA Protein führten. Dieser Befund deutet stark darauf hin, dass auch im *S. carnosus* SecA Protein der Suppressormutanten die Mutationen im IRA 2 Bereich zu einer Erhöhung der basalen ATPase Aktivität und demnach zu einem „super-aktiven“ *S. carnosus* SecA führen. Das wiederum lässt den Rückschluss zu, dass in der RMA der Aktivierungsschritt der SecA ATPase ein entscheidender Engpass bei der Initiation der Translokation ist.

In der RMA ist bei der permissiven Temperatur (37 °C) der Proteinexport, wie am Beispiel der preproLipase gezeigt, prinzipiell möglich. Das bedeutet, dass innerhalb des Komplexes bestehend aus der Lipase, dem membrangebundenen SecA von *S. carnosus* und dem SecY von *B. subtilis* die SecA ATPase aktiviert werden kann. Dagegen wird das heterologe OmpA

Protein in der RMA bei 37 °C nicht über die Cytoplasmamembran transloziert. Das bedeutet, dass in der RMA das heterologe OmpA Protein die Ursache der nicht funktionellen Aktivierung der SecA ATPase ist.

Die Schlussfolgerung ist, dass heterologe Proteine, welche in einem *B. subtilis* Wildtypstamm nur sehr ineffizient oder gar nicht über die Cytoplasmamembran transloziert werden, im Komplex mit SecA und SecY an der Cytoplasmamembran, die SecA ATPase nur schlecht bzw. gar nicht aktivieren können. Somit konnte unter Verwendung der RMA als genetisches System die nicht optimale Aktivierung der SecA ATPase als limitierender Schritt bei der Translokation heterologer Proteine identifiziert werden.

4.1.1. Die Wirkungsweise der supprimierenden *S. carnosus* SecA Mutationen

Die *in vivo* Charakterisierung der Suppressormutanten erlaubt nur eine limitierte Aussage über die Wirkungsweise der identifizierten Mutationen. Ein Vergleich der supprimierenden Mutationen im *S. carnosus* SecA mit bekannten, biochemisch charakterisierten Mutationen im SecA Protein von *E. coli*, ermöglicht jedoch Rückschlüsse darauf, welchen Mechanismen die Suppression der Defekte der RMA in den isolierten Mutanten unterliegt. Auf die möglichen Mechanismen soll in Bezug auf den wiederhergestellten Export des heterologen OmpA Proteins in den Suppressormutanten der RMA eingegangen werden.

Die mögliche Wirkungsweise der Mutationen im IRA 2 Element des *S. carnosus* SecA

Über den Mechanismus der IRA 2 vermittelten Regulation der ATP Hydrolyse an SecA werden unterschiedliche Theorien vertreten. Diese unterscheiden sich in Bezug auf den Teilschritt, der bei der Aktivierung der SecA ATPase durch IRA 2 reguliert wird. Demnach könnte der eigentliche ATP Hydrolyseschritt oder der ADP Freisetzungsschritt reguliert werden. Von Nakatogawa *et al.* (2000) wird folgender Mechanismus der Regulation in Betracht gezogen. Die SecA ATPase Aktivität unterliegt einem dualen regulatorischen Mechanismus. Hierbei stellen die Elemente IRA 1 und IRA 2 zwei unabhängige regulatorische Bereiche dar. Im nicht translokationsaktivem SecA wird die ATP Hydrolyse durch direkten Kontakt zwischen dem IRA 1 und dem IRA 2 Element mit der NBS 1 reprimiert. Bei Bindung von ATP inseriert das SecA Protein mit dem gebundenem Vorläufer am SecYEG Komplex in die Cytoplasmamembran (Economou und Wickner, 1994). Die Membraninsertion von SecA ist von einer Konformationsänderung des SecA Proteins begleitet. Aufgrund der Konformationsänderung entfernen sich der IRA 1 und der IRA 2 Bereich von der NBS 1, wodurch die Repression der ATP Hydrolyse aufgehoben wird, d. h. die ATPase aktiviert wird. Dieser Aktivierungsschritt ist in Gegenwart des veränderten SecY Proteins der Mutante *secY205* beeinträchtigt. In den „super-aktiven“ SecA Proteinen sind die intramolekularen Wechselwirkungen zwischen IRA 2 und der NBS 1 beeinträchtigt, d. h. die

ATP Hydrolyse wird nicht mehr vollständig reprimiert. Die veränderten SecA Proteine befinden sich demnach bereits in einem zumindest partiell aktivierten Zustand, da weiterhin die Repression der ATPase Aktivität durch IRA 1 besteht. Dies impliziert, dass die ATP Hydrolyse den limitierenden Schritt bei der Aktivierung der SecA ATPase darstellt. Es wäre daher denkbar, dass in der RMA innerhalb des Komplexes aus dem SecA von *S. carnosus*, dem SecY von *B. subtilis* und dem OmpA Protein das ATP gebunden werden kann, jedoch die hydrolytische Aktivität von SecA, möglicherweise im membraninserterten Zustand, beeinträchtigt ist.

Einige Befunde sprechen jedoch dagegen, dass die ATP Hydrolyse in der RMA bei der nicht optimalen Aktivierung der SecA ATPase durch das heterologe OmpA den limitierenden Schritt darstellt. Wie am Beispiel des SecA Proteins von *E. coli* gezeigt wurde, kann auch das nicht durch ein Vorläuferprotein und SecYEG aktivierte SecA prinzipiell ATP binden und hydrolysieren (Lill *et al.*, 1990), aufgrund der IRA vermittelten Repression allerdings mit sehr geringer Effizienz (Karamanou *et al.*, 1999; Nakatogawa *et al.*, 2000). Kommt es jedoch zum Austausch von ADP gegen ATP, wird gebundenes ATP unmittelbar zu ADP und anorganischem Phosphat hydrolysiert (Schmidt *et al.*, 2000; Sianidis *et al.*, 2001). Somit liegt SecA in der Zelle vorwiegend in der ADP gebundenen Form vor (Schmidt *et al.*, 2000), die kompakter und thermodynamisch stabiler als die ATP gebundene Form ist (den Blaauwen *et al.*, 1996, 1999). Durch ortsgerichtete Mutagenese konservierter Aminosäuren im IRA 2 Element des *E. coli* SecA Proteins wurden von Sianidis *et al.* (2001) weitere Mutationen identifiziert, welche die basale ATPase Aktivität von SecA erhöhten aber nicht den „superaktivierenden“ Mutationen entsprachen. Die biochemische Charakterisierung dieser mutierten SecA Proteine zeigte, dass die erhöhte ATPase Aktivität auf eine erhöhte ADP Freisetzungsrates zurückzuführen war, die im Wildtyp SecA Protein den ATP Umsatz limitierte.

Unter der Annahme, dass das *S. carnosus* SecA Protein am *B. subtilis* SecYEG Komplex bevorzugt in der ADP gebundenen, thermodynamisch stabileren Form vorliegt, könnten diese Befunde darauf hindeuten, dass der limitierende Schritt bei der ineffizienten Aktivierung der ATPase des *S. carnosus* SecA durch das OmpA Protein in der ineffizienten Freisetzung von ADP vom SecA liegt. Aufgrund einer nicht optimalen Aktivierung von SecA durch das heterologe OmpA Protein würde ADP nur sehr ineffizient oder gar nicht freigesetzt werden, so dass kein ATP gebunden werden und die Translokation nicht initiiert werden könnte.

Die Positionen der im IRA 2 Bereich des *S. carnosus* SecA identifizierten Mutationen H470Q, A474V und A493V entsprechen Positionen von Mutationen im *E. coli* SecA, die zu einem *prlD* Phänotyp führen (Fikes und Bassford 1989; Huie und Silhavy 1995). *PrlD* Mutationen ermöglichen die Translokation von Vorläuferproteinen mit defekter Signalsequenz, führen

somit, analog zu den „super-aktiven“ SecA Proteinen von *S. carnosus*, zu einer herabgesetzten Selektivität der Translokase. Von Schmidt *et al.* (2000) wurde gezeigt, dass durch *prfD* Mutationen die Affinität von SecA zu ADP herabgesetzt wird und gleichzeitig die Austauschrate von ADP an SecA erhöht wird. Daraus schlossen die Autoren, dass die Flexibilität des SecA Proteins im Bereich der NBS 1 erhöht wurde, d. h. das Konformationsgleichgewicht des SecA Proteins zu einer Form, welche „relaxed“ war, verlagert wurde. Dieser Befund ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der limitierende Schritt bei der ineffizienten Aktivierung der ATPase des *S. carnosus* SecA durch das OmpA Protein in der ineffizienten ADP Freisetzung liegen könnte und dass durch die SecA Mutationen die ADP Freisetzung erleichtert wird.

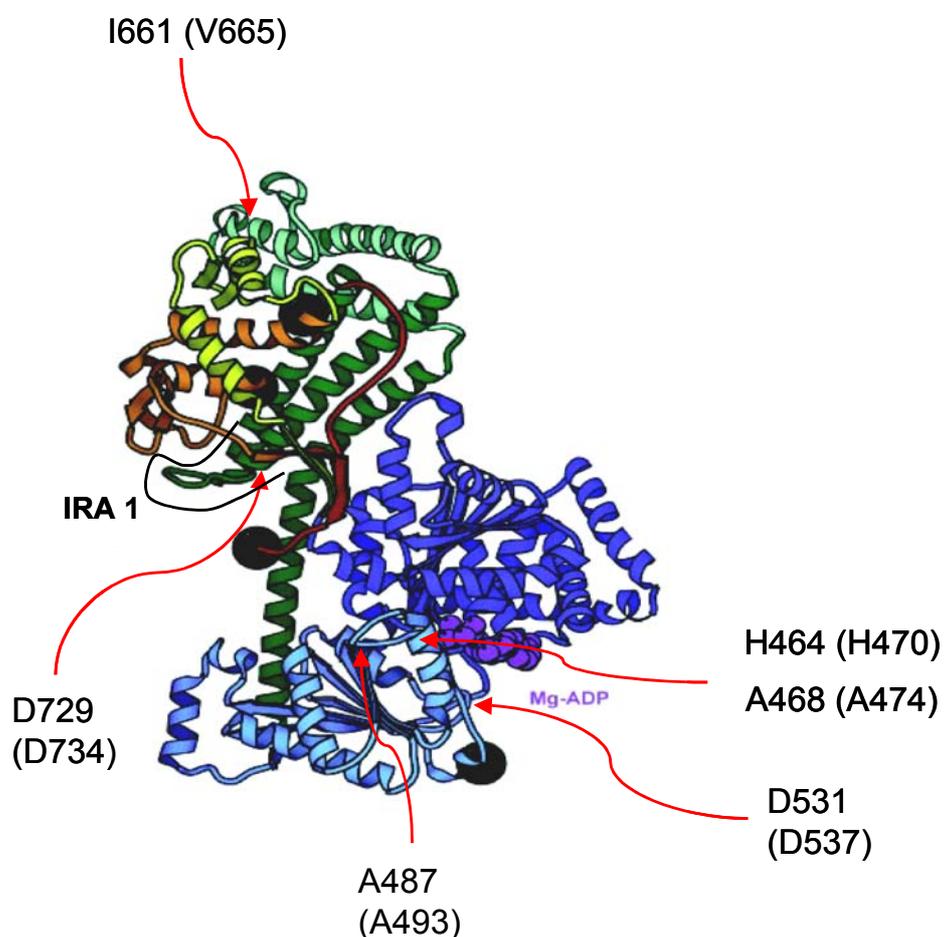


ABBILDUNG 26. Kristallstruktur des *B. subtilis* SecA Proteins. Eingetragen sind die Aminosäurepositionen im *B. subtilis* SecA, die den Positionen der Mutationen im *S. carnosus* SecA der Suppressormutanten der RMA entsprechen. In Klammern sind die entsprechenden Aminosäurepositionen der Mutationen im *S. carnosus* SecA angegeben. Die Lage des IRA 1 Elementes ist durch eine schwarze Linie gekennzeichnet. Nukleotidbindestelle 1: dunkelblau dargestellt; Nukleotidbindestelle 2: hellblau dargestellt; Preproteinbindedomäne N- Terminus: gelb dargestellt; Preproteinbindedomäne C-Terminus: orange dargestellt; helikale Flügeldomäne: hellgrün dargestellt; helikale Gerüstdomäne: dunkelgrün dargestellt; Carboxy-terminaler Linker: rot dargestellt (verändert nach Hunt *et al.*, 2002).

Anhand eines Alignments der Aminosäuresequenzen des *S. carnosus* und des *B. subtilis* SecA Proteins (vgl. Ergebnisse Abb. 7) wurden die Positionen im *B. subtilis* SecA ermittelt, die den Positionen der IRA 2 Mutationen im *S. carnosus* SecA entsprechen. Die Lage dieser Aminosäuren wurde anschließend in der Kristallstruktur des *B. subtilis* SecA bestimmt (Abb. 26). Neben der Kristallstruktur des *B. subtilis* SecA Proteins (Hunt *et al.*, 2002) wurde auch die Kristallstruktur des SecA Proteins von *M. tuberculosis* aufgeklärt (Sharma *et al.*, 2003). Der Anteil der identischen Aminosäuren in den SecA Proteinen dieser beiden Bakterien liegt bei 43,8 %. Die Strukturen zeigen eine sehr ähnliche räumliche Anordnung der unterschiedlichen funktionellen Domänen. Da die SecA Proteine von *B. subtilis* und *S. carnosus* eine höhere Anzahl an identischen Aminosäuren aufweisen (60 % Identität), ist zwischen diesen beiden Proteinen ebenfalls eine sehr ähnliche räumliche Anordnung der funktionellen Domänen zu erwarten.

Aus der Kristallstruktur des *B. subtilis* SecA Proteins wird deutlich, dass im löslich vorliegenden SecA der als Nukleotidbindedomäne 2 bezeichnete Bereich, welcher das IRA 2 Element enthält, in unmittelbarem Kontakt zur NBS 1 steht. Weiterhin wurden die Aminosäurereste innerhalb des IRA 2 Motivs identifiziert, die direkt mit dem gebundenen Nukleotid wechselwirken (Hunt *et al.*, 2002) (Tab. 15).

TABELLE 15. Aminosäurereste im IRA 2 Bereich von SecA, die mit gebundenem Nukleotid wechselwirken

SecA <i>B. subtilis</i>	SecA <i>S. carnosus</i> ¹	Komponente des Nukleotids
Gly 490	Gly 496	α - Phosphat
Asp 492	Asp 498	Ribose
Lys 494	Lys 500	Ribose
Arg 525	Arg 531	γ- Phosphat
Arg 528	Arg 534	Ribose

¹ Die Positionen wurden nach Alignment der Sequenzen des SecA Proteins von *B. subtilis* und *S. carnosus* anhand der entsprechenden Position im *B. subtilis* SecA ermittelt.

Die Aminosäuren im IRA 2 Element, die mit dem Nukleotid wechselwirken, liegen innerhalb eines hoch konservierten Bereiches. Daher ist es wahrscheinlich, dass auch die entsprechenden Aminosäuren im *S. carnosus* SecA an der Bindung des Nukleotids beteiligt sind. Auffällig ist der Befund, dass die veränderten Aminosäurereste im IRA 2 Element der *S. carnosus* SecA Proteine der Suppressormutanten (His470, Ala474, Ala493 und Asp537) zum Teil in unmittelbarer Nähe der Aminosäuren liegen, die mit dem gebundenen Nukleotid in Kontakt treten. Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung, dass durch die Mutationen im IRA 2 Bereich des SecA Proteins von *S. carnosus* lokale Konformationsänderungen an der NBS 1 stattgefunden haben könnten. Durch diese Veränderungen könnten Bindungen zwischen dem Nukleotid und den bindenden Aminosäuren im *S. carnosus* SecA, welches am SecYEG Komplex vorliegt, geschwächt worden sein. Die Folge wäre, dass vom mutierten

S. carnosus SecA, bei Bindung des OmpA Proteins, ADP besser freigesetzt werden könnte. Die schlechte Aktivierung der ATPase Aktivität des *S. carnosus* SecA Proteins innerhalb des Translokations Initiationskomplexes mit SecY von *B. subtilis* und dem OmpA Protein wäre somit umgangen, so dass die Initiation der Translokation des OmpA Proteins wieder möglich wäre.

Zusammengefasst deuten die Daten darauf hin, dass die „super-Aktivierung“ der *S. carnosus* SecA Proteine aufgrund der IRA 2 Mutationen auf eine erhöhte Flexibilität im Bereich der NBS 1 zurückzuführen ist. Die Folge wäre, dass das mutierte *S. carnosus* SecA Protein, welches am SecYEG Komplex gebunden vorliegt, ADP nicht so fest bindet. Daher könnte der Austausch von ADP gegen ATP auch in Gegenwart des heterologen OmpA Proteins, welches die ADP Freisetzung im *S. carnosus* Wildtyp SecA im Komplex mit dem *B. subtilis* SecY und dem OmpA nur schlecht unterstützt, effizienter erfolgen. Die ATP Bindung aufgrund einer effizienteren ADP Freisetzung würde somit die Initiation der Translokation des OmpA Proteins in den Suppressormutanten wieder ermöglichen.

Die mögliche Wirkungsweise der Mutation im IRA 1 Element des *S. carnosus* SecA

In einer Suppressormutante der RMA wurde ein Asparaginsäurerest an Position 734 im IRA 1 Element des *S. carnosus* SecA zu Valin umgewandelt. Im SecA Protein von *E. coli* wurde keine Mutation identifiziert, die an der entsprechenden Position liegt. Allerdings führt ein Austausch von Tryptophan zu Alanin an Position 775 im IRA 1 Element des SecA Proteins von *E. coli* zu einer ca. dreifach erhöhten basalen ATPase Aktivität (Baud *et al.*, 2002). Die Aminosäure Trp 775 entspricht der Aminosäure Trp 729 im *S. carnosus* SecA. Diese liegt wiederum in der Nähe der veränderten Aminosäure Asp 734. Das könnte darauf hindeuten, dass der Austausch D734A im *S. carnosus* SecA ebenfalls eine Erhöhung der basalen ATPase Aktivität im *S. carnosus* SecA Protein bewirkt. Daher wäre denkbar, dass das mutierte SecA Protein am SecYEG Komplex in einem bereits partiell aktivierten Zustand vorliegt, wie es auch bei den IRA 2 Mutationen der Fall ist. Die Schlussfolgerung wäre, dass in der RMA auch durch eine Schwächung der IRA 1 vermittelten Herabregulierung der ATPase Aktivität die schlechte Aktivierung der SecA ATPase Aktivität bei Bildung des Translokations-Initiationskomplexes aus dem *S. carnosus* SecA, dem *B. subtilis* SecY und dem OmpA, umgangen werden kann.

Ergebnisse von Karamanou *et al.* (1999) und Sianidis *et al.* (2001) deuten darauf hin, dass der IRA 1 Bereich die ATPase Aktivität im nicht translokationsaktivem SecA durch eine direkte Assoziation mit der NBS 1 herabreguliert. Aus der Kristallstruktur des *B. subtilis* SecA Proteins wird allerdings deutlich, dass sich der Bereich des SecA Proteins, welcher das IRA 1 Element beinhaltet, in großer räumlicher Distanz zur NBS 1 befindet (Abb. 26). Dies deutet darauf hin, dass die Regulation der SecA ATPase Aktivität durch IRA 1 nicht durch

direkte Wechselwirkungen zwischen IRA 1 und der NBS 1 vermittelt wird. Wahrscheinlicher ist, dass Konformationsänderungen im Bereich des IRA 1 in Folge der Bindung von SecA an SecYEG und das Vorläuferprotein auf die NBS 1 übertragen werden. Diese könnten dann zur Aktivierung der SecA ATPase führen. Diese Möglichkeit wird durch Untersuchungen der Konformation der C-terminalen Domäne des SecA Proteins von *E. coli* unterstützt. Durch *in vitro* Untersuchungen wurde gezeigt, dass die C-terminale Domäne ein flexibles Element darstellt, welches in Gegenwart von Phospholipiden bzw. bei Wechselwirkungen des SecA Proteins mit Signalpeptiden eine Konformationsänderung ausführt (Ding *et al.*, 2001). Diese Änderung der Konformation könnte *in vivo* in Folge der Bindung von SecA an SecYEG und das Vorläuferprotein erfolgen. Durch die Bindung, sowie die Konformationsänderung der C-terminalen Domäne könnte die Umgebung um die NBS 1 derart verändert werden, dass das SecA Protein in einen aktivierten Zustand versetzt wird und ADP freigesetzt werden kann. Durch die Mutation D734A im IRA 1 Element des *S. carnosus* SecA könnte demnach dieser aktivierte Zustand nachgeahmt werden. Das könnte bedeuten, dass das *S. carnosus* SecA am *B. subtilis* SecYEG Komplex eine Konformation besitzt, in der die IRA 1 vermittelte Herabregulierung der ATPase Aktivität, möglicherweise durch eine Konformationsänderung der flexiblen C-terminalen Domäne, aufgehoben ist. Dies könnte die ADP Freisetzung in Folge der Bindung des OmpA Proteins an das *S. carnosus* SecA erleichtern, so dass die ATP Bindung begünstigt wäre und die Translokation des OmpA Proteins in den Suppressormutanten wieder ermöglichen würde.

Die mögliche Wirkungsweise der supprimierenden Mutation an der NBS 1 im *S. carnosus* SecA

Eine supprimierende Mutation im *S. carnosus* SecA der Suppressormutanten liegt in unmittelbarer Nähe des Walker-Motivs B der NBS 1 (Tyr198His). Einen Hinweis auf den möglichen Mechanismus der Suppression in Folge dieses Austausches geben Mutationen im Bereich der NBS 1 des SecA Proteins von *E. coli*, die bei der Selektion von Suppressormutanten der Mutante *secY205* identifiziert wurden. Diese Mutationen führten dazu, dass der Exportdefekt der *E. coli* SecY Mutante *secY205* allelspezifisch supprimiert wurde. Das bedeutet, dass die veränderten SecA Proteine, im Gegensatz zu den „superaktiven“ SecA Proteinen, nur den Exportdefekt der Mutante *secY205* supprimierten (Matsumoto *et al.*, 2000). Aus der Allelspezifität der Suppression schlossen die Autoren, dass durch die Mutationen an der NBS 1 Wechselwirkungen zwischen dem mutierten SecA und dem SecY Protein der Mutante *secY205* verändert wurden. Demnach könnte die NBS 1 eine mögliche Kontaktstelle des SecA Proteins mit dem SecY Protein darstellen. Denkbar wäre, dass die Mutationen an der NBS 1 die Öffnung der Translokationspore, wenn SecA mit dem Vorläufer am SecYEG Komplex vorliegt, erleichtern.

Die identifizierte Mutation im Bereich der NBS 1 des *S. carnosus* SecA Proteins liegt in Nachbarschaft zu einigen der allelspezifisch wirkenden Mutationen der NBS 1 im *E. coli*

SecA. Daher kann geschlossen werden, dass die Suppression durch diese Mutation über verbesserte Wechselwirkungen zwischen dem SecA Protein von *S. carnosus* und dem SecY Protein von *B. subtilis* erfolgt. Es wäre vorstellbar, dass durch die Mutation die Affinität vom *S. carnosus* SecA zum *B. subtilis* SecY erhöht wird. Das könnte dazu führen, dass der Komplex aus dem mutierten *S. carnosus* SecA, dem *B. subtilis* SecY und dem OmpA länger bestehen bleibt, als es mit dem Wildtyp *S. carnosus* SecA der Fall wäre. Somit könnte die schlechte Aktivierung der *S. carnosus* SecA ATPase Aktivität durch das heterologe OmpA dadurch umgangen werden, dass die Zeitspanne erhöht wird, in der ADP spontan vom *S. carnosus* SecA freigesetzt werden könnte, während sich das SecA von *S. carnosus* noch am *B. subtilis* SecYEG Komplex befindet. Dies würde die ATP Bindung wieder ermöglichen und zur Initiation der Translokation des OmpA Proteins in der Suppressormutante führen. Diese Möglichkeit wird weiter durch *in vitro* Daten gestützt, die zeigten, dass die Affinität des *B. subtilis* SecA Proteins zum *B. subtilis* SecYEG Komplex niedriger ist als die Affinität des *E. coli* SecA Proteins zum SecYEG von *E. coli* (Swaving *et al.*, 1999). Es wäre möglich, dass die Affinität des fremden *S. carnosus* SecA zum *B. subtilis* SecYEG Komplex noch weiter herabgesetzt ist. Diese niedrige Affinität könnte ein zusätzlicher Grund für die ineffiziente Ausbildung des Translokations-Initiationskomplexes aus dem *S. carnosus* SecA, dem *B. subtilis* SecY und dem OmpA sein und würde den stabilisierenden Effekt durch die Mutation an der NBS 1 erklären.

Da sich die Mutation im Bereich der ATP Bindestelle des *S. carnosus* SecA Proteins befindet, kann die alternative Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass auch diese Mutation, analog zu den IRA Mutationen, zu einer Erhöhung des Aktivierungszustandes von SecA führt. Somit wäre die ADP Freisetzung von SecA am *B. subtilis* SecYEG Komplex sterisch begünstigt, so dass in Folge der ATP Bindung die Translokation des OmpA Proteins in der Suppressormutante wieder initiiert werden könnte.

Die mögliche Wirkungsweise der supprimierenden Mutation V665E im *S. carnosus* SecA

Eine weitere Mutation im *S. carnosus* *secA* Gen führte zum Austausch von Valin zu Glutaminsäure an Aminosäureposition 665 in der C-terminalen 30 kDa Domäne. Diese Mutation ist insofern interessant, da sie in einem Bereich liegt, dem bislang keine Aufgabe bei der SecA Funktion zugeordnet werden konnte. Außerdem wurde bislang in keinem anderen Selektionssystem eine Mutation innerhalb dieses Bereiches identifiziert. Dies verdeutlicht, dass die RMA ein neues genetisches System darstellt, welches die Identifizierung und Analyse neuer funktioneller Bereiche im SecA Protein ermöglicht. Die entsprechende Aminosäure im *B. subtilis* SecA liegt, wie in der Kristallstruktur des *B. subtilis* SecA Proteins ersichtlich, innerhalb einer α -Helix, welche zur helikalen Flügeldomäne gehört (abgekürzt HWD, in der Kristallstruktur Abb. 26 hellgrün dargestellt). Die helikale Flügeldomäne ist eine sehr mobile Domäne, welche sich *in vitro* in Folge von z. B. erhöhter

Temperatur vom SecA Kern entfernt. Diese Domänendissoziation hat eine herabgesetzte Nukleotidbindungsaffinität an der NBS 1 zur Folge, und könnte auch für eine erhöhte SecYEG Affinität von SecA verantwortlich sein (Hunt *et al.*, 2002). Unter der Annahme, dass das SecA Protein *in vivo* hauptsächlich in der ADP gebundenen kompakten Konformation vorliegt (den Blaauwen *et al.*, 1996), könnten SecYEG sowie das Vorläuferprotein das Dissoziieren der HWD vom SecA Kern bewirken, somit die ADP Freisetzung beschleunigen und die Affinität von SecA zu SecYEG erhöhen. Es wäre daher vorstellbar, dass in der RMA das OmpA Protein im Komplex mit dem *S. carnosus* SecA und dem *B. subtilis* SecY die Dissoziation der HWD vom SecA Kern nur schlecht unterstützt. Die Mutation in der HWD könnte demnach dazu führen, dass im *S. carnosus* SecA die HWD schwächer an den SecA Kern gebunden ist. Dies würde dazu führen, dass die schlechte Aktivierung der SecA ATPase umgangen wird, so dass ADP besser vom *S. carnosus* SecA freigesetzt werden könnte, und auch die Initiation des OmpA Proteins in dieser Suppressormutante wieder ermöglicht wäre.

In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, dass die Suppressormutante RK 4, welche die Mutation V665E im *S. carnosus* SecA enthält, bei erhöhter Temperatur (42 °C) nicht wachsen konnte. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die HWD aufgrund der Mutation tatsächlich eine schwächere Bindung zum SecA Kern besitzt. Durch die erhöhte Temperatur könnte eine vollständige Domänendissoziation verursacht worden sein, die zur Instabilität und somit zum Verlust der Funktion des SecA Proteins führen könnte.

4.1.2. Ein Modell zur Herabsetzung der Qualitätskontrolle der Translokase durch IRA Mutationen

Die Literaturdaten lassen den Schluss zu, dass innerhalb des Translokations-Initiationskomplexes aus dem *S. carnosus* SecA, dem *B. subtilis* SecY und dem OmpA die Freisetzung von ADP vom *S. carnosus* SecA einen entscheidenden limitierenden Schritt bei der Initiation der Translokation des OmpA Proteins in der RMA darstellt. Die identifizierten supprimierenden Mutationen im *S. carnosus* SecA führen demnach dazu, dass der ADP Freisetzungsschritt von SecA begünstigt wird, wodurch die ATP Bindung ermöglicht wird und daher das OmpA Protein wieder transloziert werden kann. Es wird nun am Beispiel der IRA Mutationen folgendes Modell aufgestellt, welchem Mechanismus die Qualitätskontrolle bei der Translokation eines heterologen Proteins unterliegen könnte (Abb. 27).

In einem *B. subtilis* Stamm, der über eine Wildtyp Translokase verfügt, reprimieren IRA 1 und IRA 2 die Freisetzung von ADP von der NBS 1. Hierbei wird die Repression durch IRA 2 über direkten Kontakt mit der NBS 1 vermittelt. Nach Bindung eines heterologen Proteins durch SecA am SecYEG Komplex findet die Qualitätskontrolle des Exportproteins statt, d. h. die Entscheidung, ob das Protein in den Translokationsweg eingeschleust wird oder nicht. In dem Falle, dass das heterologe Protein einen funktionellen Komplex mit SecA und SecY

ausbilden kann, wird das SecA Protein aktiviert. Eine möglicherweise geringfügige Konformationsänderung von SecA führt dazu, dass die IRA vermittelte Repression der ADP Freisetzung aufgehoben wird, wobei sich IRA 2 von der Nukleotidbindestelle 1 entfernt und die reprimierende Wirkung von IRA 1 herabgesetzt wird. ADP kann nun von der NBS 1 freigesetzt werden. Eine weitere Konformationsänderung von SecA, ausgelöst durch die ATP Bindung, führt zur Membraninsertion von SecA sowie zur Initiation der Translokation.

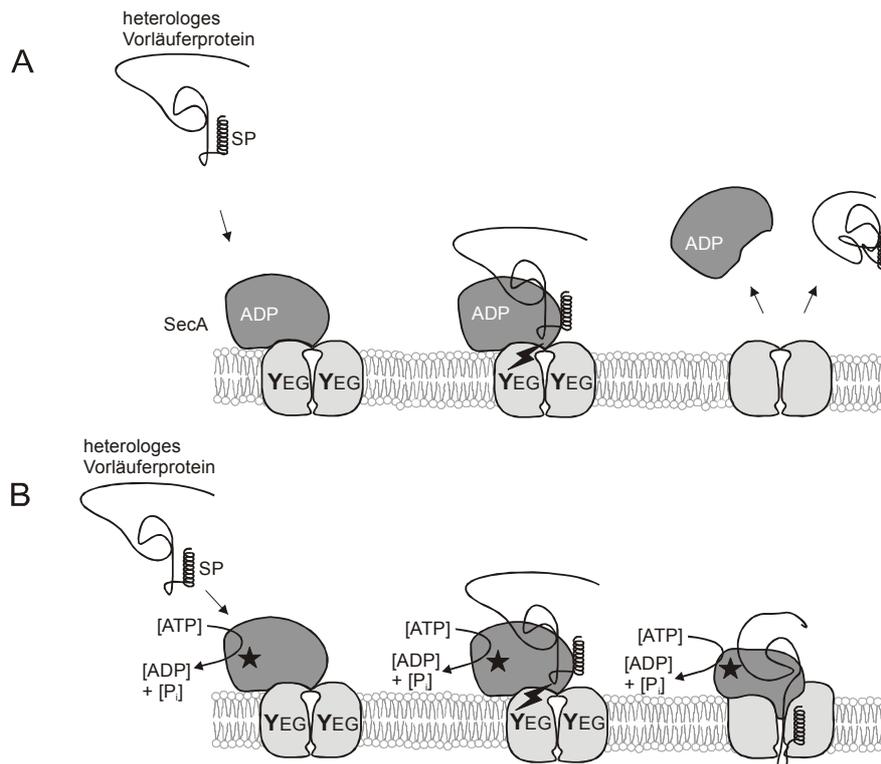


ABBILDUNG 27. A. Nicht funktionelle Aktivierung der SecA ATPase durch ein heterologes Protein. Der limitierende Schritt bei der Aktivierung der SecA ATPase Aktivität ist die ineffiziente Freisetzung von ADP von SecA innerhalb des Translokations-Initiationskomplexes mit SecY und dem heterologen Protein. **B.** Umgehung der nicht funktionellen Aktivierung der SecA ATPase durch das heterologe Protein über eine Erhöhung der basalen ATPase Aktivität.

Der Stern deutet symbolisch die SecA Mutation an. Der Blitz deutet symbolisch nicht optimale Wechselwirkungen innerhalb des Komplexes aus SecA, SecY und dem heterologen Vorläuferprotein an. SP: Signalpeptid

Im Falle, dass das heterologe Protein keinen funktionellen Komplex mit SecA und SecY an der Cytoplasmamembran ausbilden kann, wird in Folge der nicht funktionellen Wechselwirkungen die Freisetzung von ADP nicht ermöglicht. Infolgedessen zerfällt der SecA-SecY-Vorläuferprotein Komplex, so dass das Vorläuferprotein wieder ins Cytosol

freigesetzt wird (Abb. 27 A). Das bedeutet, dass für die Initiation der Translokation eines heterologen Proteins von entscheidender Bedeutung ist, wie gut es die SecA ATPase aktivieren kann, bzw. wie gut es die Freisetzung von ADP von SecA stimulieren kann.

In den „super-aktiven“ SecA Proteinen wird aufgrund der Mutationen im IRA 2 bzw. im IRA 1 Element die ADP Freisetzung nicht vollständig reprimiert (Abb. 27 B). Daher besitzen diese SecA Proteine am SecYEG Komplex in Abwesenheit des Vorläuferproteins eine, im Vergleich zum Wildtyp SecA, erhöhte ATPase Aktivität. Das SecA ist nicht vollständig aktiviert, da weiterhin die Repression durch den jeweiligen nicht mutierten IRA Bereich besteht. Ein heterologes Vorläuferprotein, welches die ATPase normalerweise nur schlecht aktiviert, kann an das mutierte SecA Protein binden. Es ist anzunehmen, dass der Komplex aus dem SecA, dem SecY und dem Vorläuferprotein weiterhin nicht optimal ist, allerdings befindet sich das SecA Protein in einem bereits voraktivierten Zustand. Somit wird die Energiebarriere, welche überschritten werden muss, um die ATPase Aktivität vollständig zu aktivieren, herabgesetzt. Dies hat auch eine Herabsetzung der Selektivität zur Folge, so dass auch ein heterologes Protein, welches die ATPase Aktivität des Wildtyp SecA nur schlecht aktiviert, in den Translokationsweg eingeschleust werden kann.

In der vorliegenden Diskussion wird, aufgrund der in der Literatur beschriebenen Datenlage, die Möglichkeit favorisiert, dass die ADP Freisetzung den limitierenden Schritt bei der Translokation des OmpA Proteins in der RMA darstellt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch ein anderer Schritt während der Translokation limitierend sein könnte. Durch das OmpA Protein könnte z. B. auch der Schritt der ATP Hydrolyse am *S. carnosus* SecA, während es sich im membraninserierten Zustand befindet, beeinträchtigt sein.

Anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bleibt festzuhalten, dass die Qualitätskontrolle der Translokase auf der Stufe der Aktivierung der SecA ATPase stattfindet, während der Komplex aus dem SecA, dem SecY und dem Vorläuferprotein ausgebildet wird. Dementsprechend liegt bei einer ineffizienten Translokation eines heterologen Proteins der entscheidende Engpass bei einer schlechten Aktivierung der SecA ATPase. Die schlechte Aktivierung der SecA ATPase durch das heterologe Vorläuferprotein kann umgangen werden, indem

1. die IRA 1 oder die IRA 2 vermittelte Repression der ATPase Aktivität abgeschwächt wird, das SecA Protein somit „super-aktiviert“ wird
2. der Komplex aus dem SecA, SecY und dem Vorläuferprotein durch eine erhöhte SecA-SecY Affinität stabilisiert wird, wodurch die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung der SecA ATPase erhöht wird.

4.2. Die Charakterisierung der Suppressormutanten der RMA

4.2.1. Der Proteinexportdefekt der RMA bei niedriger Temperatur wird durch Mutationen im *S. carnosus* SecA supprimiert

Die RMA ist bei 37 °C in der Lage, wie der *B. subtilis* Wildtyp zu wachsen und den Export der preproLipase, einem typischen Exportprotein Gram-positiver Bakterien, zu vermitteln. Das bedeutet, dass bei 37 °C das SecA Protein von *S. carnosus* in Kombination mit dem *B. subtilis* SecY und der preproLipase bzw. allen für das Wachstum essentiellen Exportproteinen einen funktionellen Komplex an der Cytoplasmamembran ausbilden kann. Diese funktionelle Komplexbildung führt zur Aktivierung der Translokations-ATPase-Aktivität von SecA, sowie zur Initiation der Translokation.

Bei 25 °C hingegen zeigt die RMA pleiotrope Exportdefekte. Dies wird deutlich anhand eines Wachstumsdefektes bei niedriger Temperatur, der darauf zurückzuführen ist, dass mindestens ein für das Wachstum essentielles Exportprotein nicht exportiert werden kann. Außerdem wird auch die preproLipase bei niedriger Temperatur nicht exportiert. Von Pogliano und Beckwith (1993) wurde gezeigt, dass der Proteinexport *per se* kältesensitiv ist, d. h. dass der Vorgang der SecA abhängigen Membrantranslokation einen Schritt beinhaltet, der durch niedrige Temperaturen stark verlangsamt ist. Die Autoren vermuteten, dass der kältesensitive und auch geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Proteintranslokation in der Insertion von SecA gemeinsam mit dem Vorläuferprotein in die Cytoplasmamembran liegt. Ein kältesensitiver Schritt würde vermuten lassen, dass eine endotherme Reaktion bei der Proteintranslokation stattfindet. In der Tat wurde in *in vitro* Untersuchungen in Gegenwart von sauren Phospholipiden eine endotherme Konformationsänderung des SecA Proteins nachgewiesen, die mit einer partiellen Entfaltung des Proteins einher ging (Ulbrandt *et al.*, 1992; Ding *et al.*, 2001). Dieser endothermen Umwandlung des SecA Proteins wurde unter physiologischen Bedingungen eine Bedeutung bei der Membraninsertion von SecA mit dem Vorläuferprotein am SecYEG Komplex zugesprochen. Das könnte darauf hindeuten, dass in der RMA aufgrund verschlechterter Wechselwirkungen zwischen dem SecA von *S. carnosus*, dem SecY von *B. subtilis* und dem Vorläuferprotein bei 25 °C die endotherme Konformationsänderung des *S. carnosus* SecA Proteins beeinträchtigt ist. Infolgedessen wird die preproLipase, sowie mindestens ein für das Wachstum essentielles Exportprotein nur noch sehr ineffizient transloziert. Wie am SecA Protein von *E. coli* *in vitro* gezeigt wurde, hat das Protein bei niedrigen Temperaturen eine hohe Bindungsaffinität zu ADP, verbunden mit einer niedrigen ADP Austauschrate (Schmidt *et al.*, 2000). Das könnte darauf hindeuten, dass *in vivo* die Wechselwirkungen zwischen dem *S. carnosus* SecA, dem Vorläuferprotein (z. B. die preproLipase) und dem *B. subtilis* SecY bei niedriger Temperatur so verschlechtert sind, dass SecA nicht ausreichend aktiviert wird, um den ADP Freisetzungsschritt zu ermöglichen. Daher wäre auch denkbar, dass der temperatursensitive Schritt beim SecA

Zyklus nicht bzw. nicht nur die Membraninsertion von SecA ist. Denkbar wäre, dass auch schon der Schritt der ADP Freisetzung, bzw. eine Konformationsänderung von SecA in Folge der Bindung von SecY und dem Vorläuferprotein, die zur Freisetzung von ADP führt, überproportional kältesensitiv ist.

Ob vom Translokationsdefekt der RMA bei 25 °C nur ein oder mehrere essentielle Exportproteine (oder sogar alle Exportproteine) betroffen sind, kann keine Aussage gemacht werden. Um zu untersuchen, welche und wie viele Exportproteine bei der nicht permissiven Temperatur in der RMA vom Export ausgeschlossen werden, müssten über 2 D-Gelelektrophorese Analysen des Proteinbestandes vom Kulturüberstand der RMA bei 25 °C durchgeführt werden.

Die sieben Suppressormutanten der RMA zeigten alle ein wiederhergestelltes Wachstum bei 25 °C. Dieses war in Flüssigkultur in allen Fällen wieder mit dem Wildtyp vergleichbar, auf Festmedium bildete die Mutante RK 3 im Vergleich zu den anderen Suppressormutanten kleinere Kolonien. Das wiederhergestellte Wachstum kann auf einen wieder verbesserten Export von für das Wachstum essentiellen Proteinen bei niedriger Temperatur zurückgeführt werden. Der verbesserte Proteinexport bei 25 °C konnte direkt am Beispiel der preproLipase gezeigt werden. Wie bereits dargestellt, wird durch die supprimierenden Mutationen die SecA ATPase pre-aktiviert bzw. der Komplex aus dem SecA, dem SecY und dem Vorläuferprotein stabilisiert. Beide Effekte haben sehr wahrscheinlich zur Folge, dass auch bei niedriger Temperatur innerhalb des Komplexes aus dem *S. carnosus* SecA, dem *B. subtilis* SecY und dem Vorläuferprotein die nicht funktionelle Aktivierung der SecA ATPase umgangen wird. Demzufolge wird ADP wieder effektiver freigesetzt, so dass die Translokation aller für das Wachstum essentiellen Proteine, sowie der preproLipase initiiert werden kann.

4.2.2. Der OmpA Exportdefekt der RMA bei 37 °C wird durch Mutationen im *S. carnosus* SecA supprimiert

Während die RMA bei der permissiven Temperatur (37 °C) alle für das Wachstum essentiellen Proteine, sowie die preproLipase über die Cytoplasmamembran translozieren kann, wird das heterologe OmpA Protein aus *E. coli* bei dieser Temperatur nahezu vollständig vom Export ausgeschlossen. Dieser Befund war insofern überraschend, da das OmpA Protein sowohl im *B. subtilis* Wildtyp, als auch im *S. carnosus* Wildtyp ein geeignetes Exportsubstrat ist (Meens *et al.*, 1993, 1997). In dem jeweiligen Wildtypstamm kann das OmpA Protein somit die SecA ATPase effizient aktivieren.

Das SecA Protein interagiert sowohl mit dem Signalpeptid als auch mit dem reifen Teil eines Exportproteins (Lill *et al.*, 1990; Akita *et al.*, 1990). Ein funktionelles Signalpeptid kann allerdings auch alleine an SecA binden und *in vitro* die SecA ATPase Aktivität stimulieren

(Miller *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000). Daher wäre denkbar, dass in der RMA das Signalpeptid des OmpA Proteins für die ineffiziente Aktivierung der SecA ATPase des *S. carnosus* SecA im Komplex mit dem *B. subtilis* SecY verantwortlich ist. Allerdings zeigte sich, dass auch ein Fusionsprotein bestehend aus dem Signalpeptid der Lipase und dem reifen Teil des OmpA Proteins in der RMA nicht transloziert wurde (M. Klein, persönliche Mitteilung). Daher trägt die Eigenschaft des gesamten OmpA Proteins zur ineffizienten Translokation in der RMA bei. Die Signalpeptidbindestelle wurde im SecA Protein von *E. coli* auf den N-terminalen Bereich von Aminosäure 1 bis 263 eingeschränkt, wobei die exakte Bindestelle nach wie vor noch nicht bekannt ist (Baud *et al.*, 2002). Durch Vernetzungsexperimente von Vorläuferproteinen mit SecA wurde eine mögliche Preproteinbindestelle auf einen Bereich von Aminosäure 263 bis 341 eingegrenzt (Kimura *et al.*, 1991). Möglicherweise befinden sich daher die Bindestellen für das Signalpeptid und den reifen Teil des Exportproteins in unterschiedlichen Bereichen innerhalb des SecA Proteins und die Besetzung beider Bindestellen könnte für die effiziente Aktivierung der SecA ATPase notwendig sein. Demzufolge wäre vorstellbar, dass das OmpA Protein das *S. carnosus* SecA Protein an einer der Bindestellen zwar binden kann, jedoch die Konformation des *S. carnosus* SecA Proteins am *B. subtilis* SecYEG Komplex die Besetzung der zweiten Bindestelle durch das OmpA Protein nicht erlaubt. Dies wäre eine Erklärung für die schlechte Aktivierung der *S. carnosus* SecA ATPase durch das OmpA Protein und den daraus resultierenden OmpA Exportdefekt. Eine nicht optimale Besetzung beider Bindestellen wäre auch eine Erklärung dafür, weshalb ein Fusionsprotein bestehend aus dem Signalpeptid der Lipase und dem reifen Teil des OmpA Proteins in der RMA nicht transloziert werden kann.

In den Suppressormutanten ist der OmpA Export wieder möglich. Wie bereits diskutiert, kann die schlechte Aktivierung der *S. carnosus* SecA ATPase durch das heterologe OmpA Protein umgangen werden, indem die Wechselwirkungen zwischen zwei Bindungspartnern (SecA *S. carnosus* und SecY *B. subtilis*) innerhalb des trimeren Translokations-Initiationskomplexes optimiert werden oder der Aktivierungszustand von SecA am SecYEG Komplex erhöht wird. Der OmpA Export erfolgt in den Suppressormutanten allerdings nicht so effizient wie im *B. subtilis* Wildtyp. Dies deutet darauf hin, dass durch die supprimierende Mutation die Aktivierung der SecA ATPase zwar ermöglicht wird, jedoch weiterhin nicht mit der Effizienz wie im *B. subtilis* Wildtyp erfolgt. Die Translokation eines Proteins ist zudem ein sehr dynamischer Vorgang, der höchst wahrscheinlich ein Zusammenspiel einer Vielzahl von sich ändernden Wechselwirkungen erfordert. Der Anteil der unterschiedlichen Aminosäuren im SecA von *B. subtilis* und *S. carnosus* beträgt 40 %. Daher wäre es auch möglich, dass in den Suppressormutanten die Wechselwirkungen zwischen dem *S. carnosus* SecA, dem OmpA und einer anderen Komponente der *B. subtilis* Translokase auf einem späteren Schritt des SecA Zyklus, d. h. nach der Aktivierung der SecA ATPase, weiterhin beeinträchtigt sind. So könnten z. B. die SecA/SecY Wechselwirkungen in den Suppressormutanten weiterhin nicht

optimal sein. Das SecG Protein unterstützt durch eine Inversion der Membrantopologie die SecA Insertion (Nishiyama *et al.*, 1996) und es wurden direkte Kontakte zwischen SecA und SecG nachgewiesen (Nagamori *et al.*, 2002). Daher ist nicht auszuschließen, dass das SecG Protein von *B. subtilis* die Membraninsertion des *S. carnosus* SecA Proteins in den Suppressormutanten nicht optimal unterstützt, so dass das OmpA Protein nicht so effizient wie im *B. subtilis* Wildtyp transloziert werden kann.

4.2.3. Durch Mutationen im *S. carnosus* SecA wird die Sporulationsfähigkeit und die Kompetenz der Suppressormutanten im Vergleich zur RMA verbessert

Häufig wurde die Beobachtung gemacht, dass Mutationen im SecA Protein von *B. subtilis* von einem Verlust der Sporulationsfähigkeit und in manchen Fällen auch von einem Verlust der Fähigkeit, natürliche Kompetenz auszubilden, begleitet sind (Sadaie und Kada 1983, 1985; Asai *et al.*, 1997). In der RMA ist der Sporulations- und Kompetenzdefekt höchst wahrscheinlich auf einen Exportdefekt eines oder mehrerer regulatorischer Phr Peptide (Phosphatase Regulatoren) aufgrund des SecA Austausches zurückzuführen. Auffällig ist, dass die Phr Peptide mit einer Länge zwischen 40 und 44 Aminosäuren als relativ kurze Vorläuferproteine synthetisiert werden (Perego und Brannigan, 2001). Untersuchungen des Exports verschieden langer N-terminaler Fragmente des OmpA Proteins in *E. coli* zeigten, dass die Effizienz des Exports abnahm, je kürzer die N-terminalen OmpA Derivate waren, wobei Peptide mit einer Länge von 68 Aminosäuren und weniger nicht mehr prozessiert wurden (Freudl und Henning, 1988; Freudl *et al.*, 1989). Untersuchungen der ATPase Aktivität von SecA in Gegenwart eines OmpA Derivates, welches aus den N-terminalen 74 Aminosäuren bestand, zeigten, dass die ATP Hydrolyse im Vergleich zum Wildtyp OmpA um den Faktor 50 reduziert war, so dass diese kurzen Peptide die SecA ATPase offensichtlich nur schlecht aktivierten (Bassilana *et al.*, 1992). Eine vergleichbare Beobachtung wurde am Beispiel von Derivaten des Hüllproteins des Phagen M13 gemacht, welches Sec unabhängig in die Cytoplasmamembran inseriert (Wolfe *et al.*, 1985). Dieses Protein ist durch zwei Transmembransegmente in der Membran verankert und besitzt eine periplasmatische Schleife bestehend aus 20 Aminosäuren. Durch Verlängerung der periplasmatischen Region auf 80 Aminosäuren wurde das Protein zwar SecA abhängig, jedoch, im Vergleich zu Derivaten, bei denen die periplasmatische Region auf 118 Aminosäuren oder mehr verlängert wurden, stark verzögert in die Cytoplasmamembran inseriert. Aus diesem Befund wurde geschlossen, dass das M13 Hüllprotein, dessen periplasmatische Region aus 80 Aminosäuren bestand, das SecA Protein zwar binden konnte, jedoch die SecA ATPase nur schlecht aktivierte (Roos *et al.*, 2001).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Länge des Exportproteins mitentscheidend dafür ist, wie gut es die ATPase Aktivität von SecA aktivieren kann. Sehr wahrscheinlich sind die kurzen Phr Peptide nur eingeschränkt in der Lage, die ATPase

Aktivität des *S. carnosus* SecA in der RMA zu aktivieren. Da das SecA Protein möglicherweise unterschiedliche Bindungsstellen für das Signalpeptid und den reifen Teil besitzt (vgl. Abschnitt 4.2.2.), wäre es möglich, dass die spezifische Konformation des SecA Proteins von *S. carnosus* am SecYEG Komplex von *B. subtilis* eine Besetzung beider Bindestellen aufgrund der geringen Länge der Phr Peptide nicht ermöglicht. Dies hätte eine schlechte Aktivierung der SecA ATPase durch die Phr Peptide, sowie den schlechten Export dieser Peptide zur Folge. In den Suppressormutanten würden demnach die suboptimale Bindung der Phr Peptide am *S. carnosus* SecA Protein durch ein bereits voraktiviertes SecA Protein bzw. optimierte SecA/SecY Wechselwirkungen kompensiert werden, so dass der Export dieser Peptide wieder besser erfolgen kann.

Die Vermutung, dass der Sec-abhängige Export sporulationsspezifischer Peptide für die Initiation der Sporulation essentiell ist, wird durch Analysen von Wechselwirkungen zwischen SecA und SecY in der *B. subtilis* secA Mutante secA12 unterstützt. Diese Mutante zeigt aufgrund eines Austausches von Serin zu Leucin an Position 515 des SecA Proteins einen Sporulationsdefekt (Asai *et al.*, 1997). Suppressormutanten, welche die Fähigkeit zu Sporulieren wiedererlangt haben, enthielten Mutationen in den Transmembransegmenten 2, 7 und 10 des *B. subtilis* SecY Proteins (Kobayashi *et al.*, 2000). Somit sind die Transmembransegmente 2, 7 und 10 wichtig für die Wechselwirkungen von SecY mit SecA und für einen funktionellen Export der sporulationsspezifischen Peptide.

4.2.4. Die Azidsensitivität einiger Suppressormutanten ist aufgrund der SecA Mutation erhöht

Azid inhibiert die Translokations-ATPase-Aktivität von SecA und ist ein wirksamer Inhibitor der Sec-abhängigen Proteintranslokation (Oliver *et al.*, 1990; Meens *et al.*, 1993). Die exakte Wirkungsweise von Azid ist bislang nicht bekannt. Die inhibitorische Wirkung von Azid beruht aber sehr wahrscheinlich darauf, dass SecA nach ATP Bindung und der Membraninsertion im membraninserterten Zustand gehalten wird, indem die ATP Hydrolyse gehemmt wird (van der Wolk *et al.*, 1997). Die Vorläuferprotein unabhängige basale ATPase Aktivität wird nicht durch Azid gehemmt (Oliver *et al.*, 1990). Daher ermöglichte die Bestimmung der Azidsensitivität der Suppressormutanten der RMA weitere Aussagen über den Zustand der veränderten *S. carnosus* SecA Proteine am SecYEG Komplex.

Die Azidsensitivität der RMA war im Vergleich zum *S. carnosus* Wildtyp nicht verändert. Dies deutet darauf hin, dass der SecYEG Komplex von *B. subtilis* im Vergleich zum SecYEG Komplex von *S. carnosus* keinen Einfluß auf die Konformation des *S. carnosus* Wildtyp SecA Proteins auf dem Schritt, der durch Azid hemmbar ist, hat. Dagegen konnten unter den Suppressormutanten vier Gruppen identifiziert werden, die unterschiedliche Azidsensitivitäten zeigten. In der ersten Gruppe (Mutanten RK 3 und RS 2) führten die SecA Mutationen zu keiner Veränderung der Azidsensitivität im Vergleich zur RMA. Die zweite

Gruppe (Mutanten RK 4 und RK 18) zeigten im Vergleich zur RMA eine leicht erhöhte Azidsensitivität. In der dritten Gruppe (Mutanten RS 1, RS 3) führten die SecA Mutationen zu einer deutlich erhöhten Azidsensitivität im Vergleich zur RMA. Die vierte Gruppe bildete die Mutante RS 7. Diese war im Vergleich zur RMA besonders sensitiv gegenüber Azid. Es ist auffällig, dass zur Gruppe drei und vier die Mutanten gehören, die Mutationen im IRA 2 Element des SecA Proteins enthalten und die höchst wahrscheinlich zu einem „super-aktiven“ SecA Protein führen. Das bedeutet, dass die SecA Mutationen in den Suppressormutanten RS 1, RS 3 und RS 7 die Konformation der SecA Proteine derart verändern, dass die Fähigkeit von Azid, die SecA Proteine im membraninserierten Zustand festzuhalten, erhöht ist. Für die Mutationen im IRA 2 Element wurde angenommen, dass durch die Veränderungen die Konformation im Bereich der NBS 1 aufgelockert wird, die zur „super-Aktivierung“ dieser SecA Proteine führt. Offensichtlich hat diese Konformationsänderung (mit Ausnahme der Mutante RK 18) auch eine erhöhte Affinität dieser SecA Proteine zu Azid zur Folge.

4.2.5. Die Stärke der Suppression der Defekte der RMA ist von der Art der Mutation und der Art des Vorläuferproteins abhängig

Die Charakterisierung der Phänotypen der Suppressormutanten der RMA zeigte, dass die unterschiedlichen SecA Mutationen zu einer Suppression des kältesensitiven Wachstums, des Sporulations- und Kompetenzdefektes und des OmpA Exportdefektes führten. In Bezug auf einen bestimmten Phänotyp, z. B. den OmpA Exportdefekt zeigte sich, dass die Stärke der Suppression von der Art der Mutation abhängig war. Während z. B. die Mutante RS 3, die eine Mutation an Aminosäureposition 493 im IRA 2 Element enthält, den OmpA Exportdefekt stark supprimierte, konnte die Mutante RK 4, die eine Mutation an Position 665 enthält, den OmpA Exportdefekt nur schwach supprimieren. Unter der Annahme, dass durch die SecA Mutationen die Aktivierungsbarriere der SecA ATPase herabgesetzt wird, würde dies darauf hindeuten, dass in der Mutante RS 3 aufgrund der SecA Mutation im IRA 2 Element die Aktivierungsbarriere der SecA ATPase stärker herabgesetzt wurde als in der Mutante RK 4.

Ein weiterer Vergleich der Suppressormutanten untereinander zeigte, dass der Wachstumsdefekt der RMA von allen Mutanten mit einer vergleichbaren Stärke supprimiert wurde. In Bezug auf den OmpA Exportdefekt, sowie den Sporulations- und Kompetenzdefekt der RMA, konnte allerdings festgestellt werden, dass die Suppressormutanten, welche Mutationen im IRA 1 oder IRA 2 Element enthalten (Klasse 2 Mutanten RK 18, RS 1, RS 2, RS 3 und RS 7) diese Defekte tendenziell stärker supprimierten als die Mutanten RK 3 und RK 4, die keine Mutation im IRA Element enthalten. Das deutet darauf hin, dass durch die IRA Mutationen die Energiebarriere, welche zur Aktivierung des SecA Proteins überwunden werden muss, stärker herabgesetzt wurde, als durch die Mutationen, die nicht in den IRA

Elementen lokalisiert waren. Demzufolge wurden in den Mutanten der Klasse 2 das OmpA, sowie die sporulations- und kompetenzspezifischen Peptide besser exportiert als in den Mutanten der Klasse 1 und 3. Hierbei war auffällig, dass alle Mutanten, welche aus der Selektion auf verbesserte Sporulation hervorgingen, die stark supprimierenden IRA Mutationen enthielten. Das deutet nun darauf hin, dass die Phr Peptide die SecA ATPase in der RMA nur sehr schlecht aktivieren. Demnach bestand bei der Selektion von Mutanten mit verbesserter Sporulation ein hoher Selektionsdruck auf die IRA Mutationen, welche zu einer stark herabgesetzten Aktivierungsbarriere der SecA ATPase führten. Bei der Selektion auf kälteresistentes Wachstum wurden, mit Ausnahme der Mutante RK 18, Mutanten isoliert (Mutanten RK 3 und RK 4), welche den OmpA Exportdefekt, sowie den Sporulations- und Kompetenzdefekt nur schwach supprimierten. Dieser Befund deutet darauf hin, dass bei der Selektion auf kälteresistentes Wachstum Mutationen selektioniert wurden, welche die Energiebarriere zur Aktivierung der SecA ATPase nicht so stark herabsetzten. Das verdeutlicht, dass in den beiden unterschiedlichen Selektionsansätzen tatsächlich ein unterschiedlicher Selektionsdruck auf den Export des zur Wiederherstellung des Wachstums bzw. des zur Wiederherstellung der Sporulationsfähigkeit essentiellen Vorläuferproteins herrschte.

In diesem Zusammenhang war jedoch überraschend, dass z. B. in der Mutante RS 7, der Sporulationsdefekt im Vergleich zu den anderen Mutanten stark supprimiert wurde, während der OmpA Exportdefekt im Vergleich zu den anderen Mutanten schwächer supprimiert wurde. Diese Beobachtung zeigt deutlich, dass nicht alleine die Art der Mutation die Effizienz der Translokation bestimmt. Auch die Beschaffenheit des Vorläuferproteins ist im Komplex mit SecA und SecY für die Effizienz der Translokation entscheidend. Somit bestimmt die Kombination aus der Art der Mutation und der Natur des Vorläuferproteins, wie effizient die Translokation des jeweiligen Vorläuferproteins initiiert werden kann.

4.3. Mutationen im *B. subtilis* SecA setzen die Qualitätskontrolle der *B. subtilis* Translokase herab

Industriell eingesetzte Produktionsstämme der Gattung *Bacillus* sind in der Lage, wirtseigene Proteine in Erträgen von bis zu 20 g/l in das Kulturmedium auszuscheiden. Versuche, diese hohe Sekretionsleistung für die sekretorische Produktion heterologer Proteine auszunutzen, führten dagegen in den allermeisten Fällen zu Erträgen von nur wenigen mg Protein / l Kultur (Simonen und Palva, 1993). Einer der Gründe hierfür ist eine häufig ineffiziente Translokation des heterologen Proteins über die Cytoplasmamembran des Wirtsbakteriums. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist die ineffiziente Translokation eines heterologen Proteins auf eine schlechte Aktivierung der SecA ATPase zurückzuführen. Unter Ausnutzung der Phänotypen der RMA wurden Mutationen im SecA Protein von *S. carnosus* identifiziert, die dazu führten, dass der in der RMA kritische Aktivierungsschritt abgeschwächt

wurde, wodurch auch die Qualitätskontrolle der Translokase der Suppressormutanten herabgesetzt wurde. Da die RMA ein artifizielles System darstellt, wurden Mutationen aus dem SecA von *S. carnosus* auf die entsprechenden Positionen im *B. subtilis* SecA übertragen und untersucht, ob auf diese Weise auch ein positiver Effekt auf die Proteintranslokation im *B. subtilis* Wildtyp erreicht werden kann.

Fünf supprimierende Mutationen wurden aus dem *S. carnosus* SecA auf die entsprechenden Positionen im *B. subtilis* SecA übertragen. Hierbei handelte es sich um vier Mutationen aus dem IRA 2 Bereich, sowie um die Mutation aus dem IRA 1 Element.

Zur Untersuchung des Proteinexports in *B. subtilis* in Gegenwart der mutierten *B. subtilis* SecA Proteine wurde eine Variante der alkalischen Phosphatase PhoB (PhoBL15Q) als Modells substrat verwendet. Dieses Protein wird aufgrund einer Mutation in der Signalsequenz nur sehr ineffizient im *B. subtilis* Wildtyp transloziert, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass dieses defekte Vorläuferprotein keinen funktionellen Translokations-Initiationskomplex mit dem SecA und SecY von *B. subtilis* ausbilden kann. In *B. subtilis* konnte im Falle der Levansucrase eine Abhängigkeit der Ausbeute an sekretiertem Protein von der SecA Menge gezeigt werden (Leloup *et al.*, 1999). Die Untersuchungen des Exports von PhoBL15Q zeigten aber, dass alleine durch Überproduktion des *B. subtilis* Wildtyp SecA Proteins der Export des defekten Vorläuferproteins nicht verbessert wurde. In Gegenwart von zwei der veränderten *B. subtilis* SecA Proteine (SecA H464Q und SecA A487V) wurde der Export von PhoB L15Q ebenfalls nicht verbessert. Dies zeigt, dass obwohl es sich bei den beiden SecA Proteinen um homologe Proteine handelt, Mutationen an identischen Positionen nicht notwendigerweise die gleiche Auswirkung (in diesem Fall auf die Regulation der ATPase Aktivität) haben. Dagegen war in Gegenwart der drei mutierten SecA Proteine (SecA A468V, SecA D531A und SecA D729V) der Export des defekten Vorläuferproteins um den Faktor drei im Vergleich zur Wildtyp SecA Kontrolle verbessert. Das deutet darauf hin, dass in Gegenwart des *B. subtilis* Wildtyp SecA Proteins der limitierende Schritt bei der Translokation von PhoBL15Q in der schlechten Aktivierung der SecA ATPase liegt. Dieser limitierende Schritt wird durch die mutierten *B. subtilis* SecA Proteine umgangen. Somit konnten Mutationen, die im *S. carnosus* SecA zu einem positiven Effekt bei der Proteintranslokation in den Suppressormutanten führten, zumindest in drei Fällen auf das *B. subtilis* SecA übertragen werden, wodurch auch ein positiver Effekt auf die Translokation im *B. subtilis* Wildtyp erreicht werden konnte. Dies zeigt, dass die Funktion der letztgenannten Aminosäuren bei der Qualitätskontrolle im *S. carnosus* SecA und im *B. subtilis* SecA konserviert ist.

Zur Untersuchung, ob die Qualitätskontrolle der *B. subtilis* Translokase noch weiter herabgesetzt werden kann, wurden die SecA Mutationen, die als Einzelmutationen den Export von PhoBL15Q verbesserten, systematisch zu Doppelmutationen kombiniert. In *E. coli* wurde *in vitro* gezeigt, dass IRA 1 und IRA 2 unabhängig voneinander die ATPase Aktivität regulieren. Enthielt das SecA Protein von *E. coli* eine „super-aktivierende“ Mutation

im IRA 2 Element, war die basale ATPase Aktivität um den Faktor 8 erhöht, jedoch aufgrund der Repression durch IRA 1 nicht vollständig aktiviert. Wurde zusätzlich die C-terminale 34 kDa Domäne des SecA Proteins, die das IRA 1 Element enthält, entfernt, war die ATPase Aktivität der N-terminalen 68 kDa Domäne um den Faktor 50 im Vergleich zur ATPase Aktivität des Wildtyp SecA Proteins erhöht, die ATPase Aktivität somit vollständig dereguliert (Nakatogawa *et al.*, 2000). Daher wurde angenommen, dass im *B. subtilis* SecA durch Kombination von zwei supprimierenden Mutationen das SecA Protein noch stärker pre-aktiviert werden könnte, wodurch der Export des Modellproteins PhoBL15Q weiter verbessert werden könnte. *In vivo* Analysen des Exports von PhoBL15Q zeigten allerdings, dass in den Stämmen, welche die SecA Proteine mit den Doppelmutationen enthielten, der Export im Vergleich zu den Stämmen, welche die SecA Proteine mit den Einzelmutationen enthielten, wieder herabgesetzt war. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis wäre, dass durch Einfügen der zweiten Mutation die Konformation der SecA Proteine derart verändert wurde, dass der „super-aktive“ Zustand direkt abgeschwächt wurde. Somit wären diese SecA Proteine am SecYEG Komplex nicht mehr so stark pre-aktiviert, wie die einfach mutierten SecA Proteine. Die Folge davon wäre, dass die Aktivierungsbarriere der SecA ATPase wieder erhöht wäre, was sich im Vergleich zu den SecA Einzelmutationen negativ auf den Export von PhoB L15Q auswirkte. Alternativ wäre denkbar, dass durch die zweite Mutation die SecA ATPase Aktivität tatsächlich weiter erhöht wurde, allerdings neue Störungen der Wechselwirkungen zwischen SecA, SecYEG und dem Vorläuferprotein auf einer bestimmten Stufe während des dynamischen Translokationsvorgangs geschaffen wurden. Demnach würden diese verschlechternden Wechselwirkungen den auf die Translokation positiv wirkenden „super-aktiven“ Zustand negativ überlagern.

Es bleibt somit festzuhalten, dass Mutationen, welche im *S. carnosus* SecA der Suppressormutanten identifiziert wurden, aus dem artifiziellen System auf das *B. subtilis* SecA übertragen werden konnten. In drei von fünf Fällen führten die auf diese Weise veränderten *B. subtilis* SecA Proteine zu einem verbesserten Export eines im *B. subtilis* Wildtyp nur schlecht exportierbaren Vorläuferproteins. Somit konnte die Beteiligung des SecA Proteins von *B. subtilis* an der Qualitätskontrolle bei der Translokation gezeigt werden und Mutationen im *B. subtilis* SecA erhalten werden, die zu einer Herabsetzung der Qualitätskontrolle führten. Auf diese Weise veränderte *B. subtilis* Stämme könnten eine biotechnologische Anwendung für eine verbesserte sekretorische Gewinnung heterologer Problemproteine finden, da sie potentiell die Sekretion von Proteinen, welche in einem Wildtypstamm nur schlecht transloziert werden, verbessern.

Im Weiteren könnten die aus den Suppressormutanten der RMA erhaltenen mutierten *S. carnosus* *secA* Gene in einen *S. carnosus* Wildtypstamm eingebracht werden. Somit wäre die Möglichkeit gegeben, dass auch solche veränderten *S. carnosus* Stämme eine herabgesetzte Qualitätskontrolle der Translokase aufweisen. Diese Stämme könnten neben

B. subtilis als alternative Expressionssysteme für die sekretorische Gewinnung problematischer heterologer Proteine eingesetzt werden.

4.4. Mutationen im *B. subtilis* SecY setzen die Qualitätskontrolle der *B. subtilis* Translokase herab

Bei der Initiation der Translokation eines Vorläuferproteins ist auch das SecY Protein ein essentieller Wechselwirkungspartner von SecA und dem Vorläuferprotein (Tippe, 2001). Daher war es wahrscheinlich, dass neben Mutationen im SecA von *B. subtilis* auch Mutationen im SecY erhalten werden könnten, welche im *B. subtilis* Wildtyp die Selektivität der Translokase herabsetzen.

In *E. coli* führen *prlA* Mutationen im SecY zu einer Herabsetzung der Qualitätskontrolle der Translokase, so dass Vorläuferproteine mit defekter Signelsequenz wieder transloziert werden können (Emr *et al.*, 1981; Osborne und Silhavy, 1993). Zusätzlich kann durch *prlA* Mutationen, wie am Beispiel des humanen Interleukin-6 gezeigt, auch die Translokation heterologer Proteine verbessert werden (Perez-Perez *et al.*, 1996). *B. subtilis* Stämme, welche *prlA* Mutationen im SecY enthalten, könnten daher ebenfalls biotechnologisch für eine verbesserte sekretorische Gewinnung heterologer Proteine einsetzbar sein. Drei Mutationen, welche im Transmembransegment 10 (TMS 10) des *B. subtilis* SecY Proteins lokalisiert waren, wurden auf ihre Fähigkeit, den Proteinexport im *B. subtilis* Wildtyp zu verbessern, charakterisiert. Diese entsprachen den Mutationen im SecY von *B. subtilis*, die dazu führten, dass der Sporulationsdefekt der *B. subtilis* *secA* Mutante *secA12* supprimiert wurde. Zudem entsprachen die Mutationsorte im *B. subtilis* SecY Orten von Mutationen im SecY von *E. coli*, die einen *prlA* Phänotyp bewirkten.

Als Modellprotein zur Untersuchung des Proteinexports in Gegenwart der veränderten SecY Proteine wurde zunächst das OmpA Protein verwendet. Dieses Protein wird in *B. subtilis* effizient transloziert, allerdings nicht so schnell wie in *E. coli*. Der für die Translokation limitierende Schritt von OmpA in *B. subtilis* könnte daher auf der Stufe der Initiation der Translokation liegen. Pulse-Chase Analysen zeigten, dass der OmpA Export in Gegenwart der mutierten SecY Proteine im Vergleich zum Wildtyp SecY unverändert war. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass der limitierende Schritt beim OmpA Export in *B. subtilis* nicht auf der Stufe der Initiation der Translokation liegt. Möglicherweise ist ein Schritt vor der Translokation, wie z. B. das „Targeting“ des OmpA Proteins zur Translokase geschwindigkeitsbestimmend.

Die Untersuchungen des Exports von PhoBL15Q zeigten, dass in Gegenwart der SecY Proteine SecY G399R und SecY I404N der Export von PhoBL15Q um den Faktor 2 - 2,5 im Vergleich zum Wildtyp SecY verbessert war. Dieser Befund zeigte, dass nicht nur durch Mutationen im SecA Protein, sondern tatsächlich auch durch Mutationen im SecY die Ausbildung des Translokations-Initiationskomplexes aus dem SecA, dem SecY und dem

defekten Vorläuferprotein optimiert wurde, wodurch die Qualitätskontrolle der *B. subtilis* Translokase herabgesetzt werden konnte. Somit wurden zum ersten Mal *prlA* Mutationen im *secY* von *B. subtilis* identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass das SecY Protein von *B. subtilis* ein Bestandteil des Qualitätskontrollsystems der *B. subtilis* Translokase ist.

Analog zur Wirkungsweise von *prlA* Mutationen im SecY von *E. coli*, könnte die gegenüber der Wildtyp Translokase herabgesetzte Selektivität durch die *prlA* Mutationen im *B. subtilis* SecY über eine Lockerung der Wechselwirkungen zwischen SecY und SecE erfolgen (Duong und Wickner, 1999). Diese Möglichkeit wird durch die Beobachtung unterstützt, dass in *E. coli* u. a. das TMS 10 von SecY direkt mit dem TMS 3 von SecE in Kontakt steht (Veenendaal *et al.*, 2002). Somit könnten die Mutationen im TMS 10 die SecY-SecE Wechselwirkungen schwächen und dadurch die ringförmige SecYEG Quartärstruktur (Meyer *et al.*, 1999; Manting *et al.*, 2000) aufweichen. Infolgedessen wäre die Energiebarriere zur Insertion des SecA Proteins mit gebundenem Vorläuferprotein herabgesetzt, so dass der SecYEG Kanal durch das SecA Protein leichter geöffnet werden könnte. Die Folge der energetisch begünstigten Reaktion wäre die herabgesetzte Selektivität der Translokase.

Entsprechend der Annahme von van der Wolk *et al.* (1998) könnte der verbesserte Export von PhoBL15Q auch auf einer Stabilisierung von SecA-SecY Wechselwirkungen beruhen. Demnach wäre in Gegenwart des Wildtyp SecY Proteins der Komplex aus dem SecA, SecY und dem PhoB L15Q instabil, so dass nach ATP Bindung kein funktioneller Initiationskomplex ausgebildet werden könnte und die Hydrolyse von ATP zum Dissoziieren von SecA und dem defekten Vorläuferprotein vom SecYEG Komplex und zum Abbruch der Translokation führen würde. Die Stabilisierung von SecA-SecY Wechselwirkungen in Gegenwart des SecY Proteins mit der *prlA* Mutation würde hingegen bewirken, dass das SecA Protein mit dem defekten Vorläufer nicht vom SecYEG Komplex dissoziiert und dadurch die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung eines funktionellen Translokations-Initiationskomplexes erhöht wäre. Entsprechend dieser Theorie würde der Überprüfungsschritt des Vorläuferproteins durch die Translokase nach Bindung von ATP und der Membraninsertion von SecA stattfinden.

Die Analysen der Suppressormutanten der RMA deuteten allerdings darauf hin, dass die Qualitätskontrolle auf der Stufe der Aktivierung der SecA ATPase stattfindet. Daher wäre denkbar, dass nicht nur intramolekulare Wechselwirkungen innerhalb des SecA Proteins den Aktivierungszustand regulieren, sondern auch das SecY direkt an der Regulation der ATPase Aktivität beteiligt ist. Demnach würde in Gegenwart der Wildtyp Translokase das SecA mit PhoBL15Q an das Wildtyp SecY binden, jedoch der nicht funktionelle Komplex bestehend aus SecA, SecY und dem defekten Vorläuferprotein die Freisetzung von ADP beeinträchtigen, so dass die Translokation nicht initiiert werden könnte. Eine durch die *prlA* Mutation veränderte Konformation des SecY Proteins könnte die Konformation des gebundenen SecA Proteins so verändern, dass die Freisetzung von ADP auch in Gegenwart

des defekten Vorläuferproteins ermöglicht wird und dadurch auch die Translokation des defekten Vorläuferproteins initiiert werden kann. Von Mori *et al.* (2002) wurden intramolekulare Suppressormutanten der *E. coli* SecY Mutante *secY205* selektioniert, welche eine zweite supprimierende Mutation innerhalb des SecY205 Proteins enthielten. Interessanterweise führte dieser Selektionsansatz zur Isolierung einer Zweitmutation, welche eine Aminosäure an der Position veränderte, die der veränderten Aminosäure I404 im *B. subtilis* SecY entspricht. Die biochemische Charakterisierung des mutierten SecY Proteins von *E. coli* zeigte, dass durch diese Mutation eine gleichbleibende Translokationsrate bei reduzierter Anzahl an SecYEG Komplexen erreicht wurde. Die Autoren schlossen aus diesem Ergebnis, dass durch die Mutation der Translokationskanal „super-aktiviert“ wird, so dass SecA am SecYEG Komplex schneller in einen translokationsaktiven Zustand gebracht wird. Dies könnte die Vermutung unterstützen, dass das SecY Protein direkt an der Regulation der SecA ATPase Aktivität beteiligt ist.

Es bleibt somit festzuhalten, dass in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass innerhalb des Translokations-Initiationskomplexes aus dem SecA, dem SecY und dem Vorläuferprotein neben dem SecA Protein auch das SecY Protein von *B. subtilis* an der Qualitätskontrolle bei der Translokation beteiligt ist. Zudem wurden Mutationen sowohl im SecA als auch im TMS 10 des SecY Proteins identifiziert, welche zu einer Herabsetzung der Qualitätskontrolle der *B. subtilis* Translokase führten.

5. Zusammenfassung

Die Translokation von Proteinen über die bakterielle Cytoplasmamembran wird von der Sec-Translokase katalysiert. Diese besteht aus dem SecA Protein, welches die Exportproteine in Abhängigkeit von ATP durch wiederholte Zyklen von Membraninsertion und -deinsertion durch den Translokationskanal, bestehend aus SecY, SecE und SecG, schleust. Für die Initiation der Translokation ist die Bildung eines funktionellen Komplexes bestehend aus SecA, SecY und dem Exportprotein essentiell. Dieser Schritt stellt eine Qualitätskontrolle dar, die bezüglich der zelleigenen Proteine zur Unterscheidung zwischen cytosolischen und Exportproteinen dient und bei der sekretorischen Gewinnung heterologer Proteine einen schwerwiegenden Engpass darstellen kann. In dieser Arbeit wurden molekulare Mechanismen, die innerhalb des Translokations-Initiationskomplexes für die Qualitätskontrolle entscheidend sind, im Detail untersucht.

Ausgangspunkt der Untersuchungen war eine *Bacillus subtilis* SecA-Austauschmutante (RMA), in der das *B. subtilis* secA Gen gegen das *Staphylococcus carnosus* secA Gen auf dem Chromosom ausgetauscht wurde. Dieser Austausch hat eine erhöhte Qualitätskontrolle der Hybridtranslokase zur Folge, die zu einem konditionalen Wachstumsdefekt aufgrund pleiotroper Exportdefekte bei 25 °C und interessanterweise zu einem selektiven Ausschluss eines heterologen Proteins (des OmpA Protein von *E. coli*) auch bei der permissiven Temperatur (37 °C) führt. Weitere Folgen des SecA Austausches sind ein Sporulations- und Kompetenzdefekt.

In dieser Arbeit wurden sieben spontane Suppressormutanten der RMA isoliert und charakterisiert, die aufgrund der Fähigkeit, das kältesensitive Wachstum bzw. den Sporulationsdefekt zu supprimieren, selektioniert wurden. Interessanterweise exportierten diese Mutanten nun auch das heterologe OmpA wieder besser als die RMA, was auf eine, im Vergleich zur RMA, herabgesetzte Qualitätskontrolle hindeutete. Die Bestimmung der Mutationsorte zeigte, dass alle Mutanten Veränderungen im SecA von *S. carnosus* enthielten. Überraschenderweise entsprachen die Positionen von vier Mutationen exakt den Positionen bekannter Mutationen im SecA von *E. coli*, die eine Erhöhung der ATPase Aktivität von SecA zur Folge haben („super-aktives“ SecA). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die entsprechenden Mutationen auch im *S. carnosus* SecA zu einer Erhöhung der ATPase Aktivität führen, wodurch der Export des heterologen OmpA wieder ermöglicht wird. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die schlechte Aktivierung der SecA ATPase durch das heterologe OmpA den kritischen Schritt bei der Translokation in der RMA darstellt. Eine Mutation lag in einem Bereich, der, wie vom SecA aus *E. coli* bekannt ist, mit SecY wechselwirkt. Daraus kann geschlossen werden, dass die Wechselwirkungen zwischen dem SecA von *S. carnosus* und dem SecY von *B. subtilis* aufgrund der Mutation optimiert wurden, wodurch auf diese Weise eine Aktivierung der SecA ATPase durch das heterologe OmpA ermöglicht wurde.

Da die RMA ein artifizielles System darstellt, wurde untersucht, ob durch Übertragung von Mutationen aus dem *S. carnosus* SecA auf die entsprechenden Positionen im *B. subtilis* SecA ein positiver Effekt auf die Proteintranslokation auch im *B. subtilis* Wildtyp erreicht werden kann. Die Übertragung von fünf Einzelmutationen führte in drei Fällen tatsächlich zu einem verbesserten Export einer Variante der alkalischen Phosphatase PhoB, die im *B. subtilis* Wildtyp nur sehr schlecht exportiert wird. Dies lässt auf eine konservierte Funktion der veränderten Aminosäuren bei Regulation der ATPase Aktivität im *S. carnosus* und *B. subtilis* SecA schließen.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Fähigkeit eines heterologen Proteins, die SecA ATPase zu aktivieren, für die Effizienz der

Translokation von entscheidender Bedeutung ist. Eine schlechte Aktivierung kann umgangen werden, indem entweder Wechselwirkungen zwischen SecA und SecY und dem Vorläuferprotein optimiert werden oder das SecA Protein in einen pre-aktivierten Zustand gebracht wird.

Da auch das SecY ein essentieller Bestandteil des Translokations-Initiationskomplexes ist, wurde untersucht, ob sich auch Veränderungen im SecY von *B. subtilis* positiv auf den Proteinexport auswirken. Von mehreren gezielt eingefügten Mutationen in Bereichen, die im *E. coli* SecY an der Qualitätskontrolle beteiligt sind, führten zwei Mutationen im Transmembransegment 10 tatsächlich auch zu einer verbesserten Translokation der im *B. subtilis* Wildtyp nur schlecht exportierbaren Variante der alkalischen Phosphatase. Dies zeigte, dass neben dem SecA Protein auch das SecY Protein einen wichtigen Bestandteil des Qualitätskontrollsystems der Translokase von *B. subtilis* darstellt.

6. Literaturverzeichnis

- Akimaru, J., Matsuyama, S., Tokuda, H. und Mizushima, S. (1991) Reconstitution of a protein translocation system containing purified SecY, SecE, and SecA from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88(15): 6545-6549
- Akita, M., Shinkai, A., Matsuyama, S. und Mizushima, S. (1991) SecA, an essential component of the secretory machinery of *Escherichia coli*, exists as homodimer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174(1):211-216.
- Asai, K., Kawamura, F., Sadaie, Y. und Takahashi, H. (1997) Isolation and characterization of a sporulation initiation mutation in the *Bacillus subtilis secA* gene. *J. Bacteriol.* 179(2):544-547.
- Ayora, S., Lindgren, P., und Götz, F. (1994) Biochemical properties of a novel metalloprotease from *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* involved in extracellular lipase processing. *J. Bacteriol.* 176 (11): 3218-3223
- Bassilana, M., Arkowitz, R.A. und Wickner, W. (1992) The role of the mature domain of proOmpA in the translocation ATPase reaction. *J. Biol. Chem.* 267(35):25246-25250.
- Baud, C., Karamanou, S., Sianidis, G., Vrontou, E., Politou, A.S. und Economou, A. (2002) Allosteric communication between signal peptides and the SecA protein DEAD motor ATPase domain. *J. Biol. Chem.* 277(16):13724-13731
- Beck, K., Eisner, G., Trescher, D., Dalbey, R.E., Brunner, J. und Muller, M. (2001) YidC, an assembly site for polytopic *Escherichia coli* membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. *EMBO Rep.* 2(8):709-714.
- Bernstein, H.D., Poritz, M.A., Strub, K., Hoben, P.J., Brenner, S. und Walter, P. (1989) Model for signal sequence recognition from amino-acid sequence of 54K subunit of signal recognition particle. *Nature* 340(6233):482-486.
- Bieker, K.L. und Silhavy, T.J. (1990) PrlA (SecY) and PrlG (SecE) interact directly and function sequentially during protein translocation in *Escherichia coli*. *Cell* 61(5):833-842.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 24;7(6):1513-1523.
- Bolhuis, A., Broekhuizen, C.P., Sorokin, A. van Rosmalen, M.L., Venema, G., Bron, S. Quax, W.J., und van Dijl J.M. (1998) SecDF of *Bacillus subtilis*, a molecular siamese twin required for the efficient secretion of proteins. *J. Biol. Chem.* 273: 21217-21224
- Bolhuis, A., Tjalsma, H., Smith, H.E., de Jong, A., Meima, R., Venema, G., Bron, S. und van Dijl, J.M. (1999) Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(7):2934-2941
- Bost, S. und Belin, D. (1997) Prl mutations in the *Escherichia coli secG* gene. *J. Biol. Chem.* 272 (7):4087-4093
- Braun, P., Gerritse, G., van Dijl, J.M. und Quax, W.J. (1999) Improving protein secretion by engineering components of the bacterial translocation machinery. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10(4):376-381.

- Brundage, L., Hendrick, J.P., Schiebel, E., Driessen, A.J. und Wickner, W. (1990) The purified *Escherichia coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* 62(4): 649-657
- Bunai, K., Yamada, K., Hayashi, K., Nakamura, K., und Yamane, K. (1999): Enhancing effect of *Bacillus subtilis* Ffh, a homologue of the SRP54 subunit of the mammalian signal recognition particle, on the binding of SecA to precursors of secretory proteins in vitro. *J. Biochem. (Tokyo)* 125 (1):151-159
- Cabelli, R.J., Chen, L., Tai, P.C. und Oliver, D.B. (1988) SecA protein is required for secretory protein translocation into *Escherichia coli* membrane vesicles. *Cell* 55(4): 683-692
- Cabelli, R.J., Dolan, K.M., Qian, L.P. und Oliver, D.B. (1991) Characterization of membrane-associated and soluble states of SecA protein from wild-type and SecA51(TS) mutant strains of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266(36):24420-24427.
- Chen, M.W. und Nagarajan, V. (1993) Chloramphenicol acetyltransferase, a cytoplasmic protein is incompatible for export from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 175 (17):5697-5700.
- Cunningham, K. und Wickner, W. (1989) Specific recognition of the leader region of precursor proteins is required for the activation of translocation ATPase of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86(22):8630-8634
- Dalbey, R.E., Lively, M.O., Bron, S. und van Dijl, J.M. (1997) The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein. Sci.* 6(6):1129-1138
- Dalbey, R.E. und von Heijne, G. (1992) Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes--a new protease family. *Trends Biochem. Sci.* 17(11): 474-478
- De Gier, J.W., Valent, Q.A., Von Heijne, G. und Luirink, J. (1997) The *Escherichia coli* SRP: preferences of a targeting factor. *FEBS Lett.* 408(1):1-4.
- den Blaauwen, T., Fekkes, P., de Wit, J.G., Kuiper, W. und Driessen, A.J. (1996) Domain interactions of the peripheral preprotein Translocase subunit SecA. *Biochemistry* 35(37):11994-12004.
- Derman, A.I., Puziss, J.W., Bassford, P.J. und Beckwith, J. (1993) A signal sequence is not required for protein export in *prl* mutants of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 12: 879-888
- Ding, H., Mukerji, I. und Oliver, D. (2001) Lipid and signal peptide-induced conformational changes within the C-domain of *Escherichia coli* SecA protein. *Biochemistry* 40(6):1835-1843.
- Dolan, K.M., und Oliver D.B. (1991) Characterization of *Escherichia coli* SecA protein binding to a site on its mRNA involved in autoregulation. *J Biol Chem.* 266 (34):23329-23333.
- Driessen, A.J. (1993) SecA, the peripheral subunit of the *Escherichia coli* precursor protein translocase, is functional as a dimer. *Biochemistry* 32(48):13190-13197.
- Driessen, A.J., Manting, E.H. und van der Does, C. (2001) The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. *Nat. Struct. Biol.* 8(6):492-498.
- Duong, F. und Wickner, W. (1997a) Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO J.* 19: 2756-2768

- Duong, F. und Wickner, W. (1997b) The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J.* 16: 4871-4879
- Duong, F. und Wickner, W. (1999) The PrIA and PrIG phenotypes are caused by a loosened association among the translocase SecYEG subunits. *EMBO J.* 18 (12):3263-3270
- Economou, A., Pogliano, J.A., Beckwith, J., Oliver, D.B. und Wickner, W. (1995) SecA membrane cycling is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell* 83: 1171-1181
- Economou, A und Wickner, W. (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* 78(5):835-843.
- Emr, S.D., Hanley-Way, S. und Silhavy T.J. (1981) Suppressor mutations that restore export of a protein with a defective signal sequence. *Cell* 23(1):79-88.
- Fekkes, P., van der Does, C., und Driessen, A.J.M. (1997) The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J.* 16:6105-6113
- Fikes, J.D. und Bassford P.J. Jr. (1989) Novel *secA* alleles improve export of maltose-binding protein synthesized with a defective signal peptide. *J. Bacteriol.* 171 (1):402-409.
- Flower, A.M., Doebele, C.L. und Silhavy, T.J. (1994) PrIA and PrIG suppressors reduce the requirement for signal sequence recognition. *J. Bacteriol.* 176 (18):5607-5614.
- Flower, A.M., Osborne, R.S. und Silhavy, T.J. (1995) The allele-specific lethality of *prIA-prIG* double mutants predicts interactive domains of SecY and SecE. *EMBO J.* 14:884-893
- Flower, A.M., Hines, L.L. und Pfennig, P.L. (2000) SecG is an auxiliary component of the protein export apparatus of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 263(1):131-136.
- Freudl, R. und Henning, U. (1988) On the role of the mature part of an *Escherichia coli* outer membrane protein (OmpA) in translocation across the plasma membrane. *J. Mol. Biol.* 203(2): 517-519
- Freudl, R., Schwarz, H., Degen, M. und Henning, U. (1989) A lower size limit exists for export of fragments of an outer membrane protein (OmpA) of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 205(4): 771-775
- Gardel, C., Benson, S., Hunt, J., Michaelis, S. und Beckwith J. (1987) *secD*, a new gene involved in protein export in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169(3):1286-1290.
- Hanada, M., Nishiyama, K.I., Mizushima, S. und Tokuda, H. (1994) Reconstitution of an efficient protein translocation machinery comprising SecA and the three membrane proteins, SecY, SecE, and SecG (p12). *J. Biol. Chem.* 269(38): 23625-23631
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA Cloning: A practical approach* (ed. D.M. Glover) vol. 1 p.109. IRL Press, Oxford
- Hardy, K.G. (1985) *Bacillus* cloning methods. In: DNA cloning Vol. II (Glover, D.M. ed), IRL Press, Oxford, Washington D.C. S. 1-17
- Harris C. R. and Silhavy T.J. (1999) Mapping an interface of SecY (PrIA) and SecE (PrIG) by using synthetic phenotypes and in vivo cross-linking. *J. Bacteriol.* 181 (11): 3438-3444

- Hartl, F.U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J.P. und Wickner, W. (1990) The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *Escherichia coli* plasma membrane. *Cell* 63(2):269-279
- Hendrick, J.P. und Wickner, W. (1991) SecA protein needs both acidic phospholipids and SecY/E protein for functional high-affinity binding to the *Escherichia coli* plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 266(36):24596-24600
- Herbort, M., Klein, M., Manting, E.H., Driessen, A.J. und Freudl, R. (1999) Temporal expression of the *Bacillus subtilis* secA gene, encoding a central component of the preprotein translocase. *J. Bacteriol.* 181(2):493-500
- Hunt, J.F., Weinkauff, S., Henry, L., Fak, J.J., McNicholas, P., Oliver, D.B., und Deisenhofer, J. (2002) Nucleotide control of interdomain interactions in the conformational reaction cycle of SecA. *Science* 297: 2018-2026
- Ichihara, S., Beppu, N. und Mizushima, S. (1984) Protease IV, a cytoplasmic membrane protein of *Escherichia coli*, has signal peptide peptidase activity. *J. Biol. Chem.* 259 (15):9853-9857
- Ito, K., Wittekind, M., Nomura, M., Shiba, K., Yura, T., Miura, A. und Nashimoto, H. (1983) A temperature-sensitive mutant of *Escherichia coli* exhibiting slow processing of exported proteins. *Cell* 32(3):789-797.
- Jeong, S.M., Yoshikawa, H., und Takahashi, H. (1993) Isolation and characterization of the secE homologue gene of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 10:133-142
- Johnson, A.E. und van Waes, M.A. (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15:799-842.
- Joly, J.C., Leonard, M.R. und Wickner, W.T. (1994) Subunit dynamics in *Escherichia coli* preprotein translocase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91(11):4703-4707.
- Joly, J.C. und Wickner W. (1993) The SecA and SecY subunits of translocase are the nearest neighbors of a translocating preprotein, shielding it from phospholipids. *EMBO J.* 12(1):255-263.
- Karamanou, S., Vrontou, E., Sianidis, G., Baud, C., Roos, T., Kuhn, A., Politou, A.S. und Economou, A. (1999) A molecular switch in SecA protein couples ATP hydrolysis to protein translocation. *Mol. Microbiol.* 34(5):1133-1145.
- Kawamura, F. und Doi, R.H. (1984) Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. *J. Bacteriol.* 160(1):442-444.
- Kihara, A., Akiyama, Y. und Ito, K. (1995) FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92(10):4532-4536.
- Kimura, E., Akita, M., Matsuyama, S. und Mizushima, S. (1991) Determination of a region in SecA that interacts with presecretory proteins in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266(10):6600-6606.
- Klein, M., Meens, J., und Freudl, R. (1995): Functional characterization of the *Staphylococcus carnosus* SecA protein in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* secA mutant strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 131: 271-277

- Klose, M., Schimz, K.L., van der Wolk, J., Driessen, A.J.M. und Freudl, R. (1993) Lysine 106 of the putative catalytic ATP-binding site of the *Bacillus subtilis* SecA protein is required for functional complementation of *Escherichia coli* secA mutants *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 268 (6): 4504-4510
- Kobayashi, H., Ohashi, Y., Nanamiya, H., Asai, K. und Kawamura, F. (2000) Genetic analysis of SecA-SecY interaction required for spore development in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 184(2):285-289.
- Köberling, O. (2000) Isolierung und Charakterisierung von Revertanten einer kälteempfindlichen secA-Austauschmutante von *B. subtilis*. Diplomarbeit, Forschungszentrum Jülich
- Kumamoto, C.A. und Beckwith, J. (1983) Mutations in a new gene, secB, cause defective protein localization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 154(1):253-260.
- Kunst, F., *et al.* (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390(6657):249-256.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lazazzera, B.A., Kurtser, I.G., McQuade, R.S. und Grossman A.D. (1999) An autoregulatory circuit affecting peptide signaling in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181(17):5193-5200.
- Leloup, L., Driessen, A.J., Freudl, R., Chambert, R. und Petit-Glatron, M.F. (1999) Differential dependence of levansucrase and alpha-amylase secretion on SecA (Div) during the exponential phase of growth of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181(6):1820-1826.
- Liebl, W. und Götz, F. (1986) Studies on Lipase directed export of *Escherichia coli* β -lactamase in *Staphylococcus carnosus*. *Mol. Gen. Genet.* 204:166-173
- Lill, R., Cunningham, K., Brundage, L.A., Ito, K., Oliver, D. und Wickner, W. (1989) SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 8(3): 961-966
- Lill, R., Dowhan, W. und Wickner, W. (1990) The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell* 60(2):271-280
- Luirink, J., ten Hagen-Jongman, C.M., van der Weijden, C.C., Oudega, B., High, S., Dobberstein, B. und Kusters, R. (1994) An alternative protein targeting pathway in *Escherichia coli*: studies on the role of FtsY. *EMBO J* 13(10):2289-2296
- Manting, E.H., van der Does, C. und Driessen, A.J. (1997) *In vivo* cross-linking of the SecA and SecY subunits of the *Escherichia coli* preprotein translocase. *J. Bacteriol.* 179(18):5699-5704.
- Manting, E.H., Kaufmann, A., van der Does, C. und Driessen, A.J. (1999) A single amino acid substitution in SecY stabilizes the interaction with SecA. *J. Biol. Chem* 274(34):23868-23874.
- Manting, E.H. und Driessen, A.J. (2000) *Escherichia coli* translocase: the unravelling of a molecular machine. *Mol. Microbiol.* 37(2):226-238.

- Manting, E.H., van Der Does, C., Remigy, H., Engel, A. und Driessen, A.J. (2000) SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *EMBO J.* 19(5):852-861.
- Matsumoto, G., Yoshihisa, T. und Ito, K. (1997) SecY and SecA interact to allow SecA insertion and protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *EMBO J.* 16(21):6384-6393.
- Matsumoto, G., Nakatogawa, H., Mori, H. und Ito K. (2000) Genetic dissection of SecA: suppressor mutations against the secY205 translocase defect. *Genes Cells* 5(12):991-999
- Matsuyama, S., Fujita, Y., und Mizushima, S. (1993) SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 12: 265-270
- Meens, J., Frings, E., Klose, M. und Freudl, R. (1993) An outer membrane protein (OmpA) of *Escherichia coli* can be translocated across the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 9(4): 847-855
- Meens, J., Herbort, M., Klein, M. und Freudl, R. (1997) Use of the pre-pro part of *Staphylococcus hyicus* lipase as a carrier for secretion of *Escherichia coli* outer membrane protein A (OmpA) prevents proteolytic degradation of OmpA by cell-associated protease(s) in two different gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(7):2814-2820.
- Meyer, T.H., Menetret, J.F., Breitling, R., Miller, K.R., Akey, C.W. und Rapoport, T.A. (1999) The bacterial SecY/E translocation complex forms channel-like structures similar to those of the eukaryotic Sec61p complex. *J. Mol. Biol.* 285(4):1789-1800.
- Miller, J.D., Bernstein, H.D. und Walter, P. (1994) Interaction of *Escherichia coli* Ffh/4.5S ribonucleoprotein and FtsY mimics that of mammalian signal recognition particle and its receptor. *Nature* 367(6464):657-659
- Miller, A., Wang, L. und Kendall, D.A. (1998) Synthetic signal peptides specifically recognize SecA and stimulate ATPase activity in the absence of preprotein. *J. Biol. Chem.* 273(19):11409-11412
- Mitchell C., und Oliver D. (1993) Two distinct ATP-binding domains are needed to promote protein export by *Escherichia coli* SecA ATPase. *Mol. Microbiol.* 10:483-497
- Miyakawa, Y., Komano, T. (1981) Study of the cell cycle of *Bacillus subtilis* using temperature-sensitive mutants. Isolation and genetic analysis of the mutants defective in septum formation. *Mol. Gen. Genet.* 181:207-214
- Mori, H., Shimizu, Y. und Ito, K. (2002) Superactive SecY variants that fulfill the essential translocation function with a reduced cellular quantity. *J. Biol. Chem.* 277(50):48550-48557
- Murphy, C.K. und Beckwith, J. (1994) Residues essential for the function of SecE, a membrane component of the *Escherichia coli* secretion apparatus, are located in a conserved cytoplasmic region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91(7):2557-2561
- Nagamori, S., Nishiyama, K. und Tokuda, H. (2002) Membrane topology inversion of SecG detected by labeling with a membrane-impermeable sulfhydryl reagent that causes a close association of SecG with SecA. *J. Biochem. (Tokyo)* 132(4):629-634

- Nakamura, K., Takamatsu, H., Akiyama, Y., Ito, K. und Yamane K. (1990) Complementation of the protein transport defect of an *Escherichia coli* *secY* mutant (*secY24*) by *Bacillus subtilis* *secY* homologue. *FEBS Lett.* 273(1-2):75-78.
- Nakatogawa, H., Mori, H. und Ito, K. (2000) Two independent mechanisms down-regulate the intrinsic SecA ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 275(43):33209-33212.
- Nishiyama, K., Mizushima, S. und Tokuda, H. (1993) A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 12(9):3409-3415
- Nishiyama, K., Hanada, M. und Tokuda, H. (1994) Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J.* 13(14):3272-3277.
- Nishiyama, K., Suzuki, T. und Tokuda, H. (1996) Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell* 85(1):71-81.
- Nouwen, N. und Driessen, A.J. (2002) SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC. *Mol. Microbiol.* 44(5):1397-1405
- Novak, P. und Dev, I.K. (1988) Degradation of a signal peptide by protease IV and oligopeptidase A. *J. Bacteriol.* 170(11): 5067-5075
- Oliver, D.B. und Beckwith, J. (1981) *E. coli* mutant pleiotropically defective in the export of secreted proteins. *Cell* 25(3):765-772.
- Oliver, D.B., Cabelli, R.J., Dolan, K.M. und Jarosik, G.P. (1990) Azide-resistant mutants of *Escherichia coli* alter the SecA protein, an azide-sensitive component of the protein export machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87(21):8227-8231
- Osborne, R.S. und Silhavy, T.J. (1993) PrlA suppressor mutations cluster in regions corresponding to three distinct topological domains. *EMBO J.* 12: 3391-3398
- Overhoff, B., Klein, M., Spies, M. und Freudl, R. (1991) Identification of a gene fragment which codes for the 364 amino-terminal amino acid residues of a SecA homologue from *Bacillus subtilis*: further evidence for the conservation of the protein export apparatus in gram-positive and gram-negative bacteria. *Mol. Gen. Genet.* 228(3):417-423.
- Park, S., Liu, G., Topping, T.B., Cover, W.H., und Randall, L.L. (1988) Modulation of folding pathways of exported proteins by the leader sequence. *Science* 239 (4843):1033-1035
- Perego, M. (1997) A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94(16):8612-8617
- Perego, M. und Brannigan, J.A. (2001) Pentapeptide regulation of aspartyl-phosphate phosphatases. *Peptides* 22(10):1541-1547.
- Perez-Perez, J., Barbero, J.L., Marquez, G. und Gutierrez, J. (1996) Different PrlA proteins increase the efficiency of periplasmic production of human interleukin-6 in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 49(1-3):245-247.
- Pogliano, K.J. und Beckwith, J. (1993) The Cs *sec* mutants of *Escherichia coli* reflect the cold sensitivity of protein export itself. *Genetics* 133(4):763-773.

- Poritz, M.A., Bernstein, H.D., Strub, K., Zopf, D., Wilhelm, H. und Walter, P. (1990) An *Escherichia coli* ribonucleoprotein containing 4.5S RNA resembles mammalian signal recognition particle. *Science* 250(4984):1111-1117.
- Powers, T. und Walter P. (1997) Co-translational protein targeting catalyzed by the *Escherichia coli* signal recognition particle and its receptor. *EMBO J.* 16(16):4880-4886
- Pragai, Z., Tjalsma, H., Bolhuis, A., van Dijl, J.M., Venema, G. und Bron, S. (1997) The signal peptidase II (*Isp*) gene of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* ;143 (Pt 4):1327-1333
- Prinz, W.A., Spiess, C., Ehrmann, M., Schierle, C., und Beckwith, J., (1996) Targeting of signal sequence less for export in *Escherichia coli* with altered protein translocase. *EMBO J.* 15: 5209-5217
- Randall, L.L. und Hardy S.J. (1995) High selectivity with low specificity: how SecB has solved the paradox of chaperone binding. *Trends Biochem. Sci.* 20(2):65-69.
- Randall, L.L., Topping, T.B., und Hardy, S.J. (1990) No specific recognition of leader peptide by SecB, a chaperone involved in protein export. *Science* 248 (4957): 860-863
- Rapoport, T.A., Rolls, M.M. und Jungnickel, B.(1996) Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8(4):499-504.
- Riggs, P.D., Derman, A.I. und Beckwith, J. (1988) A mutation affecting the regulation of a *secA-lacZ* fusion defines a new *sec* gene. *Genetics* 118(4):571-579
- Roos, T., Kiefer, D., Hugenschmidt, S., Economou, A. und Kuhn, A. (2001) Indecisive M13 procoat protein mutants bind to SecA but do not activate the translocation ATPase. *J. Biol. Chem.* 276(41):37909-37915.
- Rygus, T. und Hillen, W. (1991) Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35(5): 594-599.
- Sadaie, Y. und Kada, T. (1983) Formation of competent *Bacillus subtilis* cells. *J. Bacteriol.* 153(2): 813-281.
- Sadaie, Y. und Kada, T. (1985) *Bacillus subtilis* gene involved in cell division, sporulation, and exoenzyme secretion. *J. Bacteriol* 163(2):648-653.
- Sadaie, Y., Takamatsu, H., Nakamura, K. und Yamane, K. (1991) Sequencing reveals similarity of the wild-type *div+* gene of *Bacillus subtilis* to the *Escherichia coli secA* gene. *Gene.* 98(1):101-105.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 29;239(4839):487-491
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Samuelson, J.C., Chen, M., Jiang, F., Moller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G.J. und Dalbey, R.E. (2000) YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* 406(6796):637-641
- Sarvas M. (1986) Protein secretion in bacilli. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 125: 103-125

- Schatz, P.J., Bieker, K.L., Ottemann, K.M., Silhavy, T.J. und Beckwith, J. (1991) One of three transmembrane stretches is sufficient for the functioning of the SecE protein, a membrane component of the *Escherichia coli* secretion machinery. *EMBO J.* 10(7):1749-1757.
- Schein, C.H., Kashiwagi, K., Fujisawa, A. und Weissmann, C. (1986) Secretion of mature IFN- α 2 and accumulation of uncleaved precursor by *Bacillus subtilis* transformed with a hybrid α -amylase signal sequence-IFN- α 2 gene. *Bio/Technology* 4:719-725
- Schmidt, M., Ding, H., Ramamurthy, V., Mukerji, I. und Oliver, D. (2000) Nucleotide binding activity of SecA homodimer is conformationally regulated by temperature and altered by *prfD* and *azi* mutations. *J. Biol. Chem.* 275(20):15440-15448.
- Scotti, P.A., Urbanus, M.L., Brunner, J., de Gier, J.W., von Heijne, G., van der Does, C., Driessen, A.J., Oudega, B. und Luirink, J. (2000) YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J.* 19(4):542-549.
- Sharma, V., Arockiasamy, A., Ronning, D.R., Savva, C.G., Holzenburg, A., Braunstein, M., Jacobs, W.R. Jr und Sacchettini, J.C. (2003) Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* SecA, a preprotein translocating ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100(5):2243-2248.
- Sianidis, G., Karamanou, S., Vrontou, E., Boulias, K., Repanas, K., Kyripides, N., Politou, A.S. und Economou, A. (2001) Cross-talk between catalytic and regulatory elements in a DEAD motor domain is essential for SecA function. *EMBO J.* 20(5):961-970.
- Simonen, M. und Palva, I. (1993) Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol. Rev.* 57(1):109-137.
- Sonenshein, A.L. (2000) Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3(6):561-566.
- Stader, J., Gansheroff, L.J. und Silhavy, T.J. (1989) New suppressors of signal-sequence mutations, *prfG*, are linked tightly to the *secE* gene of *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 3(7):1045-1052.
- Suh, J.W., Boylan, S.A., Thomas, S.M., Dolan, K.M., Oliver, D.B. und Price, C.W. (1990) Isolation of a *secY* homologue from *Bacillus subtilis*: evidence for a common protein export pathway in eubacteria. *Mol. Microbiol.* 4(2):305-314.
- Suzuki, T., Itoh, A., Ichihara, S., und Mizushima, S. (1987) Characterization of the *sppA* gene coding for protease IV, a signal peptide peptidase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169(6): 2523-2528
- Swaving, J., van Wely, K.H. und Driessen, A.J. (1999) Preprotein translocation by a hybrid translocase composed of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* subunits. *J. Bacteriol.* 181(22):7021-7027.
- Takamatsu, H., Fuma, S., Nakamura, K., Sadaie, Y., Shinkai, A., Matsuyama, S., Mizushima, S. und Yamane, K. (1992) *In vivo* and *in vitro* characterization of the *secA* gene product of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174(13): 4308-4316.
- Taura, T., Akiyama, Y. und Ito, K. (1994) Genetic analysis of SecY: additional export-defective mutations and factors affecting their phenotypes. *Mol. Gen. Genet.* 243(3):261-269.
- Taura, T., Yoshihisa, T. und Ito K. (1997) Protein translocation functions of *Escherichia coli* SecY: in vitro characterization of cold-sensitive *secY* mutants. *Biochimie* 79(8):517-521.

Tippe, D. (2001) Untersuchungen von *in vivo* Wechselwirkungen zwischen sekretorischen Vorläuferproteinen und Komponenten des Proteinexportapparates Gram-positiver Bakterien. Berichte des Forschungszentrums Jülich; Jül-3877

Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J.D.H., Bron, S., und van Dijl, J.M. (2000) Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *MMBR* 64 (3):515-547

Ulbrandt, N.D., London, E. und Oliver, D.B. (1992) Deep penetration of a portion of *Escherichia coli* SecA protein into model membranes is promoted by anionic phospholipids and by partial unfolding. *J. Biol. Chem.* 267(21):15184-15192.

Ulbrandt, N.D., Newitt, J.A. und Bernstein, H.D. (1997) The *Escherichia coli* signal recognition particle is required for the insertion of a subset of inner membrane proteins. *Cell* 88(2):187-196.

Urbanus, M.L., Scotti, P.A., Froderberg, L., Saaf, A., de Gier, J.W., Brunner, J., Samuelson, J.C., Dalbey, R.E., Oudega, B. und Luirink, J. (2001) Sec-dependent membrane protein insertion: sequential interaction of nascent FtsQ with SecY and YidC. *EMBO Rep.* 2(6):524-529

Valent, Q.A., Scotti, P.A., High, S., de Gier, J.W., von Heijne, G., Lentzen, G., Wintermeyer, W., Oudega, B. und Luirink, J. (1998) The *Escherichia coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon. *EMBO J.* 17(9):2504-2512.

van der Sluis, E.O., Nouwen, N. und Driessen A.J. (2002) SecY-SecY and SecY-SecG contacts revealed by site-specific crosslinking. *FEBS Lett.* 527(1-3):159-165.

van der Wolk, J.P.W., Fekkes, P., Boorsma, A., Huie, J.L. Silhavy, T.J., und Driessen, A.J.M. (1998) PrlA4 prevents the rejection of signal sequence defective preproteins by stabilizing the SecA-SecY interaction during the initiation of translocation. *EMBO J.* 17 (13):3631-3639

van der Wolk, J.P., de Wit, J.G. und Driessen A.J. (1997) The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *EMBO J.* 16(24):7297-7304.

van Dijl, J.M., de Jong, A., Smith, H., Bron, S. und Venema, G (1991) Non-functional expression of *Escherichia coli* signal peptidase I in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 137 (Pt 9): 2073-2083.

van Wely, K.H., Swaving, J., Broekhuizen, C.P., Rose, M., Quax, W.J. und Driessen, A.J. (1999) Functional identification of the product of the *Bacillus subtilis* *yvaL* gene as a SecG homologue. *J. Bacteriol.* 181(6):1786-1792.

van Wely, K.H., Swaving, J., Freudl, R. und Driessen, A.J. (2001) Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25(4):437-454.

von Heijne, G. (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* 184(1):99-105.

Veenendaal, A.K., van der Does, C. und Driessen, A.J. (2001) Mapping the sites of interaction between SecY and SecE by cysteine scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 276(35):32559-32566

Veenendaal, A.K., Van Der Does, C. und Driessen A.J. (2002) The core of the bacterial translocase harbors a tilted transmembrane segment 3 of SecE. *J. Biol. Chem.* 277(39):36640-36645.

- von Heijne G. (1990) The signal peptide. *J. Membr. Biol.* 115(3):195-201.
- von Heijne G. und Abrahmsén L. (1989) Species-specific variation in signal peptide design. *FEBS Lett.* 244:439-446
- Wang, L., Miller, A. und Kendall, D.A. (2000) Signal peptide determinants of SecA binding and stimulation of ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 275(14):10154-10159.
- Wenzig, E., Lottspeich, F., Verhheij, B., DeHaas, G.H., und Götz, F. (1990) Extracellular processing of the *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochem. (Life Sci. Adv.)* 9:47-56
- Wolfe, P.B., Rice, M. und Wickner, W. (1985) Effects of two sec genes on protein assembly into the plasma membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 260(3):1836-1841.
- Wong, S.L. (1995) Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6(5):517-522.
- Yamada, H., Yamagata, H. und Mizushima, S. (1984) The major outer membrane lipoprotein and new lipoproteins share a common signal peptidase that exists in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 166(1): 179-182
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33(1):103-119.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Oliver Köberling
Geburtsdatum: 01.03.1973
Geburtsort: Duisburg
Wohnort: Düsseldorf

Schulbildung

1979-1983 Gemeinschaftsgrundschule Obermauerstraße, Duisburg
1983-1992 Landfermann-Gymnasium, Duisburg

Zivildienst

1992-1993 Alten- und Krankenhaus Duisburg –Beeck

Hochschulstudium

10/1994 - 02/2000 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-universität Düsseldorf
davon
03/1999 - 02/2000 Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie 1 im Forschungszentrum
Jülich unter der Anleitung von Prof. R. Freudl
Thema: „Isolierung und Charakterisierung von Revertanten einer
kälteempfindlichen *secA*-Austauschmutante von *Bacillus subtilis*“

Promotion

04/2000 - 06/2003 Dissertation am Institut für Biotechnologie 1 im Forschungszentrum
Jülich unter der Anleitung von Prof. R. Freudl
Thema: „Mechanismen der Qualitätskontrolle bei der Sec-
abhängigen Proteintranslokation in Gram-positiven Bakterien.“

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Roland Freudl für die Überlassung dieses besonders spannenden Themas, für seine ständige Hilfsbereitschaft, sowie seine guten und wertvollen Ratschläge, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. J. F. Ernst danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. H. Sahn danke ich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und für sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Proteinsekretion“ Astrid Bida, Gaby Decker, Maren Hintz, Angela Vollstedt, Michael Caspers, Peter Kreuzenbeck, Daniel Meißner und Dr. Carlo Schimz danke ich für das schöne Arbeitsklima und eine anregende, abwechslungsreiche Zeit im Labor.

Dr. Carlo Schimz danke ich für die Bereitstellung der großen Mengen an Antikörpern, die in zahlreichen Versuchen ihren Einsatz fanden.

Ebenso gilt mein Dank unseren ehemaligen Mitgliedern Natascha Blaudeck, Grit Hehmann, Stephanie Schnicke, Rainer M. Kappes, Michael Klein (dem ich alles zu verdanken habe...), Arne Matzen und Dietmar Tippe für gute Ratschläge bei den alltäglichen Arbeiten im Labor.

Allen Mitarbeitern des IBT 1 möchte ich für das gute Arbeitsklima danken, welches die Zeit an diesem Institut unvergessen macht.

Allen Mitgliedern der „European Bacillus Secretion Group“ danke ich für die äußerst freundliche Atmosphäre, die bei den halbjährigen Treffen herrschte und für den interessanten Gedankenaustausch rund um *Bacillus subtilis*.

Nicht vergessen möchte ich an dieser Stelle Oliver Heinze und Robin Ghosh, denen ich zu Dank verpflichtet bin, da sie mir während der gesamten Zeit gezeigt haben, dass es noch ein Leben neben der Arbeit gibt (na zdravý!).

Nicht zuletzt danke ich natürlich meinen Eltern und Christina für die ständige Unterstützung und das Verständnis besonders während der letzten Phase der Arbeit.