

Sekretorische Gewinnung von Enzymen aus dem  
thermoalkaliphilen Bakterium *Anaerobranca gottschalkii*  
im mesophilen Wirt *Staphylococcus carnosus*

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

vorgelegt von  
Angela Vollstedt  
aus Düsseldorf

Jülich 2003

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

Referent: Prof. Dr. R. Freudl

Koreferent: Prof. Dr. C. P. Hollenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 1. 2004

## Secretory production of enzymes from the thermoalkaliphilic bacterium *Anaerobranca gottschalkii* in the mesophilic host *Staphylococcus carnosus*

Enzymes from extremophilic microorganisms offer great potential as biocatalysts for industrial applications. However, no optimal expression systems exist for the production of such "extremozymes" to date. In contrast to the intracellular production of enzymes, secretory protein production with mesophilic Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus carnosus* offers the advantage of the proteins being secreted directly into the culture supernatant. Contrary to most other Gram-positive bacteria, *S. carnosus* is a particularly suitable production host as it does not secrete any proteases into the culture supernatant that may compromise the yields of secreted heterologous proteins. Expression systems were established for the secretory production of extremozymes derived from the thermoalkaliphilic bacterium *Anaerobranca gottschalkii* in the host *S. carnosus*.

In principle, two secretion pathways exist in Gram-positive bacteria which may be used for the secretion of heterologous proteins, for which the general Sec pathway is particularly well established. Sec-dependent secretion of heterologous proteins, which necessitates translocated proteins to assume their native conformation outside the cytosol, is often inefficient as these proteins frequently fail to fold rapidly enough in the cell envelope to avoid degradation by cell wall-associated proteases. The recently identified Tat pathway, for which biotechnological applications in Gram-positive bacteria have not been described so far, is unique in secreting fully folded proteins from the cell. The use of the Tat pathway, in which folding of the substrates occurs prior to their export, would avoid many of the problems associated with the Sec-dependent secretion of heterologous proteins and allow the secretory production of such proteins in bacteria for which this has so far not been feasible.

It was investigated whether *S. carnosus* possesses a Tat pathway and whether this is capable of secreting foreign proteins from the cell. Fusion of two model proteins, an intracellular branching enzyme and an extracellular CGTase from *A. gottschalkii*, with the signal sequence of the *E. coli* Tat substrate TorA resulted in the secretion of both enzymes in an active conformation into the culture supernatant of *S. carnosus*. Inactivation of the putative Tat translocase receptor, TatC, inhibited the secretion of both enzymes in *S. carnosus*, providing proof for the first time that *S. carnosus* possesses a functional Tat pathway, which can be used for the secretion of heterologous protein.

The biotechnological applicability of the Tat pathway was subsequently evaluated by comparing the Tat- and Sec-dependent secretion of branching enzyme and CGTase respectively. It was shown that a Sec-dependent production of both enzymes in *S. carnosus* was not feasible. The direct fusion of each enzyme with the signal sequence of a Sec-dependent lipase from *S. hyicus* did not result in the secretion of either enzyme via the Sec pathway, which was only made possible by the further addition of a propeptide known to enhance the secretion of heterologous proteins. Nonetheless, the use of the propeptide was also shown to be unsuitable for the secretory production of the enzymes, despite the secretion of large amounts of the propeptide fusions. The presence of the propeptide interfered with the correct folding of the branching enzyme, leading to the secretion of inactive protein into the culture supernatant, while the pro-CGTase fusion was largely degraded by cell wall-associated proteases. Sec-dependent secretion of the CGTase with its cognate signal sequence led to only low yields of secreted enzyme.

Compared with the secretion of both branching enzyme and CGTase via the Sec pathway, their Tat-dependent secretion each resulted in the highest yields of active enzyme in the culture supernatant, making this pathway a highly promising alternative to Sec-dependent protein production and the method of choice for the secretory production of these enzymes in *S. carnosus*. The results indicate that it is advantageous for heterologous proteins to assume their native conformation with the aid of cytosolic chaperones prior to secretion. However, the biotechnological potential of the Tat pathway is limited by the cell wall's sieve effect. Secretion of the CGTase via the Tat pathway resulted in the accumulation of the majority of the translocated enzyme in the cell wall compartment, being released into the supernatant only by cell wall turnover. The use of the Tat pathway for the secretory production of heterologous proteins in Gram-positive bacteria is therefore primarily suitable for smaller proteins that are capable of diffusing into the culture supernatant through the pores of the cell wall.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Extremophile Mikroorganismen als Quelle neuer Biokatalysatoren für die Industrie</b>	<b>1</b>
1.1.1	<i>Anaerobranca gottschalkii</i> als Quelle neuer stärkeabbauender Enzyme	1
1.1.2	Stärke als nachwachsender Rohstoff und stärkeabbauende Enzyme	2
1.1.3	Stärkemodifizierende Enzyme	2
1.1.4	Gewinnung von Extremozymen	4
1.1.5	Gram-positive Bakterien als Wirtsorganismen für die Gewinnung heterologer Proteine	5
1.1.6	Allgemeines zum Transport von Proteinen über Membranen	6
<b>1.2</b>	<b>Bakterielle Proteintranslokation</b>	<b>7</b>
1.2.1	Der generelle, essentielle Sekretionsweg (Sec-Weg)	7
1.2.1.1	Die Sec-Signalsequenz	7
1.2.1.2	Signalsequenzen und ihre Wechselwirkungen mit exportspezifischen Chaperonen	7
1.2.2	Die Sec-Translokase	9
1.2.3	Späte Schritte der Sec-abhängigen Proteintranslokation	10
1.2.3.1	Extrazelluläre Faltung (Tjalsma <i>et al.</i> , 2000)	10
1.2.3.2	Einfluss der Zellwand auf die Proteintranslokation (Foster und Popham, 2002)	11
1.2.4	Mechanismen der Qualitätskontrolle bei der Proteinsekretion	11
1.2.4.1	Qualitätskontrolle an der Sec-Translokase	11
1.2.4.2	Mechanismen der extracytosolischen Qualitätskontrolle	12
1.2.5	Sec-abhängige heterologe Proteinsekretion mit Gram-positiven Bakterien (Bolhuis <i>et al.</i> , 1999)	12
<b>1.3</b>	<b>Der Tat/<math>\Delta</math>pH-Weg</b>	<b>13</b>
1.3.1	Die Tat-Signalsequenz	13
1.3.1.1	Die Rolle des N-terminalen Konsensusmotivs S/TRRXFLK beim Targeting	14
1.3.1.2	Die Bedeutung der Hydrophobizität von Tat-Signalsequenzen beim Targeting	14
1.3.1.3	Das "Sec avoidance"-Motiv von Tat-Signalsequenzen	15
1.3.2	Die Rolle des reifen Teils von Tat-Substraten bei der Translokation	15
1.3.3	Die Tat-Translokase	16
1.3.3.1	Funktion der Tat-Proteine bei der Proteintranslokation	17
1.3.3.2	Aufbau der Tat-Translokase	18
1.3.3.3	Energetisierung des Tat-Weges	19
1.3.4	Substrate des Tat-Weges	19
1.3.5	Anwendbarkeit des Tat-Weges für die Sekretion heterologer Proteine	20
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien und Enzyme</b>	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide</b>	<b>23</b>
<b>2.3</b>	<b>Mikrobiologische Methoden</b>	<b>26</b>

2.3.1	Kultivierung von Bakterien	26
2.3.1.1	Nährmedien	26
2.3.1.2	Kultivierungsbedingungen	28
2.3.2	Stammhaltung	28
2.3.3	Transformation von Bakterien	28
2.3.3.1	Transformation von <i>E. coli</i> Stämmen (Hanahan, 1985)	28
2.3.3.2	Transformation von <i>S. carnosus</i> Protoplasten (Götz und Schumacher, 1987)	29
<b>2.4</b>	<b>Genetische Methoden</b>	<b>30</b>
2.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA	30
2.4.2	Allgemeine genetische Methoden	30
2.4.2.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	30
2.4.2.2	Agarosegelelektrophorese	30
2.4.2.3	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	31
2.4.2.4	Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase	31
2.4.2.5	Ligation von DNA-Fragmenten	31
2.4.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
2.4.3.1	Crossover-PCR	32
2.4.4	Nicht-radioaktive DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode	32
<b>2.5</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	<b>33</b>
2.5.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970)	33
2.5.2	Herstellung von Gesamtzellextrakten und Zellfraktionierung	34
2.5.2.1	Gesamtzellextrakte von <i>E. coli</i>	34
2.5.2.2	Gesamtzellextrakte von <i>S. carnosus</i>	34
2.5.2.3	Aufarbeitung von <i>S. carnosus</i> Kulturüberständen	34
2.5.2.4	Isolierung des <i>S. carnosus</i> Zellwandkompartimentes	34
2.5.3	Herstellung von Peptidseren	35
2.5.4	Western Blot-Analyse	35
2.5.4.1	Entwicklung mit alkalischer Phosphatase	35
2.5.4.2	Entwicklung mit Chemilumineszenzdetektion	36
2.5.5	Proteinlokalisierung durch Proteinase K-Verdau von <i>S. carnosus</i> Protoplasten	36
2.5.6	Native PAGE-Analyse	37
2.5.7	Photometrischer Aktivitätsnachweis	37
2.5.8	Pulse Chase-Experimente	39
2.5.8.1	Durchführung der Pulse Chase-Experimente	39
2.5.8.1.1	Lösungen und Medien	39
2.5.8.1.2	Markierung	40
2.5.8.1.3	Immunfällung	40
2.5.8.1.4	Gelaufarbeitung und Nachweis der markierten Proteine	40
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Sec-abhängige Sekretion des cytosolischen Modellproteins Branching Enzyme</b>	<b>44</b>
3.1.1	Fusion des Branching Enzyme mit dem Sec-Signalpeptid der <i>S. hyicus</i> Lipase ("Pre-BE")	44
3.1.2	Lokalisierung von Pre-BE Genprodukten in <i>Staphylococcus carnosus</i>	46
3.1.3	Das Pre-BE Fusionsprotein wird nicht in den Kulturüberstand von <i>S. carnosus</i> sekretiert	46

3.1.4	Das Pre-BE Fusionsprotein akkumuliert intrazellulär in aktiver Form	49
3.2	<b>Fusion des Branching Enzyme mit dem Sec-Signalpeptid und Propeptid der <i>S. hyicus</i> Lipase ("Prepro-BE")</b>	50
3.2.1	Lokalisierung von Prepro-BE Genprodukten in <i>S. carnosus</i>	51
3.2.2	Die Anwesenheit des Propeptids erlaubt eine effiziente Membrantranslokation des Prepro-BE Fusionsproteins	52
3.2.3	Die Überexpression des Prepro-BE Fusionsproteins führt zu einer Sättigung der Sec-Translokase	53
3.2.4	Das Propeptid der Lipase interferiert mit der korrekten Faltung des Branching Enzyme	54
3.3	Tat-abhängige Sekretion des cytosolischen Modellproteins Branching Enzyme	55
3.3.1	Fusion des Branching Enzyme mit dem Tat-Signalpeptid der <i>E. coli</i> TMAO-Reduktase ("TorA-BE")	55
3.3.2	Lokalisierung von TorA-BE Genprodukten in <i>S. carnosus</i>	57
3.3.3	Die Tat-Signalsequenz der <i>E. coli</i> TMAO-Reduktase (TorA) führt zur teilweisen Sekretion des Branching Enzyme in den Kulturüberstand von <i>S. carnosus</i>	59
3.3.4	Die Deletion des <i>tatC</i> -Gens beeinflusst die Sekretion des TorA-BE Fusionsproteins	60
3.4	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse zur sekretorischen Expression des cytosolischen Branching Enzyme in <i>S. carnosus</i></b>	62
3.5	<b>Sec-abhängige Sekretion des extrazellulären Modellproteins Cyclodextrin-Glycosyltransferase (CGTase)</b>	63
3.5.1	Die authentische CGTase	64
3.5.2	Lokalisierung der authentischen CGTase in <i>S. carnosus</i>	64
3.5.3	Die CGTase kann mit Hilfe ihrer eigenen Signalsequenz über den Sec-Weg von <i>S. carnosus</i> transloziert werden	66
3.5.4	Frühe Ereignisse verhindern die Sekretion eines Großteils der authentischen CGTase in <i>S. carnosus</i>	66
3.5.5	Die Signalsequenz der authentischen CGTase vermittelt die Sekretion von aktiver CGTase in den Kulturüberstand von <i>S. carnosus</i>	68
3.6	<b>Fusion der reifen CGTase mit dem Sec-Signalpeptid der <i>S. hyicus</i> Lipase ("Pre-CGTase")</b>	68
3.6.1	Lokalisierung des Pre-CGTase Fusionsproteins in <i>S. carnosus</i>	69
3.6.2	Das Pre-CGTase Fusionsprotein wird nicht in den Kulturüberstand von <i>S. carnosus</i> sekretiert	70
3.6.3	Das Pre-CGTase Fusionsprotein akkumuliert intrazellulär in aktiver Form	72
3.7	<b>Fusion der CGTase mit dem Sec-Signalpeptid und Propeptid der <i>S. hyicus</i> Lipase ("Prepro-CGTase")</b>	73
3.7.1	Lokalisierung des Prepro-CGTase Fusionsprotein in <i>S. carnosus</i>	73
3.7.2	Die Anwesenheit des Propeptides der Lipase vermittelt eine hoch effiziente Membrantranslokation, kann aber den Abbau durch zellassozierte Proteasen nicht verhindern	74
3.7.3	Das in den Kulturüberstand von <i>S. carnosus</i> sekretierte Pro-CGTase Fusionsprotein ist enzymatisch aktiv	75
3.8	<b>Tat-abhängige Sekretion des extrazellulären Modellproteins CGTase</b>	76
3.8.1	Fusion der CGTase mit dem Tat-Signalpeptid der <i>E. coli</i> TMAO-Reduktase ("TorA-CGTase")	76
3.8.2	Lokalisierung der TorA-CGTase Genprodukte in <i>S. carnosus</i>	77

3.8.3	Das TorA-CGTase Fusionsprotein wird mit einer für den Tat-Weg typischen Kinetik über die Plasmamembran von <i>S. carnosus</i> transloziert	78
3.8.3.1	Untersuchungen zur Energetik der Tat-abhängigen Proteintranslokation in <i>S. carnosus</i>	79
3.8.4	Die Prozessierung des TorA-CGTase Fusionsproteins ist sowohl vom Zwillingsarginin-Motiv als auch von der zentralen Translokasekomponente TatC abhängig	81
3.8.5	Ereignisse sowohl vor als auch nach der Membrantranslokation behindern die Sekretion der TorA-CGTase	84
3.8.6	Die Signalsequenz der TMAO-Reduktase vermittelt die Sekretion von aktiver CGTase in den Kulturüberstand von <i>S. carnosus</i>	86
3.8.7	Eine schnelle Sättigung der Tat-Translokase behindert die Sekretionseffizienz des <i>S. carnosus</i> Tat-Weges und führt zu einer partiellen Zell-Lyse	87
3.8.8	Die Zellwand stellt ein zentrales Hindernis für die Sekretion von gefalteten Proteinen dar	88
3.9	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse zur sekretorischen Expression der CGTase in <i>S. carnosus</i></b>	89
4	<b>DISKUSSION</b>	91
4.1	Das Pre-BE Fusionsprotein wird in <i>S. carnosus</i> nicht prozessiert und akkumuliert intrazellulär in aktiver Form	92
4.2	Der Prepro-Anteil der <i>S. hyicus</i> Lipase vermittelt eine sehr effiziente Sekretion des Branching Enzyme in <i>S. carnosus</i> , interferiert jedoch mit dessen Faltung	95
4.3	Das Tat-Signalpeptid der <i>E. coli</i> TMAO-Reduktase vermittelt eine Tat-abhängige Sekretion des Branching Enzyme in <i>S. carnosus</i>	97
4.4	Die CGTase kann mit Hilfe ihrer eigenen Signalsequenz über den Sec-Weg von <i>S. carnosus</i> sekretiert werden	100
4.5	Das Pre-CGTase Fusionsprotein wird in <i>S. carnosus</i> nicht sekretiert und akkumuliert intrazellulär in aktiver Form	103
4.6	Der Prepro-Anteil der Lipase vermittelt eine hoch effiziente Sekretion der CGTase in <i>S. carnosus</i> , kann aber den Abbau durch zellassozierte Proteasen nicht verhindern	104
4.7	Die TorA-Signalsequenz vermittelt eine Tat-abhängige Sekretion der CGTase in <i>S. carnosus</i>	106
4.7.1	Die Sekretion des TorA-CGTase Fusionsproteins ist abhängig von der Anwesenheit des Zwillingsarginin-Motivs in der Signalsequenz und dem TatC-Protein	108
4.7.2	Der Großteil der translozierten reifen CGTase akkumuliert in aktiver Form in der Zellwand von <i>S. carnosus</i>	110
4.8	<b>Biotechnologische Bedeutung der erzielten Ergebnisse</b>	112
5	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	113
6	<b>LITERATUR</b>	115



## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	Bromochloro-indolyl-phosphat
BE	Branching Enzyme
bp	Basenpaar
BSA	Bovine serum albumin
CCCP	Carboxylamid-m-chlorophenylhydrazon
CGTase	Cyclodextrin-Glycosyltransferase
Ci	Curie
Cm	Chloramphenicol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
$\Delta$ pH	pH-Differenz (Protonengradient)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g/l	Gramm/Liter
GFOR	Glucose-Fructose-Oxidoreduktase
GFP	Green Fluorescent Protein
GRAS	Generally regarded as safe
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunden
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton
M	Molar
mA	Milliampère
mg/ml	Milligramm/Milliliter
Min.	Minuten
mM	Millimolar
$\mu$ g/ml	Mikrogramm/Milliliter
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NBT	4-Nitro-Tetrazolium-Chlorid

nm	Nanometer
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PPIase	Peptidylprolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RNC	Ribosome nascent chain complex
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SP	Signalpeptid
SRP	Signal recognition particle
SS	Signalsequenz
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit, Enzymeinheit
UDP	Uridin-5'-diphosphat
ÜN	über Nacht
UTR	5' untranslatierte Region eines Gens
V	Volt
WT	Wildtyp

#### Drei- und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren:

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

# 1. Einleitung

## 1.1 Extremophile Mikroorganismen als Quelle neuer Biokatalysatoren für die Industrie

Für industrielle Anwendungen besteht ein großes Interesse an Enzymen, die außer der gewünschten Substratspezifität auch eine besondere Stabilität unter Produktionsbedingungen aufweisen. Einen Ansatz, industriell besser geeignete Enzyme zu erhalten, stellt die Suche nach neuen Enzymen aus extremophilen Mikroorganismen dar. Diese verfügen durch ihre Anpassung an die extremsten Lebensbedingungen dieser Erde über eine den jeweiligen Bedingungen adaptierte Enzymausstattung ("Extremozyme"), die eine besondere Stabilität gegenüber chemischer und/oder thermischer Denaturierung durch Detergenzien (Scandurra *et al.*, 1998), chaotrope Salze, organische Lösungsmittel und extreme pH- bzw. Temperaturwerte aufweist, und daher für industrielle Anwendungen ein ausgesprochen großes Potential besitzt (Hough und Danson, 1999; van den Burg, 2003; Horikoshi, 1999; Demirjian *et al.*, 2001; Vieille und Zeikus, 2001). Enzyme aus thermo-, psychro- und alkaliphilen Mikroorganismen werden heute vor allem in der Waschmittel-, papierverarbeitenden- und Lebensmittelindustrie eingesetzt (van den Burg, 2003). Hinsichtlich des Einsatzes von Biokatalysatoren nimmt die Stärkeindustrie eine besondere Stellung ein, da sie den nachwachsenden Rohstoff Stärke zur Gewinnung hochwertigerer Produkte, wie z.B. verzweigte Dextrine und Cyclodextrine, nutzt. Stärkemodifizierende Enzyme machen 30 % des globalen Enzymverbrauchs aus (van der Maarel *et al.*, 2002), doch die bislang für die Verarbeitung von Stärke eingesetzten Enzyme sind nur teilweise optimiert. Für die Weiterverarbeitung muss Stärke zunächst in einem mehrstufigen Prozess unter Einsatz verschiedener Enzyme hydrolysiert werden ("Stärkeverflüssigung"), wobei unterschiedliche Temperatur- und pH-Bedingungen auf Grund der jeweiligen Optima der eingesetzten Enzyme notwendig sind. Es besteht deshalb ein großer Bedarf an Biokatalysatoren, die auf Grund einer höheren Temperatur- und pH-Stabilität eine konstantere und damit günstigere Prozessführung ermöglichen würden (Crabb und Shetty, 1999; van der Maarel *et al.*, 2002).

### 1.1.1 *Anaerobranca gottschalkii* als Quelle neuer stärkeabbauender Enzyme

Enzyme alkaliphiler Mikroorganismen zeichnen sich durch ein besonders breites pH-Spektrum aus, in der Regel von pH 4 bis 10 (Antranikian, 2000), was für viele industrielle Verfahren vorteilhaft ist. Es sind jedoch nur relativ wenige, sog. thermoalkaliphile Mikroorganismen bekannt, die eine besondere Toleranz gegenüber hohen Temperaturen und hohen pH-Werten aufweisen (Antranikian, 2000). *Anaerobranca gottschalkii* ist ein thermoalkaliphiles Gram-positives Bakterium, das aus einer Bodenprobe am alkalischen Bogoria-See in Kenia mit dem Ziel der Identifizierung thermoalkalistabiler Biokatalysatoren isoliert wurde (Prowe und Antranikian, 2001). Das Bakterium wächst optimal streng anaerob bei pH 9.5 und 55°C. Darüber hinaus ist es in der Lage, in einem pH-Bereich von pH 6 bis 10.5 und einem Temperaturbereich von 30 bis 65°C zu wachsen. Prowe *et al.* (1996) konnten zeigen, dass das Wachstum von *A. gottschalkii* unter alkalischen Bedingungen einen an Natrium-Ionen statt an Protonen gekoppelten Energiemetabolismus aufweist und bei 1 % NaCl optimal ist. Im Gegensatz zu anderen Thermoalkaliphilen wächst *A. gottschalkii* heterotroph auf einer Vielzahl von mono- und polymeren Sacchariden wie Glucose, Ribose, Mannose, Fructose, Saccharose, Maltose, Stärke, Pullulan, Xylan und Cellulose als Kohlenstoff- und Energiequelle (Prowe

und Antranikian, 2001) und verfügt deshalb über eine Enzymausstattung, die ihm die Nutzung dieser Substrate ermöglicht. Mehrere stärkeabbauende Enzyme, darunter je eine extrazelluläre  $\alpha$ -Amylase, Pullulanase und Cyclodextrin-Glycosyltransferase (CGTase), sowie ein intrazelluläres Branching Enzyme, wurden in *Anaerobranca gottschalkii* nachgewiesen, die ein großes Potential für Anwendungen in der Lebensmittelindustrie besitzen (s. Abschnitt 1.3).

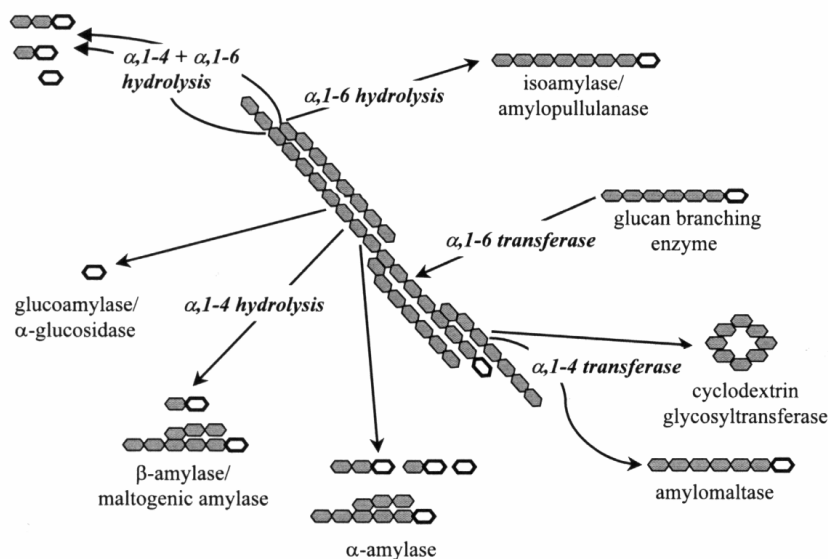
### 1.1.2 Stärke als nachwachsender Rohstoff und stärkeabbauende Enzyme

Stärke ist ein ausschließlich aus Glucoseresten bestehendes Speicherpolymer, das von Pflanzen in Chloroplasten und Reserveorganen als Energie- und Kohlenstoffreserve synthetisiert wird. Sie ist aus zwei hochmolekularen Komponenten, der linearen, aus  $\alpha$ 1,4-glycosidisch verknüpften Glucoseresten bestehenden Amylose, und dem stark verzweigten, aus  $\alpha$ 1,6-glycosidisch verknüpften Glucoseresten bestehenden Amylopektin, zusammengesetzt. Die Zusammensetzung von Stärke variiert je nach Pflanzenart, wobei der Amyloseanteil durchschnittlich 20-25 % beträgt (van der Maarel *et al.*, 2002). Mehrere Enzyme sind an der Synthese von Stärke beteiligt, die mit der Umwandlung von Sucrose zum Nucleotidzucker ADP-Glucose, dem eigentlichen Ausgangsmolekül für die Stärkesynthese, beginnt. Die Bildung der Stärkekomponenten Amylose und Amylopektin erfolgt durch die Enzyme Stärkesynthase und Branching Enzyme. Während die Stärkesynthase für die Bildung der linearen Amyloseketten verantwortlich ist, katalysiert das Branching Enzyme die  $\alpha$ 1,6-Verknüpfung von Glucosemolekülen an linearen Glucoseketten, was zu ihrer Verzweigung und damit zur Entstehung von Amylopektin führt. Da der molekulare Aufbau der Stärke sehr komplexer Natur ist, wird eine Vielzahl von Enzymen benötigt, um den Speicherstoff soweit zu zersetzen, dass die Bestandteile in den Zellstoffwechsel einfließen können. Zusätzlich zu den intrazellulären stärkeabbauenden Enzymen, die zur Nutzung von Stärke als Kohlenstoff- und Energiequelle nötig sind, sezernieren viele Mikroorganismen außerdem auch entsprechende hydrolytische Enzyme in großen Mengen in die Umgebung, um sich externe Stärkequellen zu erschließen (van der Maarel *et al.*, 2002; van der Veen *et al.*, 2000).

### 1.1.3 Stärkewandlungs Enzyme

Stärkewandlungs Enzyme lassen sich nach den glycosidischen Bindungen, die sie präferentiell angreifen, aufteilen (MacGregor *et al.*, 2001). Enzyme, die ausschließlich  $\alpha$ 1,4-glycosidische Bindungen hydrolysieren, werden als  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylasen bezeichnet (s. Abb. 1). Während  $\alpha$ -Amylasen  $\alpha$ 1,4-glycosidische Bindungen innerhalb des Stärkemoleküls unter Bildung linearer Dextrine hydrolysieren, spalten  $\beta$ -Amylasen vom nicht-reduzierenden Ende der Glucoseketten Glucose und Maltose ab. Da Amylasen keine  $\alpha$ 1,6-glycosidischen Bindungen hydrolysieren, können sie das Stärkemolekül nur bis zum Erreichen dieser Bindungen (Verzweigungspunkte) zersetzen, was zur Bildung hoch verzweigter Dextrine, sog. Grenzdextrine, als Nebenprodukte führt (Bertoldo und Antranikian, 2002). Zu den Enzymen, die  $\alpha$ 1,4-glycosidische Bindungen hydrolysieren, gehören auch die Glucanotransferasen, die lineare Glucoseketten spalten und kurzkettige Fragmente an andere lineare Glucoseketten  $\alpha$ 1,4-glycosidisch binden. Einen Sonderfall unter diesen Enzymen stellen Cyclodextrin-Glycosyltransferasen (CGTasen) dar. CGTasen haben eine relativ geringe hydrolytische Aktivität im Vergleich zu anderen  $\alpha$ -Amylasen, katalysieren jedoch nach Abspaltung von Glucoseketten mit

einer Länge von 6, 7, oder 8 Glucoseresten eine intramolekulare Transglycosylierungsreaktion, die zur Cyclisierung der Kette und zur Bildung entsprechender  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrine führt (s. Abb. 1). Auch CGTasen bilden als Nebenprodukte hochverzweigte Grenzextrine (MacGregor *et al.*, 2001). Die  $\alpha$ 1,6-glycosidischen Bindungen des Amylopektins werden durch **Verzweigungsenzyme (Branching Enzyme)** synthetisiert. Sie spalten  $\alpha$ 1,4-verknüpfte lineare Glucoseketten und können diese kurzkettigen Fragmente sowohl an dieselben (intramolekulare Transglycosylierung) als auch an andere Glucoseketten (intermolekulare Transglycosylierung) in  $\alpha$ 1,6-Stellung binden, was zur Bildung der verzweigten Glucoseketten führt (MacGregor *et al.*, 2001).



**Abb. 1:** Die unterschiedlichen Klassen stärkehydrolysierender Enzyme. Die offene Ringstruktur stellt das nichtreduzierende Ende der Glucoseketten dar (van der Maarel *et al.*, 2002).

In der stärkeverarbeitenden Industrie kommt neben der Produktion des Kernproduktes Fructose für die Lebensmittelindustrie vor allem der Herstellung von Cyclodextrinen große Bedeutung zu. Cyclodextrine besitzen in vielen Industriebereichen, darunter besonders in der pharmazeutischen Industrie, ein enormes Potential (van der Veen *et al.*, 2000; Allegre und Deratani, 1994). Die Glucosemoleküle der Cyclodextrine sind so angeordnet, dass im Inneren des Rings ein unpolarer Raum entsteht, während das Ringäußere hydrophil ist. Die außerordentlich hohe Wertschöpfung von Cyclodextrinen leitet sich aus ihrer Fähigkeit zur Komplexbildung mit einer Vielzahl hydrophober Substanzen ab, die von diesem unpolaren Raum eingeschlossen werden. Die Einkapselung solcher sog. Gastmoleküle verändert ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften, was zur Stabilisierung von licht-, temperatur- und luftempfindlichen sowie flüchtigen Substanzen ausgenutzt werden kann (van der Veen *et al.*, 2000; Biber *et al.*, 2002). Die Herstellung von Cyclodextrinen im großen Maßstab wird allerdings dadurch limitiert, dass alle bislang bekannten CGTasen ein Gemisch aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrinen produzieren und diese in aufwendigen, kostenintensiven Verfahren voneinander getrennt werden müssen.  $\beta$ -Cyclodextrine können auf Grund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit relativ einfach aus den Gemischen auskristallisiert werden,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrine müssen jedoch selektiv mit organischen

Lösungsmitteln komplexiert und ausgefällt werden, die anschließend aufwendig zurückgewonnen werden müssen (Biwer *et al.*, 2002). In der industriellen Cyclodextrinproduktion werden bislang keine thermostabilen CGTasen eingesetzt, obwohl es hierfür ein ausgesprochen großes Potential gibt (van der Veen *et al.*, 2000; Biwer *et al.*, 2002).

Branching Enzyme werden derzeit nicht in industriellen Verfahren eingesetzt, da ausreichend stabile Enzyme bislang nicht identifiziert werden konnten (van der Maarel *et al.*, 2002). Auf Grund ihrer Fähigkeit Amylopektin zu synthetisieren, können Branching Enzyme zur Produktion von hochmolekularer Stärke mit einer geringen Viskosität genutzt werden, da Amylopektin im Gegensatz zu Amylose gut löslich ist. Solche niedrigviskosen Stärken können zur Beschichtung von Papier eingesetzt werden (Bruinenberg *et al.*, 1996). Die schlechte Löslichkeit von Amylose ist auch dafür verantwortlich, dass es zur sog. Retrogradation während der konventionellen Stärkeverflüssigung kommt, bei der ausgefallene Amylose aggregiert und eine gelartige Konsistenz annimmt, die im Temperaturbereich bis 100°C unlöslich ist und nicht weiter enzymatisch verarbeitet werden kann. Branching Enzyme können somit zur Verminderung der Retrogradation und damit zu einer verbesserten Stärkeverflüssigung beitragen.

#### 1.1.4 Gewinnung von "Extremozymen"

Obwohl "Extremozyme" für eine Vielzahl industrieller Anwendungen sehr vielversprechend sind, stellt die Produktion dieser Enzyme in einem geeigneten Maßstab eine der größten Limitierungen für ihren industriellen Einsatz dar. Die Fermentation extremophiler Mikroorganismen zur Enzymgewinnung ist bislang auf Grund des enormen technischen und finanziellen Aufwandes, der durch die extremen Lebensbedingungen dieser Organismen bedingt ist, keineswegs ein standardisiertes Verfahren. Für eine lohnende Enzymproduktion sind jedoch hohe Enzymausbeuten ausschlaggebend. Um dies zu erreichen, ist die Produktion von Enzymen extremophilen Ursprungs in mesophilen Produktionswirten mit hohen Expressionsleistungen sinnvoll (van den Burg, 2003; Schiraldi und De Rosa, 2002).

Neben dem Erzielen hoher Enzymausbeuten ist für die Produktion von Enzymen, die für den Einsatz in der Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie bestimmt sind, die Wahl eines Produktionsorganismus mit "Generally regarded as safe"-(GRAS) Status wichtig. Hierzu werden mesophile Bakterienarten wie *E. coli* und *B. subtilis* sowie nicht-pathogene Hefen wie *Candida utilis* und *Kluyveromyces lactis* eingesetzt, wobei die intrazelluläre Produktion der gewünschten Enzyme häufig zur Bildung sog. Inclusion bodies bei entsprechend hoher Überexpression der Enzyme führt und eine Renaturierung der Enzyme nötig macht (van den Burg, 2003).

### 1.1.5 Gram-positive Bakterien als Wirtsorganismen für die Gewinnung heterologer Proteine

Gram-positive Bakterien der Gattung *Bacillus* werden bereits seit langem für die industrielle Gewinnung von Proteinen für den technischen Einsatz verwendet. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Enzyme wie Amylasen, Proteasen und Lipasen, die vor allem in der Waschmittel- und Lebensmittelindustrie Anwendung finden (Ferrari *et al.*, 1993). Diese Enzyme werden von den Bakterien in Mengen bis zu 20 g/l in das umgebende Kulturmedium ausgeschieden. Im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* haben Gram-positive Bakterien keine äußere Membran, so dass Proteine, die über die Plasmamembran exportiert werden, direkt in das umgebende Medium gelangen. Dies hat den Vorteil, dass eine selektive Anreicherung der Zielproteine, potentiell in löslicher und korrekt gefalteter Form, im Kulturüberstand erreicht wird. In *E. coli* dagegen werden dieselben Proteine in einem zusätzlichen, zellgebundenen Kompartiment, dem Periplasma, zurückgehalten. Die sekretorische Produktion von Proteinen mit Gram-positiven Bakterien ist gegenüber der intrazellulären Expression auch deshalb vorteilhaft, weil eine aufwendige Abtrennung der Zielproteine von den Zellproteinen entfällt. Bei den in großen Mengen sekretierten Proteinen handelt es sich allerdings um authentische sekretorische Enzyme der Wirtsorganismen selbst, die als **homologe** Proteine bezeichnet werden. Versuche, *B. subtilis* für die Produktion **heterologer** Proteine zu etablieren, verliefen meist nicht erfolgreich (Harwood, 1992). *Bacillus*-Arten besitzen besonders viele zellwandassoziierte und lösliche Proteasen, die bei der Gewinnung heterologer Proteine zu dramatischen Ausbeuteverlusten führen und die Verwendung alternativer Produktionssysteme nötig machen.

*Staphylococcus carnosus* wird seit langem in der Lebensmittelindustrie als Starterkultur für die Herstellung von Fisch- und Fleischprodukten eingesetzt (Liepe, 1982). Auf Grund seines GRAS-Status und seiner relativ hohen Sekretionsleistung (2g/l, Dilsen *et al.*, 2000) gewinnt *S. carnosus* als Produktionsorganismus immer mehr an Bedeutung. Bislang sind sowohl Enzyme als auch therapeutische Proteine, wie z.B. Antikörperfragmente, mit *S. carnosus* hergestellt worden (Thudt *et al.*, 1985; Pschorr *et al.*, 1994; Schnappinger *et al.*, 1995; Dilsen *et al.*, 2000; Sturmfels *et al.*, 2001). Darüber hinaus wird der Einsatz von *S. carnosus* besonders zum sog. "Surface display" als Träger heterologer Proteine in biotechnologischen Anwendungen sowie von immunogenen Proteinen in Impfstoffen diskutiert (Gunneriusson *et al.*, 1996; Liljeqvist *et al.*, 1997; Gunneriusson *et al.*, 1999; Lehtio *et al.*, 2001; Wernerus *et al.*, 2001; Wernerus *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu *B. subtilis* sezerniert *S. carnosus* keine Proteasen in den Kulturüberstand, so dass die Ausbeuten sekretierter heterologer Proteine nicht beeinträchtigt werden. Dies macht *S. carnosus* somit zu einem sehr attraktiven Produktionswirt (Dilsen *et al.*, 2000). Bislang sind allerdings nur vereinzelte Versuche zur sekretorischen Gewinnung von Enzymen aus extremophilen Mikroorganismen mit mesophilen Wirtsorganismen beschrieben worden, darunter die Produktion einer  $\alpha$ -Amylase aus dem thermophilen Bakterium *Bacillus stearothermophilus* in den verwandten *Bacillus*-Arten *B. subtilis* und *B. brevis* 47-5 (Tsukagoshi *et al.*, 1985), sowie in verschiedenen *Staphylococcus*-Arten (Thudt *et al.*, 1985).

### 1.1.6 Allgemeines zum Transport von Proteinen über Membranen

Alle Zellen sind von mindestens einer Biomembran, die aus einer hydrophoben Phospholipid-Doppelschicht besteht, umgeben. Diese Membran erlaubt die Passage nicht polarer, hydrophober Substanzen, stellt jedoch eine Permeabilitätsbarriere für große und geladene Moleküle dar. Membranproteine, die als Kanäle, Pumpen oder "Carrier" dienen, regulieren den kontrollierten Stoffaustausch mit der Umgebung. Biomembranen haben eine weitere Funktion in der Abgrenzung funktionell unterschiedlicher Reaktionsräume innerhalb der Zelle (Kompartimentierung). Eukaryotische Zellen besitzen eine Vielzahl unterschiedlicher Kompartimente, darunter den Zellkern, das Endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Apparat und verschiedene Zellorganellen wie Mitochondrien, Chloroplasten und Peroxisomen. Die Proteinbiosynthese findet mit Ausnahme von einigen Proteinen der Mitochondrien und Chloroplasten im Cytoplasma statt, was den Transport aller Proteine, die nicht für das Cytoplasma bestimmt sind, zu ihrem jeweiligen Wirkort nötig macht. Die Notwendigkeit der Proteinsortierung, die als **Targeting** bezeichnet wird, wird durch spezifische Erkennungsmerkmale, die sog. **Targeting-Signale**, innerhalb der Primärstruktur des jeweiligen Proteins vermittelt. Der Transport des Proteins über die Membran wird durch membranständige Multienzym-Komplexe, sog. Translokasen, die je nach Zellkompartiment eine unterschiedliche Zusammensetzung aufweisen, vermittelt.

Im Gegensatz zur komplexen Kompartimentierung eukaryotischer Zellen weisen Prokaryoten einen vergleichsweise einfachen Zellaufbau auf. Bei Gram-positiven Bakterien ist das Cytoplasma nur durch die Cytoplasmamembran und eine sehr dicke Zellwand, in der zahlreiche Proteine lokalisiert sind, von der Umgebung abgegrenzt. Gram-negative Bakterien dagegen haben eine dünnere Zellwand, besitzen aber auf Grund ihrer äußeren Membran ein zusätzliches Kompartiment, das Periplasma. Deshalb müssen bei Prokaryoten alle nicht für das Cytoplasma bestimmten Proteine die Cytoplasmamembran passieren. Hierfür stehen zwei unterschiedliche Wege zur Verfügung: der generelle Sekretionsweg (Sec-Weg, Sec= secretion) und der Tat-Weg (Twin arginine translocation-Weg). Der Tat-Weg ist außer in Bakterien auch in der Thylakoidmembran von Chloroplasten vorhanden, wo er als  $\Delta$ pH-Weg bekannt ist.

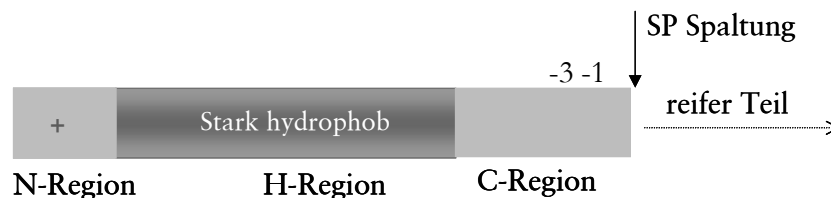


## 1.2 Bakterielle Proteintranslokation

### 1.2.1 Der generelle, essentielle Sekretionsweg (Sec-Weg)

#### 1.2.1.1 Die Sec-Signalsequenz

Bakterielle Proteine, die für den Export über die Cytoplasmamembran in den periplasmatischen Raum oder den extrazellulären Raum, bzw. als Außenmembranproteine für die äußere Membran Gram-negativer Bakterien bestimmt sind, sind durch eine N-terminal lokalisierte **Signalsequenz** (Targeting-Signal; s. Abb. 2), die während oder kurz nach der Membrantranslokation durch eine Signalpeptidase abgespalten wird, gekennzeichnet. Das Exportprotein wird vor diesem als **Prozessierung** bekannten Schritt als **Vorläufer** und im Anschluss daran als **reifes Protein** bezeichnet. Bakterielle Signalsequenzen des Sec-Weges weisen auf der Ebene der Primärsequenz praktisch keine Homologie auf, zeichnen sich jedoch durch ein hoch konserviertes Bauprinzip aus drei verschiedenen Domänen aus: auf die am N-Terminus lokalisierte positiv geladene **N-Region** (1-5 Aminosäuren) folgt eine hydrophobe, zentrale **H-Region** (7-15 Aminosäuren) und eine eher polare **C-Region** (3-7 Aminosäuren) (von Heijne, 1985). In der C-Region ist die Erkennungssequenz für die Signalpeptidase enthalten und stellt den einzigen Teil der Sec-Signalsequenz dar, der auf Ebene der Primärstruktur gewisse Homologien aufweist. An den Positionen -1 und -3 relativ zur Signalpeptidase-Spaltstelle befinden sich kleine, neutrale Reste, vorzugsweise Alanin, was zur Definition des Erkennungsmotivs der Signalpeptidase als Ala-X-Ala geführt hat (von Heijne, 1984). Die Signalpeptidase-Erkennungssequenz der Lipoproteine weist dagegen konservierte Bereiche an den Positionen -3 (größere, hydrophobe Reste, v.a. Leucin) und +1 (ein strikt konservierter Cysteinrest) auf (Sankaran *et al.*, 1994).



**Abb. 2: Eigenschaften von bakteriellen Sec-Signalsequenzen.** Sie sind nach einem hoch konservierten Bauprinzip aus drei Domänen aufgebaut und haben außer der konservierten Erkennungssequenz Ala-X-Ala (-3, -1) für die Signalpeptidase keine weiteren konservierten Motive. SP, Signalpeptid.

#### 1.2.1.2 Signalsequenzen und ihre Wechselwirkungen mit exportspezifischen Chaperonen

Der überwiegende Teil der sekretorischen Proteine wird in einer ungefalteten Konformation über den Sec-Weg transloziert. Im Gegensatz zur Proteintranslokation über die Membran des Endoplasmatischen Retikulums findet die Sec-abhängige Membrantranslokation bei Bakterien post-translational statt, so dass eine vorzeitige Faltung der Vorläuferproteine vor der Membrantranslokation verhindert werden muss. Hierzu trägt ein komplexes Wechselspiel zwischen exportspezifischen Chaperonen und Signalpeptiden bzw. den reifen Teilen der Vorläuferproteine bei. Die Signalsequenzen haben dabei neben ihrer Funktion als Determinante des Targetingweges zur Sec-Translokase eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Exportkompetenz der

sekretorischen Proteine, da sie nach Translation die Faltung des reifen Teils der wachsenden Polypeptidkette in eine stabile Tertiärstruktur verzögern. Die Faltung wird verlangsamt, damit das Zeitfenster für eine Wechselwirkung mit den exportspezifischen Chaperonen verlängert wird (Park *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1989).

In *E. coli*, wo der Sec-abhängige Proteinexport bislang am besten untersucht ist, gibt es zwei Targetingwege, die zur membranständigen Sec-Translokase führen. Es handelt sich hierbei um den SecB- und den SRP-abhängigen Targetingweg, wobei SecB und SRP, das Signal Recognition Particle, zwei exportspezifische Chaperone darstellen, die jeweils unterschiedliche Klassen von Proteinen zur Translokase leiten. Bei der Wahl des jeweiligen Targetingsystems erfüllt die Signalsequenz wichtige Funktionen (Valent *et al.*, 1998). Das bakterielle SRP ist ein Ribonucleoprotein-Komplex, das kotranslational an lange, hydrophobe Signalsequenzen und/oder Transmembransegmente von naszierenden Membranproteinen bindet. Diese werden in Assoziation mit dem Ribosom als sog. Ribosome-Nascent chain Complex (RNC) vom SRP an die Membran geleitet. Nachdem das SRP an den membranständigen SRP-Rezeptor FtsY gebunden hat, folgt die Freisetzung des RNC vom SRP und die Übergabe des Vorläufers an die Sec-Translokase. Nach GTP-Hydrolyse dissoziiert SRP von FtsY und kehrt zurück ins Cytosol (Manting und Driessen, 2000; Driessen *et al.*, 2001; van Wely *et al.*, 2001). Proteine, die weniger hydrophobe Signalsequenzen besitzen, werden nicht mit Hilfe des SRP an die Membran geleitet, müssen aber ebenfalls an einer vorzeitigen Faltung vor ihrer Membrantranslokation gehindert werden. Hierbei spielt das mit dem Ribosom assoziierte Chaperon Trigger factor eine wichtige Rolle, da es die Bindung von SRP kompetitiv hemmt und die Vorläuferproteine so in den SecB-abhängigen Targetingweg leitet (Valent *et al.*, 1997). SecB bindet naszierende Proteine erst ab einer Länge von etwa 150 Aminosäuren und erkennt nicht ihre Signalsequenzen, sondern bestimmte Motive im reifen Teil der Proteine, die normalerweise nur im Inneren eines gefalteten Proteins vorkommen (Kim und Kendall, 1998; Knoblauch *et al.*, 1999).

Das Targeting des Komplexes aus SecB und Vorläuferprotein an die Translokase erfordert eine hochaffine Wechselwirkung des SecB-Vorläuferprotein-Komplexes mit einem an SecYEG-gebundenen SecA, das eine hochkonservierte, C-terminale Bindestelle für SecB besitzt. Hierbei finden spezifische Wechselwirkungen zwischen dem Signalpeptid und SecA statt, die zur Dissoziation der SecB-SecA Bindung und einem gleichzeitigen Transfer des Vorläuferproteins von SecB an SecA führen (Manting und Driessen, 2000; Driessen *et al.*, 2001). Die Signalsequenzen binden über ihre N-terminal lokalisierten positiv geladenen Aminosäuren (s. Abb. 2) an SecA, was zu einer Konformationsänderung und Steigerung der ATPase-Aktivität von SecA und der anschließenden Einschleusung des Vorläuferproteins in die Translokase führt (Wang *et al.*, 2000). Die ATPase SecA schleust als Motor der Translokase die ungefaltete Polypeptidkette in wiederholten Zyklen der Insertion und Deinsertion in die Membran durch die Sec-Translokase (s. Kapitel 1.2.2). In Gram-positiven Bakterien ist das exportspezifische Chaperon SRP allein für das Targeting von Exportproteinen an die Sec-Translokase verantwortlich. SRP leitet den Ribosome-Nascent chain Complex an das SecYEG-gebundene SecA, wobei auch hier die Signalsequenz wie beschrieben spezifische Wechselwirkungen mit SecA eingeht, die zur Initiation der Translokation und zum Einschleusen des Vorläuferproteins in die Sec-Translokase führen.

Da im Sekretionsprozess kinetische Parameter die Wechselwirkungen zwischen Chaperonen und den Vorläuferproteinen bestimmen, ist in diesem Zusammenhang das Modell des *kinetic partitioning* entwickelt worden, mit dem die ständige Konkurrenz zwischen intrinsischer Faltungstendenz des Vorläuferproteins und der spezifischen Bindung an exportspezifische Chaperone beschrieben wird (Diamond und Randall, 1997; Topping und Randall, 1997). Daraus folgt, dass die Sekretionsrate eines sekretorischen Proteins bereits durch solche frühen kinetischen Ereignisse wesentlich beeinflusst wird.

### 1.2.2 Die Sec-Translokase

Die Sec-Translokase ist ein aus zwei Subkomplexen bestehender Komplex aus sieben verschiedenen integralen Membranproteinen (s. Abb. 3). Hierbei handelt es sich um die Proteine SecY, SecE, SecG, die einen der beiden Komplexe bilden, und SecD, SecF, YajC, die in einem zweiten Komplex vorliegen, der mit SecYEG wechselwirkt (Driessen *et al.*, 2001). Zusätzlich assoziiert das erst kürzlich entdeckte YidC, das eine Rolle bei der Membrantranslokation- und insertion von Membranproteinen eine Rolle spielt, mit der Translokase (Chen *et al.*, 2002; Houben *et al.*, 2002; Nouwen und Driessen, 2002). SecY und SecE bilden die zentrale Komponente des hydrophilen Translokasekanals, durch den die sekretorischen Proteine geschleust werden. Diese sind während ihrer Membranpassage nicht mit den Phospholipiden der Membran in Kontakt, sondern vor allem mit SecY und SecA (Joly und Wickner, 1993; Manting und Driessen, 2000). SecG, SecD, SecF und YajC haben während des Translokationsprozesses eine stimulierende Funktion. SecA ist die zentrale Komponente der Translokase und geht funktionelle Wechselwirkungen mit dem Chaperon SecB und Signalsequenzen ein, aber auch mit dem reifen Teil der Vorläuferproteine, sauren Phospholipiden in der Membran und den integralen Membrankomponenten der Sec-Translokase. In Gegenwart aller Wechselwirkungspartner wird die ATPase-Aktivität von SecA stimuliert, die die Translokation der Vorläuferproteine über die Membran antreibt (Or *et al.*, 2002). In durch ATP-Hydrolyse getriebenen Zyklen der Insertion und Deinsertion in die Membran schleust SecA ein ca. 2.5 kDa großes Fragment des zu exportierenden Proteins bei jedem Zyklus durch die Translokase. So werden ATP-Bindung und Hydrolyse mit dem Transport der ungefalteten Polypeptidkette über die Membran gekoppelt. Neben der aus ATP-Hydrolyse gewonnenen Energie wird auch das Membranpotential ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) als Energiequelle benötigt. Alle Sec-Komponenten, mit der Ausnahme des Chaperons SecB, sind auch in Gram-positiven Bakterien nachgewiesen worden.

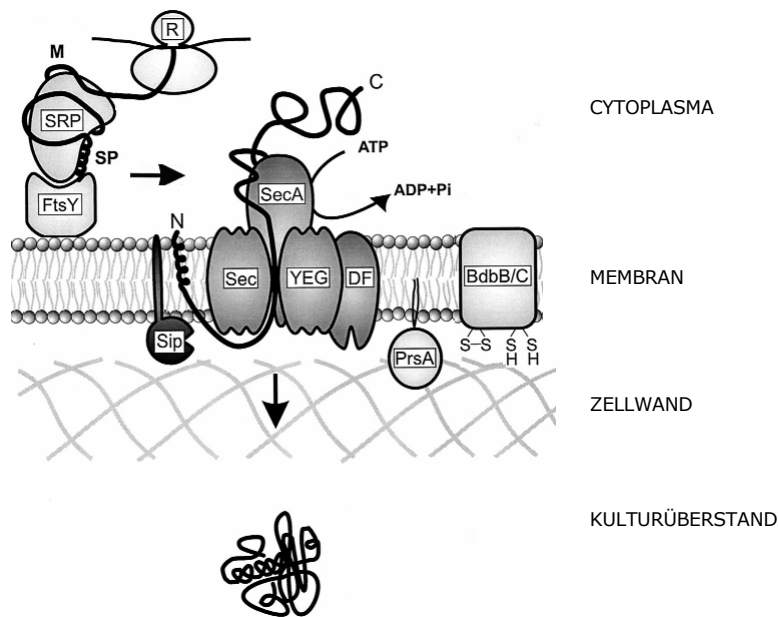


Abb. 3: Schematische Darstellung der Sec-Translokase und Komponenten des Sec-Weges von *B. subtilis* (nach Tjalsma *et al.*, 2000). SRP, Signal Recognition Particle; FtsY, bakterieller SRP-Rezeptor; Sip, Signalpeptidase; PrsA, Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerase; BdbB/C, Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen; SP, Signalsequenz des Vorläuferproteins, M, reifer Teil des Vorläuferproteins; R, Ribosom.

### 1.2.3 Späte Schritte der Sec-abhängigen Proteintranslokation

#### 1.2.3.1 Extrazelluläre Faltung (Tjalsma *et al.*, 2000)

Eine Abspaltung der Signalsequenz ist für die Membrantranslokation nicht zwingend erforderlich, wohl aber für die Freisetzung des Proteins aus der Membran (Dalbey und Wickner, 1985). Da Signalsequenzen auf Grund ihrer Hydrophobizität eine Ähnlichkeit zu Transmembransegmenten aufweisen, würde ein Nicht-Abspalten der Signalsequenz zur Lokalisierung des Proteins in der Membran führen. Während oder kurz nach der Membrantranslokation wird deshalb die Signalsequenz durch membranständige Signalpeptidasen von den Vorläuferproteinen abgespalten ("Prozessierung") und das noch ungefaltete reife Protein auf der *trans*-Seite der Membran freigesetzt, wo es nun seine korrekte Konformation einnehmen muss. Da sich in dieser Umgebung mehrere Proteasen befinden, ist eine schnelle und korrekte Faltung der Proteine essentiell. Hierzu stehen eine Reihe von Faltungsfaktoren zur Verfügung, die aber im Gegensatz zu cytosolischen Faltungshelfern nicht zu den "klassischen" Chaperonen wie dem cytosolischen Hitzeschockprotein Hsp70 zählen, da diese für ihre Funktion ATP benötigen, das außerhalb der Zelle nicht vorhanden ist. Zu den extrazellulären Faltungshelfern zählen Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) und Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen, die die Ausbildung von Disulfidbrücken katalysieren, einem für die Faltung von Proteinen häufig limitierenden Schritt. PPIasen katalysieren die *cis/trans*-Isomerisierung von X-Pro-Peptidbindungen, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt. Während in *E. coli* vier periplasmatisch lokalisierte PPIasen bislang identifiziert worden sind, ist in *B. subtilis* dagegen nur eine extrazelluläre PPIase bekannt, das essentielle Lipoprotein PrsA. PrsA-Mutanten sekretieren deutlich geringere Mengen Protein, und die Verfügbarkeit von PrsA kann bei Überexpression sekretorischer Proteine für deren Sekretion limitierend sein (Kontinen *et al.*, 1993; Vitikainen *et al.*, 2001). Die

mit der Zellwand Gram-positiver Bakterien assoziierten negativ geladenen Teichon- und Lipoteichonsäuren binden große Mengen an  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die für die Faltung einiger extrazellulärer Enzyme sehr wichtig sind. Für solche Enzyme kann die Verfügbarkeit von Kationen in der Zellwand die Freisetzung in das Kulturmedium beeinflussen.

#### 1.2.3.2 Einfluss der Zellwand auf die Proteintranslokation (Foster und Popham, 2002)

Im Vergleich zu *E. coli* ist die Zellwand Gram-positiver Bakterien etwa 10 Mal dicker sowie stärker vernetzt, was je nach Organismus und Wachstumsbedingungen stark variieren kann. Sie enthält kovalent gebundene anionische Polymere, sog. Teichon- und Lipoteichonsäuren, die der Zellwand ihre stark negative Ladung geben. Zum Stoffaustausch mit der Umgebung besitzt die Zellwand Poren mit einer durchschnittlichen Größe von 4 nm, die u. a. auch Proteine mit einer Größe bis 50 kDa und geringer Nettoladung ungehindert passieren können. Auf Grund ihrer Ladungseigenschaft hat die Zellwand einen großen Einfluss auf die Sekretionsrate von sekretorischen Proteinen, für die die Passage durch die Zellwand das letzte Hindernis vor Erreichen des extrazellulären Raums darstellt. Große Proteine oder solche, die eine insgesamt positive Ladung aufweisen, tendieren dazu, Wechselwirkungen mit der Zellwand einzugehen, die ihre Sekretion erheblich beeinträchtigen können (Tjalsma *et al.*, 2000).

### 1.2.4 Mechanismen der Qualitätskontrolle bei der Proteinsekretion

#### 1.2.4.1 Qualitätskontrolle an der Sec-Translokase

Um zu gewährleisten, dass nur sekretorische Proteine aus der Zelle ausgeschleust werden, existiert an der Sec-Translokase ein strikter Mechanismus der Qualitätskontrolle. Über genetische Selektion wurden dominante Suppressoren exportdefekter Signalsequenzen identifiziert, die als sog. "*prl* (protein localization)"-Allele bezeichnet werden. *Prl*-Allele führen auf Grund ihrer Suppression exportdefekter Signalsequenzen zu einer herabgesetzten Qualitätskontrolle an der Translokase (Bieker *et al.*, 1990; Flower *et al.*, 1994; Bost und Belin, 1997) und sind in den Genen, die für die Translokasekomponenten SecA (*PrlD*), SecY (*PrlA*), SecE (*PrlG*) und SecG (*PrlH*) kodieren, identifiziert worden. Eine gelockerte Assoziation von SecY, SecE und SecG, die durch die Suppressorallele *PrlA* und *PrlG* hervorgerufen wird, führt durch eine vereinfachte Insertion von SecA mit dem Exportprotein in die Membran zu einer erhöhten Translokationsrate, so dass selbst Exportproteine ohne Signalsequenz sekretiert werden können (Duong und Wickner, 1999). Das Membranpotential trägt erheblich zur Effizienz der Translokation bei, indem es den Zyklus der Membraninsertion- und deinsertion, den die ATPase SecA vollzieht, beeinflusst. Mutationen in SecY (*PrlA4*) können die normalerweise vom Membranpotential getriebene Deinsertion von SecA, die einen limitierenden Schritt bei der Translokation darstellt, kompensieren und so zu einer vom Membranpotential unabhängigen Translokation führen (Perez-Perez *et al.*, 1994; Nishiyama *et al.*, 1999; De Keyser *et al.*, 2002). Proteasen der ATP-abhängigen AAA-Familie tragen außerdem zur Qualitätskontrolle von sekretorischen und Membranproteinen in eukaryotischen Zellorganellen bei (Langer, 2000). Auch in *E. coli* ist eine AAA-Protease, die membranständige

Metalloprotease FtsH, an der Qualitätskontrolle einiger Membranproteine beteiligt, darunter auch die Translokasekomponente SecY (Schumann, 1999).

#### 1.2.4.2 Mechanismen der extracytosolischen Qualitätskontrolle

Gram-negative Bakterien besitzen mehrere regulatorische Systeme, um sich vor einer Akkumulation falsch gefalteter und/oder aggregierter Proteine zu schützen. Bei cytosolischen Stressantworten kommt es zur Aktivierung der Hitzeschockproteine, molekularen Chaperonen und Proteasen, die sowohl die Rückfaltung falsch gefalteter oder aggregierter Proteine als auch deren proteolytischen Abbau katalysieren, wenn diese nicht hinreichend gefaltet werden können. Für *E. coli* sind bislang drei überlappende Stressantworten, die auf Störungen bei der korrekten Faltung von Proteinen im Periplasma und in der äußeren Membran reagieren, bekannt. Hierbei handelt es sich um eine durch die Zwei-Komponenten-Systeme CpxRA und BaeRS (Raffa und Raivio, 2002), sowie durch den alternativen Sigmafaktor  $\sigma^E$  vermittelte transkriptionelle Regulation von extrazellulären Faltungshelfern und Proteasen, sowie von Komponenten der Signaltransduktionswege selbst. Neben dem Cpx-System ist der zur Klasse der ECF (Extracytoplasmic function)-Sigmafaktoren gehörende Sigmafaktor  $\sigma^E$  am Schutz der Zellhülle beteiligt, der bei Überschreitung der Kapazität der periplasmatischen Chaperone, die zum vermehrten Auftreten ungefalteter Proteine führt, aktiviert wird (Raivio und Silhavy, 1999; Walsh *et al.*, 2003). Inzwischen hat man auch bei *B. subtilis* ein Zwei-Komponenten-System, das homolog zu CpxA/R ist und ebenso die korrekte Faltung extrazellulärer Proteine kontrolliert, gefunden. Dieses als CsxSR bezeichnete Zwei-Komponenten-System wird sowohl bei Hitzeschock als auch bei Überexpression sekretorischer Proteine aktiviert und führt zur erhöhten Expression von zwei HtrA-homologen Proteinen, den extrazellulären Proteasen HtrA und HtrB, und von CsxSR selbst (Hyryläinen *et al.*, 2001; Darmon *et al.*, 2002).

#### 1.2.5 Sec-abhängige heterologe Proteinsekretion mit Gram-positiven Bakterien (Bolhuis *et al.*, 1999)

Trotz der potentiell sehr hohen Sekretionsleistung des Gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis* ist die Sekretion heterologer Proteine vielfach nur ineffizient und mit geringen Ausbeuten verbunden. Bislang sind verschiedene sekretionslimitierende Parameter festgestellt worden, die für eine ineffiziente Sekretion verantwortlich sind und auf den intrinsischen Qualitätskontrollmechanismen des Sekretionsweges beruhen. Dabei handelt es sich um die cytosolische Aggregation von Vorläuferproteinen auf Grund einer Überlastung der Kapazität der exportspezifischen Chaperone (s. Abschnitt 1.2.1.2), die durch die Überexpression von Vorläuferproteinen hervorgerufen werden kann. Unproduktive Wechselwirkungen der Vorläuferproteine mit den Translokasekomponenten können darüber hinaus ebenfalls deren Sekretion verhindern (s. Abschnitt 1.2.1.2 und 1.2.4.1). Auch die extrazellulären Faltungsfaktoren wie die PPIase PrsA können für die Sekretion verschiedener Proteine limitierend sein und bei Überlastung eine Akkumulation falsch gefalteter Proteine in der Zellhülle zur Folge haben, was schließlich zum vorzeitigen Abbau dieser Proteine in der Zellhülle führt (s. Abschnitt 1.2.3.1). Die Gram-positive Zellwand stellt ein eigenständiges Kompartiment dar, das viele Proteine enthält, die entweder kovalent an das Peptidoglycan oder über elektrostatische Wechselwirkungen daran verankert sind. Dies sind vor allem Proteasen wie die am Zellwandturnover beteiligten Autolysine oder

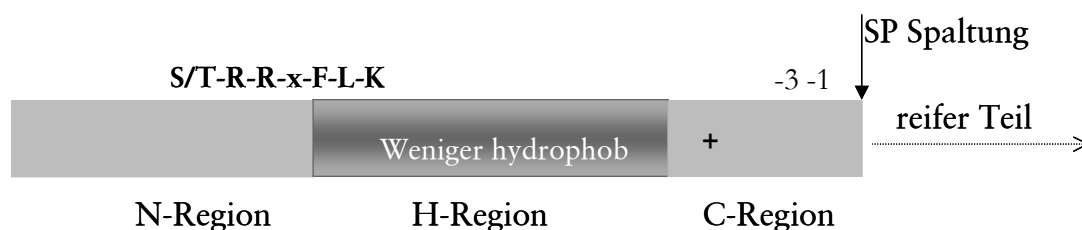
solche, die für die Erschließung von Nahrungsquellen verantwortlich sind. Eine langsame Faltung von heterologen Proteinen in der Zellhülle auf Grund von nicht ausreichenden oder fehlenden Faltungsfaktoren, oder aber Wechselwirkungen mit der Zellwand, verlängert den Zeitraum, in dem die Proteine solchen Proteasen zugänglich sind und ist häufig der Grund für niedrige Proteinausbeuten.

### 1.3 Der Tat/ $\Delta$ pH-Weg

Im Gegensatz zum Sec-Weg, bei dem Exportproteine nur im ungefalteten Zustand über die Membran transloziert werden, besitzt der Tat/ $\Delta$ pH-Weg die herausragende Fähigkeit, Proteine, die bereits im Cytosol ihre native Konformation eingenommen haben, zu exportieren. Substrate des Tat-Weges besitzen dabei Signalsequenzen, deren charakteristische Merkmale für die Spezifität des Targeting an die Tat-Translokase verantwortlich sind.

#### 1.3.1 Die Tat-Signalsequenz

Tat-Signalsequenzen besitzen den gleichen strukturellen Aufbau aus drei Domänen wie Sec-Signalsequenzen: eine positiv geladene N-Region, eine hydrophobe H-Region und die C-Region mit Signalsequenz-Spaltstelle. Eine genauere Betrachtung von Tat-Signalsequenzen zeigt jedoch, dass sie einige besondere Merkmale aufweisen, die sie von Sec-Signalsequenzen deutlich unterscheidet (s. Abb. 4). In der N-Region von Tat-Signalsequenzen befindet sich am Übergang zur H-Region ein hoch konserviertes Motiv, S/TRRXFLK, von dem die zwei Argininreste besonders stark konserviert sind und deshalb für den Exportweg namensgebend waren (Twin arginine translocation). Auffällig an Tat-Signalsequenzen ist auch, dass die H-Region weniger hydrophob als bei Sec-Signalsequenzen ist und dass sich in der C-Region kurz vor der Signalsequenz-Spaltstelle ein oder mehrere positiv geladene Reste befinden, die als "Sec avoidance"-Motiv bezeichnet werden. Tat-Signalsequenzen sind im Allgemeinen deutlich länger als Sec-Signalsequenzen, was u.a. auf eine verlängerte N-Region zurückzuführen ist.



**Abb. 4: Eigenschaften der Tat-Signalsequenzen.** Die N-Region ist ungewöhnlich lang und beinhaltet das "Twin Arginine"-Konsensusmotiv. Die H-Region ist deutlich weniger hydrophob als bei Sec-Signalsequenzen. In der C-Region sind die häufig zu findenden basischen Aminosäuren mit einem + gekennzeichnet, sowie die Signalpeptidase-Spaltstelle (-3, -1).

Da Substrate sowohl des Sec- als auch des Tat-Exportweges jeweils sehr spezifisch exportiert werden, müssen in den Vorläuferproteinen besondere Merkmale für die Wahl des Exportweges vorhanden sein. Tatsächlich hat sich gezeigt, dass die charakteristischen Besonderheiten von Tat-Signalsequenzen dafür

verantwortlich sind, ein spezifisches Targeting von Tat-Substraten an die Tat-Translokase zu vermitteln und Wechselwirkungen mit der Sec-Translokase weitgehend zu verhindern (Cristóbal *et al.*, 1999; Wiegert *et al.*, 1997). Darüber hinaus bestimmt jedoch auch der korrekte Faltungszustand des reifen Teils von Vorläuferproteinen maßgeblich das Targeting des Proteins an die Translokase (Halbig *et al.*, 1999).

#### 1.3.1.1 Die Rolle des N-terminalen Konsensusmotivs S/TRRXFLK beim Targeting

Die Bedeutung der zwei Argininreste beim Targeting von Tat-Substraten an die Tat-Translokase wurde in vielen Arbeiten gezeigt. So führt bei den meisten Substraten der Austausch der hoch konservierten Argininreste (RR) durch Lysinreste (KK) zu einem vollständigen Exportblock. *In vitro* Arbeiten haben gezeigt, dass nur funktionelle Tat-Vorläuferproteine, die das RR-Motiv tragen, auch funktionelle Wechselwirkungen mit Komponenten der Tat-Translokase eingehen (Cline und Mori, 2001; de Leeuw *et al.*, 2002; Alder und Theg, 2003a). Einige wenige authentische Tat-Substrate besitzen ein nicht perfektes Konsensusmotiv: so weist die Signalsequenz des *S. typhimurium* Tat-Substrates TtrB statt des RR ein KR-Motiv auf (Hinsley *et al.*, 2001), während eine Penicillin-Amidase von *E. coli* ein RNR-Motiv besitzt (Ignatova *et al.*, 2002). Allerdings haben mehrere Arbeitsgruppen inzwischen gezeigt, dass ein Tat-abhängiger Export von Tat-Substraten nicht zwingend von der Anwesenheit der zwei Argininreste abhängt (Chaddock *et al.*, 1995; P. Kreutzenbeck und R. Freudl, unveröffentlichte Ergebnisse). So toleriert der Tat-Apparat von *E. coli*, der die Reporterproteine TorA-MalE und TorA-ColV exportiert, konservative Austausche des RR-Motives zu KR, RK und KK, die die Effizienz des Exportes jedoch beeinträchtigen (Ize *et al.*, 2002a). Erst ein Ladungsverlust (QQ, Ize *et al.*, 2002b; KQ, P. Kreutzenbeck, R. Freudl, unveröffentlichte Ergebnisse) bzw. eine Ladungsumkehr (DD, P. Kreutzenbeck, R. Freudl, unveröffentlichte Ergebnisse) an den Positionen der zwei Argininreste führt einen totalen Exportblock herbei. Dass das "Twin Arginine"-Motiv allein für das Targeting zur Tat-Translokase nicht ausreichend ist, beweisen Arbeiten, in denen das Motiv an entsprechender Stelle in Sec-Signalsequenzen eingefügt wurde (Brink *et al.*, 1998; Brüser *et al.*, 1998). Ein solcher Austausch führt nicht zur Umleitung des Vorläuferproteins in den Tat-Weg und beeinträchtigt darüber hinaus seine Sec-abhängige Translokation in keiner Weise, was bedeutet, dass zusätzliche Merkmale für ein Targeting zur Tat-Translokase verantwortlich sein müssen.

#### 1.3.1.2 Die Bedeutung der Hydrophobizität von Tat-Signalsequenzen beim Targeting

Cristóbal *et al.* (1999) zeigten, dass eine schwach hydrophobe H-Region der Tat-Signalsequenz für das Targeting zur Tat-Translokase nötig ist. Das Fusionsprotein TorA-Lep, das aus dem Signalpeptid der *E. coli* TMAO-Reduktase, einem Tat-Substrat, und der löslichen Domäne der *E. coli* Leaderpeptidase Lep, einem Sec-Substrat, besteht, wird durch eine Erhöhung der Hydrophobizität der H-Region der TorA-Signalsequenz vom Tat-Weg in den Sec-Weg umgeleitet. Es wurde gezeigt, dass einige Tat-Signalsequenzen, deren Gesamthydrophobizität ähnlich hoch wie die von Sec-Signalsequenzen ist (so z.B. die der *E. coli* TMAO-Reduktase (TorA)), imstande sind, die ATPase-Aktivität von SecA in *in vitro*-Versuchen zu aktivieren. *In vivo* kommt es dennoch nicht zu einer funktionellen Wechselwirkung dieser Signalsequenzen mit SecA. Nicht alle Tat-Signalsequenzen weisen eine so hohe Gesamthydrophobizität auf und sind dementsprechend nicht in der Lage, eine Aktivierung von SecA herbeizuführen (Kebir und Kendall, 2002). Inzwischen sind authentische Tat-



Signalsequenzen bekannt, die bifunktionell sind und bei einer Blockierung des Tat-Weges einen Sec-abhängigen Export der Substrate vermitteln können (DeLisa *et al.*, 2003). Interessanterweise ist mit dem Sec-Substrat Ribosebindeprotein (RBP) auch ein Gegenbeispiel bekannt, welches bei Blockierung des Sec-Weges auf den Tat-Weg ausweichen kann (Pradel *et al.*, 2003).

### 1.3.1.3 Das "Sec avoidance"-Motiv von Tat-Signalsequenzen

Die bereits erwähnten positiv geladenen Reste in der C-Region von Tat-Signalsequenzen stellen ein sog. "Sec avoidance"-Motiv dar, das unproduktive Wechselwirkungen mit der Sec-Translokase verhindert und somit für zusätzliche Spezifität beim Targeting verantwortlich ist. Diese C-terminalen positiven Aminosäuren kommen bei Sec-Signalsequenzen nur äußerst selten vor. Wie auch beim Konsensusmotiv in der N-Region ist aber auch dieses Motiv alleine nicht in der Lage, einen Sec-Vorläufer in den Tat-Weg zu leiten, wenn die Gesamthydrophobizität der Signalsequenz noch hoch genug für eine produktive Wechselwirkung mit der Sec-Translokase ist (Bogsch *et al.*, 1997). Wird das "Sec avoidance"-Motiv aus der Tat-Signalsequenz entfernt, findet eine Umleitung der Tat-Vorläufer in den Sec-Weg statt (Bogsch *et al.*, 1997; Cristóbal *et al.*, 1999; Ize *et al.*, 2002b; Blaudeck *et al.*, 2003). Da nicht alle Tat-Substrate über ein "Sec avoidance"-Motiv verfügen, ist es wahrscheinlich, dass dieses Motiv vor allem bei solchen Substraten zur Spezifität des Targeting beiträgt, deren Gesamthydrophobizität der Signalsequenz ausreicht, um potentiell Wechselwirkungen mit der Sec-Translokase eingehen zu können. Das "Sec avoidance"-Motiv verhindert in diesen Fällen gemeinsam mit dem N-terminalen Konsensusmotiv eine falsche Einschleusung von Tat-Vorläuferproteinen in den Sec-Weg.

### 1.3.2 Die Rolle des reifen Teils von Tat-Substraten bei der Translokation

Die herausragende Eigenschaft des Tat-Weges ist seine Fähigkeit, vollständig gefaltete Proteine zu exportieren (Hynds *et al.*, 1998; Clark und Theg, 1997), während Substrate des Sec-Weges an einer Faltung vor ihrem Export durch exportspezifische Chaperone gehindert werden müssen (s. Abschnitt 1.2.1.2). Im Gegensatz zu den Substraten den  $\Delta$ pH-Weges in Thylakoiden besteht ein großer Teil der bakteriellen Tat-Substrate aus Redoxkofaktor-bindenden di- oder multimeren Enzymen, die ihre Kofaktoren und/oder Partneruntereinheiten bereits im Cytoplasma binden und damit ihre native Konformation einnehmen. Da nicht alle Redoxkofaktor-bindenden Enzyme Tat-abhängig sekretiert werden, bestimmt in der Regel die Art des gebundenen Kofaktors die Wahl des Exportweges. Darüber hinaus binden nicht alle Tat-Substrate Kofaktoren oder stellen Enzymkomplexe dar. So werden z.B. das monomere SufI-Protein aus *E. coli* und das 23K-Protein aus Weizen über den Tat/ $\Delta$ pH-Weg exportiert, weil sie für einen Transport über den Sec-Weg vermutlich zu schnell falten (Sargent *et al.*, 1999; Bogsch *et al.*, 1997).

Der korrekte Faltungszustand der Tat-Substrate ist eine Voraussetzung für eine Tat-abhängige Membrantranslokation, da in mehreren Arbeiten bereits gezeigt wurde, dass inkorrekt gefaltete Proteine nicht über den Tat-Weg transportiert werden. So wird das NADP-abhängige Enzym Glucose-Fruktose-Oxidoreduktase (GFOR) nur dann exportiert, wenn der Kofaktor gebunden ist und das Enzym somit korrekt gefaltet vorliegt (Halbig *et al.*, 1999). Für einige Kofaktor-bindende Redoxproteine gibt es bereits erste

Hinweise, dass unter den entsprechenden Wachstumsbedingungen dezidierte Chaperone an der Translokase den Export dieser Enzyme kontrollieren, möglicherweise indem sie den Einbau der Kofaktoren überwachen (Dubini und Sargent, 2003; Papish *et al.*, 2003). [NiFe]-Hydrogenasen sind dimere Enzyme, die aus einer kleinen und einer großen Untereinheit bestehen, wobei nur die kleine Untereinheit eine Tat-Signalsequenz trägt. Trotz einer fehlenden Signalsequenz wird die große Untereinheit jedoch ebenfalls exportiert, so dass eine Assemblierung beider Untereinheiten im Cytosol vor dem gemeinsamen Export stattfinden muss (Rodrigue *et al.*, 1999). Darüber hinaus wird die kleine Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenasen nur dann exportiert, wenn auch die große Untereinheit anwesend ist. DeLisa *et al.* (2003) zeigten außerdem, dass der Tat-abhängige Export von Antikörperfragmenten, deren nativer Zustand von der Ausbildung von Disulfidbrücken abhängig ist, nur in *E. coli*-Mutanten, die eine Ausbildung von Disulfidbrücken im Cytosol erlauben, möglich ist. Bislang ist jedoch vollkommen unklar, wie das korrekte Targeting an die Translokase sowie die Qualitätskontrolle an der Tat-Translokase stattfindet.

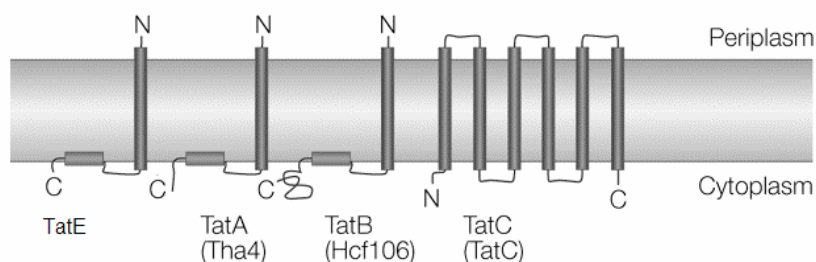
### 1.3.3 Die Tat-Translokase

Der Tat/ $\Delta$ pH-Weg wurde ursprünglich als Proteinimportweg in der Thylakoidenmembran von Chloroplasten entdeckt, der im Gegensatz zum Sec-Weg ausschließlich durch den Protonengradienten über der Membran energetisiert wird. Das erste für eine Komponente des  $\Delta$ pH-Weges kodierende Gen, *hcf106*, wurde in Mais isoliert und kodiert für ein Membranprotein der Thylakoidenmembran, dessen Inaktivierung zur Akkumulation bestimmter Enzymkomplexe führt, die an der Photosynthese beteiligt sind (Settles *et al.*, 1997). *Hcf106*-Mutanten sind auf Grund einer gestörten Photosynthese über das Keimlingsstadium hinaus nicht lebensfähig. Für Substrate des  $\Delta$ pH-Weges in Thylakoiden war aufgefallen, dass diese mit charakteristischen Signalsequenzen synthetisiert werden, die ein Zwillingarginin-Motiv aufweisen, welches am Targeting zum  $\Delta$ pH-Weg beteiligt ist (s. Abschnitt 1.3.1.1; Chaddock *et al.*, 1995; Henry *et al.* 1997). Berks zeigte 1996, dass neben einigen Thylakoidproteinen auch eine Gruppe von bakteriellen Redoxkofaktor bindenden Enzymen mit Signalsequenzen mit einem Zwillingarginin-Motiv synthetisiert wird und postulierte, dass Bakterien einen zum  $\Delta$ pH-Weg homologen Proteintranslokationsweg besitzen. Weiner *et al.* (1998) isolierten daraufhin eine Punktmutante in einem zu *hcf106* homologen Gen von *E. coli*, die zur Mislokalisierung von drei Molybdoenzymen, die mit einer Zwillingarginin-Signalsequenz synthetisiert werden, führte. Das Gen *mttA* ist Teil eines zunächst als *mtt* bezeichneten Operons (für membrane targeting and translocation), das später aber in *tat* (für twin arginine translocation) umbenannt wurde (Sargent *et al.*, 1998). Es wurde gezeigt, dass *mttA* für zwei zum Hcf106-Protein homologe Proteine, TatA und TatB, kodiert. Das *tat*-Operon enthält die Gene *tatABCD*, wobei für das TatD-Protein gezeigt wurde, dass es an der Tat-abhängigen Proteintranslokation nicht beteiligt ist (Wexler *et al.*, 2000). Das zu *tatA* homologe *tatE*-Gen liegt monocistronisch in einem anderen Abschnitt des Chromosoms vor. Außer in Chloroplasten und in allen sequenzierten bakteriellen Genomen, die größer als 2 Megabasen sind, ist der Tat-Weg auch in Archaeen vorhanden (Wu *et al.*, 2000). Neben einem *tatC*-Gen ist immer mindestens ein *hcf106*-homologes Gen (*tatA/B/E*) vorhanden, so dass ein funktioneller Tat-Apparat offenbar mindestens aus einem Hcf106-Homolog und TatC besteht. In Chloroplasten ist die Translokase des  $\Delta$ pH-Weges aus den Komponenten Tha4 (TatA), Hcf106 (TatB) sowie TatC zusammengesetzt.

In *E. coli* ist neben den drei Komponenten TatA, TatB und TatC auch das TatE-Protein am Tat-abhängigen Export beteiligt.

### 1.3.3.1 Funktion der Tat-Proteine bei der Proteintranslokation

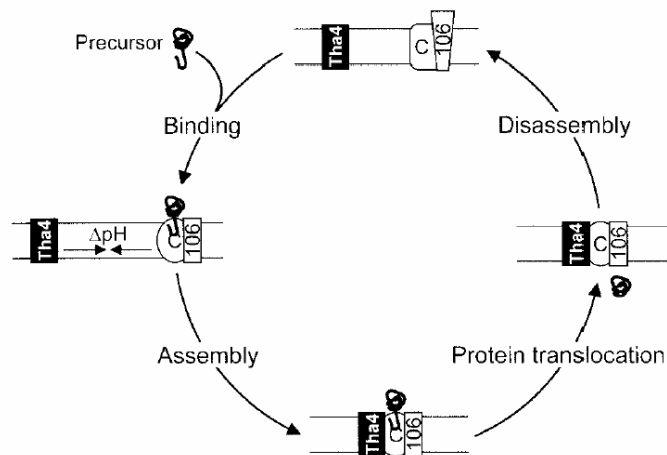
TatA, TatB und TatE haben trotz ihres ähnlichen Aufbaus (s. Abb. 5) sehr unterschiedliche Funktionen. TatA und TatE sind in *E. coli* zu etwa 60 % identisch und haben überlappende Funktionen, wobei TatE jedoch nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint und möglicherweise eine kryptische Genduplikation von TatA darstellt (Jack *et al.*, 2001). Bei Deletionen in *tatA* oder *tatE* kommt es lediglich zu einer verminderten Effizienz des Exports, da TatA und TatE die Exportdefekte für das jeweils fehlende Protein teilweise kompensieren können. TatB hat einen ähnlichen strukturellen Aufbau wie TatA, besitzt aber mit 25 % eine deutlich geringere Sequenzidentität zu TatA. TatA und TatB haben grundsätzlich verschiedene Funktionen, da TatB in *E. coli* für den Tat-abhängigen Export aller authentischen Tat-Substrate essentiell ist (Sargent *et al.*, 1999). Eine Vielzahl von Arbeiten deutet darauf hin, dass TatA die Hauptkomponente der Tat-Translokase ist, da TatA ca. 20 Mal höher als TatB und TatC exprimiert wird (Jack *et al.*, 2001) und sowohl in einem 600 kDa großen Komplex mit TatB und TatC in 20-fachem molaren Überschuss gegenüber den anderen beiden Proteinen (Sargent *et al.*, 2001), als auch in einem 460kDa großen, homooligomeren Komplex vorkommt (Porcelli *et al.*, 2002). Sowohl für den  $\Delta$ pH-Weg in Thylakoiden als auch für den bakteriellen Tat-Weg wurde gezeigt, dass Tha4/TatA erst zur Translokation eines bereits an einen Komplex aus Hcf106/TatB und TatC gebundenen Substrates rekrutiert wird (s. Abb. 6; Cline und Mori, 2001; Alami *et al.*, 2003). Dabei wird spekuliert, dass TatA-Untereinheiten nach Wechselwirkung des Substrates mit der Translokase über ihre Transmembransegmente oligomerisieren und einen hydrophilen Translokationskanal bilden (Porcelli *et al.*, 2002).



**Abb. 5:** Die vorhergesagte Topologie der *E. coli* Tat-Proteine (TatA/B/C/E) und der Komponenten des homologen  $\Delta$ pH-Weges (Tha4/Hcf106/TatC) in Chloroplasten (nach Robinson und Bolhuis, 2001).

TatB bildet eine strukturelle und funktionelle Einheit mit TatC und liegt in einem Verhältnis von 1:1 mit TatC in der Translokase vor (Bolhuis *et al.*, 2001), geht jedoch auch mit TatA Wechselwirkungen ein. Das für den Tat-abhängigen Export essentielle TatC-Protein weist dagegen keine Homologie zu den anderen Tat-Proteinen auf und besitzt keine mit ihnen überlagernde Funktionen (Bogsch *et al.*, 1998). Viele Arbeiten deuten darauf hin, dass TatC der Rezeptor der Tat-Translokase ist. Im  $\Delta$ pH-Weg bilden Hcf106/TatB und TatC einen etwa 700 kDa großen Komplex, an den die Vorläuferproteine vor ihrer Translokation in Abwesenheit von TatA binden (Cline und Mori, 2001; Mori und Cline, 2002). Ergebnisse von Alami *et al.* (2003) stützen dieses

Modell und zeigen darüber hinaus, dass das Vorläuferprotein über das Zwillingsarginin-Motiv in der Signalsequenz zunächst spezifische Wechselwirkungen mit dem putativen Rezeptor der Translokase TatC und anschließend mit TatB und TatA eingeht. Dabei stellt TatB sehr wahrscheinlich ein Bindeglied zwischen TatC und der vermutlich aus TatA zusammengesetzten Tat-Pore dar. In dieser Abfolge von Wechselwirkungen wird für TatB eine Rolle bei einer möglichen Qualitätskontrolle von Tat-Vorläuferproteinen diskutiert. Im Gegensatz zu TatA und TatC ist TatB in der Lage, nicht nur mit dem RR-Motiv der Signalsequenz, sondern auch mit der hydrophoben H-Region und dem frühen reifen Teil des Vorläuferproteins zu wechselwirken. Dabei erfolgt die Wechselwirkung mit der H-Region auch bei einem exportinkompetenten Vorläuferprotein, dessen RR-Motiv durch ein KK-Motiv ersetzt wurde. Aus dem Befund, dass TatA erst nach Wechselwirkung eines Vorläuferproteins mit TatC und TatB an das RR-Motiv der Signalsequenz bindet, und dass TatB auch exportinkompetente Vorläuferproteine erkennen kann, wurde geschlossen, dass TatB möglicherweise dafür verantwortlich ist, nur exportkompetente Vorläufer, die eine RR-Signalsequenz tragen, an die vermutlich aus TatA zusammengesetzte Tat-Pore zu übergeben.



**Abb. 6:** Das derzeitige Modell des Mechanismus der Tat-Translokase (Mori und Cline, 2002). Hcf106 (TatB) und TatC bilden den membranständigen Rezeptor für Tat-Substrate, in dem kein Tha4 (TatA) vorliegt. Tha4 (TatA) wird erst in Gegenwart eines gebundenen Vorläuferproteins an den Rezeptor rekrutiert und eine vollständige Translokase aus Tha4 (TatA)/Hcf106 (TatB)/TatC vermittelt die Translokation des Substrates. Im Anschluss an die Translokation dissoziiert Tha4 (TatA) wieder vom Hcf106 (TatB)/TatC Komplex.

### 1.3.3.2 Aufbau der Tat-Translokase

Tat-Substrate werden im gefalteten Zustand vermutlich durch einen wässrigen Kanal über die Membran exportiert, ohne die Membran permeabel für Ionen zu machen. Da die Größen von Tat-Substraten von 9 kDa (HiPIP, *A. chromatium*) bis zu 142 kDa (FdnGH-Subkomplex der FDH von *E. coli*) reichen, ergibt sich für den Durchmesser der Translokasepore des Tat-Apparates eine Größenforderung von 20-70 Å, der je nach Substrat variieren muss (Berks *et al.*, 2000). Bolhuis *et al.* (2001) isolierten in *E. coli* einen 600 kDa großen membranständigen Komplex, in dem die Komponenten TatB und TatC im equimolaren Verhältnis

anwesend sind und die TatA-Menge variiert. Sargent *et al.* (2001) isolierten dagegen einen nur aus TatA und TatB bestehenden, ebenfalls 600 kDa großen Komplex, wobei TatA in einem 20-fachen Überschuss zu TatB vorhanden war. de Leeuw *et al.* (2002) zeigten daraufhin, dass beide Komplexe, neben einem dritten, aus TatA/B/C, mit einem großen Überschuss an TatA bestehenden Komplex, gleichzeitig in der Membran von *E. coli* anwesend sind. Es zeigte sich jedoch, dass nur der erstmals von Bolhuis *et al.* (2001) isolierte Komplex in der Lage ist, mit Tat-Signalsequenzen Wechselwirkungen einzugehen (de Leeuw *et al.*, 2002). Oates *et al.* (2003) spekulieren auf Grund von elektronenmikroskopischen Untersuchungen von TatABC-Komplexen, dass diese allein nicht die für den Export großer Substrate erforderliche Größe erreichen, und dass deshalb entweder mehrere TatABC-Komplexe miteinander, oder aber mit den 460 kDa großen TatA-Komplexen assemblieren müssen. Für sog. "minimale" Tat-Translokasen, die nur aus den Komponenten TatA und TatC bestehen, gibt es hinsichtlich der Funktion der Komponenten und dem Aufbau der Translokase bislang keine Erkenntnisse.

### 1.3.3 Energetisierung des Tat-Weges

Der Tat-Weg wird über den elektrochemischen Gradienten der Membran energetisiert und benötigt keine Energie in Form von NTPs. Protonophoren, die das Membranpotential zerstören, blockieren auch den Tat-abhängigen Export. Der Inhibitor der Sec-ATPase SecA, Azid, blockiert den Tat-Weg in *E. coli* partiell (Santini *et al.*, 1998), was aber auch durch einen indirekten Effekt auf terminale Reduktasen der Elektronen-Transportkette zurückzuführen sein könnte (Berks *et al.*, 2000). Für den  $\Delta\text{pH}$ -Weg wurde gezeigt, dass ein substratspezifischer  $\Delta\text{pH}$ -Mindestwert für den Export notwendig ist. Offenbar gibt es eine substratspezifische Energiebarriere, die möglicherweise von Parametern wie Substratgröße, Faltungsstabilität oder Unterschieden in der Affinität zur Translokase bestimmt wird (Alder und Theg, 2003b). Da der Protonengradient scheinbar über den gesamten Transportverlauf genutzt wird, fungiert die Tat-Translokase vermutlich als Protonen/Protein Antiporter.

### 1.3.4 Substrate des Tat-Weges

Inzwischen kennt man eine Vielzahl von Tat-Substraten, die keine Redox-Proteine sind (Jongbloed *et al.*, 2000; Angelini *et al.*, 2001; Ignatova *et al.*, 2002). Hierbei kristallisiert sich eine wichtige Rolle des Tat-Weges bei der Sekretion von Virulenzfaktoren pathogener Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* (Voulhoux *et al.*, 2001; Ochsner *et al.*, 2002), *Agrobacterium tumefaciens* (Ding und Christie, 2003) und *E. coli* 0157:H7 (Pradel *et al.*, 2003) heraus. In diesen Organismen sind Aspekte wie Motilität, Chemotaxis, Biofilm-Bildung, Eisenaufnahme und die Sekretion von Toxinen durch den Ausfall des Tat-Weges betroffen. In *E. coli* sind Substrate des Tat-Weges neben der anaeroben Atmung auch am Zellwandaufbau beteiligt (Bernhardt und de Boer, 2003; Ize *et al.*, 2003), während *tat*<sup>-</sup>-Stämme von *Rhizobium leguminosarum* außerdem die Fähigkeit zur Knöllchenbildung an Wurzeln verlieren (Meloni *et al.*, 2003). Der Tat-Weg wird je nach Organismus unterschiedlich viel genutzt, z.B. besitzt *B. subtilis* nur ein bekanntes Tat-Substrat, während 20 % der sekretorischen Proteine von *Streptomyces coelicolor* putative Tat-Substrate sind und halophile Archaeen den Tat-Weg vermutlich fast ausschließlich zur Proteinsekretion verwenden (Bolhuis, 2002; Dilks *et al.*, 2003). Interessanterweise scheinen in *B. subtilis* zwei parallel funktionierende Tat-Apparate vorhanden zu sein, von

denen einer für den Export nur eines Substrates, der Phosphodiesterase PhoD, unter Phosphat-limitierenden Bedingungen verantwortlich zu sein scheint (Jongbloed *et al.*, 2000).

### 1.3.5 Anwendbarkeit des Tat-Weges für die Sekretion heterologer Proteine

Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass der Tat-Apparat von *E. coli* in der Lage ist, auch heterologe Proteine und Sec-Substrate über die Membran ins Periplasma zu exportieren (Thomas *et al.*, 2001; Gerard *et al.*, 2002; Ize *et al.*, 2002a; Blaudeck *et al.*, 2003). Der Tat-Weg ist für die sekretorische Gewinnung von Proteinen besonders attraktiv: Proteine, die nicht in der Lage sind außerhalb der Zelle ihre native Konformation einzunehmen, können so vor ihrem Export zunächst im Cytoplasma gefaltet werden. Besonders eindrucksvoll ist dies für das Green Fluorescent Protein (GFP) aus der Qualle *Aequoria victoria* belegt, das in *E. coli* zwar Sec-abhängig sekretiert werden kann, im Periplasma jedoch in inaktiver Form akkumuliert. Dagegen führt der Tat-abhängige Export des GFP zur Ausschleusung von korrekt gefaltetem und aktivem Protein in das Periplasma (Thomas *et al.*, 2001). Weitere Untersuchungen zum biotechnologischen Potential des Tat-abhängigen Proteinexports in *E. coli* zeigen, dass selbst hoch komplexe Antikörperfragmente in aktiver Form über den Tat-Weg in das Periplasma exportiert werden (DeLisa *et al.*, 2003).

### 1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das thermoalkaliphile Bakterium *Anaerobranca gottschalkii* besitzt eine Vielzahl biotechnologisch interessanter Enzyme, darunter auch stärkernodifizierende Enzyme mit großem industriellen Potential, wie den genannten Enzymen Branching Enzyme und CGTase. Für die Gewinnung solcher "Extremozyme" fehlen bislang allerdings überzeugende Expressionssysteme. Eine industrielle Produktion mit den extremophilen Organismen selbst ist auf Grund ihrer extremen Wachstumsbedingungen und dem damit verbundenen technischen und finanziellen Aufwand, wenig sinnvoll. Im Gegensatz zu Ansätzen zu einer intrazellulären Enzymproduktion bietet eine sekretorische Proteingewinnung mit mesophilen Gram-positiven Bakterien wie *Staphylococcus carnosus* den Vorteil, dass die gewünschten Proteine direkt in den Kulturüberstand sekretiert werden. *S. carnosus* eignet sich als Produktionswirt deshalb besonders, weil dieser im Gegensatz zu den meisten anderen Gram-positiven Bakterien keine Proteasen in den Kulturüberstand sezerniert, die die Ausbeute an sekretierten heterologen Proteinen beeinträchtigen können.

Die Schwerpunkte dieser Arbeit sollten zum Einen in der Etablierung von Expressionssystemen für die sekretorische Gewinnung von Extremozymen aus *A. gottschalkii* im mesophilen Produktionswirt *S. carnosus* liegen. Prinzipiell stehen in den meisten Gram-positiven Bakterien zwei Sekretionswege zur Verfügung. Dabei handelt es sich einerseits um den allgemeinen Sec-Weg, der bereits seit langem für die sekretorische Proteingewinnung verwendet wird. Die Sec-abhängige Sekretion von heterologen Proteinen, bei der diese in ungefalteter Form über die Plasmamembran transloziert werden und außerhalb des Cytosols ihre korrekte Konformation einnehmen müssen, verläuft allerdings häufig ineffizient. Fremdproteine sind oft nicht in der Lage, nach erfolgter Membrantranslokation in der Zellhülle schnell genug zu falten, um einem Abbau durch in der Zellwand lokalisierte Proteasen zu entgehen. Der erst kürzlich entdeckte Tat-Weg, für den eine

biotechnologische Anwendung in Gram-positiven Bakterien bislang noch nicht beschrieben wurde, besitzt dagegen die herausragende Eigenschaft, bereits vollständig gefaltete Proteine aus der Zelle auszuschleusen. Die für die Tat-abhängige Membrantranslokation notwendige Faltung von Vorläuferproteinen im Cytosol vermeidet dabei die genannten Probleme, die die Sec-abhängige Gewinnung heterologer Proteine beeinträchtigen. Die Nutzung des Tat-Weges eröffnet zum ersten Mal die Möglichkeit, solche Proteine in Bakterien sekretorisch zu gewinnen, die mit einer Sekretion über den Sec-Weg bislang nicht oder mit nur geringer Effizienz produziert werden können. Um daher den Tat-Weg für eine heterologe Proteinsekretion im Wirt *S. carnosus* zu erschließen, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob *S. carnosus* einen funktionellen Tat-Weg besitzt, und ob dieser für die sekretorische Gewinnung von heterologen Proteinen in Gram-positiven Bakterien allgemein eingesetzt werden kann. Zum Anderen sollte die biotechnologische Nutzbarkeit des Tat-Weges durch eine vergleichende Analyse der Sec- bzw. Tat-abhängigen Sekretion des intrazellulären Branching Enzyme und der extrazellulären CGTase als Modellenzyme aus *A. gottschalkii* in *S. carnosus* evaluiert werden.

Mit dem Branching Enzyme wurde ein cytosolisches Enzym stellvertretend für die Klasse der intrazellulären Proteine gewählt, die als solche keine natürlichen Substrate für die Sekretionswege darstellen. Cytosolische Proteine können nur bedingt ihre native Konformation außerhalb der Zelle einnehmen, da sie an eine Faltung im extrazellulären Raum nicht adaptiert sind und extracytosolische Faltungsfaktoren für eine Faltung oft nicht ausreichend sind. Bei der CGTase handelt es sich dagegen um ein authentisches sekretorisches Enzym mit einer typischen Sec-Signalsequenz, das stellvertretend für die Klasse der extrazellulären Proteine verwendet wurde. Sec-abhängige sekretorische Proteine sind daran adaptiert, vor ihrer Membrantranslokation in ungefalteter Form mit exportspezifischen Chaperonen zu wechselwirken, die eine vorzeitige Faltung der Vorläufer in der Zelle verhindern, um nach erfolgter Membrantranslokation ihre native Konformation in der Zellhülle einzunehmen. Während Proteine über den Sec-Weg nur in ungefalteter Form aus der Zelle ausgeschleust werden, ist die Faltung von Tat-Vorläuferproteinen im Cytosol erst die Voraussetzung für eine Membrantranslokation. Es sollte daher untersucht werden, ob die natürlichen Faltungstendenzen der beiden Modellsubstrate einen Einfluss auf die Sekretionseffizienz und Ausbeute abhängig vom gewählten Exportweg haben.

Zum Einschleusen der Modellenzyme in den jeweiligen Sekretionsweg sollten unterschiedliche Sec- bzw. Tat-Weg-spezifische Signalsequenzen verwendet werden. Für die Sec-abhängige Sekretion der beiden Enzyme sollte das Signalpeptid einer Lipase aus *Staphylococcus hyicus* verwendet werden, und als Variation dieses Ansatzes das Lipase-Signalpeptid mit dem dazugehörigen Propeptid, für das bekannt ist, dass es sich hinsichtlich der Ausbeuten positiv auf die Sekretion heterologer Proteine auswirkt. Da zu Beginn der Arbeiten nicht feststand, ob *S. carnosus* überhaupt über einen Tat-Weg verfügt, und keine authentischen Tat-Substrate von *S. carnosus* bekannt waren, sollte untersucht werden, ob die Modellsubstrate mit Hilfe der TorA-Signalsequenz des *E. coli* Tat-Substrates TMAO-Reduktase sekretiert werden können. Für diese Signalsequenz war bereits bekannt, dass sie sowohl mit heterologen Tat-Apparaten wechselwirkt, als auch die Sekretion von verschiedenen heterologen Proteinen vermittelt. Durch die sowohl Sec-als auch Tat-abhängige Sekretion der

beiden Modellproteine sollte ein Effizienzvergleich beider Sekretionswege durchgeführt werden, der Aufschluss über mögliche Limitierungen geben und Ansätze zur Optimierung aufzeigen sollte.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

In der vorliegenden Arbeit wurden analysenreine Chemikalien der Firmen Merck AG (Darmstadt), Sigma Chemie (Deisenhofen) und Carl Roth (Karlsruhe) verwendet. Biochemikalien und Enzyme, inklusive der dazugehörigen Puffer, stammten von den Firmen Roche (Mannheim), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt a. M.). Zusätze für Nährmedien wurden von der Firma Difco Laboratories (Augsburg) bezogen. <sup>35</sup>S-L-Methionin stammte von NEN DuPont (Bad Homburg) oder Amersham Life Science (Braunschweig).

### 2.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

#### Stämme

Art	Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i>	JM 109	<i>RecA supE endA hsdR gyrA relA thi</i> ( $\Delta$ lac- <i>proAB</i> ) F' <i>traD proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> <math>\Delta</math>(lacZ)</i> M	Yanish-Perron <i>et al.</i> 1985
	BL21	B F <i>dcm ompT hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>gal</i>	Studier und Moffatt, 1986
<i>S. carnosus</i>	TM300	Wildtyp	Schleifer und Fischer, 1982
	$\Delta$ <i>tatC</i>	S1 <i>AtatC</i>	D. Meissner, pers. Mitteilung

#### Plasmide

Plasmid	Stamm	Resistenz	Klonierte Gene	Referenz
pULS183 K2	<i>E. coli</i>	Amp	<i>Staphylococcus hyicus</i> Prepro-Lipase mit <i>NaeI</i> -Schnittstelle zur Fusion des Signalpeptids mit heterologen Genen	J. Meens, pers. Mitteilung
pULS183 K23	<i>E. coli</i>	Amp	<i>S. hyicus</i> Prepro-Lipase mit <i>SnaBI</i> -Schnittstelle zur Fusion des Lipase Prepro-Anteils mit heterologen Genen	J. Meens, pers. Mitteilung
pBluescriptTorA <sup>SP</sup>	<i>E. coli</i>	Amp	Signalsequenz der <i>E. coli</i> TMAO-Reduktase (TorA)	N. Blaudeck, pers. Mitteilung
pULS183 K2-pBE	<i>E. coli</i>	Amp	Fusion von <i>S. hyicus</i> Lipase <sup>SP</sup> mit Branching Enzyme	Diese Arbeit
pULS183 K23-ppBE	<i>E. coli</i>	Amp	Fusion von <i>S. hyicus</i> Lipase <sup>SP</sup> und Propeptid mit Branching Enzyme	Diese Arbeit
pBluescriptTorA <sup>SP</sup> -BE	<i>E. coli</i>	Amp	Fusion von <i>E. coli</i> TorA <sup>SP</sup> mit <i>A. gottschalkii</i> Branching Enzyme	Diese Arbeit

pULS183 K2- pCGT	<i>E. coli</i>	Amp	Fusion von <i>S. hyicus</i> Lipase <sup>SP</sup> mit <i>Anaerobranca gottschalkii</i> reifer CGTase	Diese Arbeit
pXR100	<i>E. coli</i>	Amp	Leervektor	J. Meens, pers. Mitteilung
	<i>S. carnosus</i>	Cm		
pET28A-CGTm	<i>E. coli</i>	Kan	reifer Teil der <i>A. gottschalkii</i> CGTase	C. Jürgens, Univ. Köln, pers. Mitteilung
pQE82-BE	<i>E. coli</i>	Amp	<i>A. gottschalkii</i> Branching Enzyme Strukturgen	Diese Arbeit
pXR100-TorA-BE	<i>E. coli</i>	Amp	Fusion von <i>E. coli</i> TorA <sup>SP</sup> mit Branching Enzyme	Diese Arbeit
	<i>S. carnosus</i>	Cm		
pXR100-pBE	<i>E. coli</i>	Amp	Fusion von <i>S. hyicus</i> Lipase <sup>SP</sup> mit Branching Enzyme	Diese Arbeit
	<i>S. carnosus</i>	Cm		
pXR100-ppBE	<i>E. coli</i>	Amp	Fusion von <i>S. hyicus</i> Lipase <sup>SP</sup> und Propeptid mit Branching Enzyme	Diese Arbeit
	<i>S. carnosus</i>	Cm		
pXR100-TorA- CGT	<i>E. coli</i>	Amp	Fusion von <i>E. coli</i> TorA <sup>SP</sup> mit CGTase	Diese Arbeit
	<i>S. carnosus</i>	Cm		
pXR100-pCGT	<i>E. coli</i>	Amp	Fusion von <i>S. hyicus</i> Lipase <sup>SP</sup> mit CGTase	Diese Arbeit
	<i>S. carnosus</i>	Cm		
pXR100-ppCGT	<i>E. coli</i>	Amp	Fusion von <i>S. hyicus</i> Lipase <sup>SP</sup> und Propeptid mit CGTase	Diese Arbeit
	<i>S. carnosus</i>	Cm		
pXR100-aCGT	<i>E. coli</i>	Amp	Authentische CGTase	Diese Arbeit
	<i>S. carnosus</i>	Cm		
pXR100- TorA <sup>KQ</sup> CGT	<i>E. coli</i>	Amp	RR->KQ Austausch im TorA- CGTase Fusionsprotein	Diese Arbeit
	<i>S. carnosus</i>	Cm		
pXR100-ppLip	<i>E. coli</i>	Amp	<i>S. hyicus</i> Prepro-Lipase	A. Bida, R. Freudl, pers. Mitteilung
	<i>S. carnosus</i>	Cm		

## Primer

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
AV 1	TTC GAG AGG TGA TAC GTA ATG GAA AAT ATG ATA AGG GCT ATT AAT	Konstruktion von pXR-pBE, -ppBE, -TorA-BE
AV 2	CGG GCA TGC GTC GAC CTA TTT TTT CAA CTT TAA ACA AAT AAT GGC	Konstruktion von pXR-pBE, -ppBE, -TorA-BE
AV 3	GGA ATC TAC TTT TAC TTT TGA AGG GAC TGG TTT AAT GAA CAA TAA CGA TCT CTT TCA GGC ATC ACG	Konstruktion von pXR-TorA-BE, -TorA-CGT
AV 5	CCC CAG GCT TTA CAC TTT ATG CTT CCG GCT CGT ATG TTG TGT GGA AT	Konstruktion von pXR-TorA-BE
AV 6	CGT GAT GCC TGA AAG AGA TCG TTA TTG TTC ATT AAA CCA GTC CCT TCA AAA GTA AAA GTA GAT TCC	Konstruktion von pXR-TorA-BE, -TorA-CGT
AV 7	GGA ATC TAC TTT TAC TTT TGA AGG GAC TGG TTT AAT GAT AAA TAA AAA AAA TAG TAT AGG TAA AGC AAT ATG TAT TTG TTT ATC	Konstruktion von pXR-aCGT, -ppCGT
AV 8	AAT AAA ATG CAT GCA TTT ACC ATT CAA AAT AAA TTG TAT CTG TTC C	Konstruktion von pXR-aCGT, -ppCGT, -TorA-CGT
AV 9	CGG TAC CCG GGG TCG ACC TAG AGT	Amplifizierung des 5' UTR-Bereichs der <i>S. byicus</i> Lipase
AV 10	GAT AAA CAA ATA CAT ATT GCT TTA CCT ATA CTA TTT TTT TTA TTT ATC ATT AAA CCA	Amplifizierung des 5' UTR-Bereichs der <i>S. byicus</i> Lipase
AV 11	AGC ATT TTT CAA CCA GTA ACA TAC GTA ACT CAA AAT TCA CTA	Konstruktion von pXR-pCGT
AV 12	GCC GCA TGC GTC GAC TTA CCA TTC AAA ATA AAT TGT ATC TGT TCC	Konstruktion von pXR-pCGT
AV 13	CGA CTG ACG CTG TCG AAT TCG ATG TAA CTC AAA ATT CAC TAG AAC ATA TCA AAG AGC ATA CAA GTG	Konstruktion von pXR-TorA-CGT
AV 14	CAC TTG TAT GCT CTT TGA TAT GTT CTA GTG AAT TTT GAG TTA CAT CGA ATT CGA CAG CGT CAG TCG	Konstruktion von pXR-TorA-CGT
AV 15	GGC GGG AAT CTA CTT TTA CTT TTG AAG GGA CTG GTT TAA TGA ACA ATA ACG ATC TCT TTC AGG CAT CAA AAC AGC GTT TTC TGG CAC AAC	Konstruktion von pXR-TorA <sup>KQ</sup> -CGT
AV 16	GTT GTG CCA GAA AAC GCT GTT TTG ATG CCT GAA AGA GAT CGT TAT TGT TCA TTA AAC CAG TCC CTT CAA AAG TAA AAG TAG ATT CCC GCC	Konstruktion von pXR-TorA <sup>KQ</sup> -CGT

Die Konstruktion der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide ist in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Kultivierung von Bakterien

#### 2.3.1.1 Nährmedien

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

pro Liter

10 g Bacto-Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

Zur Herstellung von festen Nährboden wurden dem Medium zusätzlich 18 g Agar pro Liter zugesetzt. Dieses Medium diente standardmäßig der Anzucht von *E. coli* und *S. carnosus* Stämmen. Zur Selektion auf Antibiotikaresistenz wurden dem Medium die entsprechenden Antibiotika in folgender Endkonzentration zugefügt:

Ampicillin (in Aqua bidest.): 100 mg/l

Chloramphenicol (in abs. Ethanol): 15 mg/l

Kanamycin (in Aqua bidest.) : 75 mg/l

##### PH-Medium zur Herstellung von *S. carnosus* Protoplasten (Liebl, 1986)

pro Liter

10 g Bacto-Pepton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

1 g Glucose

1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

##### DM3 Medium für die Protoplastentransformation von *S. carnosus* (Götz *et al.*, 1981)

Folgende Lösungen wurden einzeln angesetzt und autoklaviert:

500 ml 1M Na-Succinat pH 7.3 (mit Bernsteinsäure eingestellt)

5 % Agar 200 ml in Aqua bidest.

je 3.3 % Casamino Acids und Hefeextrakt in 150 ml Aqua bidest.

3.5 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 1.5 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 100 ml Aqua bidest.

Nach dem Autoklavieren wurden die Lösungen steril zusammengeführt und mit 20 ml 1M MgCl<sub>2</sub>, 10 ml 50 % (w/v) Glucose und 10 ml 5 % (w/v) BSA versetzt.

## Minimalmedium zur radioaktiven Markierung von *S. carnosus* Stämmen

(MMSc; D. Tippe, pers. Mitteilung)

Folgende Lösungen wurden einzeln angesetzt und sterilfiltriert:

-10 x Aminosäuremix (AS 1): je 1.2 % in Aqua bidest

Alanin, Arginin, Asparagin, Glutamin, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Valin

-20 x Aminosäuremix (AS 2):

je 1 % in 0.5 M NaOH: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Tyrosin

100 x Aminosäuremix (AS 3): 1 % Tryptophan in 0.2 M HCl

- 4 x Salzlösung pro Liter:

4 g  $\text{NH}_4\text{SO}_4$

2 g Na-Citrat x 2  $\text{H}_2\text{O}$

8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

0.4 g  $\text{MgSO}_4$  x 7  $\text{H}_2\text{O}$

0.04 g  $\text{FeSO}_4$  x 7  $\text{H}_2\text{O}$

- 500 x Vitaminlösung

pro 100 ml: 500 mg Nicotinsäure, 25 mg Thiamin/HCl

- 100 x Metallmix

pro 100 ml: 20 ml 1 M  $\text{MgCl}_2$ , 7 ml 1 M  $\text{CaCl}_2$ , 5 ml 10 mM  $\text{FeCl}_3$ , 1 ml 10 mM  $\text{ZnCl}_2$  5 ml 100 mM  $\text{MnCl}_2$

- 2 % Hefeextrakt

- 100  $\mu\text{g/ml}$  Riboflavin (in Aqua bidest.)

- 10 mg/ml Uridin

- 25 mg/ml Cystein (in Aqua bidest.)

Für 100 ml Medium wurden die Lösungen wie folgt zusammengesetzt:

10 ml	AS 1 (10 x)
5 ml	AS 2 (20 x)
1 ml	AS 3 (100 x)
25 ml	Salzlösung (4 x)
0.2 ml	Vitaminlösung (500 x)
0.2 ml	Riboflavin (100 µg/ml)
0.28 ml	Uridin (10 mg/ml)
2.5 ml	Hefeextrakt (2 %)
1.148 ml	Glycerin (87 %)
5 ml	Cystein (25 mg/ml)
1 ml	Metallmix (100 x)

Übernachtskulturen wurden 5 µl Methionin (25 mg/ml) zugesetzt.

### 2.3.1.2 Kultivierungsbedingungen

Flüssigkulturen aller verwendeten Stämme wurden bei 37°C in Reagenzgläsern mit 5 ml Medium bzw. in 250 ml-Erlenmeyerkolben mit 50 ml Medium (140-170 rpm) angezogen. Die Inkubation erfolgte für 14-16 Stunden.

### 2.3.2 Stammhaltung

Die langfristige Stammhaltung erfolgte in Form von Glycerin-Dauerkulturen. Hierzu wurden 330 µl einer Übernachtskultur mit 670 µl 87 % Glycerin versetzt und bei -75°C gelagert.

### 2.3.3 Transformation von Bakterien

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

Die Transformation von Plasmid-DNA erfolgte über kompetente Zellen, die nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt wurden (Hanahan, 1985). Hierzu wurde der jeweilige Stamm in 50 ml LB- Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.3 angezogen. Die Zellen wurden 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (15 Min. bei 4°C und 3500 rpm) geerntet. Das Pellet wurde zunächst in 16 ml eiskaltem RF1-Puffer aufgenommen und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 4 ml eiskaltem RF 2-Puffer resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden bis zur Verwendung in 200 µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -75°C gelagert.

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, je Aliquot mit ca. 100 ng Plasmid-DNA (oder maximal 20 µl Ligationsansatz) versetzt und der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann folgte eine Hitzeschockbehandlung für 90 sec bei 42°C im Heizblock. Zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz wurde der Ansatz nach Zugabe von 400 µl LB-Medium bei 37°C für 45 Minuten geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1 Min., 4000 rpm, RT) und anschließender Aufnahme in ca. 50 µl LB konzentriert, auf Selektionsplatten ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

**RF1:** pro Liter

12 g RbCl, 9.9 g MnCl<sub>2</sub>, 1.5 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 2.9 g Kaliumacetat, 121 ml Glycerin (87 %), pH 5.8 mit 0.2 N Essigsäure eingestellt.

**RF2:** pro Liter

2.1 g MOPS, 1.2 g RbCl, 11 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 121 ml Glycerin (87 %), pH 6.8 mit 1 M NaOH eingestellt.

#### 2.3.3.2 Transformation von *S. carnosus* Protoplasten (Götz und Schumacher, 1987)

Die Transformation von Plasmid-DNA in *S. carnosus* erfolgte über Protoplasten. Hierzu wurde der jeweilige Stamm in 500 ml PH-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5 angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (6700 rpm, 15 Min., 4°C) geerntet. Das Pellet wurde anschließend in 30 ml SMMP-Lösung resuspendiert, in einen sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit 30 µl 0.5 mg/ml Lysostaphin versetzt und 16-18 Stunden bei 30°C stehend inkubiert. Die so hergestellten Protoplasten wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet (25 Min., 7600 rpm, RT) und in 5 ml SMMP gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Protoplasten in 2.1 ml SMMP aufgenommen und bis zur Verwendung in 300 µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -75°C gelagert.

Für die Transformation wurden die Protoplasten auf Eis aufgetaut und je Aliquot mit 1-2 µg DNA versetzt. Nach Zugabe von 2 ml 40 %iger PEG/SMM-Lösung und einer Inkubation von 2 Minuten bei RT wurden 7 ml SMMP-Lösung zugesetzt, die Protoplastensuspension sanft vermischt und anschließend 15 Minuten bei 7600 rpm, RT zentrifugiert. Die geernteten Protoplasten wurden in 250 µl SMMP resuspendiert, auf DM3 Platten ausplattiert und für 4.5 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die DM3-Platten mit 3 ml CY-Softagar (50°C), der das gewünschte Antibiotikum in 10-facher Konzentration enthielt, überschichtet und für 2-4 Tage bei 37°C inkubiert.

**2x SMM-Lösung:** 1 M Saccharose, 40 mM Maleinsäure, 40 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.5 mit NaOH eingestellt, 15 Min. autoklaviert

**4 x PAB:** 7 % (w/v) Difco Antibiotic Medium No. 3, 15 Min. autoklaviert

**5% BSA-Lösung:** 5 % Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin), sterilfiltriert

**SMMP-Lösung:** für 50 ml werden zusammengesetzt: 38 ml 2 x SMM, 9.5 ml 4 x PAB, 2.5 ml 5 % BSA

**40 % PEG/SMM-Lösung:** 40 g PEG 6000 in 50 ml 2 x SMM lösen, mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen, 15 Min. autoklaviert

#### **CY3-Softagar:**

**CY-Agar pro Liter:** 25 g Hefeextrakt, 25 g Casamino acids, 14.75 g NaCl, 8 g Agar

Bei Bedarf werden für CY3-Softagar gemischt:

25 ml	CY-Agar (frisch aufgekocht und auf 50°C abgekühlt)
25 ml	1 M- Na-Succinat pH7.3 (50°C)
2 ml	1.5 M Na-Glycerophosphat
1 ml	1 M MgCl <sub>2</sub>
0.5 ml	50 % Glucose
0.5 ml	5 % BSA

## **2.4 Genetische Methoden**

### **2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *S. carnosus* erfolgte mit Hilfe des "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Qiagen, Hilden). Bei der Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. carnosus* wurde die Vorschrift folgendermaßen geändert: Die Probe wurde im P1-Puffer des Kits gelöst, mit 10 µl Lysostaphin (1 mg/ml) versetzt und 20-30 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Zellwand zu verdauen. Anschließend wurde nach Vorschrift fortgefahren.

### **2.4.2 Allgemeine genetische Methoden**

#### *2.4.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen*

Die DNA wurde in den vom Enzymhersteller (Roche, Mannheim; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) mitgelieferten Puffern nach Vorschrift des Herstellers verdaut.

#### *2.4.2.2 Agarosegelelektrophorese*

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte über Agarosegelelektrophorese. Die Agarosekonzentration betrug zwischen 0.8 und 1.5 %, je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10 x Probenpuffer versetzt und die Elektrophorese in 1x TAE-Puffer bei 100 V durchgeführt. Das Gel wurde zum Anfärben der DNA 5 Minuten in einer 1 %igen Ethidiumbromidlösung inkubiert und 10 Minuten in Wasser entfärbt.



**10 x TAE-Puffer** : pro Liter  
48.4 g Tris  
11.42 ml Essigsäure (96 %)  
7.44 g EDTA/Na<sub>2</sub>

**10 x Probenpuffer:**  
0.05 % Bromphenolblau  
0.05 % Xylencyanol  
50 % Glycerin

#### *2.4.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Agarosegelen erfolgte über das "QIAquick Gel Extraction Kit" nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden).

#### *2.4.2.4 Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase*

Zur Verhinderung von Religationen der linearisierten Vektoren wurden vor der Ligation die 5'-Phosphatreste mit alkalischer Phosphatase entfernt. Hierzu wurde der linearisierte Vektor nach Isolierung aus dem Agarosegel (in 28 µl EB-Puffer gelöst) mit 3.3 µl 10 x SAP-Puffer und 1.5 Einheiten "Shrimp alkaline phosphatase" versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Phosphatase wurde die Probe 10 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend mit Hilfe des "QIAquick Gel Extraction Kit" nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

**EB-Puffer:** Elutionspuffer des "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden)

**SAP-Puffer:** Reaktionspuffer der "Shrimp alkaline phosphatase" (Roche, Mannheim)

#### *2.4.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten*

Im Ligationsansatz wurde ein molares Verhältnis von Fragment zu Vektor von 3:1 eingestellt, wobei ca. 50 ng Vektor-DNA eingesetzt wurden. Ligationen wurden entweder mit dem "Rapid DNA Ligation Kit" (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers oder mit 1 Einheit der T4 DNA Ligase und 1/10 Volumen T4 Ligationspuffer in einem Volumen von 10 µl und bei 16°C ÜN durchgeführt.

**T4 Ligationspuffer:** Reaktionspuffer der T4 DNA Ligase (Roche, Mannheim)

### 2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die *in vitro*-Verfältigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) Hierzu wurden zwei komplementäre, konvergierende Oligonukleotide (Primer) verwendet, die das zu amplifizierende Fragment flankieren. Die PCR-Reaktion wurde mit Hilfe der Pwo-DNA-Polymerase bzw. HighFidelity-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion erfolgte im T3-Thermocycler (Whatman Biometra, Göttingen) und wurde in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Als Template-DNA wurden ca. 500 ng chromosomale DNA bzw. 5-10 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Das gewünschte PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel von Nebenprodukten getrennt und über das "QIAquick Gel Extraction Kit" nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

**Programmzyklen:** s. Abschnitt 2.4.3.1

#### 2.4.3.1 Crossover-PCR

Für die Fusion von DNA-Fragmenten, die nicht mit Hilfe der üblichen Subklonierung erreicht werden konnte, wurde die Crossover PCR-Methode eingesetzt. Hierbei werden mit Hilfe von zwei komplementären, konvergierenden Primern, die das jeweilige zu amplifizierende Fragment flankieren, zwei oder mehr DNA Fragmente mit komplementären Überhängen amplifiziert. Die Fragmente, die in dieser ersten Reaktion entstehen, werden in einer anschließenden "Fusionsreaktion", in der sich die komplementären Überhänge der zwei Fragmente aneinander lagern, die zwei Ausgangsfragmente miteinander fusioniert und mit Hilfe von Primern, die das Fusionsfragment flankieren, weiter amplifiziert.

Die Primer wurden so gewählt, dass die komplementären Überhänge jeweils eine Schmelztemperatur ( $T_m$ ) von ca. 65°C und einen G/C-Gehalt von ca. 50 % haben. Zur optimalen Anlagerung der Überhänge wurde die Reaktion bei 60°C durchgeführt. Die aus der ersten Amplifikation erhaltenen PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel von Nebenprodukten getrennt (s. Abschnitt 2.4.2.3), bevor sie zur Fusion eingesetzt wurden. Für die Fusionsreaktion wurden jeweils zwischen 5 und 10 ng DNA pro Fragment verwendet.

**Programmzyklen:**

**Lange Fragmente:** 94°C, 5 Min, 15-20 x [94°C, 1 Min; 60-65°C, 30s; 72°C, 2 Min + 5s Inkrement pro Zyklus], 72°C, 5 Min

**Kurze Fragmente:** 94°C, 5 Min, 15-20 x [94°C, 1 Min; 60-65°C, 30s; 72°C, 30s], 72°C, 5 Min

### 2.4.4 Nicht-radioaktive DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode

Wie bei der von Sanger (1977) beschriebenen radioaktiven Sequenziermethode wird auch hier der Abbruch der DNA-Polymerasereaktion beim Einbau von Dideoxynukleotiden genutzt. Hierzu werden Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide (MWG Biotech, Ebersberg) als Primer und zirkuläre Plasmid-DNA als Matrize verwendet. Die Sequenzierung wurde mit der LI-COR Apparatur der Firma MWG Biotech nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Sequenzierreaktion wurde das "Thermo Sequenase fluorescent

labelled primer cycle sequencing Kit" der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) verwendet. Die PCR-Reaktion wurde im T3-Thermocycler (Whatman Biometra, Göttingen) nach den Angaben von MWG Biotech durchgeführt: 95°C, 3 Min, 30 x [95°C, 15s; T<sub>m</sub> des Primers (50-65°C), 30s; 70°C, 40s], 15 x [95°C, 20s; 70°C, 30s] . Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl "Stop Solution" des Kits und Erhitzen bei 95°C für 5 Minuten gestoppt.

Die Gelelektrophorese wurde in einem Gel mit einem Polyacrylamidgehalt von 4.6 % (LongRanger Polyacrylamid), 66 cm Länge und 0.25 mm Dicke in 1 x TBE Laufpuffer durchgeführt. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Gel für ca. 10 Minuten auf 45°C vortemperiert. Es wurden jeweils 1.5-2 µl Probe auf das Gel aufgetragen. Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden mit der Software "Base ImageIR", der Begleitsoftware zur LI-COR Apparatur, erfasst und ausgewertet.

**10 x TBE-Puffer:** 890 mM Tris base, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA/Na<sub>2</sub>

## 2.5 Proteinchemische Methoden

### 2.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse erfolgte in 10 %igen Polyacrylamidgelen nach der Standardmethode von Laemmli (1970). Vor dem Auftragen wurden die Proteine mit 2x Probenpuffer versetzt und zur Denaturierung 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Als Größenstandard diente der "Prestained Protein Marker Broad Range" (New England Biolabs, Schwalbach).

**Trenngel 10 %:** pro 55 ml

18.3 ml	Acrylamid
13.8 ml	1.5 M Tris/HCl pH 8.8
0.37 ml	15 % SDS
16 ml	Aqua bidest.
5.95 ml	87 % Glycerin
36.7 µl	TEMED
550 µl	APS

**Sammelgel 6.5 %:** pro 12.5 ml

2.7 ml	Acrylamid
1.5 ml	0.5 M Tris/HCl pH 6.8
125 µl	15% SDS
8.1 ml	Aqua bidest.
8 µl	TEMED
125 µl	APS

**Probenpuffer:** 125mM Tris HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 8.7 % Glycerin, Spatelspitze Bromphenolblau, 1.6 % (w/v) DTT

## 2.5.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten und Zellfraktionierung

### 2.5.2.1 Gesamtzellextrakte von *E. coli*

Für den Zellaufschluss wurden 4 ml Kultur für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 1 ml 30 mM Tris/HCl pH 8 aufgenommen. Anschließend wurden Glaskugeln ( $\varnothing$  0.1-0.25 mm, Fa. Claus, Nidderau) dazugegeben und die Zellen 10 Minuten bei maximaler Schüttelfrequenz in der Retschmühle aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden 10 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit einer geeigneten Menge 5 x Probenpuffer versetzt und 10 Minuten bei 95 °C erhitzt.

### 2.5.2.2 Gesamtzellextrakte von *S. carnosus*

2 ml einer Kultur wurden durch Zentrifugation geerntet (5 Min., 13000 rpm) und der Kulturüberstand sorgfältig entfernt (s. 2.5.2.3). Die Zellen wurden in 110  $\mu$ l Lysostaphin-Puffer, zu dem 25  $\mu$ l Lysostaphin (1 mg/ml) hinzugefügt wurde, für 30 Minuten bei 37°C aufgeschlossen. Anschließend wurden 90  $\mu$ l 2x Probenpuffer zugegeben und die Probe 10 Minuten bei 95°C inkubiert.

**Lysostaphin-Puffer:** 145 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7.5

### 2.5.2.3 Aufarbeitung von *S. carnosus* Kulturüberständen

Die Zellen wurden durch Zentrifugation vom Kulturüberstand getrennt und die im Überstand befindlichen Proteine mit 10 % TCA 45 Minuten auf Eis oder ÜN bei 4°C gefällt. Das Präzipitat wurde nach Zentrifugation mit 1.5 ml 100 % Aceton gewaschen und nach erneuter Zentrifugation bei RT getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50  $\mu$ l 2x Probenpuffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 95°C erhitzt.

### 2.5.2.4 Isolierung des *S. carnosus* Zellwandkompartimentes

Für die Isolierung des Zellwandkompartimentes wurden 2 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 4 für 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und der Kulturüberstand entfernt (s. Abschnitt 2.5.2.3). Das Pellet wurde in 96  $\mu$ l SMM-Lösung resuspendiert, mit 4  $\mu$ l Lysostaphin (5 mg/ml in SMM gelöst) versetzt und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann 10 Minuten bei 15300 rpm (16,000 x g) zentrifugiert, um das Zellwandkompartiment (Überstand) von den protoplastierten Zellen (Pellet) zu trennen. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 7.5 % TCA gefällt. Das Pellet wurde mit 500  $\mu$ l SMM gewaschen und schließlich in 500  $\mu$ l 50 mM Tris/HCl pH 7.5 resuspendiert und ebenfalls mit 7.5 % TCA gefällt. Die Proben wurden entweder 45 Minuten auf Eis oder ÜN bei 4°C gefällt. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 15300 rpm zentrifugiert und ein Mal je mit 100 % Aceton und 80 % Aceton gewaschen. Das Präzipitat wurde bei RT getrocknet und in 85  $\mu$ l 2x Probenpuffer aufgenommen und dann 10 Minuten bei 95°C erhitzt.

**SMM-Lösung** (Navarre *et al.*, 1996):

500 mM Sucrose, 20 mM Maleinsäure, MgCl<sub>2</sub>

### 2.5.3 Herstellung von Peptidseren

Zum Nachweis der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modellproteine mittels Western Blot und Pulse Chase-Analyse wurden Peptidseren, die gegen das Branching Enzyme und die CGTase gerichtet waren, von der Firma Eurogentec (Herstal, Belgien) hergestellt. Für die Immunisierung von Kaninchen wurden je Protein zwei Peptide synthetisiert und an den Träger Keyhole Limpet Haemocyanin gekoppelt.

Die folgenden Peptide wurden zur Immunisierung verwendet:

**CGTase:**

1) CNG DPY NRK PMS SFD Q

2) TDR FLD GDK YNN PTC

**Branching Enzyme (BE):**

1) QWG DGR WQE RKN KID C

2) CFE NEN PKK ADN PQW G

### 2.5.4 Western Blot-Analyse

#### 2.5.4.1 Entwicklung mit alkalischer Phosphatase

Der immunologische Nachweis einzelner Proteine erfolgte nach der Methode von Towbin *et al.* (1979). Die über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden im Elektroblobverfahren unter Verwendung einer Mini-Trans-Blot™ Kammer (BioRad, München) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran ("Immobilon P", Millipore, Eschborn) übertragen. Der Blot erfolgte dabei in Tris/Glycin-Puffer bei 350 mA für 45 Minuten. Nach Transfer der Proteine wurde die PVDF-Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 20 Minuten bei RT im WB-Puffer geschüttelt. Anschließend wurde die Membran mit spezifischen Antikörpern 45 Minuten bei 37°C oder ÜN bei 4°C inkubiert. Die Antikörper wurden dazu 1:1000 in frischem WB-Puffer verdünnt. Nach zweimaligem Waschen (jeweils 10 Min.) mit WB-Puffer wurde die Membran 45 Minuten bei 37°C mit dem sekundären Antikörper, der an das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist, inkubiert. Hierzu wurde Anti-Rabbit IgG (Sigma) 1:10000 verdünnt eingesetzt. Überschüssige Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen in WB-Puffer entfernt. Danach wurde die Membran für 5 Minuten im Entwicklungspuffer equilibriert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte durch anschließende Zugabe der Entwicklungslösung. Die Detektionsreaktion wurde mit 3 %iger TCA bzw. Wasser gestoppt.

**Tris/Glycin Puffer:** 250 mM Tris, 1.92 M Glycin

**WB-Puffer:** 100 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 % Tween 20

**Entwicklungspuffer:** 100 mM Tris/HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>

**Entwicklungslösung:** 10 ml Entwicklungspuffer, darin gelöst 66 µl NBT-Lösung (5 % Nitroblau-Tetrazolium in 70 % Dimethylformamid (DMF)) und 66 µl BCIP-Lösung (2.5 % Bromo-Chloro-Indolylphosphat in 50 % DMF).

#### 2.5.4.2 Entwicklung durch Chemilumineszenzdetektion

Die Western Blot Analyse durch Chemilumineszenzdetektion bietet gegenüber der alkalischen Phosphatase-Entwicklung eine 10-fach höhere Sensitivität. Die Proteinauftrennung und der Elektrobplot wurden wie unter Abschnitt 2.5.4.1 beschrieben durchgeführt. Nach Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde die Membran 15 Minuten in 10 % entfettetem Milchpulver (in TBST gelöst) geschüttelt und anschließend zwei Mal für 15 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen. Die Membran wurde mit spezifischen Antikörpern 45 Minuten bei 37°C oder ÜN bei 4°C inkubiert. Die Antikörper wurden dazu 1:1000 in frischem TBST-Puffer verdünnt. Nach zweimaligem Waschen mit TBST-Puffer wurde die Membran 45 Minuten bei 37°C mit dem sekundären Antikörper, der an das Enzym Horseradish Peroxidase gekoppelt ist, inkubiert. Hierzu wurde Anti-Rabbit IgG (Amersham Biosciences, Freiburg) 1:10000 verdünnt eingesetzt. Überschüssige Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen in TBST-Puffer entfernt. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte nach Zugabe der vom Hersteller gelieferten Substratlösungen (ECL Western Blotting System, Amersham Biosciences, Freiburg) mit Hilfe einer CCD-Kamera (Fujifilm LAS-1000 Luminescent Image Analyzer). Die Auswertung erfolgte mit der Begleitsoftware AIDA (Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenherdt).

TBST: 20 mM Tris base, 137 mM NaCl, 0.1 % Tween 20; pH 7.6

#### 2.5.5 Proteinlokalisierung durch Proteinase K-Verdau von *S. carnosus* Protoplasten

Die zelluläre Lokalisierung von Proteinen, die in *S. carnosus* exprimiert wurden, wurde durch die Behandlung von protoplastierten Zellen mit Proteinase K untersucht. Hierzu wurden jeweils 2 ml Aliquots Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 4 in einem Volumen von 100 µl wie unter 2.5.2.4 beschrieben protoplastiert, eine Entfernung des Zellwandkompartimentes fand jedoch nicht statt. Anschließend wurde ein Aliquot der Suspension mit 10 µl Proteinase K (500 µg/ml Proteinase K in SMM gelöst (s. 2.5.2.4) versetzt und 20 Minuten auf Eis inkubiert, ein zweites Aliquot wurde mit 5 % Triton X-100 (20 %ige Stammlösung) aufgeschlossen und dann mit 12.5 µl Proteinase K (500 µg /ml Proteinase K in SMM gelöst (s. 2.5.2.4) versetzt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Ein drittes Aliquot wurde für die Zeit des Verdaus ebenfalls auf Eis gestellt. Alle Proben wurden mit 7.5 % TCA für 45 Minuten auf Eis oder bei 4°C ÜN gefällt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie unter 2.5.2.4 beschrieben.

### 2.5.6 Native PAGE-Analyse

Um aktive Proteinspezies der einzelnen Enzymvarianten lokalisieren zu können, wurden sogenannte Zymogramme durchgeführt. Da es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Enzymen um stärkeabbauende Enzyme handelt, wurde der Aktivitätsnachweis im Gel auf der Basis der Jodstärke-Reaktion durchgeführt. Hierzu wurden Proteinfractionen im nativen Zustand in einer nicht-denaturierenden, nativen PAGE ("Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese) in Gelen mit einem Polyacrylamidgradienten von 4 bis 20 % (BioRad) aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in Gegenwart einer Lösung inkubiert, die das Enzymsubstrat Stärke enthielt (siehe unten). Anschließend wurde das mit Stärke gesättigte Gel mit einer Jodlösung angefärbt (Lugolsche Lösung), was durch Einlagerung des Jods in die Stärke zu einer Blaufärbung des Gels führt. Der Stärkeabbau durch die im Gel aufgetrennten Enzyme wird dort sichtbar, wo das Gel keine Blaufärbung mehr und stattdessen eine rötliche oder weiße Färbung aufweist.

Für den Aktivitätsnachweis wurden jeweils 1 ml Gesamtzellfraktion mit einer  $OD_{600}$  von 0.1 und 1 ml Kulturüberstand mit einer  $OD_{600}$  von 1 eingesetzt. Hierzu wurde das Zellpellet in 8  $\mu$ l Lysostaphin-Puffer resuspendiert, mit 2  $\mu$ l Lysostaphin (1mg/ml) versetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2  $\mu$ l 5 x nicht-denaturierender Probenpuffer zugegeben. Der Kulturüberstand wurde über Microcon YM-50 Filtereinheiten (Millipore, Eschborn), deren Membranen eine Ausschlussgröße für Proteine mit einem Molekulargewicht von 50 kDa besitzen, auf ein Volumen von 10  $\mu$ l aufkonzentriert und ebenfalls mit 2  $\mu$ l 5 x Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden sofort auf ein nicht-denaturierendes Tris/HCl Gel (Ready Gel, BioRad) mit einem Polyacrylamidgradienten von 4-20 % aufgetragen. Der Gellauf erfolgte ÜN bei 10 V. Für den Aktivitätsnachweis wurde das Gel nach der Elektrophorese in 25 ml einer 1 %igen Stärkelösung (Kartoffelstärke (Sigma) in 50 mM Tris/HCl pH 7 gelöst) für 45 Minuten bei RT geschüttelt und anschließend für 45 Minuten in 50 mM Tris/HCl pH 7 gewaschen. Dann wurde das Gel mit 3 ml Lugolscher Lösung (1.5 % KI, 0.15 %  $I_2$ ) gleichmäßig überschichtet und überschüssige Jodlösung mit Wasser kurz ausgewaschen. Das Gel wurde für eine spätere Auswertung sofort fotografiert.

**Lysostaphin-Puffer:** 145 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7.5

**5x Probenpuffer:** 125mM Tris HCl, pH 6.8, 8.7 % Glycerin, Spatelspitze Bromphenolblau, 1.6 % (w/v) DTT

### 2.5.7 Photometrischer Aktivitätsnachweis (Takata *et al.*, 1994)

Zum Nachweis von Branching Enzyme und CGTase Aktivität wurde ein photometrischer Aktivitätstest durchgeführt, der auf der Jodstärke-Reaktion beruht. Die Zugabe von Jod verursacht durch Einlagerung in die  $\alpha$ 1,4-glycosidisch verknüpfte Amylosekette eine veränderte Lichtabsorption und führt zur Blaufärbung. Höher verzweigte Dextrine weisen nach Jodzugabe je nach Verzweigungsgrad eine andere Färbung auf. So führt der Einschluss von Jod in Amylopektin beispielsweise zu einer rötlichen Färbung, hochverzweigte und cyclische Dextrine weisen dagegen eine gelbe Färbung auf bzw. sind farblos. Als Mitglieder der  $\alpha$ -Amylase Familie der stärkeabbauenden Enzyme führen sowohl das Branching Enzyme als auch die CGTase zunächst die

hydrolytische Spaltung von  $\alpha$ 1,4-glycosidischen Bindungen durch, bevor sie ihre jeweiligen intra-bzw. intermolekularen Transglycosilierungsreaktionen katalysieren. Im Falle des Branching Enzyme stellt dies das Knüpfen von  $\alpha$ 1,6-glycosidischen Bindungen und damit die Verzweigung von Amylose zu Amylopektin dar, während es bei der CGTase zur Cyclisierung von kurzen Glucoseketten mit 6, 7, oder 8 Glucoseeinheiten zu  $\alpha$ -,  $\beta$ -, bzw.  $\gamma$ - Cyclodextrinen kommt.

Als Enzymsubstrat wurde für diesen Aktivitätstest Amylose (Typ III, Sigma) verwendet. Hierzu wurden 25 ml einer 0.5 %igen Amyloselösung (in 50 mM Tris/HCl, pH 7) für eine Stunde in kochendem Wasser in Lösung gebracht und anschließend 10 Minuten bei 4500 rpm zentrifugiert um den unlöslichen Anteil der Amylose zu entfernen. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen, in ein neues Falcon-Tube überführt und 1:2 verdünnt. Anschließend wurde die Absorption dieser Lösung, die 0.1 % entspricht (Dr. C. Bertoldo, TU Hamburg-Harbug, pers. Mitteilung), im Bereich von 400-800 nm bestimmt, um zu gewährleisten, dass sie bei der im Test verwendeten Wellenlänge von 660 nm gesättigt war.

Für den Test wurden jeweils 5 ml Überstand einer Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 1 über Amicon Ultra Filter YM-50 mit einer Ausschlussgrenze von 50 kDa (Millipore, Eschborn) auf ein Volumen von 500  $\mu$ l aufkonzentriert. 500  $\mu$ l Zellen mit einer  $OD_{600}$  von 1 wurden nach Zentrifugation (2 Minuten bei 13000 rpm), sorgfältigem Entfernen des Kulturüberstandes und Waschen in 1 ml 50 mM Tris/HCl pH 7 in 40  $\mu$ l 50 mM Tris/HCl pH 7 aufgenommen und mit 10  $\mu$ l Lysostaphinlösung (1 mg/ml) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte für 20 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden 450  $\mu$ l 50 mM Tris/HCl pH 7 dazugegeben. Die Aktivitätsmessung erfolgte bei 50°C. Hierzu wurden die Amyloselösung und die Proben jeweils auf 50°C vorgewärmt. Die Kulturüberstände und Zellextrakte in einem Volumen von jeweils 500  $\mu$ l wurden dann je mit 500  $\mu$ l 0.1 %iger Amyloselösung versetzt und bei 50°C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach Beginn der Reaktion (nach 5, 10, 20, 40 und 60 Minuten) wurden jeweils 200  $\mu$ l des Reaktionsgemisches zur Bestimmung der Aktivität in eine Küvette, die bereits 1 ml Jodlösung enthielt, überführt und die Enzymreaktion damit abgestoppt. Als Kontrollen wurden statt der Kulturüberstände und Zellextrakte entsprechende Mengen 50 mM Tris/HCl pH 7 bzw. LB-Medium mit der Substratlösung versetzt. Nach sorgfältigem Mischen wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Eine Einheit Enzymaktivität ist als die Menge definiert, die die Absorption des Amylose-Jod Komplexes bei 660 nm um 1 % pro Minute reduziert (Takata *et al.*, 1993). Zur Bestimmung der Aktivität wurde jeweils der Zeitpunkt gewählt, bei dem 50 % des Substrates umgesetzt worden waren.

**KI/I<sub>2</sub> Stammlösung:** 0.26 g I<sub>2</sub>, 2.6 g KI in 10 ml Aqua bidest.

**Jodlösung** (immer frisch angesetzt): 0.5 ml KI/I<sub>2</sub> Stammlösung, 0.5 ml 1N HCl, Aqua bidest. *ad* 130 ml.



## 2.5.8 Pulse Chase-Experimente

Die Exportkinetik von Sec- und Tat-Substraten in *S. carnosus* wurde anhand der Prozessierung (Umwandlung von Proteinvorläufer in die reife Form) im Pulse Chase-Experiment untersucht. Hierbei werden über einen bestimmten Zeitraum alle neu synthetisierten Proteine mit radioaktivem Methionin markiert ("Pulse"); der Einbau von radioaktivem Methionin wird durch die Zugabe eines Überschusses an nicht-radioaktivem Methionin sowie von Inhibitoren der Proteinbiosynthese gestoppt ("Chase"). Daraufhin werden zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen, um den Export des markierten Protein-Pools anhand der Prozessierung zu verfolgen. Die zu untersuchenden Proteine werden nach Zellaufschluss mittels Immunfällung isoliert. Die Markierung von Proteinen mit anschließender Fällung durch spezifische Antikörper erfolgte nach den Vorschriften von Gebert *et al.* (1988), Ito *et al.* (1981) und Shuman *et al.* (1980). Nach Auftrennung der Proteine im SDS-Gel wurden die Proteine mittels Autoradiographie oder mit Hilfe eines Phosphorimagers dargestellt und mit der Begleitsoftware AIDA ausgewertet.

### 2.5.8.1 Durchführung der Pulse Chase-Experimente

#### 2.5.8.1.1 Lösungen und Medien

**Pulse:**  $35^S$ -L-Methionin (1 mCi/ml)

**Chase:** 450  $\mu$ l Methionin (50 mg/ml), 45  $\mu$ l Puromycin (1 mg/ml), 5  $\mu$ l Erythromycin (250 mg/ml)

**Lysepuffer:** 500mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 100  $\mu$ g/ml Lysostaphin

#### **Immunpräzitationspuffer (IP-Puffer):**

**BE/CGTase:** 0.5 % Triton X-100, 50 mM Tris/HCl pH 6.8, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA

**Lipase:** 1 % Triton X-100, 50 mM Tris/HCl pH 6.8, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA

#### **Waschpuffer I**

**BE/CGTase:** 0.5 % Triton X-100, 50 mM Tris/ HCl pH 8, 1 M NaCl

**Lipase:** 1 % Triton X-100, 50 mM Tris/ HCl pH 8, 1 M NaCl

#### **Waschpuffer II**

**BE/CGTase:** 0.04 % SDS, 50 mM Tris/ HCl pH 7.5, 0.5 M LiCl

**Lipase:** 0.1 % SDS, 50 mM Tris/ HCl pH 7.5, 0.5 M LiCl

#### **Waschpuffer III** 50 mM Tris/HCl pH 7.5

**Medium:** *S. carnosus* Minimalmedium (MMsc, s. Abschnitt 2.3.1.1)

#### 2.5.8.1.2 Markierung

Die *S. carnosus* Stämme wurden über Nacht in *S. carnosus* Minimalmedium mit einem geeignetem Antibiotikum angezogen. Die Arbeitskulturer (Minimalmedium) wurde ausgehend von der ÜN-Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0.2 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.7 bei 37°C geschüttelt. 3 ml der Kultur wurden in 15 ml Falcon-Tubes überführt und durch Zentrifugation (2 Minuten, 4500 rpm) geerntet. Die Zellen wurden dann zwei Mal mit vorgewärmtem Minimalmedium ohne Methionin gewaschen und schließlich in 3 ml Minimalmedium ohne Methionin resuspendiert. Die Kultur wurde durch Zugabe von 0.5 % Xylose induziert und für weitere 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. 3 ml Kultur wurden mit 300 µCi <sup>35</sup>S-L-Methionin für 1 Minute markiert, bzw. mit 600 µCi <sup>35</sup>S-L-Methionin für 10 Minuten (TorA-CGTase Enzymvariante). Der Chase erfolgte mit 240 µl Chase-Lösung. Je nach Versuchsanordnung wurden zur Inhibierung der Sec-abhängigen Translokation 5 Minuten vor der Markierung 20 mM Natrium-Azid (3 M Stammlösung) oder 0.5 mM CCCP (50 mM Stammlösung) zur Inhibierung der Sec- und Tat-abhängigen Proteintranslokation hinzugefügt. Zu den jeweiligen Chase-Zeiten wurden 600 µl Probe entnommen und in 300 µl 40 %ige eiskalte TCA pipettiert. Die Fällung der Proteine erfolgte für 30 Minuten auf Eis.

#### 2.5.8.1.3 Immunfällung

Das TCA-Pellet wurde abzentrifugiert (10 Minuten, 15300 rpm), der Überstand abgesaugt und das Pellet drei Mal mit 80 %igem Aceton gewaschen. Das Pellet wurde 5 Minuten bei 95°C getrocknet, sorgfältig in 100 µl Lysepuffer resuspendiert (Pellet mit Spitze vom Eppendorfgefäß lösen) und 30 Minuten bei 37°C geschüttelt. Nach Zugabe von 10 µl 10 % SDS wurden die Zellen 5 Minuten bei 95°C aufgeschlossen. Anschließend wurde 1 ml IP-Puffer zugesetzt und die aufgeschlossenen Zellen wurden für 10 Minuten bei 15300 rpm zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde jeweils in ein neues Eppendorfgefäß dekantiert. Zur Immunpräzipitation wurden je 10 µl des Antikörpers zugegeben und 45 Minuten bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Fällung des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgte mit je 100 µl Pansorbinzellen (10 % w/v fixierte *Staphylococcus aureus* Zellen mit exponiertem Protein A; Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden) für 45 Minuten unter Schütteln auf Eis. Nach Zentrifugation (3 Min., 15300 rpm) wurden die Zellen in Folge mit jeweils 1 ml Waschpuffer I, II und III gewaschen (jeweils 5 Minuten auf einem Mixer schütteln) und schließlich in je 30 µl 2x Probenpuffer resuspendiert und 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Nach Zentrifugation (1 Min., 14000 rpm) wurde der gesamte Probenüberstand auf ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

#### 2.5.8.1.4 Gelaufarbeitung und Nachweis der markierten Proteine

Das Gel wurde nach dem Lauf für 15 Minuten fixiert (35 % Ethanol, 10 % Essigsäure) und zur späteren Fluorografie für 30 Minuten mit EN<sup>3</sup>HANCE (NEN Life Science Products, Bad Homburg) unter Schütteln imprägniert. Nach 15 Minuten Wässern wurde das Gel für 45 Minuten unter Vakuum auf Filterpapier (Whatman Biometra, Göttingen) getrocknet. Der Nachweis der Proteine erfolgte entweder durch Exposition eines Röntgenfilms (X-Ray, Fuji; T-Mat Medical, Kodak) für 1-2 Wochen oder mit Hilfe eines

Phosphorimagers (Fuji BAS 1800 Bio Image Analyzer). Hierzu wurde für einige Stunden oder über Nacht ein "Screen" (Fuji BAS-MP Imaging Plate) exponiert, der anschließend in den Phosphorimager eingelesen wurde. Die radioaktiv markierten Proteinproben wurden mit der Software "AIDA", der Begleitsoftware des Phosphorimagers, quantifiziert.



### 3. Ergebnisse

#### Etablierung von Expressionssystemen zur sekretorischen Gewinnung von Extremozymen aus *Anaerobranca gottschalkii* im mesophilen Produktionswirt *Staphylococcus carnosus*

Für die Gewinnung von Enzymen extremophiler Herkunft fehlen bislang überzeugende Expressionssysteme. Die Fermentation extremophiler Mikroorganismen zur Produktion von Extremozymen ist angesichts des großen technischen und finanziellen Aufwandes, der durch die extremen Lebensbedingungen dieser Organismen bedingt ist, kaum sinnvoll. Da für eine lohnende Enzymproduktion jedoch hohe Enzymausbeuten ausschlaggebend sind, ist die Gewinnung von Extremozymen in mesophilen Produktionswirten mit hohen Expressionsleistungen zweckmäßig. Bislang werden für die Produktion von Extremozymen im großen Maßstab generell Expressionssysteme für eine intrazelluläre Expression in mesophilen Bakterienarten wie *E. coli* oder nicht-pathogenen Hefen wie *K. lactis* verwendet. Obwohl die intrazelluläre Enzymproduktion ein weit verbreitetes Verfahren ist, wird ihre Effizienz durch die Tendenz zur Bildung von Inclusion bodies, die eine aufwendige Renaturierung der gewünschten Proteine nötig macht, stark eingeschränkt. Eine sekretorische Produktion von Proteinen mit Gram-positiven Bakterien wie *Staphylococcus carnosus* ist gegenüber der intrazellulären Expression deswegen vorteilhaft, weil eine selektive Anreicherung der Enzyme im Kulturüberstand potentiell in löslicher Form erreicht wird. Darüber hinaus bietet dieses Verfahren den Vorteil, dass eine Abtrennung der Zielproteine von Zellproteinen entfällt. Weil es bislang nur vereinzelte Versuche zur sekretorischen Gewinnung von Enzymen aus extremophilen Mikroorganismen in mesophilen Wirtsorganismen gibt, sollten in dieser Arbeit neue Expressionssysteme für eine sekretorische Enzymproduktion im mesophilen Wirt *S. carnosus* etabliert werden.

Für eine sekretorische Enzymgewinnung können prinzipiell zwei Exportwege genutzt werden. Hierbei handelt es sich zum Einen um den Sec-Weg, der bereits seit langem für die heterologe Proteinproduktion in Gram-positiven Bakterien verwendet wird (s. Kapitel 1.2). Zum Anderen kann auch der erst kürzlich entdeckte Tat-Weg prinzipiell zur Sekretion heterologer Proteine genutzt werden, wie neuere Untersuchungen des Tat-Weges von *E. coli* gezeigt haben (s. Kapitel 1.3.5). Eine biotechnologische Anwendung des Tat-Weges für die heterologe Enzymproduktion in Gram-positiven Bakterien ist bislang jedoch nicht beschrieben. Daher sollte in dieser Arbeit die biotechnologische Anwendbarkeit des Tat-Weges von *S. carnosus* für die sekretorische Produktion der Modellenzyme Branching Enzyme und CGTase aus *A. gottschalkii* evaluiert werden. Das Branching Enzyme wurde als cytosolisches Enzym stellvertretend für die Klasse der intrazellulären Proteine gewählt, die an eine Faltung im extrazellulären Raum nicht adaptiert sind. Die sekretorische CGTase wurde als extrazelluläres Modellprotein gewählt, das als Sec-Substrat durch Wechselwirkung mit exportspezifischen Chaperonen an einer intrazellulären Faltung gehindert wird, und erst außerhalb der Zelle seine native Konformation einnimmt. Bei der Sec-abhängigen Sekretion werden Sec-Substrate in ungefalteter Form über die Plasmamembran transloziert, während im Tat-Weg eine intrazelluläre Faltung der Exportproteine Voraussetzung für deren Translokation ist. Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, inwieweit die natürlichen Faltungstendenzen der beiden Modellproteine die Sekretionseffizienz bei der

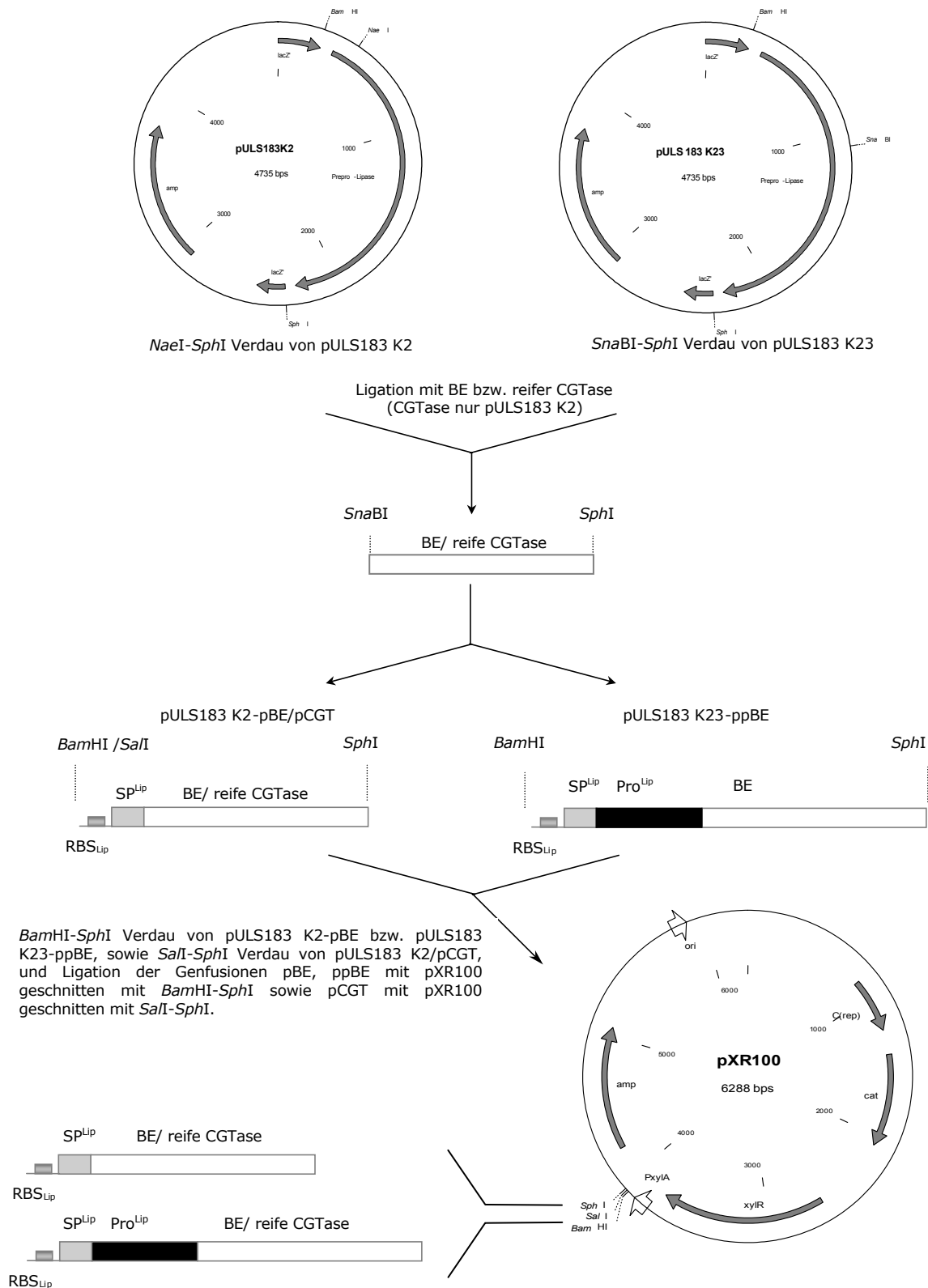
Membrantranslokation über den Sec- bzw. Tat-Weg beeinflussen, indem das Branching Enzyme und die CGTase mit unterschiedlichen Sec- bzw. Tat-Weg spezifischen Signalsequenzen versehen wurden.

### 3.1 Sec-abhängige Sekretion des cytosolischen Modellproteins Branching Enzyme

Für eine Sec-abhängige Sekretion des Branching Enzyme wurde das cytosolische Modellprotein mit der Signalsequenz einer Lipase aus *S. hyicus* bzw. mit dem Prepro-Anteil dieser Lipase fusioniert. Das Propeptid der Lipase ist bereits auf Grund seiner sekretionsbeschleunigenden Wirkung, die sich positiv auf die Proteinausbeuten im Kulturüberstand auswirkt, erfolgreich in der Sekretion von heterologen Proteinen in *S. carnosus* eingesetzt worden (Meens *et al.*, 1997; Samuelson *et al.*, 1999; Dilsen *et al.*, 2000).

#### 3.1.1 Fusion des Branching Enzyme mit dem Sec-Signalpeptid der *S. hyicus* Lipase ("Pre-BE")

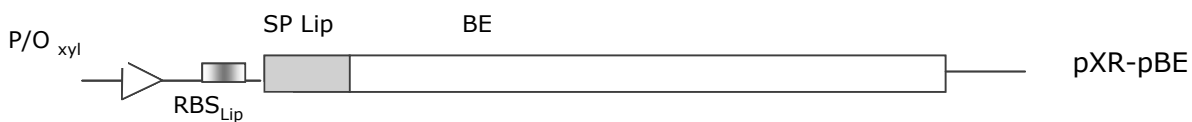
Die Gensequenz für das Strukturgen, das für das Branching Enzyme von *A. gottschalkii* kodiert, sowie chromosomale DNA von *A. gottschalkii* wurden von Dr. C. Bertoldo (Technische Universität Hamburg-Harburg) bereitgestellt. Das Strukturgen wurde zunächst mit den Primern AV 1 und AV 2 in einer PCR von chromosomaler DNA aus *A. gottschalkii* amplifiziert. Das PCR-Fragment, welches das komplette Strukturgen des Branching Enzyme ohne Ribosomenbindungsstelle enthielt, wurde über die Schnittstellen *Sna*BI und *Sph*I in das *Nae*I-*Sph*I geschnittene pUC18-Derivat pULS183 K2 kloniert. Dieses Plasmid enthält das Gen der *S. hyicus* Prepro-Lipase und erlaubt durch eine am Übergang der Signalsequenz zum Propeptid der Lipase befindliche *Nae*I-Schnittstelle eine Fusion der Signalsequenz mit einem fremden Protein, das gegen die Pro-Lipase ausgetauscht wird (s. Abb. 7; Abb. 8). Die Fusion der Lipase-Signalsequenz mit dem Branching Enzyme wurde nach Sequenzierung über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sph*I in den *E. coli*-*S. carnosus* Shuttlevektor pXR100 subkloniert. Im Vektor pXR100 wird die Expression der Genfusionen in *S. carnosus* durch die Xylose-regulierbare Promotor/Operator-Region des *xylA*-Gens von *S. xylosus* gesteuert (Wieland *et al.*, 1995). Nach Transformation des pXR-pBE Plasmids in den *S. carnosus* Wildtyp-Stamm TM300 wurden zunächst Expression und Sekretion des Pre-BE Fusionsproteins untersucht. Das PCR-Fragment des Branching Enzyme Strukturgens wurde außerdem in das *E. coli*-Plasmid pQE82 (Qiagen, Hilden) kloniert, und nach *E. coli* JM109 transformiert. Von diesem pQE82-BE genannten Plasmid wird die Expression des Branching Enzyme ohne Signalsequenz mit IPTG induziert und kann als interner Größenstandard genutzt werden.



**Abb. 7: Klonierungsschema für die Konstruktion der Genfusionen Pre-BE, Pre-CGTase und Prepro-BE.** Erläuterungen siehe Kapitel 3.1 für die Pre-BE Fusion, Kapitel 3.2 für die Prepro-BE Fusion und Kapitel 3.6 für die Pre-CGTase Fusion. Das *E. coli-S. carnosus* Shuttleplasmid pXR100 erlaubt eine Selektion von Transformanten auf Ampicillin-Resistenz in *E. coli* und auf Choramphenicol-Resistenz in *S. carnosus*. In *S. carnosus* wird die Expression der Genfusionen vom Xylose-induzierbaren Promotor/Operator des *xylA* Gens gesteuert.

### 3.1.2 Lokalisierung von Pre-BE Genprodukten in *Staphylococcus carnosus*

Abbildung 10 A zeigt die im Western Blot untersuchten Zellfraktionen von *S. carnosus* (pXR-pBE). Das Fusionsprotein aus der Signalsequenz der *S. hyicus* Lipase und dem Branching Enzyme aus *A. gottschalkii* (p, *precursor*) wird mit einer berechneten Größe von etwa 75 kDa in *S. carnosus* korrekt exprimiert, wie der Vergleich der *S. carnosus* Zellfraktion (Abb. 10 A, Zellfraktion) mit dem in *E. coli* exprimierten reifen Branching Enzyme mit einer berechneten Größe von etwa 69 kDa (m, *mature*) zeigt. Das in der Zellfraktion vorhandene Vorläuferprotein (Proteinmenge einer OD<sub>600</sub> von 0.5 entsprechend aufgetragen) befindet sich im großen Überschuss zu einer Proteinform im Kulturüberstand von *S. carnosus*, die das gleiche Laufverhalten wie das Vorläuferprotein besitzt (Proteinmenge in der Überstandfraktion entspricht einer OD<sub>600</sub> von 1.5). Eine kleinere Proteinform, die dem prozessierten, reifen Branching Enzyme entspricht, ist im Überstand dagegen nicht zu erkennen. Die Anwesenheit des Pre-BE Vorläufers im Überstand, sowie die offensichtliche Abwesenheit von sekretiertem reifen BE außerhalb der Zelle deuten darauf hin, dass es nicht zu einer Sekretion des cytosolischen Modellproteins Branching Enzyme über den Sec-Weg von *S. carnosus* kommt. Stattdessen tritt offensichtlich eine Freisetzung von Vorläuferprotein in den Kulturüberstand vermutlich durch eine partielle Zell-Lyse auf, die durch die Überproduktion des heterologen Proteins verursacht wird. Die Prozessierung eines Vorläuferproteins zur reifen Form ist die Voraussetzung für dessen Sekretion, da eine nicht abgespaltene Signalsequenz zur Membranverankerung eines translozierten Proteins führt (s. Abschnitt 1.2.3.1). Deshalb kann die Anwesenheit von Vorläuferprotein im Kulturüberstand nur durch Zell-Lyse verursacht werden.



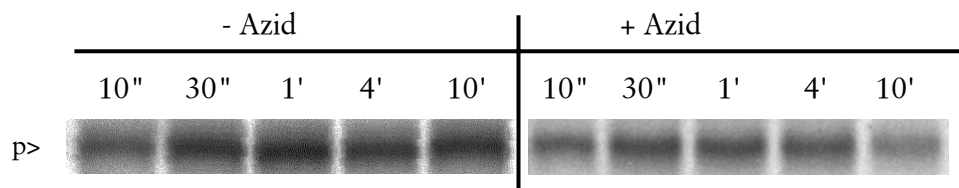
**Abb. 8: Schematische Darstellung der Pre-BE Genfusion.** Gezeigt ist die Promotor/Operator-Region P/O<sub>xyl</sub>, die die Xylose-gesteuerte Expression des Fusionsproteins in *S. carnosus* erlaubt, gefolgt vom 5' untranslatierten Bereich mit Ribosomenbindungsstelle (RBS) der *S. hyicus* Lipase. Die Signalsequenz der Lipase (SP Lip) ist in grau eingezeichnet, das Strukturgen des Branching Enzyme schließt sich daran an.

### 3.1.3 Das Pre-BE Fusionsprotein wird nicht in den Kulturüberstand von *S. carnosus* sekretiert

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass sekretiertes Branching Enzyme doch im Kulturüberstand vorliegt, aber in zu geringen Mengen um mit der Western Blot-Methode detektiert werden zu können, wurde nachfolgend im Pulse Chase-Experiment untersucht, ob eine Prozessierung, also Abspaltung der Signalsequenz des Pre-BE Vorläufers, stattfindet. Durch die Markierung aller neusynthetisierten Proteine mit <sup>35</sup>S-Methionin für einen bestimmten Zeitraum (Pulse) kann die Überführung der Vorläuferform in die reife Form sekretorischer Proteine in bestimmten Zeitabständen nach Abschluss der Markierung (Chase) beobachtet werden (s. Kapitel 2.5.8). Sec-abhängige Vorläuferproteine werden gewöhnlich sehr schnell prozessiert, und liegen meist schon nach wenigen Sekunden im reifen, über die Membran translozierten Zustand vor. Diese Prozessierung kann durch Zugabe von Azid blockiert werden, da Azid die ATPase SecA in ihrem Zyklus der



Membraninsertion- und deinsertion hemmt. Hierbei kommt es zu einer Akkumulation der Vorläuferform von Exportproteinen.

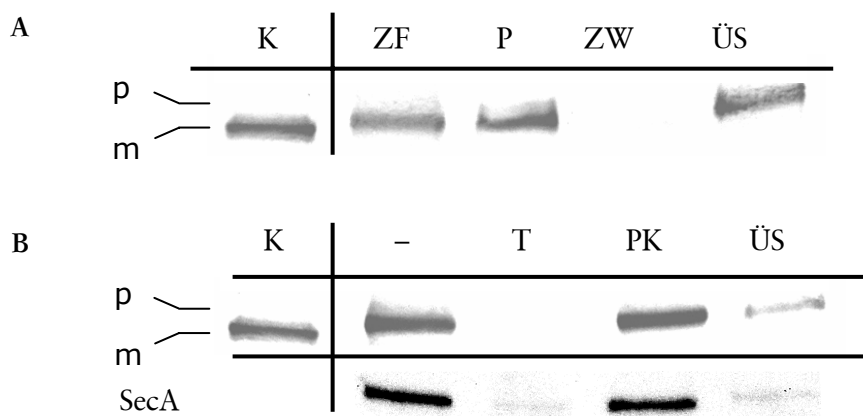


**Abb. 9: Prozessierungskinetik des Pre-BE Vorläuferproteins in *S. carnosus* (pXR-pBE) in An- oder Abwesenheit des SecA-Inhibitors Azid.** Der Stamm wurde in einem Pulse Chase-Experiment mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin für 1 Minute markiert und Proben wurden 10'', 30'', 1', 4' und 10' nach Zugabe der Chase-Lösung genommen. Azid wurde in einer Konzentration von 20 mM 5' vor der Markierung zugegeben. Die Immunfällung wurde mit einem gegen das Branching Enzyme gerichteten Antiserum durchgeführt, die isolierten Proteine in einem 10 %-PA-SDS-Gel aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte mit der Software AIDA (s. Abschnitt 2.5.8.1.4). p, Pre-BE Vorläufer.

Abbildung 9 zeigt die Prozessierungskinetik des Pre-BE Vorläuferproteins in *S. carnosus*. Es ist deutlich zu erkennen, dass über den gesamten Beobachtungszeitraum von 10 Minuten keine Prozessierung des Pre-BE Vorläuferproteins zum reifen BE stattfindet, da selbst nach 10 Minuten noch 100 % des Vorläufers vorhanden sind und eine Überführung des Vorläufers in die reife, und damit über die Membran translozierte Form des Proteins nicht nachweisbar ist. Bei Azidzugabe wird das identische Ergebnis, d.h. eine Akkumulation der Pre-BE Vorläuferform, wie in Abwesenheit von Azid erhalten. Die Prozessierungskinetik bestätigt, dass es nicht zu einer Sekretion des cytosolischen Modellproteins Branching Enzyme über den Sec-Weg kommt und zeigt, dass die Lipase-Signalsequenz alleine nicht in der Lage ist, eine Sec-abhängige Sekretion des Branching Enzyme in *S. carnosus* zu vermitteln.

Für die ausbleibende Prozessierung des Pre-BE Vorläufers gibt es zwei mögliche Ursachen. Zum Einen ist es denkbar, dass der Vorläufer auf Grund von unproduktiven Wechselwirkungen mit Komponenten der Sec-Translokase nicht in die Translokase eingeschleust wird, was eine intrazelluläre Akkumulation des Proteins zur Folge hätte. Andererseits ist es möglich, dass eine Einleitung des Pre-BE Vorläuferproteins in den Sec-Weg zwar stattfindet, aber eine Abspaltung der Signalsequenz des Vorläufers nicht erfolgen kann. Dies wäre der Fall, wenn die Signalpeptidase-Schnittstelle der Signalsequenz der Signalpeptidase nicht optimal zugänglich ist, und würde zu einer Membranverankerung des Vorläufers über dessen Signalsequenz führen. Dabei wäre der BE-Anteil des Vorläuferproteins auf der *trans*-Seite der Membran exponiert und damit extracytosolisch lokalisiert. Nachfolgend Experimente wurden deshalb zur eindeutigen Lokalisierung des zellassozierten Pre-BE Vorläuferproteins durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine Trennung des Zellextraktes in Protoplasten und Zellwandkompartiment durchgeführt. Mit dieser Fraktionierung kann gezeigt werden, inwieweit zellassozierte Proteine mit den Protoplasten assoziiert sind oder aber sich im Zellwandbereich befinden, und damit extracytosolisch vorliegen. Daraus kann weiterhin geschlossen werden, ob die Zellwand den Austritt translozierter Proteine in den Kulturüberstand behindert und zu deren Anreicherung im

Zellwandkompartiment führt. Durch eine zusätzliche Proteinase K-Behandlung der Protoplasten lässt sich darüber hinaus zeigen, ob die mit den Protoplasten assoziierten Proteine intrazellulär vorliegen (und damit vor Verdau durch Proteinase K geschützt sind) oder ob sie sich auf der *trans*-Seite der Plasmamembran befinden und damit durch Proteinase K verdaut werden können. Durch einen Aufschluss der Protoplasten mit Triton X-100 und anschließendem Proteinase K-Verdau wird gezeigt, ob das Protein prinzipiell durch die Protease abgebaut werden kann, wenn es nicht durch die Plasmamembran geschützt ist. Die Lokalisierungsexperimente geben also darüber Auskunft, warum das Pre-BE Vorläuferprotein nicht sekretiert wird: entweder weil es nicht in den Exportweg eingeschleust wird (kein Verdau durch Proteinase K, da durch Plasmamembran geschützt) oder weil es nach erfolgter Membrantranslokation in der Membran verankert wird (Verdau durch Proteinase K).



**Abb. 10: A. Zellfraktionierung von *S. carnosus* (pXR-pBE) zur Lokalisierung des Pre-BE Vorläuferproteins.** Die Trennung des Zellextraktes in die Protoplastenfraction und das Zellwandkompartiment sowie die Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen ist in Kapitel 2.5.2.4 beschrieben. Die im Zellextrakt (ZF), der Protoplastenfraction (P) und dem Zellwandkompartiment (ZW) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 0.5, die Proteinmenge im Überstand (ÜS) 1 ml Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 1.5. Als Größenstandard (Kontrolle, K) diente das in *E. coli* exprimierte Branching Enzyme ohne Signalsequenz. Die Proben wurden nach ihrer Auftrennung in einem 10 % PA-SDS-Gel im Western Blot mit BE-Antiserum sichtbar gemacht. **B. Lokalisierung des Pre-BE Vorläuferproteins durch Proteinase K-Behandlung von *S. carnosus* (pXR-pBE) Protoplasten.** Der Stamm wurde wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben protoplastiert, jedoch ohne danach eine Trennung der Protoplasten- und Zellwandfraktionen vorzunehmen, und anschließend für 20 Minuten in Gegenwart von 50 µg/ml Proteinase K auf Eis inkubiert (PK). Der Aufschluss der Protoplasten zum Verdau intrazellulär lokalisierter Proteine (T) erfolgte durch Zugabe von Triton X-100 in einer Endkonzentration von 5 %, bevor Proteinase K zugesetzt wurde. (-), ohne Proteinase K bzw. Triton X-100 behandelte Probe. Aufarbeitung und Nachweis der Proben erfolgten wie unter A beschrieben. Die für die mit (PK) bzw. ohne (-) Proteinase K behandelten Protoplasten, sowie für die vor Proteinase K-Verdau durch Triton X-100 aufgeschlossenen Protoplasten (T) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 0.5, die Proteinmenge im Überstand (ÜS) einer  $OD_{600}$  von 1.5. Die Qualität der Protoplastierung sowie die Wirkung der Proteinase K wurden anhand des cytoplasmatischen Kontrollproteins SecA überprüft. p, Pre-BE Vorläufer; m, reifes Branching Enzyme.

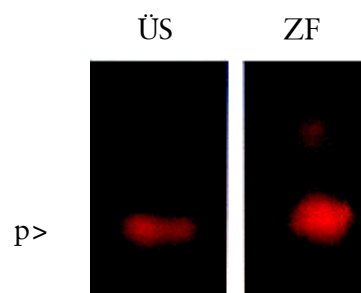
In Abbildung 10 A ist die Fraktionierung des Zellextraktes in Protoplasten und Zellwandkompartiment dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass der zellassozierte Pre-BE Vorläufer in der Protoplastenfraction vorliegt, während im Zellwandkompartiment offenbar kein Protein vorhanden ist. Durch die Proteinase K-Behandlung (Abb. 10 B) der protoplastierten Zellen bestätigt sich, dass der Vorläufer intrazellulär vorliegt, da im Vergleich zur unbehandelten Probe die Zugabe von Proteinase K zu keinem erkennbaren Abbau des mit den Protoplasten assoziierten Vorläuferproteins führt. Dieser ist daher durch die Plasmamembran vor dem Abbau durch Proteinase K geschützt. Anhand des cytoplasmatischen Kontrollproteins SecA lässt sich zeigen, dass die hergestellten Protoplasten intakt sind, da die SecA-Menge sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Proteinase K gleich ist und SecA erst nach Aufschluss der Protoplasten durch Zugabe von Triton X-100 verdaut wird. Die Verteilung des SecA-Proteins in den einzelnen Fraktionen macht ebenfalls deutlich, dass es unter den Bedingungen fortdauernder Überexpression des Pre-BE Proteins in der Tat zu einer partiellen Zell-Lyse *S. carnosus* (pXR-pBE) kommt, da neben dem Vorläuferprotein auch eine signifikante Menge von SecA in den Kulturüberstand freigesetzt wird. Zusammen mit den Ergebnissen des Pulse Chase-Experimentes zeigt die Lokalisierung des Pre-BE Vorläufers, dass das Protein nicht sekretiert wird und stattdessen intrazellulär akkumuliert. Die Lipase-Signalsequenz alleine kann daher das cytosolische Branching Enzyme nicht in den Sec-Weg einschleusen.

#### 3.1.4 Das Pre-BE Fusionsprotein akkumuliert intrazellulär in aktiver Form

In den vorangegangenen Western Blot-Experimenten wurde gezeigt, dass eine Sec-abhängige Sekretion des Branching Enzyme in *S. carnosus* nicht stattfindet. Abschließend wurde untersucht, in welchem Faltungszustand sich das Pre-BE Vorläuferprotein befindet. Hierzu wurde ein Aktivitätsnachweis des Branching Enzyme mittels nativer PAGE durchgeführt, der den Abbau von Stärke durch das Branching Enzyme mit Hilfe der Jodstärke-Reaktion zeigt. Die Jodstärke-Reaktion nutzt die Blaufärbung von Amylose durch Jod aus, die durch die Einlagerung der Jodmoleküle in die Amylose-Helices hervorgerufen wird, um den Abbau von Amylose nachzuweisen. Sowohl der Abbau von Amylose als auch deren Umsetzung zu Dextrinen erzeugt charakteristisch gefärbte Komplexe mit Jod. Die vom Branching Enzyme durch Hydrolyse und anschließende intra- bzw. intermolekulare Transglycosylierung (s. Kapitel 1.1.3) katalysierte Umsetzung von Amylose zu Amylopektin führt zu einem rot gefärbten Komplex mit Jod. Obwohl diese Methode rein qualitativ ist, stellt sie eine ausgesprochen sensitive Methode zum Nachweis der Verteilung aktiver Proteinspezies in den einzelnen Zellfraktionen dar. Abbildung 11 zeigt, dass im Zellextrakt von *S. carnosus* (pXR-pBE) tatsächlich aktives Branching Enzyme nachweisbar ist, das an Hand der vorangegangenen Experimente sehr wahrscheinlich der Vorläuferform Pre-BE entspricht. Auch im Kulturüberstand ist eine aktive Proteinform mit dem gleichen Laufverhalten erkennbar. Die intrazelluläre Faltung dieses Vorläuferproteins in eine aktive Konformation kann einerseits eine Folge der ausbleibenden Sekretion sein. Andererseits ist es denkbar, dass das Pre-BE Fusionsprotein auf Grund einer zu starken Faltungstendenz des Branching Enzyme-Anteils in eine exportinkompetente Form faltet, und durch ein sog. *kinetic partitioning* (s. Abschnitt 1.2.1.2; Diamond und Randall, 1997; Topping und Randall, 1997) aus dem Sec-Exportweg ausscheidet. Durch eine partielle Zell-Lyse

kommt es zum Austritt des aktiven Vorläuferproteins in den Kulturüberstand. Dieses Ergebnis deckt sich somit mit den Befunden der Western Blot-Untersuchungen (s. Abb. 10).

Die Menge des aktiven Pre-BE Proteins im Kulturüberstand sowie im Zellextrakt wurde nachfolgend mit Hilfe des photometrischen Aktivitätstests wie in Kapitel 2.5.7 beschrieben gemessen. Die Definition einer Einheit BE-Enzymaktivität ist als eine 1 %ige Abnahme der Extinktion pro Minute bei 660 nm vorgegeben (Takata *et al.*, 1993). Obwohl eine Sec-abhängige Sekretion des cytosolischen Branching Enzyme nicht stattfindet, zeigten die Messungen, dass es durch die Zell-Lyse zu einer Anreicherung des aktiven Vorläufers im Kulturüberstand mit einer Ausbeute von 2 U/ml/OD<sub>600</sub> kommt. Die im Zellextrakt gemessene Enzymaktivität von 10 U/ml/OD<sub>600</sub> bestätigt die Ergebnisse des in Abbildung 10 gezeigten Western Blot, nach denen ein großer Überschuss des Vorläuferproteins in der Zelle akkumuliert.



**Abb. 11: Aktivitätsnachweis des Pre-BE Genprodukte in *S. carnosus* (pXR-pBE) mittels nativer PAGE und Jodstärkereaktion.** Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen ist in Kapitel 2.5.6 beschrieben. Zellextrakt (ZF) und Überstandsfraktion (ÜS) wurden im nativen Zustand in einem nicht-denaturierenden 4-20 % PA-Gradientengel aufgetrennt und das Gel anschließend in einer 1 %igen Stärkelösung inkubiert. Durch aktive Branching Enzyme-Formen abgebaute Stärke wurde durch Anfärben des Gels mit Lugolscher Jodlösung sichtbar gemacht. Die in der Zellfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.1 und die Proteinmenge im Kulturüberstand 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1.

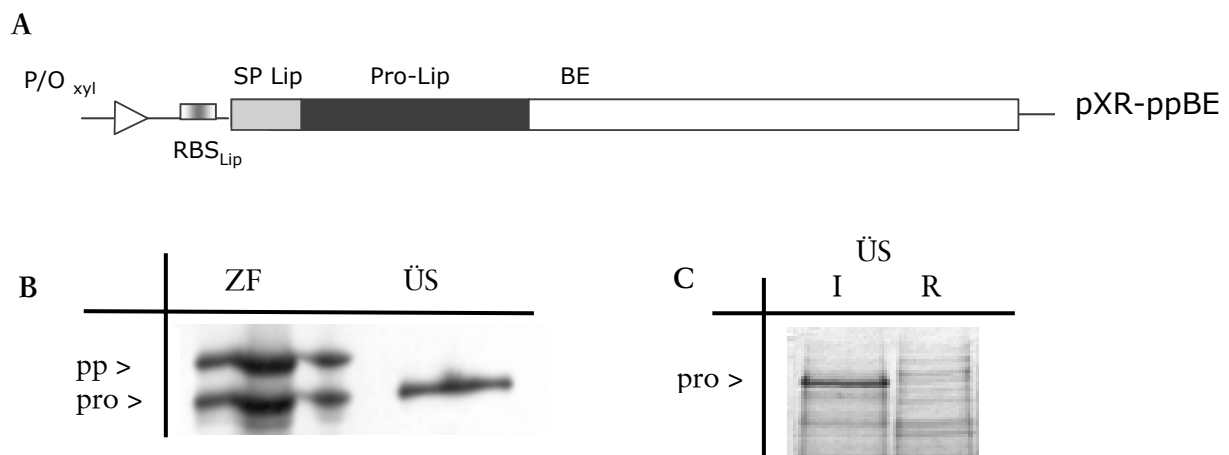
### 3.2 Fusion des Branching Enzyme mit dem Sec-Signalpeptid und Propeptid der *S. hyicus* Lipase ("Prepro-BE")

Da im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde, dass eine Sekretion des cytosolischen Modellproteins Branching Enzyme mit dem Sec-Signalpeptid der Lipase allein nicht erreicht werden kann, wurde nachfolgend untersucht, ob die Lipase-Signalsequenz zusammen mit ihrem dazugehörigen Propeptid eine Sekretion des Branching Enzyme vermitteln kann. Hierzu wurde das Branching Enzyme mit dem Prepro-Anteil der *S. hyicus* Lipase fusioniert. Das Propeptid der *S. hyicus* Lipase ist bislang vielfach erfolgreich in der Sekretion und im "Surface display" von heterologen Proteinen in *S. carnosus* eingesetzt worden (Demleitner und Götz, 1994; Samuelson *et al.*, 1995; Meens *et al.*, 1997; Samuelson *et al.*, 1999; Sturmfels *et al.*, 2001). Das Propeptid hat eine sekretionsbeschleunigende Wirkung, die die Aufenthaltszeit der heterologen Proteine im Zellwandbereich dramatisch verkürzt und damit die Wahrscheinlichkeit des proteolytischen Abbaus durch zellwandassoziierte Proteasen verringert, was zu erhöhten Ausbeuten der Proteine im Kulturüberstand führt.

Das mit den Primern AV 1 und AV 2 amplifizierte PCR-Fragment, welches das komplette Branching Enzyme Strukturgen ohne Ribosomenbindungsstelle enthält (s. Kapitel 3.1), wurde über die Schnittstellen *Sna*BI und *Sph*I in das pUC18-Derivat pULS183 K23 kloniert (s. Abb. 7). Dieses Plasmid enthält das Gen der *S. hyicus* Prepro-Lipase und erlaubt durch eine am Übergang des Propeptids zum reifen Teil der Lipase befindliche *Sna*BI Schnittstelle die *in-frame* Fusion des Prepro-Anteils der Lipase mit einem fremden Gen, das hier gegen die reife Lipase ausgetauscht wird (s. Abb. 12 A). Die Fusion des Branching Enzyme mit dem Prepro-Teil der Lipase wurde über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sph*I in den Vektor pXR100 kloniert. Nach Transformation dieses pXR-ppBE genannten Plasmids in *S. carnosus* Wildtyp wurden zunächst Expression und Sekretion des pp-BE Fusionsproteins in *S. carnosus* untersucht.

### 3.2.1 Lokalisierung von Prepro-BE Genprodukten in *S. carnosus*

Abbildung 12 B zeigt die im Western Blot untersuchten Zellfraktionen von *S. carnosus* (pXR-ppBE). Die zusätzliche Anwesenheit des Propeptides der *S. hyicus* Lipase mit einer Größe von etwa 25 kDa führt zu einem Fusionsprotein von ca. 95 kDa, das korrekt exprimiert im Zellextrakt dieses *S. carnosus* Stammes vorliegt (Abb. 13 B). Es ist deutlich zu erkennen, dass es zur Sekretion großer Mengen des Pro-BE Hybridproteins in den Kulturüberstand von *S. carnosus* kommt. Die Anfärbung der Proteinbanden mit Coomassie Blau zeigt, dass das Pro-BE Hybridprotein die dominante Bande der im Überstand befindlichen Proteine darstellt (s. Abb. 12 C). Das Propeptid wird in *S. carnosus* nach Sekretion in den Kulturüberstand vom nachfolgenden reifen Teil nicht proteolytisch abgespalten, da die in *S. hyicus* dafür verantwortliche lösliche Protease im Überstand von *S. carnosus* fehlt. Somit bleibt nach der Sekretion ein aus Propeptid und Branching Enzyme bestehendes Fusionsprotein mit einem berechneten Molekulargewicht von ca. 90 kDa bestehen.



**Abb. 12:** A. Schematische Darstellung der Genfusion Prepro-BE. Gezeigt ist die Promotor/Operator-Region P/O<sub>xyI</sub>, die die Xylose-gesteuerte Expression des Fusionsproteins in *S. carnosus* erlaubt, gefolgt vom 5' untranslatierten Bereich mit Ribosomenbindungsstelle der *S. hyicus* Lipase. Die Signalsequenz der Lipase (SP Lip) ist in grau eingezeichnet, das Lipase Propeptid in schwarz. Das Strukturgen des Branching Enzyme schließt sich daran an. B. Untersuchung der Proteinverteilung der Prepro-BE Genprodukte in *S. carnosus* (pXR-ppBE) mittels Western Blot. Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen ist in Kapitel 2.5.2.2 und 2.5.2.3 beschrieben. Die Proben wurden nach ihrer Auftrennung in einem 10 % PA-SDS-Gel im Western Blot

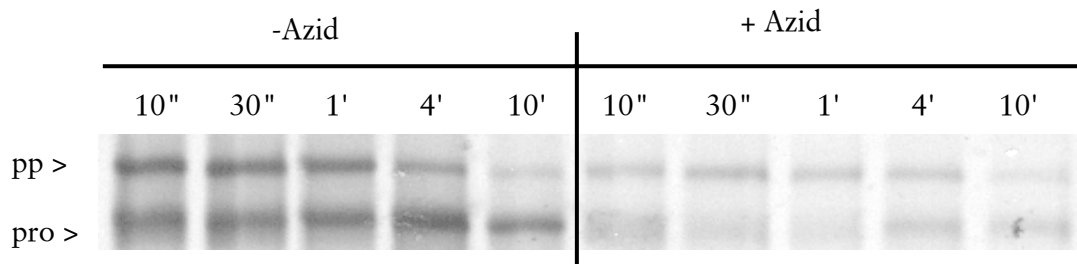
mit BE-Antiserum sichtbar gemacht. Die in der Zellfraktion (ZF) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.2, die Proteinmenge im Kulturüberstand (ÜS) 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.2. pp, Prepro-BE Vorläufer; pro, Pro-BE. **C. Untersuchung der Proteinverteilung der Prepro-BE Genprodukte in *S. carnosus* (pXR-ppBE) durch Anfärben mit Coomassie Blau.** Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen ist in Kapitel 2.5.2.2 und 2.5.2.3 beschrieben. Der Nachweis erfolgte durch Anfärben eines 10 %-PA-SDS Gels mit Coomassie Brilliant Blue (Sigma) nach dem Gellauf. Die im Kulturüberstand aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1.5. pp, Prepro-BE Vorläufer; pro, Pro-BE. I, Proben aus einer Kultur mit Xylose-induzierter Expression; R, Proben aus einer Kultur mit Glucose-reprimierter Expression.

Im Zellextrakt sind sowohl die Vorläuferform Prepro-BE als auch das reife Pro-BE in vergleichbaren Mengen nachweisbar, wobei die Menge des reifen Proteins in Zellextrakt und Kulturüberstand etwa gleich ist. Die Tatsache, dass sowohl das Vorläuferprotein als auch die reife Form im Zellextrakt akkumulieren, legt nahe, dass im Sekretionsablauf des Prepro-BE Hybridproteins Faktoren limitierend auf die Sekretion wirken. Für eine Akkumulation des Vorläufers könnten eine Sättigung der Sec-Translokase oder aber eine Sättigung der exportspezifischen Chaperone durch die große Menge des synthetisierten Vorläufers verantwortlich sein.

### **3.2.2 Die Anwesenheit des Propeptids erlaubt eine effiziente Membrantranslokation des Prepro-BE Fusionsproteins**

Um die Parameter zu bestimmen, die den Export des Prepro-BE Proteins beeinflussen, wurde zunächst die Prozessierungskinetik des Prepro-BE Proteins im Pulse Chase-Experiment untersucht. Wie in Abbildung 13 deutlich zu erkennen ist, findet eine sehr schnelle und effiziente Membrantranslokation des Hybridproteins statt, da eine Prozessierung des Vorläufers bereits innerhalb von 10 Sekunden nach Zugabe der Chase-Lösung nachweisbar ist und innerhalb des Beobachtungszeitraums von 10 Minuten nahezu vollständig abgeschlossen ist. Bereits nach 10 Sekunden ist mit 57 % mehr reifes, prozessiertes Pro-BE als Vorläuferprotein vorhanden, und nach 10 Minuten sind nur noch 1.5 % des Vorläufers vorhanden. Dies ist für Sec-abhängige Proteine eine typische Prozessierungskinetik. Im Vergleich dazu ist die Prozessierungskinetik in Anwesenheit von Azid beeinträchtigt und die Prozessierung wird stark verzögert. Während in Abwesenheit von Azid nach vier Minuten bereits 85 % des Vorläufers in die reife Form ungewandelt sind, werden in Gegenwart von Azid nur etwa 40 % des Vorläuferproteins prozessiert. Dies zeigt, dass es sich hierbei in der Tat um einen Sec-abhängigen Export handelt. Die Kinetik beweist darüber hinaus, dass die Membrantranslokation sehr effizient verläuft und damit offensichtlich nicht den für die Akkumulation des Vorläufers in der Zelle verantwortlichen limitierenden Parameter darstellt. Eine Akkumulation des reifen Pro-BE Proteins im Zellextrakt könnte dagegen je nach Lokalisierung unterschiedliche Gründe haben. Vor dem Hintergrund der sehr effizienten Membrantranslokation wäre es möglich, dass es zu einer Akkumulation des Pro-BE Proteins in der Zellhülle kommt, obwohl das Propeptid eine Beschleunigung der Zellwandpassage des Hybridproteins bewirken soll. Andererseits könnte es zu einer intrazellulären Akkumulation des Pro-BE Proteins kommen, wenn die große Menge des Vorläuferproteins die Menge der exportspezifischen Chaperone des Sec-Weges überschreitet. Die Signalsequenz des intrazellulär akkumulierten Vorläuferproteins könnte somit durch cytosolische Proteasen unspezifisch abgespalten werden. Dabei ist allerdings zu beachten, dass eine unspezifische Abspaltung der

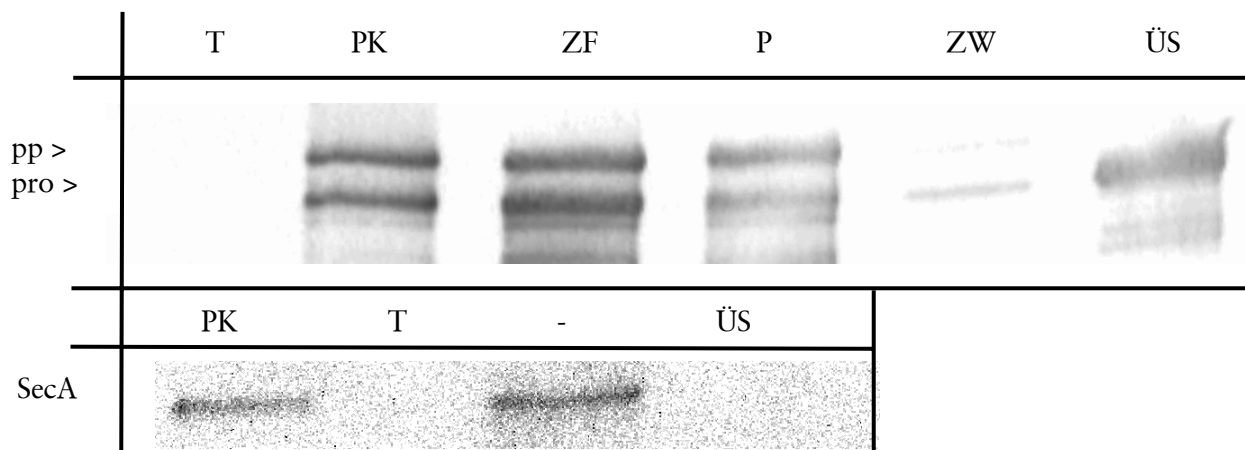
Signalsequenz durch cytosolische Proteasen auch der Grund für die intrazelluläre Akkumulation des Pro-BE Fusionsproteins sein könnte.



**Abb. 13: Prozessierungskinetik des Prepro-BE Vorläuferproteins in *S. carnosus* (pXR-ppBE) in An- oder Abwesenheit des SecA-Inhibitors Azid.** *S. carnosus* (pXR-ppBE) wurde in einem Pulse Chase-Experiment mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin für 1 Minute markiert und Proben wurden 10'', 30'', 1', 4' und 10' nach Zugabe der Chase-Lösung genommen. Azid wurde in einer Konzentration von 20 mM 5' vor der Markierung zugegeben. Die Immunfällung wurde mit BE-Antiserum durchgeführt und die isolierten Proteine in einem 10% PA-SDS-Gel aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte mit der Software AIDA (s. Abschnitt 2.5.8.1.4). pp, Prepro-BE Vorläufer; pro, Pro-BE.

### 3.2.3 Die Überexpression des Prepro-BE Fusionsproteins führt zu einer Sättigung der Sec-Translokase

Nachfolgend wurden Lokalisierungs-Experimente durchgeführt, um zu untersuchen, welche Faktoren für die Sekretion des Prepro-BE Fusionsproteins limitierend sind. Zunächst wurde eine Trennung des Zellextraktes in Protoplasten und Zellwandkompartiment durchgeführt, um eine Lokalisierung der zellassoziierten Proteinformen vornehmen zu können. Die in Abbildung 14 gezeigte Fraktionierung belegt, dass der zellassoziierte Vorläufer Prepro-BE (pp) sowie die Pro-BE (pro) Form des Proteins fast ausschließlich in der Protoplastenfraction zu finden sind, während im Zellwandkompartiment nur eine sehr geringe Menge des Pro-BE Fusionsproteins vorliegt. Diese Fraktionierung beweist, dass hauptsächlich Ereignisse vor der Membrantranslokation die Sekretion beeinträchtigen. Sie zeigt außerdem, dass die Zellwand tatsächlich keine Barriere für die Sekretion des Pro-BE Proteins darstellt, da eine nur sehr geringe Menge dieses Proteins im Zellwandkompartiment nachweisbar ist. Die Beobachtung, dass hauptsächlich frühe Schritte im Sekretionsverlauf die Effizienz der Sekretion limitieren, wird auch durch die Proteinase K-Behandlung protoplastierter Zellen gestützt (Abb. 14). So führt die Zugabe von Proteinase K im Vergleich zur unbehandelten Probe zu keinem signifikanten Abbau der mit den Protoplasten assoziierten Proteinformen, die demnach durch die Anwesenheit der Plasmamembran geschützt sind und intrazellulär vorliegen. Da weder die Membrantranslokation noch die Zellwand die Effizienz der Sekretion des Prepro-BE Proteins behindern, aber eine signifikante Menge des Pro-BE Proteins intrazellulär vorliegt, beweist dieser Befund, dass es zu früheren Zeitpunkten im Sekretionsverlauf, d.h. vor der eigentlichen Membrantranslokation, zu Engpässen kommt, die zur Akkumulation und zur unspezifischen Proteolyse des Proteins führen. Wahrscheinlich kommt es zu einer Sättigung der exportspezifischen Chaperone durch die Menge des Vorläufers, so dass es zu einem *kinetic partitioning* (s. Kapitel 1.2.1.2) eines signifikanten Teils des Proteins aus dem Sekretionsweg heraus kommt.



**Abb. 14: Zellfraktionierung von *S. carnosus* (pXR-ppBE) sowie Proteinase K-Behandlung von *S. carnosus* (pXR-ppBE) Protoplasten zur Lokalisierung der Prepro-BE Genprodukte.** Die Trennung des Zellextraktes (ZF) in die Protoplastenfraction (P) und das Zellwandkompartiment (ZW) sowie die Aufarbeitung der Proben ist in Kapitel 2.5.2.4 beschrieben. Die in allen Fraktionen, auch dem Kulturüberstand (ÜS), aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 0.5. Zur Proteinase K-Behandlung wurden die Zellen wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben protoplastiert, jedoch ohne danach eine Trennung der Protoplasten- und Zellwandfraktionen vorzunehmen, und anschließend für 20 Minuten in Gegenwart von 50  $\mu\text{g/ml}$  Proteinase K auf Eis inkubiert (PK). Der Aufschluss der Protoplasten (T) zum Verdau intrazellulär lokalisierter Proteine erfolgte durch Zugabe von Triton X-100 in einer Endkonzentration von 5 %, bevor Proteinase K zugesetzt wurde. (-), ohne Proteinase K oder Triton X-100 behandelte Probe. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie in Kapitel 2.5.2.4. Die für die mit (PK) bzw. ohne (-) Proteinase K behandelten Protoplasten, sowie für die vor Proteinase K-Verdau durch Triton X-100 aufgeschlossenen Protoplasten (T) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 0.5, die Proteinmenge im Überstand (ÜS) einer  $OD_{600}$  von 1.5. Die Proben wurden nach ihrer Auftrennung in einem 10 % PA-SDS-Gel im Western Blot mit BE-Antiserum sichtbar gemacht. Die Qualität der Protoplastierung sowie die Wirkung der Proteinase K wurden anhand des cytoplasmatischen Kontrollproteins SecA überprüft. pp, Prepro-BE Vorläufer; pro, Pro-BE.

### 3.2.4 Das Propeptid der Lipase interferiert mit der korrekten Faltung des Branching Enzyme

Aktivitätsmessungen und native PAGE Untersuchungen wurden durchgeführt, um festzustellen, ob das sekretierte Pro-BE im Überstand von *S. carnosus* in einer aktiven Konformation vorliegt und wie hoch die Ausbeute an aktivem Enzym ist. Es zeigte sich jedoch mit beiden Methoden, dass das Fusionsprotein keinerlei enzymatische Aktivität besitzt. Offenbar interferiert die Anwesenheit des Propeptids am N-terminalen Ende des Branching Enzyme mit dessen korrekter Faltung. Damit kann trotz der hohen Sekretionseffizienz dieses Sekretionssystems kein aktives Branching Enzyme mit Hilfe des Prepro-Anteils der *S. hyicus* Lipase in *S. carnosus* gewonnen werden.



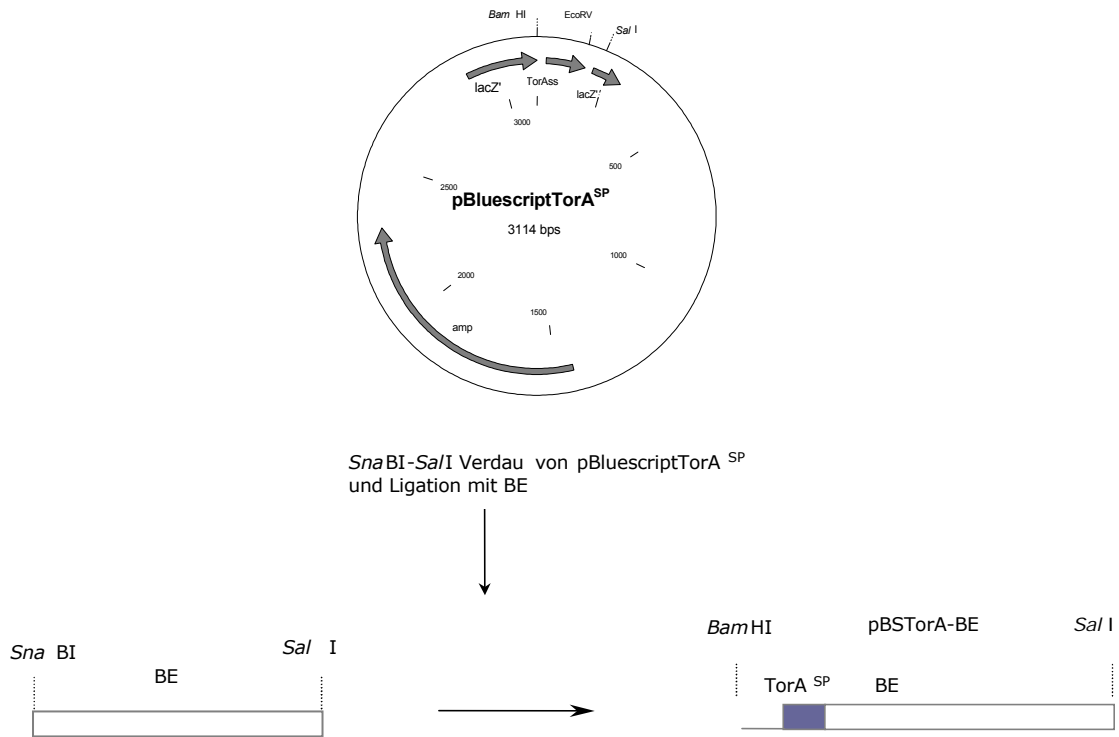
### 3.3 Tat-abhängige Sekretion des cytosolischen Modellproteins Branching Enzyme

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass eine Sec-abhängige Sekretion für die Gewinnung des Branching Enzyme nicht zweckmäßig ist, weil das Fusionsprotein aus Lipase-Signalsequenz und Branching Enzyme intrazellulär akkumuliert und das sekretierte Pro-BE Hybridprotein enzymatisch inaktiv ist. Daher wurde alternativ dazu untersucht, ob eine Tat-abhängige Sekretion des cytosolischen Modellproteins in *S. carnosus* möglich ist. Zu Beginn der Arbeiten war nicht bekannt, ob *S. carnosus* überhaupt einen Tat-Weg besitzt, und wenn ja, ob dieser funktionell sein würde. Da authentische *S. carnosus* Tat-Substrate ebenfalls unbekannt waren, wurde das Branching Enzyme zur Einschleusung in einen möglichen Tat-Weg von *S. carnosus* mit der Signalsequenz der *E. coli* TMAO-Reduktase (TorA) fusioniert. Für diese Signalsequenz wurde bereits gezeigt, dass sie sowohl mit heterologen Tat-Apparaten wechselwirkt, als auch den Export von verschiedenen Fremdproteinen vermittelt (Schaerlaekens *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001; DeLisa *et al.*, 2003).

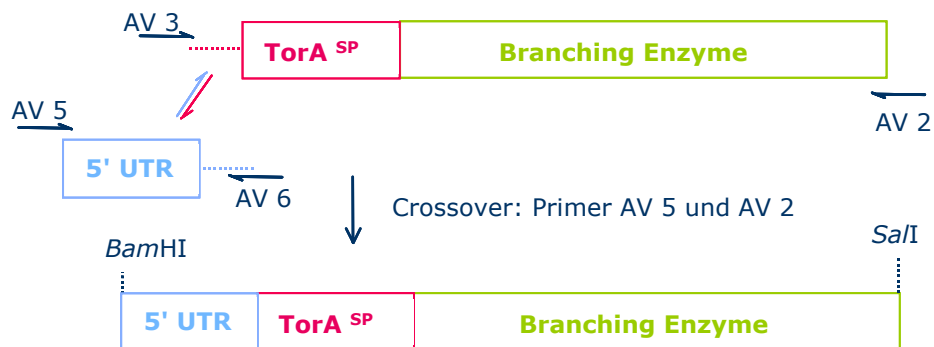
#### 3.3.1 Fusion des Branching Enzyme mit dem Tat-Signalpeptid der *E. coli* TMAO-Reduktase ("TorA-BE")

Zur Fusion des cytosolischen Branching Enzyme mit der Signalsequenz des *E. coli* Tat-Substrates TorA (TorA<sup>SP</sup>) wurde das Strukturgen des Branching Enzyme mit den Primern AV 1 und AV 2 ausgehend von chromosomaler DNA aus *A. gottschalkii* amplifiziert und über die Schnittstellen *Sna*BI und *Sal*I in das *Eco*RV und *Sal*I geschnittene Plasmid pBluescriptTorA<sup>SP</sup> kloniert (s. Abb. 15). Die daraus resultierende Fusion TorA-BE wurde anschließend in einer Crossover PCR mit dem 5' untranslatierten Bereich der *S. hyicus* Lipase, inklusive der Ribosomenbindungsstelle, fusioniert (s. Abb. 15) und nach *Bam*HI-*Sal*I-Verdau in den Vektor pXR100 kloniert (s. Abb. 7). Nach Transformation des pXR-TorA-BE Plasmids in *S. carnosus* Wildtyp wurden zunächst Expression und Sekretion des TorA-BE Proteins untersucht.

A



B



**Abb. 15: A. Klonierungsschema für die Konstruktion der TorA-BE Genfusion.** Das für das Branching Enzyme (BE) kodierende Strukturgen wurde mit den Primern AV 1 und AV 2 ausgehend von *A. gottschalkii* chromosomaler DNA amplifiziert und *Sna*BI-*Sal*I verdaut. Zur Fusion des BE-Strukturgens mit dem für die TorA-Signalsequenz kodierenden Genabschnitt wurde das Plasmid pBluescriptTorA<sup>SP</sup> *Bam*HI-*Eco*RV verdaut und mit dem *Sna*BI-*Sal*I geschnittenen BE-Fragment ligiert. **B. Reaktionsschema für die mittels Crossover PCR konstruierte Genfusion TorA-BE.** Nach Klonierung des Branching Enzyme Strukturgens in das Plasmid pBluescriptTorA<sup>SP</sup> wie in A beschrieben wurde die TorA-BE Genfusion in einer PCR über die Primer AV 3 und AV 2 mit einem 5' Überhang versehen, der zum 3' Ende des 5' untranslatierten Bereichs (5' UTR) der *S. hyicus* Lipase komplementär ist. Weiterhin wurde dieser untranslatierte Bereich mit den Primern AV 5 und AV 6 von Plasmid pULS183 K2 so amplifiziert, dass er am 3' Ende einen zum Anfang des TorA Signalpeptids komplementären Überhang enthielt. In einer sog. Crossover PCR wurden die beiden PCR-Fragmente mit den Primern AV 5 und AV 2 über ihre komplementären Überhänge miteinander fusioniert. Anschließend wurde die Fusion über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in das Plasmid pXR100 kloniert und nach Sequenzierung in den *S. carnosus* Wildtyp transformiert (s. Abb. 7).

### 3.3.2 Lokalisierung von TorA-BE Genprodukten in *S. carnosus*

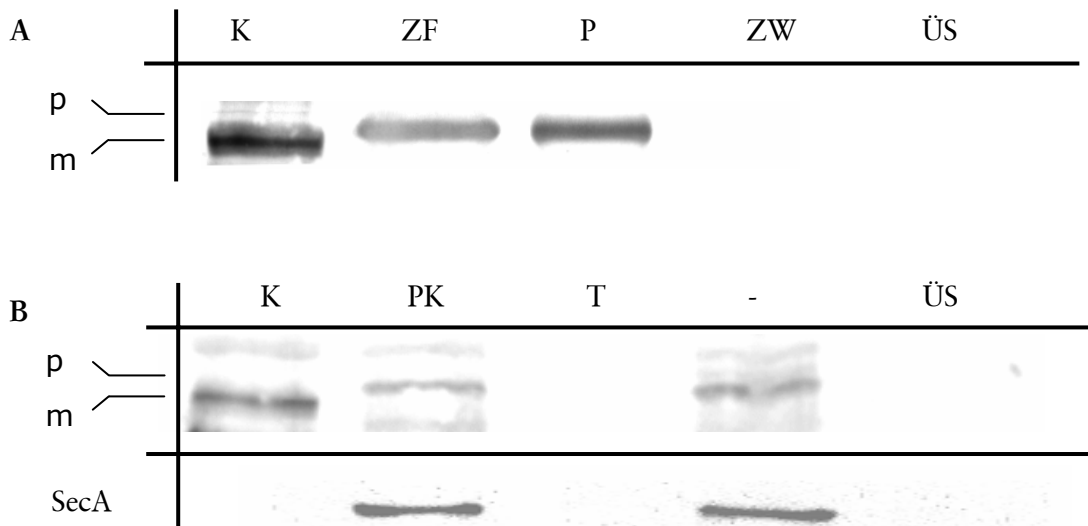
Abbildung 16 B zeigt die im Western Blot untersuchten Zellfraktionen von *S. carnosus* (pXR-TorA-BE). Das Fusionsprotein wird mit einem berechneten Molekulargewicht von 75 kDa korrekt in *S. carnosus* exprimiert, wie der Vergleich des *S. carnosus* Zellextraktes mit dem in *E. coli* exprimierten Branching Enzyme ohne Signalsequenz (m) belegt. Wie aus der Abbildung hervorgeht, ist neben dem zellassozierten TorA-BE Vorläuferprotein (p) kein Branching Enzyme im Kulturüberstand dieses Stammes im Western Blot nachweisbar.



**Abb. 16:** A. Schematische Darstellung der TorA-BE Genfusion. Gezeigt ist die Promotor/Operator-Region P/O<sub>xyl</sub>, die die Xylose-gesteuerte Expression des Fusionsproteins in *S. carnosus* erlaubt, gefolgt vom 5' untranslatierten Bereich (5'UTR) mit Ribosomenbindungsstelle der *S. hyicus* Lipase. Die Signalsequenz des TorA-Proteins (SP TorA) ist in grau eingezeichnet, das Strukturgen des Branching Enzyms schließt sich daran an. B. Proteinverteilung des TorA-BE Genprodukte in *S. carnosus* (pXR-TorA-BE). Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen ist in Kapitel 2.5.2.2 und 2.5.2.3 beschrieben. Die Proben wurden nach ihrer Auftrennung in einem 10 % PA-SDS-Gel im Western Blot mit BE-Antiserum sichtbar gemacht. Die im Zellextrakt (ZF) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.25, die Proteinmenge im Kulturüberstand (ÜS) 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1.5. Als Größenstandard (Kontrolle, K) für die TorA-BE Genprodukte diente das in *E. coli* exprimierte Branching Enzyme ohne Signalsequenz (pQE82-BE). p, TorA-BE Vorläufer; m, reifes Branching Enzyme.

Um daher feststellen zu können, ob es dennoch zu einer geringfügigen Sekretion dieses Proteins kommt, wurde nachfolgend versucht, die Prozessierungskinetik des TorA-BE Vorläuferproteins aufzunehmen. Versuche, das TorA-BE Fusionsprotein mit einer Immunpräzipitation nachzuweisen, waren jedoch nicht erfolgreich, da das Protein in zu geringen Mengen pro Zeiteinheit synthetisiert wurde. Um das zellassozierte TorA-BE Vorläuferprotein lokalisieren zu können, wurde zunächst der Zellextrakt in Protoplasten und Zellwandkompartiment fraktioniert. In Abbildung 17 A ist durch den Vergleich des Zellwandfraktion mit der Protoplastenfraktion klar zu erkennen, dass das TorA-BE Vorläuferprotein ausschließlich mit den Protoplasten assoziiert ist, und dass im Zellwandkompartiment kein Protein nachweisbar ist. Die Behandlung der protoplastierten Zellen mit Proteinase K belegt darüber hinaus, dass das Vorläuferprotein intrazellulär vorliegt, da es durch die Plasmamembran vor dem Verdau durch Proteinase K geschützt ist (Abbildung 17 B). Die Entwicklung derselben Proben mit einem SecA-Antiserum zeigt, dass die Protoplasten intakt sind. Diese

Ergebnisse beweisen damit, dass es zu einer intrazellulären Akkumulation des TorA-BE Vorläufers kommt. Zum Einen könnte dies darin begründet liegen, dass das aus *E. coli* stammende Tat-Signalpeptid nicht durch die Tat-Translokase von *S. carnosus* erkannt wird oder dass die Signalsequenz durch Wegfaltung in das Innere der Branching Enzyme-Struktur der Translokase nicht zugänglich ist. Darüber hinaus wäre es ebenfalls denkbar, dass die Tat-Translokase unter diesen experimentellen Bedingungen nicht aktiv ist: so existiert in *B. subtilis* eine Tat-Translokase, die zusammen mit ihrem Substrat PhoD nur unter phosphatlimitierenden Bedingungen exprimiert wird (Jongbloed *et al.*, 2000).



**Abb. 17: A. Zellfraktionierung von *S. carnosus* (pXR-TorA-BE) zur Lokalisierung des TorA-BE Vorläuferproteins.** Die Trennung des Zellextraktes (ZF) in die Protoplastenfraction (P) und das Zellwandkompartiment (ZW) sowie die Aufarbeitung der Proben ist in Kapitel 2.5.2.4 beschrieben. Die im Zellextrakt, der Protoplastenfraction und im Zellwandkompartiment aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.5, die Proteinmenge im Überstand (ÜS) 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1.5. **B. Lokalisierung des TorA-BE Vorläuferproteins durch Proteinase K-Behandlung von *S. carnosus* (pXR-TorA-BE) Protoplasten.** Die Zellen wurden wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben protoplastiert, jedoch ohne danach eine Trennung der Protoplasten- und Zellwandfraktionen vorzunehmen, und anschließend für 20 Minuten in Gegenwart von 50 µg/ml Proteinase K auf Eis inkubiert (PK). Der Aufschluss der Protoplasten (T) erfolgte durch Zugabe von Triton X-100 in einer Endkonzentration von 5 %, bevor Proteinase K zugesetzt wurde. (-), unbehandelte Probe. Die für die mit (PK) bzw. ohne (-) Proteinase K behandelten Protoplasten, sowie für die vor Proteinase K-Verdau durch Triton X-100 aufgeschlossenen Protoplasten (T) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.5, die Proteinmenge im Überstand (ÜS) einer OD<sub>600</sub> von 1.5. Die Qualität der Protoplastierung sowie die Wirkung der Proteinase K wurden anhand des cytoplasmatischen Kontrollproteins SecA überprüft. Als Größenstandard (Kontrolle, K) für die TorA-BE Genprodukte diente das in *E. coli* exprimierte Branching Enzyme ohne Signalsequenz (pQE82-BE). Die Proben wurden nach ihrer Auftrennung in einem 10 % PA-SDS-Gel im Western Blot mit BE-Antiserum sichtbar gemacht. p, TorA-BE Vorläufer; m, reifes Branching Enzyme.

### 3.3.3 Die Tat-Signalsequenz der *E. coli* TMAO-Reduktase (TorA) führt zur teilweisen Sekretion des Branching Enzyme in den Kulturüberstand von *S. carnosus*

Da mit Hilfe der Western Blot-Methode kein Branching Enzyme im Überstand von *S. carnosus* (pXR-TorA-BE) nachgewiesen werden konnte, wurden die einzelnen Zellfraktionen nachfolgend mit dem deutlich sensitiveren Aktivitätsnachweis mittels nativer PAGE und Aktivitätsfärbung untersucht. Wie in Abbildung 18 deutlich zu erkennen ist, lässt sich damit tatsächlich zeigen, dass aktives Branching Enzyme im Kulturüberstand dieses *S. carnosus* Stammes vorliegt. Interessanterweise ist auch das intrazelluläre TorA-BE des Zellextraktes in einer aktiven Form vorhanden, die ein langsames Laufverhalten als die aktive extrazelluläre Form des Branching Enzyme aufweist. Die Tatsache, dass auf die beiden Fraktionen zwei aktive Proteinformen unterschiedlicher Größe verteilt sind, wobei die intrazelluläre Form das größere der beiden Proteine darstellt und somit sehr wahrscheinlich dem TorA-BE Vorläuferprotein entspricht, zeigt, dass es in der Tat zu einer partiellen Sekretion des Branching Enzyme von *S. carnosus* kommt. Einen abschließenden Beweis dafür, dass es sich bei dem im Überstand dieses Stammes vorliegenden Protein tatsächlich um das Branching Enzyme handelt, erbrachte eine N-terminale Sequenzierung des aus dem Überstand aufgereinigten Proteins (Dr. C. Bertoldo, pers. Mitteilung).

Mit Hilfe des photometrischen Aktivitätstests wurde die Menge des aktiven Branching Enzyme-Proteins im Kulturüberstand sowie im Zellextrakt des *S. carnosus* pXR-TorA-BE Stammes quantifiziert (s. Kapitel 2.5.7). Erstaunlicherweise wurde mit 2.75 U/ml/OD<sub>600</sub> mehr Enzymaktivität im Überstand gemessen als im Falle des in großen Mengen durch Zell-Lyse ausgetretenen Pre-BE Vorläuferproteins (s. Kapitel 3.1.4), obwohl das Branching Enzyme im Überstand des pXR-TorA-BE *S. carnosus* Stammes im Western Blot nicht nachweisbar ist. Die im Zellextrakt des pXR-TorA-BE *S. carnosus* Stammes gemessene Enzymaktivität von 10 U/ml/OD<sub>600</sub> bestätigt die Ergebnisse der in Abbildung 17 gezeigten Lokalisierung des TorA-BE Vorläuferproteins, nach denen der Vorläufer in großer Menge intrazellulär akkumuliert.

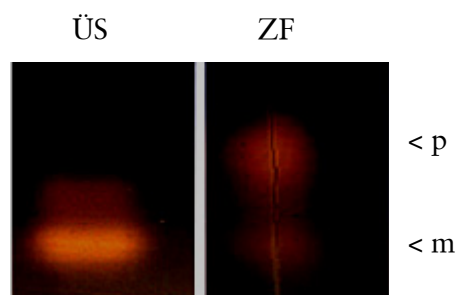


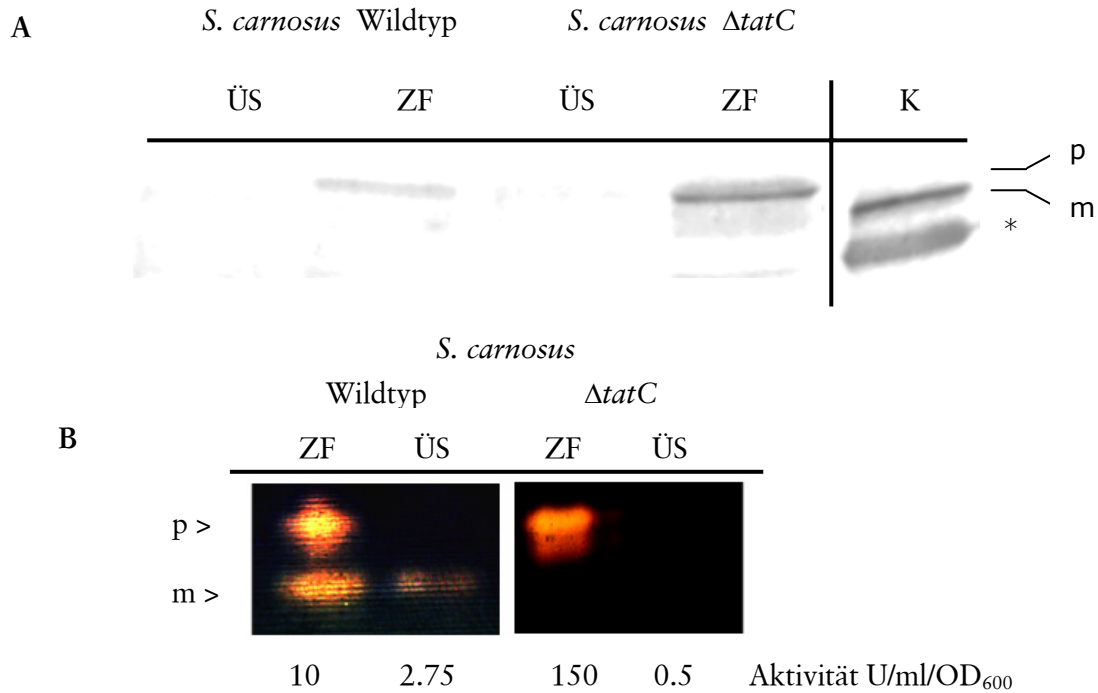
Abb. 18: Aktivitätsnachweis der TorA-BE Genprodukte in *S. carnosus* (pXR-TorA-BE) mittels nativer PAGE und Jodstärkereaktion. Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen sowie der Aktivitätsnachweis sind in Kapitel 2.5.6 beschrieben. Zellextrakt (ZF) und Überstandsfraktion (ÜS) wurden im nativen Zustand in einem nicht-denaturierenden 4-20 % PA-Gradientengel aufgetrennt und das Gel anschließend in einer

1 %igen Stärkelösung inkubiert. Durch aktive Branching Enzyme-Formen abgebaute Stärke wurde durch Anfärben des Gels mit Lugolscher Jodlösung sichtbar gemacht. Die in der Zellfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.1 und die Proteinmenge im Kulturüberstand 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1.

### 3.3.4 Die Deletion des *tatC*-Gens beeinflusst die Sekretion des TorA-BE Fusionsproteins

Zu Beginn der Arbeiten war unbekannt, ob *S. carnosus* einen Tat-Weg besitzt und, falls vorhanden, ob dieser funktionell sein würde. Während der Arbeiten konnten dann die Gene für die Translokasekomponenten TatA und TatC in *S. carnosus* kloniert werden, die im Gegensatz zu der aus *E. coli* bekannten TatA/B/C/E-Translokase für eine sog. "Minimal-Translokase" kodieren (A. Bida, R. Freudl, unveröffentl. Ergebnisse). Außerdem wurde eine *S. carnosus* Mutante konstruiert, in der der Translokaserezeptor TatC deletiert ist (D. Meissner, R. Freudl, unveröffentl. Ergebnisse). In allen bislang untersuchten Tat-Systemen führt die Deletion von TatC, des putativen Rezeptors der Tat-Translokase, zum vollständigen Exportblock aller Tat-Substrate. Um daher zu beweisen, dass das Fusionsprotein TorA-BE tatsächlich über den Tat-Weg von *S. carnosus* sekretiert wird, wurde in einem *S. carnosus*  $\Delta$ *tatC*-Stamm untersucht, welche Auswirkung die Deletion der für die Funktionalität der Tat-Translokase essentiellen Komponente TatC auf die Sekretion des TorA-BE Proteins hat. Hierzu wurden zunächst im Western Blot die Fraktionen des *S. carnosus* Wildtyps und  $\Delta$ *tatC*-Stammes, die jeweils das Plasmid pXR-TorA-BE tragen, miteinander verglichen (s. Abb. 19 A). Wie in Kapitel 3.3.2 bereits erläutert, kann das in den Kulturüberstand sekretierte reife Branching Enzyme im Western Blot-Verfahren nicht nachgewiesen werden, was ein Vergleich der Überstandsfraktionen des Wildtyps und der *tatC*-Mutante von *S. carnosus* hier bestätigt. Im Vergleich zum Wildtyp wurde im Zellextrakt des  $\Delta$ *tatC*-Stammes jedoch eine deutlich größere Menge des TorA-BE Vorläuferproteins festgestellt. Auf Grund einer fehlenden Sekretion des Proteins in der *tatC*-Mutante kommt es offensichtlich zu einer vermehrten Akkumulation des Vorläuferproteins in der Zelle. Wegen der höheren Sensitivität des Aktivitätsnachweises wurden die einzelnen Zellfraktionen beider Stämme mittels nativer PAGE und anschließender Aktivitätsfärbung untersucht. Wie in Abbildung 19 B klar zu erkennen ist, ist im Vergleich zur Überstandsfraktion des Wildtyps kein aktives Branching Enzyme im Kulturüberstand der *tatC*-Mutante von *S. carnosus* nachweisbar, während im Zellextrakt der *tatC*-Mutante eine große Menge einer Proteinform vorhanden ist, die sehr wahrscheinlich dem TorA-BE Vorläuferprotein entspricht. Dieses Ergebnis beweist, dass das Branching Enzyme tatsächlich über den Tat-Weg von *S. carnosus* in den Kulturüberstand gelangt.

Ergänzend zur nativen PAGE wurden die Mengen an aktivem Branching Enzyme-Protein in den Fraktionen beider Stämme im Aktivitätstest gemessen (s. Abb. 19 B). Dabei bestätigte sich das Ergebnis der Western Blot-Analyse, dass sich im Zellextrakt der *tatC*-Mutante von *S. carnosus* mit 150 U/ml/OD<sub>600</sub> eine deutlich größere Menge an aktivem Vorläuferprotein im Vergleich zum Zellextrakt des Wildtyps (10 U/ml/OD<sub>600</sub>) befindet. Im Gegensatz zum Aktivitätsnachweis mittels nativer PAGE, mit der im Überstand des  $\Delta$ *tatC*-Stammes kein aktives Branching Enzyme detektiert werden konnte, zeigte die Aktivitätsmessung eine sehr geringe Menge an aktivem Protein im Kulturüberstand der *tatC*-Mutante. Gegenüber der im Überstand des Wildtyp-Stammes gemessenen Aktivität ist diese Menge an aktivem Protein jedoch deutlich geringer, und tritt wahrscheinlich durch eine partielle Zell-Lyse, die durch die starke Akkumulation des Vorläufers in der Zelle möglicherweise verursacht wird, aus.



**Abb. 19: A. Proteinverteilung der TorA-BE Genprodukte in *S. carnosus* Wildtyp und  $\Delta$ tatC.** Die im Zellextrakt (ZF) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.5, die Proteinmenge im Kulturüberstand (ÜS) 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1.5. Als Größenstandard (Kontrolle, K) für die TorA-BE Genprodukte diente das in *E. coli* exprimierte Branching Enzyme ohne Signalsequenz (pQE82-BE). Die Proben wurden nach ihrer Auftrennung in einem 10 % PA-SDS-Gel im Western Blot mit BE-Antiserum sichtbar gemacht. p, TorA-BE Vorläufer; m, reifes Branching Enzyme; \*, Abbauprodukt. **B. Aktivitätsnachweis der TorA-BE Genprodukte in *S. carnosus* Wildtyp und  $\Delta$ tatC mittels nativer PAGE und Jodstärkereaktion.** Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen sowie der Aktivitätsnachweis sind in Kapitel 2.5.6 beschrieben. Zellextrakte (ZF) und Überstandsfraktionen (ÜS) wurden im nativen Zustand in einem nicht-denaturierenden 4-20 % PA-Gradientengel aufgetrennt und das Gel anschließend in einer 1 %igen Stärkelösung inkubiert. Durch aktive Branching Enzyme-Formen abgebaute Stärke wurde durch Anfärben des Gels mit Lugolscher Jodlösung sichtbar gemacht. Die in der Zellfraktion (ZF) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.1 und die Proteinmenge im Kulturüberstand (ÜS) 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1. Im Kontrollstamm *S. carnosus* pXR100 (Leervektor) war weder mittels nativer PAGE noch im Aktivitätstest Enzymaktivität nachweisbar (nicht gezeigt). p, TorA-BE Vorläufer; m, reifes Branching Enzyme.

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass eine, wenn auch geringe, Tat-abhängige Sekretion des Branching Enzyme in den Kulturüberstand von *S. carnosus* stattfindet und dass *S. carnosus* somit tatsächlich über einen funktionellen Tat-Weg verfügt. Sie zeigen außerdem, dass das TatC-Protein bei der Translokation von Proteinen über den Tat-Weg von *S. carnosus*, ebenso wie bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *E. coli*, eine zentrale Rolle spielt. Darüber hinaus belegen sie, dass der Tat-Apparat von *S. carnosus* grundsätzlich in der Lage ist, ein fremdes Protein als Substrat zu akzeptieren. Damit ist gezeigt, dass sich der *S. carnosus* Tat-Weg prinzipiell für die Sekretion heterologer Proteine nutzen lässt.

### 3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur sekretorischen Expression des cytosolischen Branching Enzyme in *S. carnosus*

Es konnte gezeigt werden, dass eine Sec-abhängige Sekretion des cytosolischen Modellproteins Branching Enzyme in *S. carnosus* für eine sekretorische Gewinnung des Enzyms nur bedingt geeignet ist. So wird ein Fusionsprotein aus Lipase-Signalsequenz und Branching Enzyme gar nicht sekretiert und es kommt zur intrazellulären Akkumulation und Faltung des Vorläuferproteins, welches enzymatische Aktivität aufweist. Durch die starke intrazelluläre Akkumulation wird eine partielle Zell-Lyse verursacht und es kommt zum Austritt eines Teils des aktiven Vorläuferproteins in den Kulturüberstand. Das Einfügen des Propeptids der *S. hyicus* Lipase zwischen Signalsequenz und Branching Enzyme führt dagegen zu einer effizienten Sekretion des Pro-BE Hybridproteins in den Überstand von *S. carnosus*. Allerdings ist dieser Ansatz für die Gewinnung des Branching Enzyme ebenfalls ungeeignet, da das Propeptid mit der nativen Konformation des Branching Enzyme interferiert und ausschließlich enzymatisch inaktives Protein in den Überstand gelangt. Dagegen scheint die Tat-abhängige Sekretion des cytosolischen Modellproteins die Methode der Wahl für dessen sekretorische Gewinnung in *S. carnosus* zu sein. Mit der Tat-abhängigen Sekretion des Branching Enzyme, für die eine intrazelluläre Faltung des Fusionsproteins kein Sekretionshindernis darstellt, wurde im Vergleich zu den Sec-abhängigen BE-Varianten mit 2.75 U/ml/OD<sub>600</sub> die höchste Ausbeute an aktivem Branching Enzyme im Kulturüberstand von *S. carnosus* erzielt. Mit Hilfe des TorA-BE Fusionsproteins konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass *S. carnosus* einen funktionellen Tat-Weg besitzt und dass über diesen Weg prinzipiell heterologe Proteine sekretiert werden können.



### 3.5 Sec-abhängige Sekretion des extrazellulären Modellproteins Cyclodextrin-Glycosyltransferase (CGTase)

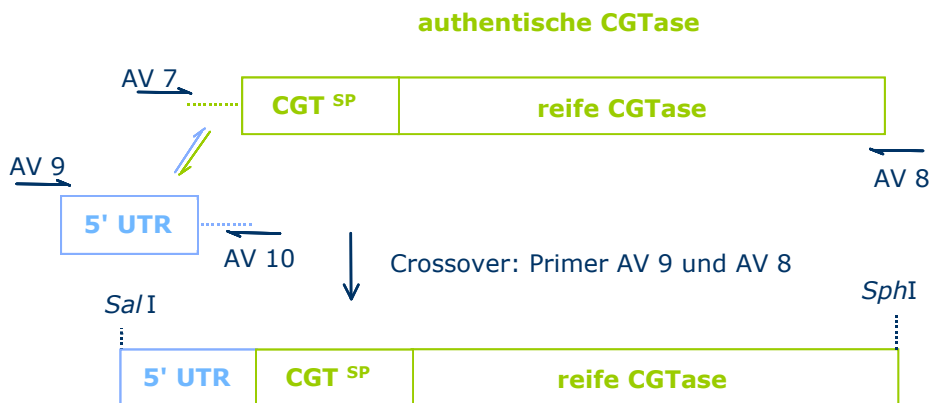
Sec-Signalsequenzen verschiedener Organismengruppen besitzen das gleiche Bauprinzip und unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Länge sowie in der Anzahl der positiv geladenen Aminosäuren in der N-Region (s. Kapitel 1.2.1.1). Die Signalsequenz der authentischen CGTase aus *A. gottschalkii* ist insgesamt 34 Aminosäuren lang und damit vier Aminosäuren kürzer als die Signalsequenz der Prepro-Lipase aus *S. hyicus* (s. Abb. 20). Aus der Gegenüberstellung der beiden Signalsequenzen wird ersichtlich, dass die CGTase-Signalsequenz eine kürzere N- und H-Region, aber eine etwas längere C-Region aufweist als die Signalsequenz der Prepro-Lipase. Unterschiede bestehen auch in der Zahl der positiv geladenen Aminosäuren in der N-Region der beiden Signalsequenzen, sowie in der Beschaffenheit der C-Region, die die Spaltstelle für die Signalpeptidase enthält. Die N-Region der Lipase-Signalsequenz enthält 6 positiv geladene Reste (Nettoladung +5), während die N-Region der CGTase-Signalsequenz nur 3 positiv geladene Reste (Nettoladung +3) aufweist. Auffällig an der C-Region der CGTase-Signalsequenz ist, dass das darin enthaltene Signalpeptidase-Erkennungsmotiv vom weitgehend konservierten Ala<sup>-3</sup>-X-Ala<sup>-1</sup> Motiv abweicht (wobei X eine beliebige Aminosäure sein kann) und stattdessen die Aminosäureabfolge Thr<sup>-3</sup>-Asn-Ala<sup>-1</sup> besitzt (s. Abb. 20). Die Ursache für solche Unterschiede zwischen den Signalsequenzen sind Anpassungen der sekretorischen Proteine an die Komponenten des jeweiligen Sec-Apparates. Dennoch sind Sec-Signalsequenzen unterschiedlicher Herkunft auch in heterologen Systemen prinzipiell funktionell. Da es bislang es kaum Arbeiten zur sekretorischen Gewinnung authentischer Exportproteine aus extremophilen Bakterien in mesophilen bakteriellen Produktionswirten gibt, wurde für eine Sec-abhängige Sekretion der CGTase zunächst untersucht, ob die CGTase in ihrer authentischen Zusammensetzung mit ihrer eigenen Signalsequenz in *S. carnosus* sekretiert werden kann. Analog zu den Ansätzen zur Sec-abhängigen Sekretion des Branching Enzyme, wurde darüber hinaus der reife Teil der CGTase auch jeweils mit der Signalsequenz der Lipase aus *S. hyicus* bzw. mit dem Prepro-Anteil dieser Lipase fusioniert.

N	H	C	-	reifes Protein [...]
auth. CGTase ( <i>A. gottschalkii</i> )				
MINKKNSIGK	AICICLSILLFGVL	SIFQPV	<u>INA</u>	- TQNSLEHIKEHTSVNQNQVNYATDVIIYQIVT [...]
Prepro-Lipase ( <i>S. hyicus</i> )				
MKETKHQHTFSIRK	SAYGAASVMVASCIFVI	GGGV	<u>AEA</u>	- NDSTTQTTTLEVAQTSQQETHHQTPVTSLSH [...]

Abb. 20: Schematische Darstellung der Signalsequenz und ersten 30 Aminosäuren des reifen Teils der authentischen CGTase aus *A. gottschalkii* sowie der Prepro-Lipase aus *S. hyicus*. Die Signalpeptidase-Schnittstelle der authentischen CGTase-Signalsequenz wurde mit Hilfe der Software SignalP bestimmt, die vom Center for Biological Sequence Analysis der Technical University of Denmark zur Verfügung gestellt wird (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Die Aminosäuren an den Positionen -1 und -3 relativ zur Signalpeptidase-Spaltstelle der beiden Signalsequenzen sind unterstrichen dargestellt.

### 3.5.1 Die authentische CGTase

Zur Expression der authentischen CGTase in *S. carnosus* wurde zunächst das Strukturgen mit den Primern AV 7 und AV 8 in einer PCR von chromosomaler DNA aus *A. gottschalkii* amplifiziert. Die Gensequenz für das Strukturgen, das für die authentische CGTase aus *A. gottschalkii* kodiert, wurde von C. Jürgens (Univ. zu Köln) bereitgestellt. Dieses PCR-Fragment wurde anschließend in einer Crossover PCR mit dem 5' untranslatierten Bereich inkl. Ribosomenbindungsstelle der *S. hyicus* Lipase fusioniert (s. Abb. 21) und über die Schnittstellen *SalI* und *SphI* in den *E. coli*-*S. carnosus* Shuttlevektor pXR100 kloniert (s. Abb. 7). Nach Transformation des pXR-aCGT genannten Plasmids in *S. carnosus* Wildtyp wurden nachfolgend zunächst Expression sowie Sekretion der authentischen CGTase untersucht.

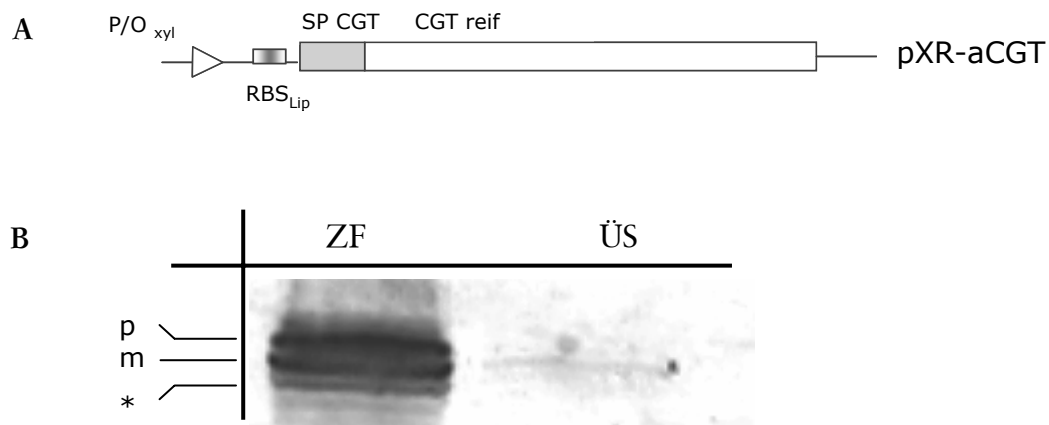


**Abb. 21:** Reaktionsschema für die Fusion des authentischen CGTase Strukturgens von *A. gottschalkii* mit dem 5' UTR-Bereich der *S. hyicus* Lipase. Das Strukturgen wurde mit den Primern AV 7 und AV 8 in einer PCR ausgehend von *A. gottschalkii* chromosomaler DNA amplifiziert und mit einem 5' Überhang versehen, der zum 3' Ende des 5'untranslatierten Bereichs der *S. hyicus* Lipase komplementär ist. Dieser untranslatierte Bereich wurde mit den Primern AV 9 und AV 10 von Plasmid pULS183 K2 so amplifiziert, dass er am 3' Ende einen zum Anfang des CGTase-Signalpeptids komplementären Überhang enthielt. In einer Crossover PCR wurden die beiden PCR-Fragmente mit den Primern AV 9 und AV 8 über ihre komplementären Überhänge miteinander fusioniert. Anschließend wurde die Fusion über die Schnittstellen *SalI* und *SphI* in das Plasmid pXR100 kloniert (s. Abb. 7) und nach Sequenzierung in *S. carnosus* Wildtyp transformiert.

### 3.5.2 Lokalisierung der authentischen CGTase in *S. carnosus*

Abbildung 22 B zeigt die im Western Blot untersuchten Zellfraktionen von *S. carnosus* (pXR-aCGT). Die authentische CGTase wird mit einem berechneten Molekulargewicht von 80 kDa korrekt in *S. carnosus* synthetisiert, wie ein Vergleich mit der in *E. coli* exprimierten reifen CGTase (m) belegt (s. Abb. 24). Wie aus Abbildung 22 B hervorgeht, befinden sich im Zellextrakt dieses Stammes neben der Vorläuferform der CGTase (p) auch die reife Form (m), die die dominante Proteinspezies darstellt, sowie ein Abbauprodukt des Proteins (\*), wobei alle drei Proteinformen in einem sehr deutlichen Überschuss zum extrazellulären Protein vorliegen. Die Anwesenheit von reifer CGTase im Kulturüberstand dieses *S. carnosus* Stammes beweist jedoch, dass die

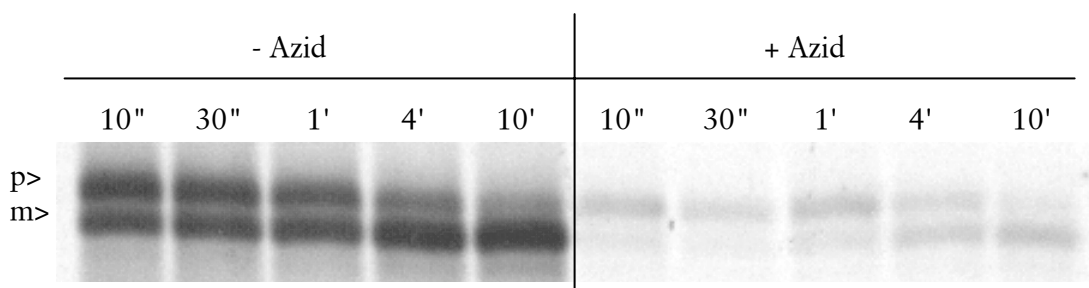
Signalsequenz der authentischen CGTase prinzipiell funktionelle Wechselwirkungen mit der Sec-Translokase von *S. carnosus* eingehen und die Sekretion der CGTase in den Kulturüberstand von *S. carnosus* vermitteln kann. Die Tatsache, dass sich fast die gesamte Menge an synthetisierter authentischer CGTase in zellassoziierter Form befindet und nur eine sehr geringe Menge der reifen CGTase in den Kulturüberstand gelangt, zeigt allerdings, dass es Engpässe im Sekretionsverlauf der authentischen CGTase gibt. Für eine Akkumulation des Vorläufers in der Zelle könnten eine Sättigung der Sec-Translokase oder aber der exportspezifischen Chaperone verantwortlich sein. Eine Akkumulation der reifen CGTase im Zellextrakt könnte dagegen je nach Lokalisierung unterschiedliche Gründe haben. Das intrazellulär akkumulierte Vorläuferprotein könnte durch cytosolische Proteasen unspezifisch zur reifen CGTase abgebaut werden. Andererseits wäre es denkbar, dass die reife CGTase extracytosolisch aber noch zellassoziert vorliegt und z.B. durch Wechselwirkungen mit der Zellwand an der Sekretion in den Überstand gehindert wird.



**Abb. 22:** A. Schematische Darstellung der Genfusion aus authentischer CGTase und 5'UTR-Bereich der *S. hyicus* Lipase. Gezeigt ist die Promotor/Operator-Region  $P/O_{xyl}$ , die die Xylose-gesteuerte Expression des Fusionsproteins in *S. carnosus* erlaubt, gefolgt vom 5' untranslatierten Bereich mit Ribosomenbindungsstelle der *S. hyicus* Lipase. Die Signalsequenz der CGTase (SP CGT) ist in grau eingezeichnet, die reife CGTase schließt sich daran an. B. Proteinverteilung der Genprodukte der authentischen CGTase in *S. carnosus* (pXR-aCGT). Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen ist in Kapitel 2.5.2.2 und 2.5.2.3 beschrieben. Die Proben wurden nach ihrer Auftrennung in einem 10 % PA-SDS-Gel im Western Blot mit einem gegen die CGTase gerichteten Antiserum sichtbar gemacht. Die in der Zellfraktion (ZF) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 0.5, die Proteinmenge im Kulturüberstand (ÜS) 1 ml Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 1.5.

### 3.5.3 Die CGTase kann mit Hilfe ihrer eigenen Signalsequenz über den Sec-Weg von *S. carnosus* transloziert werden

Um zu bestimmen, welche Faktoren die Effizienz der Sekretion der authentischen CGTase beeinflussen, wurde nachfolgend zunächst die Prozessierungskinetik der authentischen CGTase als Maß für die Effizienz der Membrantranslokation im Pulse Chase-Experiment untersucht. In Abbildung 23 ist deutlich zu erkennen, dass eine Prozessierung der authentischen CGTase in *S. carnosus* stattfindet. Bereits nach 10 Sekunden liegt reifes, prozessiertes Protein in gleicher Menge wie der Vorläufer vor, und nach 10 Minuten ist die Überführung des Vorläufers in die reife Form nahezu vollständig abgeschlossen. Die Zugabe von Azid hemmt die Prozessierung stark. Während in Abwesenheit von Azid nach 1 Minute bereits 60 % des Vorläufers in die reife Form umgewandelt sind, werden in Gegenwart von Azid nur etwa 20 % des Vorläuferproteins prozessiert. Dies beweist somit, dass die authentische CGTase tatsächlich in *S. carnosus* über den Sec-Weg transloziert wird. Die Prozessierungskinetik der authentischen CGTase zeigt, dass die aus *A. gottschalkii* stammende authentische CGTase zwar als fremdes Substrat von der Sec-Translokase von *S. carnosus* akzeptiert wird und eine Sekretion der CGTase in *S. carnosus* grundsätzlich stattfindet. Vor dem Hintergrund, dass der Großteil der CGTase-Proteinformen jedoch in zellassoziierter Form vorliegt, wird deutlich, dass die Effizienz des Sekretionsverlaufs stark beeinträchtigt ist.

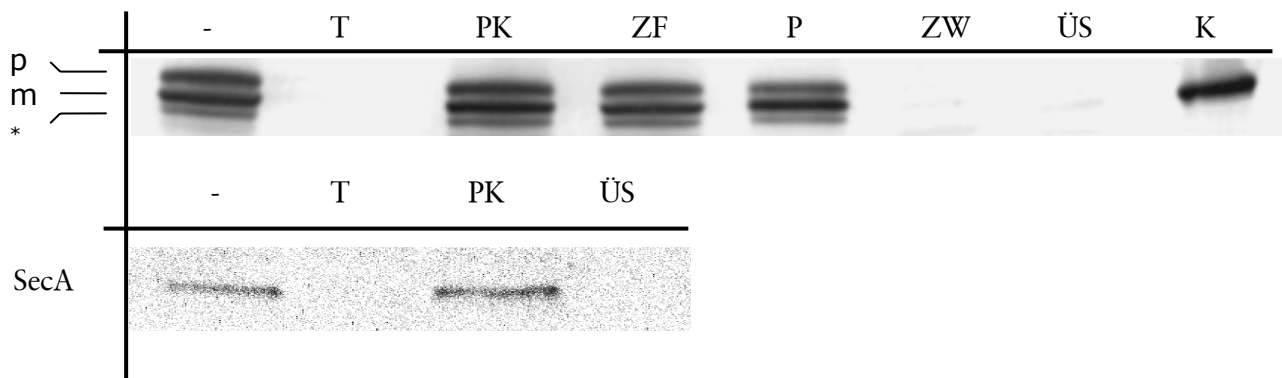


**Abb. 23: Prozessierungskinetik der authentischen CGTase in *S. carnosus* (pXR-aCGT) in An- oder Abwesenheit des SecA-Inhibitors Azid.** Der Stamm wurde in einem Pulse Chase Experiment mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin für 1 Minute markiert und Proben wurden 10'', 30'', 1', 4' und 10' nach Zugabe der Chase-Lösung genommen. Azid wurde in einer Konzentration von 20 mM 5' vor der Markierung zugegeben. Die Immunfällung wurde mit CGTase-Antiserum durchgeführt, die isolierten Proteine in einem 10% PA-SDS-Gel aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte mit der Software AIDA (s. Abschnitt 2.5.8.1.4). p, Vorläufer der authentischen CGTase; m, reife CGTase.

### 3.5.4 Frühe Ereignisse verhindern die Sekretion eines Großteils der authentischen CGTase in *S. carnosus*

Nachfolgend wurden Lokalisierungs-Experimente durchgeführt, um zu untersuchen, warum es zur beobachteten Akkumulation von Vorläuferprotein und reifer CGTase im Zellextrakt kommt. Dazu wurde zunächst eine Trennung des Zellextraktes in Protoplasten und Zellwandkompartiment durchgeführt, um die zellassozierten Proteine zu lokalisieren. In Abbildung 24 ist klar zu erkennen, dass sowohl der zellassozierte Vorläufer (p) als auch die reife Form des Proteins (m) und ein Abbauprodukt (\*) fast ausschließlich in der

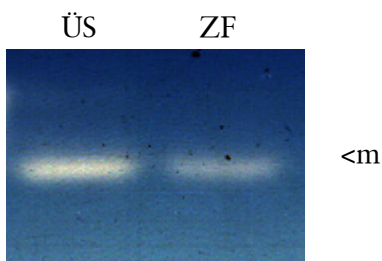
Protoplastenfraction zu finden sind. Die Zugabe von Proteinase K führt zu keinem signifikanten Abbau der mit den Protoplasten assoziierten Proteinformen, die demnach durch die Anwesenheit der Plasmamembran geschützt sind und im Cytosol vorliegen. Zusammen mit der Proteinase K-Behandlung protoplastierter Zellen beweist die Fraktionierung, dass in erster Linie Ereignisse zu frühen Zeitpunkten im Sekretionsverlauf die Sekretion der CGTase beeinträchtigen. Das Fehlen größerer Mengen reifen Proteins im Zellwandkompartiment zeigt, dass die Zellwand offensichtlich keine Barriere für die Sekretion der authentischen CGTase darstellt. Die starke intrazelluläre Akkumulation des authentischen CGTase-Vorläufers ist möglicherweise auf eine Sättigung exportspezifischer Chaperone durch die Menge des Vorläuferproteins zurückzuführen, so dass es zu einem *kinetic partitioning* eines signifikanten Teils des Vorläufers aus dem Sekretionsweg heraus kommt (s. Kapitel 1.2.1.2). Andererseits ist es denkbar, dass es auf Grund unproduktiver Wechselwirkungen des CGTase-Vorläuferproteins mit der Sec-Translokase von *S. carnosus* zur Akkumulation des Vorläufers im Cytosol kommt. In beiden Fällen wird dabei das intrazellulär akkumulierte Vorläuferprotein unspezifisch zu einer kleineren, der reifen CGTase entsprechenden Form, sowie einer weiteren Proteinform abgebaut.



**Abb. 24:** Zellfraktionierung von *S. carnosus* (pXR-aCGT) und Proteinase K-Behandlung von *S. carnosus* (pXR-aCGT) Protoplasten zur Lokalisierung der Genprodukte der authentischen CGTase. Die Trennung des Zellextraktes (ZF) in die Protoplastenfraction (P) und das Zellwandkompartiment (ZW) sowie die Aufarbeitung der Proben ist in Kapitel 2.5.2.4 beschrieben. Die im Zellextrakt, der Protoplastenfraction und im Zellwandkompartiment aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.5, die Proteinmenge im Überstand 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1.5. Für den Proteinase K-Verdau wurde der Stamm wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben protoplastiert, jedoch ohne danach eine Trennung der Protoplasten- und Zellwandfraktionen vorzunehmen, und anschließend für 20 Minuten in Gegenwart von 50 µg/ml Proteinase K auf Eis inkubiert (PK). Der Aufschluss der Protoplasten (T) zum Verdau intrazellulär lokalisierter Proteine erfolgte durch Zugabe von Triton X-100 in einer Endkonzentration von 5 %, bevor Proteinase K zugesetzt wurde. (-), ohne Proteinase K oder Triton X-100 behandelte Probe. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie in Kapitel 2.5.2.4. Die für die mit (PK) bzw. ohne (-) Proteinase K behandelten Protoplasten, sowie für die vor Proteinase K-Verdau durch Triton X-100 aufgeschlossenen Protoplasten (T) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.5, die im Überstand (ÜS) einer OD<sub>600</sub> von 1.5. Die Qualität der Protoplastierung sowie die Wirkung der Proteinase K wurden anhand des cytoplasmatischen Kontrollproteins SecA überprüft. Als Größenstandard (Kontrolle, K) für die Genprodukte der authentischen CGTase diente die in *E. coli* exprimierte reife CGTase (pET28-CGTm). Die Proben wurden nach ihrer Auftrennung in einem 10 % PA-SDS-Gel im Western Blot mit CGTase-Antiserum sichtbar gemacht. p, Vorläufer der authentischen CGTase; m, reife CGTase; \*, Abbauprodukt.

### 3.5.5 Die Signalsequenz der authentischen CGTase vermittelt die Sekretion von aktiver CGTase in den Kulturüberstand von *S. carnosus*

Da in den vorangegangenen Western Blot-Versuchen gezeigt wurde, dass die authentische CGTase-Signalsequenz eine Sekretion der reifen CGTase, wenn auch nur in geringen Mengen, in den Kulturüberstand von *S. carnosus* vermittelt, wurde nachfolgend untersucht, ob die reife CGTase dort in aktiver Konformation vorliegt. Die in Abbildung 25 gezeigte native PAGE mit anschließender Aktivitätsfärbung der einzelnen Fraktionen von *S. carnosus* (pXR-aCGT) belegt, dass die in den Überstand sekretierte CGTase in der Tat in aktiver Form vorliegt und somit in der Lage ist, im extrazellulären Raum von *S. carnosus* ihre native Konformation einzunehmen. Auch im Zellextrakt dieses *S. carnosus* Stammes ist aktives Protein nachweisbar, das auf Grund seines Laufverhaltens der reifen CGTase zugeordnet werden kann. Mit Hilfe des photometrischen Aktivitätstests wurde im Kulturüberstand eine Enzymaktivität von 3 U/ml/OD<sub>600</sub> und von 10 U/ml/ OD<sub>600</sub> im Zellextrakt gemessen. Aus der Lokalisierung der Genprodukte der authentischen CGTase (s. Abb. 24) geht hervor, dass sich neben der reifen CGTase auch das Vorläuferprotein im Zellextrakt befindet und dass diese im großen Überschuss zur sekretierten CGTase vorliegen. Von den intrazellulären Proteinformen besitzt jedoch offensichtlich nur das Protein mit der Größe der reifen CGTase enzymatische Aktivität (s. Abb. 25). Aus dem Befund, dass die im Zellextrakt gemessene Enzymaktivität nur etwa 3 Mal höher ist als im Kulturüberstand, obwohl sich der Großteil des insgesamt synthetisierten Proteins in dieser Fraktion befindet, kann geschlossen werden, dass offenbar nur ein sehr geringer Teil der intrazellulär lokalisierten reifen CGTase in einer aktiven Konformation vorliegt.



**Abb. 25: Aktivitätsnachweis der authentischen CGTase in *S. carnosus* (pXR-aCGT) mittels nativer PAGE und Jodstärkereaktion.** Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen sowie der Aktivitätsnachweis sind in Kapitel 2.5.6 beschrieben. Zellextrakt (ZF) und Überstandsfraction (ÜS) wurden im nativen Zustand in einem nicht-denaturierenden 4-20 % PA-Gradientengel aufgetrennt und das Gel anschließend in einer 1 %igen Stärkelösung inkubiert. Durch aktive CGTase-Formen abgebaute Stärke wurde durch Anfärben des Gels mit Lugolscher Jodlösung sichtbar gemacht. Die in der Zellfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.1 und die Proteinmenge im Kulturüberstand 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1. m, reife CGTase.

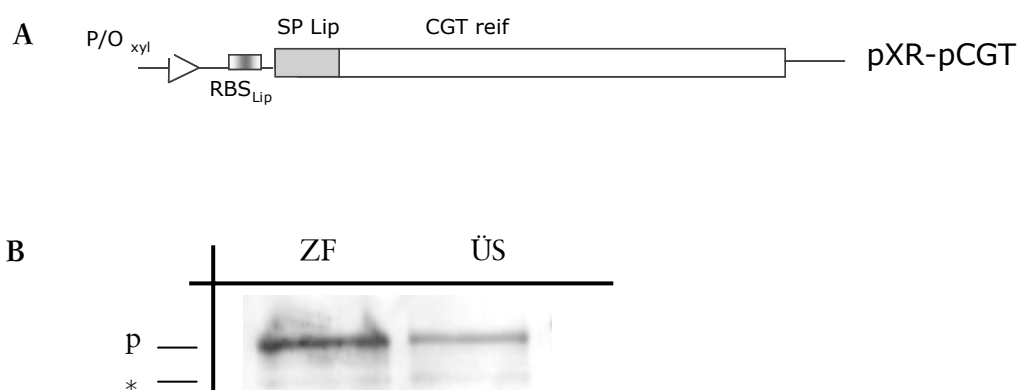
### 3.6 Fusion der reifen CGTase mit dem Sec-Signalpeptid der *S. hyicus* Lipase ("Pre-CGTase")

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass eine sekretorische Gewinnung der CGTase in *S. carnosus* in ihrer authentischen Zusammensetzung prinzipiell möglich ist, diese aber vor allem auf Grund von Ereignissen vor der Membrantranslokation, die eine Einschleusung der authentischen CGTase in den Sec-

Weg behindern, stark eingeschränkt wird. Daher wurde nachfolgend untersucht, ob die reife CGTase in Fusion mit der Signalsequenz der *S. hyicus* Lipase, eines aus einer nahe verwandten *Staphylococcus*-Art stammenden Exportproteins, besser über den Sec-Weg von *S. carnosus* sekretiert werden kann. Zur Fusion der Lipase-Signalsequenz mit dem reifen Teil der CGTase wurde der für die reife CGTase kodierende Teil des Strukturgens mit den Primern AV 11 und AV 12 ausgehend von chromosomaler DNA von *A. gottschalkii* in einer PCR amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde dann über die Schnittstellen *Sna*BI und *Sph*I in das *Nae*I-*Sph*I geschnittene Plasmid pULS183 K2 kloniert (s. Abb. 7). Am 5' Ende der daraus resultierenden Fusion von Lipase-Signalsequenz und reifer CGTase (Pre-CGTase) wurde eine *Sal*I-Schnittstelle mit Hilfe der Primer AV 9 und AV 12 eingefügt. Anschließend wurde die Pre-CGTase Genfusion über die Schnittstellen *Sal*I und *Sph*I in den Vektor pXR100 kloniert (s. Abb. 7). Nach Transformation des pXR-pCGT genannten Plasmids in *S. carnosus* Wildtyp wurden zunächst Expression und Sekretion des Pre-CGTase Fusionsproteins untersucht.

### 3.6.1 Lokalisierung des Pre-CGTase Fusionsproteins in *S. carnosus*

Abbildung 26 B zeigt die im Western Blot untersuchten Zellfraktionen von *S. carnosus* (pXR-pCGT). Das Fusionsprotein aus Lipase-Signalsequenz und reifer CGTase wird mit einem berechneten Molekulargewicht von ca. 80 kDa korrekt in *S. carnosus* exprimiert, wie ein Vergleich mit der in *E. coli* exprimierten reifen CGTase (m) belegt (s. Abb. 28 B). Sowohl in der Zellfraktion als auch im Kulturüberstand befinden sich zwei Proteinformen, von denen eine das gleiche Laufverhalten wie das Vorläuferprotein (p) aufweist. Eine Proteinform mit der Größe der reifen CGTase ist im Überstand nicht nachweisbar. Die Anwesenheit des Pre-CGTase Vorläufers im Kulturüberstand sowie die offensichtlich fehlende reife CGTase deuten darauf hin, dass es nicht zu einer Sekretion des Pre-CGTase Fusionsproteins über den Sec-Weg von *S. carnosus* kommt. Stattdessen tritt eine Freisetzung eines Teils des Vorläuferproteins in den Kulturüberstand vermutlich durch eine partielle Zell-Lyse auf, die durch die Überproduktion des Pre-CGTase Fusionsproteins verursacht wird.



**Abb. 26:** A. Schematische Darstellung der Pre-CGTase Genfusion. Dargestellt ist die Promotor/Operator-Region  $P/O_{xyl}$ , die die Xylose-gesteuerte Expression des Fusionsproteins in *S. carnosus* erlaubt, gefolgt vom 5' untranslatierten Bereich mit Ribosomenbindungsstelle der *S. hyicus* Lipase. Die Signalsequenz der Lipase ist in grau eingezeichnet, der für die reife CGTase kodierende Teil des Strukturgens schließt sich daran an. B. Proteinverteilung der Pre-CGTase Genprodukte in *S. carnosus* (pXR-pCGT). Die

Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen ist in Kapitel 2.5.2.2 und 2.5.2.3 beschrieben. Die Proben wurden nach ihrer Auftrennung in einem 10 % PA-SDS-Gel im Western Blot mit CGTase-Antiserum sichtbar gemacht. Die in der Zellfraktion (ZF) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.5, die Proteinmenge im Kulturüberstand (ÜS) 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1.5. p, Pre-CGTase Vorläufer; \*, Abbauprodukt.

### 3.6.2 Das Pre-CGTase Fusionsprotein wird nicht in den Kulturüberstand von *S. carnosus* sekretiert

Da eine Sec-abhängige Sekretion der CGTase in *S. carnosus* generell möglich ist, wie am Beispiel der authentischen CGTase gezeigt wurde (s. Kapitel 3.5.1), besteht im nicht sekretierten Pre-CGTase Vorläuferprotein offenbar eine Inkompatibilität zwischen der Signalsequenz der Lipase aus *S. hyicus* und dem reifen Teil der CGTase aus *A. gottschalkii*. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass reife CGTase dennoch im Kulturüberstand vorliegt, aber in zu geringen Mengen für einen Western Blot-Nachweis, wurde im Pulse Chase-Experiment untersucht, ob sich eine Prozessierung der Pre-CGTase in *S. carnosus* nachweisen lässt. Wie in Abbildung 27 zu erkennen ist, erfolgt über den gesamten Beobachtungszeitraum von 10 Minuten keine Prozessierung des Pre-CGTase Vorläuferproteins. Auch nach 10 Minuten sind noch 100 % des Vorläuferproteins vorhanden und eine Überführung des Vorläufers in die reife Form ist nicht nachweisbar. Bei Azidzugabe wird das identische Ergebnis wie in Abwesenheit von Azid, d.h. eine Akkumulation der Pre-CGTase Vorläuferform, erhalten.

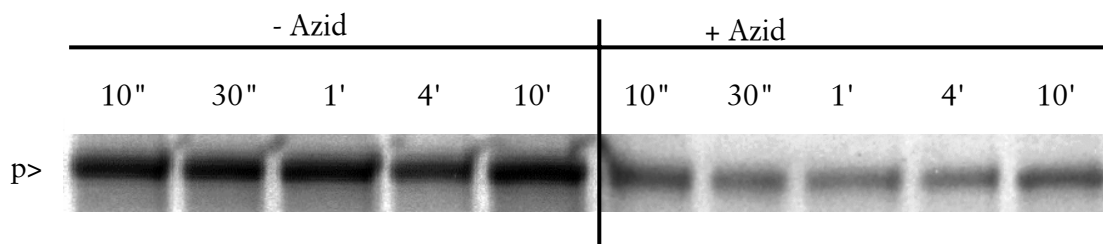


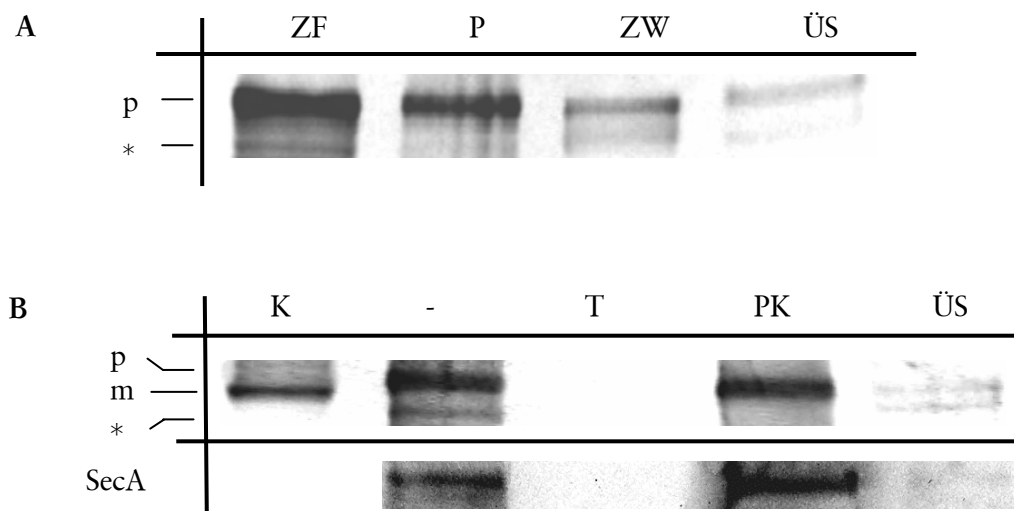
Abb. 27: Prozessierungskinetik des Pre-CGTase Vorläuferproteins in *S. carnosus* (pXR-pCGT) in An- oder Abwesenheit des SecA-Inhibitors Azid. Der Stamm wurde in einem Pulse Chase Experiment mit <sup>35</sup>S-Methionin 1' markiert und Proben wurden 10'', 30'', 1', 4' und 10' nach Zugabe der Chase-Lösung genommen. Azid wurde in einer Konzentration von 20 mM 5' vor der Markierung zugegeben. Die Immunfällung wurde mit CGTase-Antiserum durchgeführt, die isolierten Proteine in einem 10 % PA-SDS-Gel aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte mit der Software AIDA (s. Abschnitt 2.5.8.1.4). p, Pre-CGTase Vorläufer.

Die Prozessierungskinetik bestätigt, dass die Lipase-Signalsequenz alleine nicht in der Lage ist, eine Sec-abhängige Sekretion der CGTase zu vermitteln. Ähnlich wie im Falle des Pre-BE Hybridproteins (s. Kapitel 3.1.3) gibt es für die ausbleibende Prozessierung des Pre-CGTase Vorläufers mehrere mögliche Gründe. Einerseits könnten unproduktive Wechselwirkungen des Vorläufers mit Komponenten der Sec-Translokase, die nicht zu einer Initiation der Translokation durch die Sec-Translokase führen, eine intrazelluläre Akkumulation des Vorläuferprotein verursachen. Da eine Sec-abhängige Sekretion der CGTase mit ihrer eigenen Signalsequenz in *S. carnosus* möglich ist, könnte die Akkumulation des Pre-CGTase Vorläufers aber auch auf eine mangelnde Faltungsverzögerung der reifen CGTase durch die Lipase-Signalsequenz zurückzuführen sein, durch die es zu einer vorzeitigen Wegfaltung der Signalsequenz in das Innere der Struktur der CGTase kommt



und Wechselwirkungen des Vorläufers mit Komponenten des Sec-Weges verhindert werden. Andererseits könnte es zu einer Membranverankerung des Vorläufers über die am Aminoterminus gelegene Signalsequenz kommen, wenn eine Abspaltung der Signalsequenz durch die Signalpeptidase nicht stattfindet. In diesem Fall wäre der CGTase-Anteil des Fusionsproteins auf der *trans*-Seite der Membran exponiert. Nachfolgend wurden deshalb Experimente zur eindeutigen Lokalisierung des zellassozierten Pre-CGTase Vorläuferproteins durchgeführt.

Hierzu wurde zunächst der Zellextrakt in Protoplasten und Zellwandkompartiment fraktioniert. In Abbildung 28 A ist deutlich zu erkennen, dass der Großteil des zellassozierten Vorläufers in der Protoplastenfraction lokalisiert ist, während eine geringere Menge des Proteins im Zellwandkompartiment auftritt. Durch die Proteinase K-Behandlung der protoplastierten Zellen bestätigt sich, dass der Vorläufer vorrangig intrazellulär akkumuliert, da der Großteil des Proteins durch die Plasmamembran vor Verdau durch Proteinase K geschützt ist (s. Abb. 28 B). Diese Ergebnisse beweisen zusammen mit der Prozessierungskinetik des Pre-CGTase Vorläuferproteins, dass die Pre-CGTase intrazellulär akkumuliert und nicht sekretiert wird. Anhand der Verteilung des cytoplasmatischen Kontrollproteins SecA in den einzelnen Fraktionen wird deutlich, dass es bei andauernder Überexpression der Pre-CGTase tatsächlich zur partiellen Zell-Lyse dieses *S. carnosus* Stammes kommt, da sowohl das SecA-Protein als auch der Pre-CGTase Vorläufer im Kulturüberstand nachgewiesen werden kann.

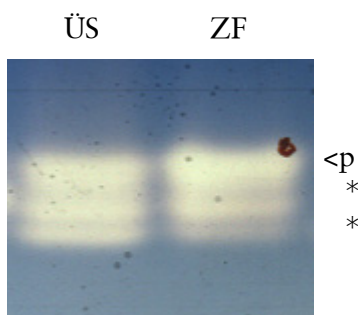


**Abb. 28:** A. Zellfraktionierung von *S. carnosus* (pXR-pCGT) zur Lokalisierung des Pre-CGTase Vorläuferproteins. Die Trennung des Zellextraktes (ZF) in die Protoplastenfraction (P) und das Zellwandkompartiment (ZW) sowie die Aufarbeitung der Proben ist in Kapitel 2.5.2.4 beschrieben. Die im Zellextrakt, der Protoplastenfraction und im Zellwandkompartiment aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.5, die Proteinmenge im Überstand 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1.5. B. Lokalisierung des Pre-CGTase Vorläuferproteins durch Proteinase K-Behandlung von *S. carnosus* (pXR-pCGT) Protoplasten. Der Stamm wurde wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben protoplastiert, jedoch ohne danach eine Trennung der Protoplasten- und Zellwandfraktionen vorzunehmen, und anschließend für 20 Minuten in Gegenwart von 50 µg/ml Proteinase K auf Eis inkubiert (PK). Der Aufschluss der Protoplasten (T) zum Verdau intrazellulär lokalisierter Proteine erfolgte durch Zugabe von Triton X-100 in einer Endkonzentration von 5 %,

bevor Proteinase K zugesetzt wurde. (-), ohne Proteinase K oder Triton X-100 behandelte Probe. Die für die mit (PK) bzw. ohne (-) Proteinase K behandelten Protoplasten, sowie für die vor Proteinase K-Verdau durch Triton X-100 aufgeschlossenen Protoplasten (T) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.5, die Proteinmenge im Überstand (ÜS) einer OD<sub>600</sub> von 1.5. Die Qualität der Protoplastierung sowie die Wirkung der Proteinase K wurden anhand des cytoplasmatischen Kontrollproteins SecA überprüft. Als Größenstandard (Kontrolle, K) für die Genprodukte der authentischen CGTase diente die in *E. coli* exprimierte reife CGTase (pET28-CGTm). Die Proben wurden nach ihrer Auftrennung in einem 10 % PA-SDS-Gel im Western Blot mit CGTase-Antiserum sichtbar gemacht. p, Pre-CGTase Vorläufer; \*, Abbauprodukt.

### 3.6.3 Das Pre-CGTase Fusionsprotein akkumuliert intrazellulär in aktiver Form

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass die Lipase-Signalsequenz eine Sec-abhängige Sekretion der CGTase nicht vermitteln kann. Abschließend wurde untersucht, in welchem Faltungszustand sich das Pre-CGTase Vorläuferprotein befindet. Mit Hilfe der nativen PAGE und anschließenden Aktivitätsfärbung der in *S. carnosus* (pXR-pCGT) aktiven Proteinspezies sind im Zellextrakt dieses Stammes drei aktive Proteinformen des Pre-CGTase Proteins erkennbar (s. Abb. 29). An Hand der vorausgegangenen Ergebnisse handelt es sich bei der größten Proteinform sehr wahrscheinlich um das Pre-CGTase Vorläuferprotein. Die Lipase-Signalsequenz ist damit im Gegensatz zur authentischen CGTase-Signalsequenz (s. Abb. 25) nicht in der Lage, die Faltung der nachgeschalteten reifen CGTase durch Wechselwirkung mit exportspezifischen Chaperonen im Cytosol zu verzögern, was eine Faltung des Pre-CGTase Vorläufers zur Folge hat. Im Zellextrakt treten zusätzlich zwei verkürzte Proteinformen auf, die vermutlich auf Grund von unspezifischer Proteolyse entstehen. Da eine signifikante Menge der Pre-CGTase im Zellwandkompartiment vorliegt, ist es denkbar, dass sie durch zellwandassoziierte Proteasen proteolytisch abgebaut werden kann. Eine der verkürzten aktiven Proteinformen im Zellextrakt entspricht dabei möglicherweise dem im Zellwandkompartiment lokalisierten Abbauprodukt (\*) der Pre-CGTase (s. Abb. 28 A). Alle drei aktiven Proteinformen sind auch im Kulturüberstand nachweisbar. In Folge der ausbleibenden Sekretion kommt es demnach zu einer starken intrazellulären Akkumulation des Vorläufers in einer aktiven Konformation und durch eine partielle Zell-Lyse zum Austritt des aktiven Vorläufers sowie zweier verkürzter Formen des Vorläufers in den Kulturüberstand von *S. carnosus*.



**Abb. 29: Aktivitätsnachweis des Pre-CGTase Genprodukte in *S. carnosus* (pXR-pCGT) mittels nativer PAGE und Jodstärkereaktion.** Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen sowie der Aktivitätsnachweis sind in Kapitel 2.5.6 beschrieben. Zellextrakt (ZF) und Überstandsfraktion (ÜS) wurden im nativen Zustand in einem nicht-denaturierenden 4-20 % PA-Gradientengel aufgetrennt und das Gel anschließend in einer 1 %igen Stärkelösung inkubiert. Durch aktive CGTase-Formen abgebaute Stärke wurde durch Anfärben des Gels mit Lugolscher Jodlösung sichtbar gemacht. Die in der Zellfraktion (ZF) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.1 und die Proteinmenge im Kulturüberstand (ÜS) 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1. p, Pre-CGTase Vorläufer; \*, Abbauprodukte.

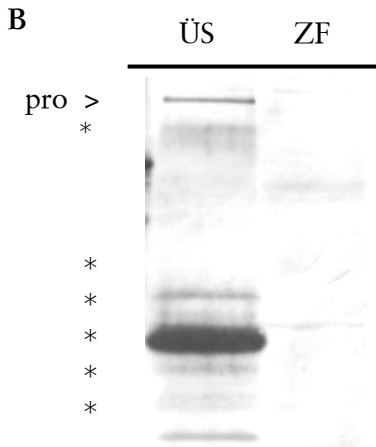
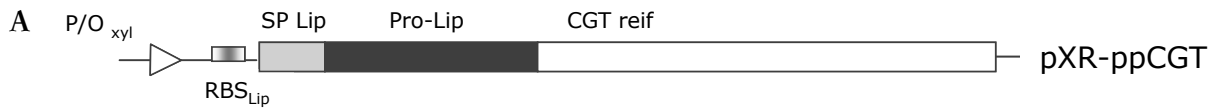
Mit Hilfe des photometrischen Aktivitätstests (s. Kapitel 2.5.7) wurde die Menge an aktiver CGTase in den einzelnen Fraktionen von *S. carnosus* (pXR-pCGT) bestimmt. Die Messungen zeigten, dass die durch Zell-Lyse in den Kulturüberstand dieses Stammes ausgetretenen aktiven Proteinspezies zu einer Ausbeute von 4.5 U/ml/OD<sub>600</sub> Enzymaktivität führen. Darüber hinaus bestätigten die Messungen der intrazellulären Enzymaktivität mit einem Ergebnis von etwa 100 U/ml/OD<sub>600</sub> die Ergebnisse sowohl des Western Blot als auch der nativen PAGE, nach denen es zu einer sehr starken intrazellulären Akkumulation der Pre-CGTase kommt.

### 3.7 Fusion der CGTase mit dem Sec-Signalpeptid und Propeptid der *S. hyicus* Lipase ("Prepro-CGTase")

Da eine Sekretion des sekretorischen Modellproteins CGTase in Fusion mit der Signalsequenz der Lipase alleine nicht möglich ist, wurde nachfolgend untersucht, ob die Lipase-Signalsequenz zusammen mit ihrem dazugehörigen Propeptid eine Sekretion der CGTase vermitteln kann. Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, führte dies auch bereits für das cytosolische Branching Enzyme zu einer erfolgreichen Sekretion. Zur Fusion des reifen Teils der CGTase mit dem Prepro-Anteil der *S. hyicus* Lipase wurde zunächst der für die reife CGTase kodierende Teil des CGTase Strukturgens mit den Primern AV 7 und AV 8 von chromosomaler DNA aus *A. gottschalkii* amplifiziert und über die Schnittstellen *Sna*BI und *Sph*I gegen das Branching Enzyme im Plasmid pXR-ppBE ausgetauscht (s. Abb. 7 und Abb. 12A). Nach Transformation des Plasmids pXR-ppCGT in *S. carnosus* Wildtyp wurden zunächst Expression und Sekretion der Prepro-CGTase untersucht.

#### 3.7.1 Lokalisierung des Prepro-CGTase Fusionsproteins in *S. carnosus*

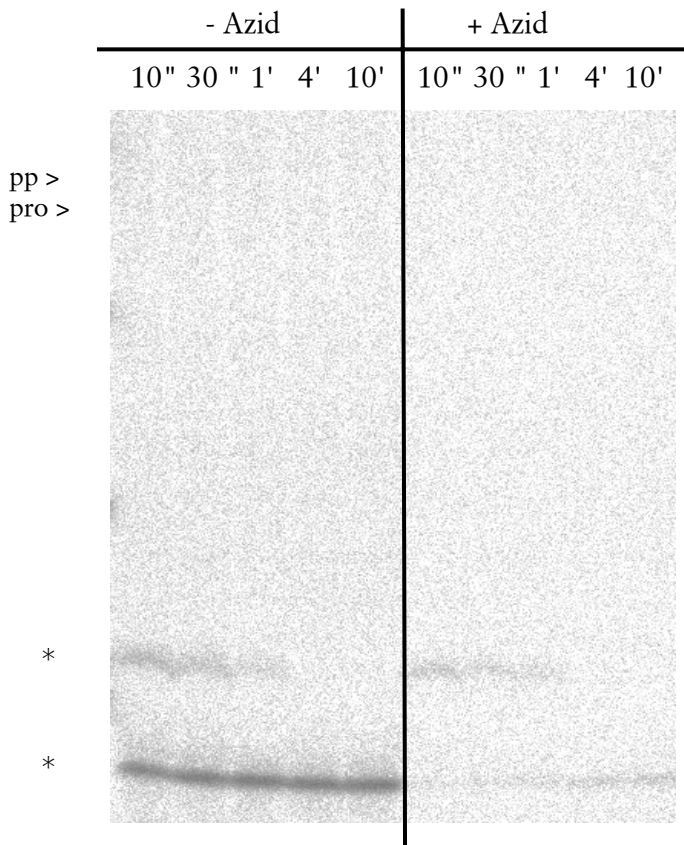
Abbildung 30 B zeigt die im Western Blot untersuchten Zellfraktionen von *S. carnosus* (pXR-ppCGT). Die zusätzliche Anwesenheit des Propeptids der *S. hyicus* Lipase im Prepro-CGTase Fusionsprotein (mit einer Größe von etwa 25 kDa) führt zu einem Vorläuferprotein von ca. 100 kD, das in prozessierter Form eine Größe von 95 kD besitzt. Das Propeptid der Lipase bleibt auch nach der Sekretion mit der CGTase fusioniert, da die in *S. hyicus* für die Abspaltung des Propeptids verantwortliche Protease im Kulturüberstand von *S. carnosus* fehlt. Wie in Abbildung 30 B deutlich zu erkennen ist, führt die Anwesenheit des Propeptides offenbar zu einer höchst effizienten Sekretion der CGTase, da das 100 kDa große Vorläuferprotein gar nicht nachweisbar ist und das gesamte synthetisierte Protein in den Kulturüberstand sekretiert wird. Die Tatsache, dass das gesamte Protein aus der Zelle sekretiert werden kann bedeutet, dass es zumindest zu frühen Zeitpunkten des Sekretionsverlaufs keine sekretionslimitierenden Faktoren gibt, d.h. dass sowohl die Einschleusung des Fusionsproteins in den Exportweg als auch die Translokation über die Membran optimal verlaufen. Auffällig ist jedoch, dass das sekretierte Pro-CGTase Protein (pro) selbst nur einen sehr geringen Anteil am insgesamt sekretierten Protein darstellt, während eine Vielzahl von Abbauprodukten dieses Proteins (\*) im Überstand erkennbar sind. Darunter dominiert ein etwa 40 kDa großes Protein, das in einem sehr großen Überschuss zur intakten Pro-CGTase vorliegt.



**Abb. 30: A. Schematische Darstellung der Prepro-CGTase Genfusion.** Dargestellt ist die Promotor/Operator-Region  $P/O_{xyl}$ , die die Xylose-gesteuerte Expression des Fusionsproteins in *S. carnosus* erlaubt, gefolgt vom 5' untranslatierten Bereich mit Ribosomenbindungsstelle der *S. hyicus* Lipase. Die Signalsequenz der Lipase ist in grau eingezeichnet, das Propeptid in schwarz. Die reife CGTase schließt sich daran an. **B. Proteinverteilung der Prepro-CGTase Genprodukte in *S. carnosus* (pXR-ppCGT).** Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen ist in Kapitel 2.5.2.2 und 2.5.2.3 beschrieben. Die Proben wurden nach ihrer Auftrennung in einem 10 % PA-SDS-Gel im Western Blot mit CGTase-Antiserum sichtbar gemacht. Die in der Zellfraktion (ZF) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 0.5 und die Proteinmenge im Kulturüberstand (ÜS) 1 ml Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 1.5. pro, Pro-CGTase; \*, Abbauprodukte.

### 3.7.2 Die Anwesenheit des Propeptids der Lipase vermittelt eine hoch effiziente Membrantranslokation, kann aber den Abbau der Pro-CGTase durch zellassoziierte Proteasen nicht verhindern

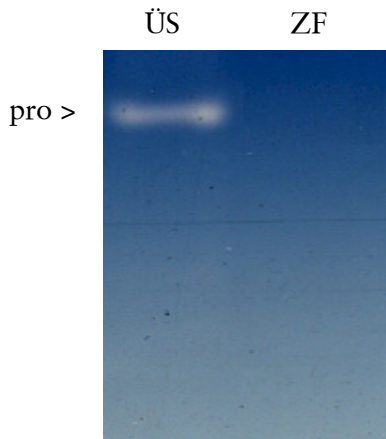
Um die Faktoren näher zu bestimmen, die trotz der scheinbar hoch effizienten Ausschleusung der Pro-CGTase aus der Zelle zu einem solchen Ausbeuteverlust des Hybridproteins führen, wurde zunächst die Prozessierungskinetik des Vorläufers aufgenommen (Abb. 31). Darin ist deutlich zu erkennen, dass die Prozessierung der Prepro-CGTase ausgesprochen schnell verläuft, denn bereits nach 10 Sekunden ist kein Vorläufer mehr nachweisbar. Die prozessierte, reife Form ist allerdings offenbar extrem anfällig für proteolytischen Abbau, da sie ebenfalls zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden kann. Über den Beobachtungszeitraum von 10 Minuten sind nur zwei Abbauprodukte der Pro-CGTase erkennbar, darunter das dominante 40 kDa Protein. Selbst die Zugabe von Azid führt zu keiner nachweisbaren Akkumulation des Vorläufers und erzeugt nur eine schwache Hemmung des proteolytischen Abbaus der Pro-CGTase. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Zugabe von Azid bei *S. carnosus* einen im Vergleich zu *E. coli* und anderen Organismen nur geringen Effekt auf die Prozessierung hat.



**Abb. 31: Prozessierungskinetik des Prepro-CGTase Vorläuferproteins in *S. carnosus* (pXR-ppCGT) in An- oder Abwesenheit des SecA-Inhibitors Azid.** Der Stamm wurde in einem Pulse Chase Experiment mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin für 1 Minute markiert und Proben wurden 10", 30", 1', 4' und 10' nach Zugabe der Chase-Lösung genommen. Azid wurde in einer Konzentration von 20 mM 5' vor der Markierung zugegeben. Die Immunfällung wurde mit CGTase-Antiserum durchgeführt, die isolierten Proteine in einem 10 % PA-SDS-Gel aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht. pp; pro, zu erwartende Positionen der Prepro- bzw. Pro-CGTase; \*, Abbauprodukte.

### 3.7.3 Das in den Kulturüberstand von *S. carnosus* sekretierte Pro-CGTase Fusionsprotein ist enzymatisch aktiv

Um zu untersuchen, ob das in den Überstand gelangte Pro-CGTase Hybridprotein enzymatische Aktivität aufweist, wurde abschließend mit Hilfe der nativen PAGE ein Aktivitätsnachweis durchgeführt. Wie in Abbildung 32 deutlich zu erkennen ist, besitzt dabei von den im Western Blot nachweisbaren Proteinformen nur das 95 kDa große Pro-CGTase Fusionsprotein nachweisbare Aktivität. Im Gegensatz zum Pro-BE Hybridprotein (s. Kapitel 3.2.4) interferiert das am Aminoterminus der reifen CGTase gelegene Propeptid offensichtlich nicht mit dessen Faltung. Im Zellextrakt von *S. carnosus* (pXR-ppCGT) ist dagegen keine aktive CGTase-Form nachweisbar, was sich mit den Ergebnissen der Western Blot-Analyse deckt. Mit Hilfe des Aktivitätstests wurde schließlich die Ausbeute an aktiver Pro-CGTase im Überstand bestimmt. Vor dem Hintergrund des massiven proteolytischen Abbaus der Pro-CGTase ist es erklärlich, dass mit 1.5 U/ml/ OD<sub>600</sub> nur eine sehr geringe Ausbeute an aktivem Protein im Überstand erzielt werden kann.



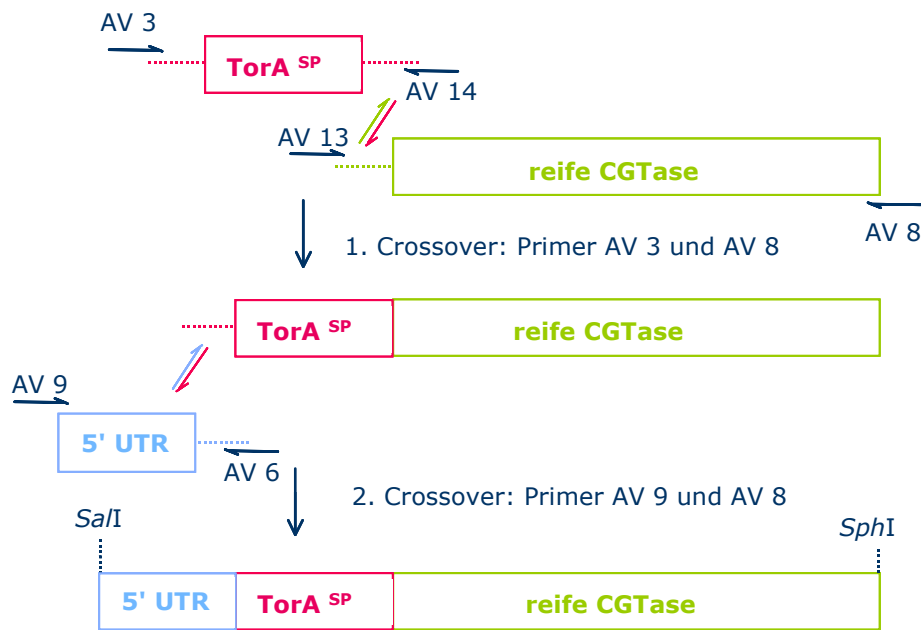
**Abb. 32: Aktivitätsuntersuchung der Prepro-CGTase Genprodukte in *S. carnosus* (pXR-ppCGT) mittels nativer PAGE und Jodstärkereaktion.** Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen sowie der Aktivitätsnachweis sind in Kapitel 2.5.6 beschrieben. Zellextrakt (ZF) und Überstandsfraktion (ÜS) wurden im nativen Zustand in einem nicht-denaturierenden 4-20 % PA-Gradientengel aufgetrennt und das Gel anschließend in einer 1 %igen Stärkelösung inkubiert. Durch aktive CGTase-Formen abgebaute Stärke wurde durch Anfärben des Gels mit Lugolscher Jodlösung sichtbar gemacht. Die in der Zellfraktion (ZF) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.1 und die Proteinmenge im Kulturüberstand (ÜS) 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1. pro, Pro-CGTase.

### 3.8 Tat-abhängige Sekretion des extrazellulären Modellproteins CGTase

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass eine Sec-abhängige Sekretion der CGTase in *S. carnosus* prinzipiell möglich ist. Dabei führt unter den Sec-abhängigen CGTase-Varianten die Sekretion der CGTase in ihrer authentischen Zusammensetzung zur höchsten Ausbeute an aktivem Enzym im Kulturüberstand von *S. carnosus*, obwohl die Sekretionseffizienz der authentischen CGTase durch eine starke intrazelluläre Akkumulation des Vorläuferproteins stark beeinträchtigt wird. Die Fusion der reifen CGTase mit der Signalsequenz der *S. hyicus* Lipase führt dagegen zu keiner Sekretion der CGTase in *S. carnosus*, da das Pre-CGTase Fusionsprotein in aktiver Form intrazellulär akkumuliert. Im Gegensatz dazu führt die Fusion der reifen CGTase mit dem Prepro-Anteil der Lipase zur vollständigen Ausschleusung des gesamten synthetisierten Proteins aus der Zelle, doch das translozierte Pro-CGTase Hybridprotein unterliegt einem massiven Abbau durch zellassoziierte Proteasen, der zu starken Verlusten bei der Ausbeute an aktiver CGTase im Überstand führt. Im Folgenden wurde daher auch für das sekretorische Modellprotein CGTase untersucht, ob eine Tat-abhängige Sekretion eine sinnvolle Alternative zur deren Sec-abhängiger Sekretion in *S. carnosus* darstellt.

#### 3.8.1 Fusion der CGTase mit dem Tat-Signalpeptid der *E. coli* TMAO-Reduktase ("TorA-CGTase")

Zur Fusion der reifen CGTase mit dem Signalpeptid des *E. coli* TorA-Proteins wurde der entsprechende Teil des CGTase Strukturgens von chromosomaler DNA aus *A. gottschalkii* mit den Primern AV 13 und AV 8 amplifiziert und in zwei aufeinander folgenden Crossover PCR-Reaktionen, wie in Abbildung 33 dargestellt, mit dem Genbereich der Signalsequenz von TorA sowie mit dem 5' untranslatierten Bereich der *S. hyicus* Lipase fusioniert. Die daraus resultierende TorA-CGTase Genfusion wurde über die Schnittstellen *Sall* und *SphI* in das Plasmid pXR100 kloniert (s. Abb. 7). Nach Transformation des Plasmids pXR-TorA-CGT in *S. carnosus* Wildtyp wurden zunächst Expression und Sekretion der TorA-CGTase untersucht.

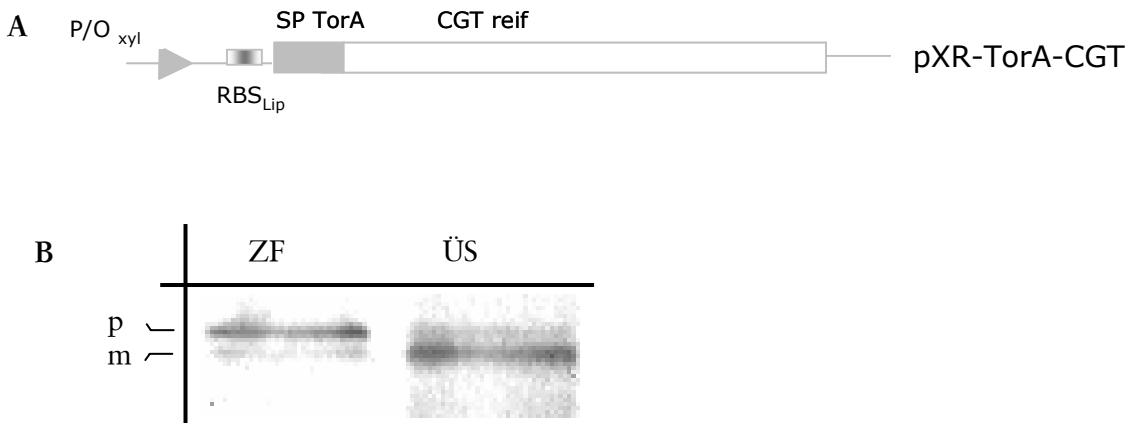


**Abb. 33: Reaktionsschema für die mittels Crossover PCR konstruierte TorA-CGTase Genfusion.** Der für die reife CGTase kodierende Teil des CGTase Strukturgens wurde mit den Primern AV 13 und AV 8 in einer PCR von *A. gottschalkii* chromosomaler DNA amplifiziert und mit einem 5' Überhang versehen, der zum 3' Ende des Genbereichs der TorA-Signalsequenz komplementär ist. Der für die TorA-Signalsequenz kodierende Genbereich wurde vom Plasmid pBluescriptTorA<sup>SP</sup> mit den Primern AV 3 und AV 14 so amplifiziert, dass am 3' Ende ein zum Anfang der reifen CGTase komplementärer Überhang entstand. Am 5' Ende der reifen CGTase wurde ein zum 3' Ende des Lipase untranslatierten Bereichs komplementärer Überhang eingebaut. Im 1. Schritt der Crossover PCR wurden diese beiden PCR-Fragmente mit den Primern AV 3 und AV 8 über ihre komplementären Überhänge miteinander fusioniert. Jedes PCR-Fragment wurde vor dem nächsten Schritt in einem Agarosegel von potentiellen Nebenprodukten getrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und über eine Gelelektrophorese aufgereinigt. Der 5' untranslatierte Bereich der *S. hyicus* Lipase wurde über die Primer AV 9 und AV 6 vom Plasmid pULS183 K2 so amplifiziert, dass am 3' Ende ein zum Anfang des für die TorA-Signalsequenz kodierenden Genabschnitts komplementärer Überhang eingebaut wurde. Im 2. Schritt der Crossover PCR wurden die aus dem 1. Schritt erhaltene Fusion und der 5' UTR-Bereich der Lipase über die Primer AV 9 und AV 8 über ihre komplementären Überhänge miteinander fusioniert. Anschließend wurde die Fusion über die Schnittstellen *SalI* und *SphI* in das Plasmid pXR100 kloniert und nach Sequenzierung in *S. carnosus* Wildtyp transformiert (s. Abb. 7).

### 3.8.2 Lokalisierung der TorA-CGTase Genprodukte in *S. carnosus*

In Abbildung 34 B sind die im Western Blot untersuchten Zellfraktionen von *S. carnosus* (pXR-TorA-CGT) dargestellt. Das TorA-CGTase Vorläuferprotein wird mit einem berechneten Molekulargewicht von rund 80 kDa in *S. carnosus* korrekt exprimiert. Wie in Abbildung 34 B deutlich zu erkennen ist, befindet sich neben der Vorläuferform des Proteins auch eine geringe Menge der reifen Form im Zellextrakt dieses Stammes, wobei das Verhältnis von Vorläufer zu reifem Protein einen deutlichen Überschuss des Vorläufers im Zellextrakt zeigt. Im Kulturüberstand sind diese beiden Proteinformen ebenfalls nachweisbar, jedoch ist hier ihr Verhältnis

zueinander umgekehrt und die Menge des reifen Proteins überwiegt die Menge des Vorläufers. Diese Proteinverteilung zeigt, dass die sekretorische CGTase wie auch das cytosolische Branching Enzyme in Fusion mit dem TorA-Signalpeptid aus *E. coli* erfolgreich in *S. carnosus* sekretiert werden kann. Die Anwesenheit von reifem Protein im Zellextrakt sowie von Vorläuferprotein im Kulturüberstand deutet auf verschiedene sekretionslimitierende Parameter hin, die einerseits zur Rückhaltung des reifen Proteins im Zellextrakt führen. Andererseits deutet der im Überstand befindliche Vorläufer auf eine unter induzierenden Wachstumsbedingungen auftretende partielle Zell-Lyse hin, die zum Austritt eines Teils des Vorläuferproteins führt.

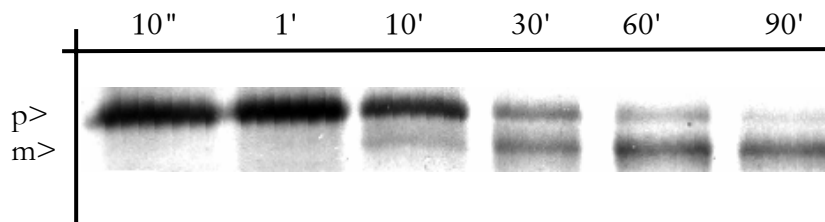


**Abb. 34:** A. Schematische Darstellung der TorA-CGTase Genfusion. Dargestellt ist die Promotor/Operator-Region  $P/O_{xyl}$ , die die Xylose-gesteuerte Expression des Fusionsproteins in *S. carnosus* erlaubt, gefolgt vom 5' untranslatierten Bereich mit Ribosomenbindungsstelle der *S. hyicus* Lipase. Die TorA Signalsequenz (SP TorA) ist in grau eingezeichnet, die reife CGTase schließt sich daran an. B. Proteinverteilung der TorA-CGTase Genprodukte in *S. carnosus* (pXR-TorA-CGT). Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen ist in Kapitel 2.5.2.2 und 2.5.2.3 beschrieben. Die Proben wurden nach ihrer Auftrennung in einem 10 % PA-SDS-Gel im Western Blot mit CGTase-Antiserum sichtbar gemacht. Die in der Zellfraktion (ZF) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 0.2 und die Proteinmenge im Kulturüberstand (ÜS) 1 ml Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 0.75. p, TorA-CGTase Vorläufer; m, reife CGTase.

### 3.8.3 Das TorA-CGTase Fusionsprotein wird mit einer für den Tat-Weg typischen Kinetik über die Plasmamembran von *S. carnosus* transloziert

Um die für die Sekretion der TorA-CGTase limitierenden Faktoren näher zu bestimmen, wurde zunächst die Prozessierungskinetik des TorA-CGTase Hybridproteins im Pulse Chase-Experiment untersucht. In Abbildung 35 ist deutlich zu erkennen, dass das TorA-CGTase Vorläuferprotein innerhalb des Beobachtungszeitraums von 90 Minuten fast vollständig in die reife Form überführt wird. Die Prozessierung des TorA-CGTase Vorläufers findet mit einer für den Tat-Weg typischen Kinetik statt, die sich in charakteristischer Weise von der Kinetik des Sec-Weges unterscheidet. Während bei Sec-Substraten die Prozessierung meist innerhalb von Sekunden abläuft, dauert die Prozessierung von Tat-Substraten wesentlich länger.





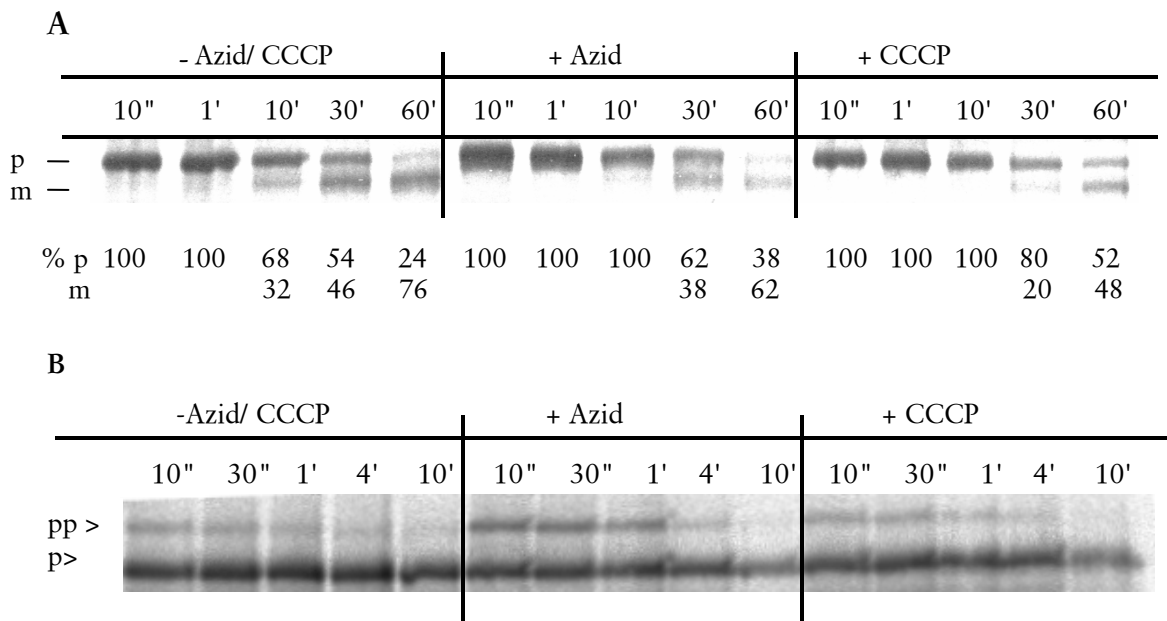
**Abb. 35: Prozessierungskinetik des TorA-CGTase Fusionsproteins in *S. carnosus* (pXR-TorA-CGT).** Der Stamm wurde in einem Pulse Chase-Experiment mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin für 10 Minuten markiert und Proben wurden 10'', 1', 10', 30', 60' und 90' nach Zugabe der Chase-Lösung genommen. Die Immunfällung wurde mit CGTase-Antiserum durchgeführt, die isolierten Proteine in einem 10 % PA-SDS-Gel aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht. p, TorA-CGTase Vorläufer; m, reife CGTase.

Aus der Kinetik geht hervor, dass über einen Zeitraum von 30 Minuten etwa 50 % des insgesamt synthetisierten TorA-CGTase Vorläuferproteins in die reife CGTase-Form prozessiert werden. Obwohl die Prozessierung von Tat-Substraten im Vergleich zu Substraten des Sec-Weges deutlich langsamer ist, verläuft die Umwandlung des TorA-CGTase Vorläufers in die reife CGTase in *S. carnosus* etwas langsamer als bei der Prozessierung bisher bekannter Tat-Substrate beobachtet worden ist. Sowohl in *E. coli* (Cristóbal *et al.*, 1999; Yahr und Wickner, 2001; Blaudeck, 2001) als auch im  $\Delta\text{pH}$ -Weg der Thylakoidenmembran (Mori und Cline, 2002; Dabney-Smith *et al.*, 2003) variiert der Zeitraum, in dem die Umwandlung von 50 % des insgesamt synthetisierten Vorläuferproteins in die reife Form erfolgt, je nach Substrat zwischen 1 und 10 Minuten. Da ein Vergleich mit der Kinetik eines authentischen *S. carnosus* Tat-Substrates nicht möglich ist, kann nicht festgestellt werden, ob der Tat-Weg von *S. carnosus* an sich langsamer ist als in anderen Organismen, oder ob die langsame Membrantranslokation der TorA-CGTase in einer ineffizienten Wechselwirkung zwischen Hybridvorläufer und Translokase begründet liegt.

### 3.8.3.1 Untersuchungen zur Energetik der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *S. carnosus*

Der  $\Delta\text{pH}$ -Weg der Thylakoiden ist im Gegensatz zum Sec-Weg allein von einem intakten Membranpotential abhängig und gegenüber dem ATPase-Inhibitor Azid vollkommen insensitive. Durch die Zugabe des SecA-Inhibitors Azid bzw. des Protonophors CCCP bei der Untersuchung der Proteintranslokation kann so zwischen Substraten des Sec- und des  $\Delta\text{pH}$ -Weges unterschieden werden, da Azid mit großer Effizienz die ATPase-Aktivität des SecA-Proteins und damit den Sec-Exportweg inhibiert. Die Zugabe des Protonophors CCCP blockiert durch die Zerstörung des Membranpotentials dagegen beide Exportwege. Der bakterielle Tat-Weg ist gegenüber Azid ebenfalls zumeist deutlich unempfindlicher, so dass die Zugabe von Azid bei der Untersuchung der Membrantranslokation Hinweise auf den von einem sekretorischen Protein eingeschlagenen Exportweg geben kann. In weiteren Pulse Chase-Experimenten in Gegenwart der genannten Inhibitoren wurde deshalb die Tat-Abhängigkeit der Membrantranslokation des TorA-CGTase Vorläuferproteins untersucht. Aus Abbildung 36 A geht hervor, dass in der Abwesenheit beider Inhibitoren über einen Zeitraum von 30 Minuten fast 50 % des synthetisierten TorA-CGTase Vorläufers in die reife CGTase überführt werden. Betrachtet man die Prozessierung des TorA-CGTase Vorläufers nach Zugabe von Azid, so ist eine Verzögerung der

Prozessierung des TorA-CGTase Vorläufers zu erkennen. Hier liegen nach 30 Minuten noch 62 % des Vorläufers unprozessiert vor. Die Zugabe des Protonophors CCCP bewirkt allerdings eine deutlichere Hemmung des TorA-CGTase Exports. 30 Minuten nach dem Chase liegen noch 80 % des Vorläuferproteins unprozessiert vor. Einschränkend bei diesen Experimenten ist die Tatsache, dass die Wirkung der Inhibitoren Azid und CCCP bei *S. carnosus* deutlich schwächer ist als in vergleichbaren Versuchen in anderen Organismen. Wie in Abbildung 36 B zu erkennen ist, haben die Inhibitoren auf die Prozessierung des Sec-abhängigen Kontrollproteins Prepro-Lipase in *S. carnosus* ebenfalls nur einen schwachen Einfluss.



**Abb. 36: A. Prozessierungskinetik der TorA-CGTase in *S. carnosus* (pXR-TorA-CGT) in An- oder Abwesenheit von Azid bzw. CCCP.** Der Stamm wurde im Pulse Chase-Experiment mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin für 10 Minuten markiert und Proben wurden 10", 1', 10', 30' und 60' nach Zugabe der Chase-Lösung genommen. Azid wurde in einer Konzentration von 20 mM, CCCP in einer Konzentration von 0.5 mM 5' vor der Markierung zugegeben. Die Immunfällung wurde mit CGTase-Antiserum durchgeführt, die isolierten Proteine in einem 10 % PA-SDS-Gel aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht. p, TorA-CGTase Vorläufer; m, reife CGTase. **B. Prozessierungskinetik der Prepro-Lipase in *S. carnosus* (pXR-ppLip) in An- oder Abwesenheit von Azid bzw. CCCP.** Der Stamm wurde mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin für 1 Minute markiert und Proben wurden 10", 30", 1', 4' und 10' nach Zugabe der Chase-Lösung genommen. Azid wurde in einer Konzentration von 20 mM, CCCP in einer Konzentration von 0.5 mM 5' vor der Markierung zugegeben. Die Immunfällung wurde mit einem Lipase-Antiserum durchgeführt und die isolierten Proteine wie unter A weiter aufgearbeitet. pp, Prepro-Lipase Vorläufer; pro, Pro-Lipase.

Die beobachtete Auswirkung der Inhibitoren auf die Prozessierung der TorA-CGTase deckt sich mit den bekannten Eigenschaften des Tat-Weges. Obwohl Azid als spezifischer Inhibitor der ATPase SecA und damit des Sec-Exportweges verwendet wird, kann die Zugabe von Azid je nach Substrat und Organismus einen unterschiedlich starken Einfluss auf den Export von Tat-Substraten haben. So ist der Tat-Weg von *Zymomonas mobilis* als azidsensitiv beschrieben worden (Wiegert *et al.*, 1997). In *E. coli* ist dagegen das nicht-authentische Tat-Substrat TorA-MalE vollkommen insensitiv gegenüber Azid (Blaudeck, 2001), während das authentische Tat-Substrat TorA (TMAO-Reduktase) zu 50 % durch Azid gehemmt wird (Santini *et al.*, 1998). Zur Erklärung der Azidsensitivität des Tat-Weges, an dem SecA nicht nachweislich direkt beteiligt ist, wurde eine

Beeinträchtigung der Sec-abhängigen Membranintegration der Tat-Translokase diskutiert. Auch der in *S. carnosus* beobachtete Einfluss von Azid auf die Prozessierung der TorA-CGTase könnte auf einen indirekten Effekt durch eine Hemmung von SecA und einem beeinträchtigten Einbau von Komponenten des Tat-Apparates in die Membran zurückgeführt werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine noch unbekannt, azidsensitive Komponente an der Tat-abhängigen Proteintranslokation beteiligt ist.

### 3.8.4 Die Prozessierung des TorA-CGTase Fusionsproteins ist sowohl vom Zwillingsarginin-Motiv als auch von der zentralen Translokasekomponente TatC abhängig

Die zwei Argininreste im Konsensusmotiv S/T-R-R-X-F-L-K von Tat-Signalsequenzen spielen eine wichtige Rolle beim Targeting der Substrate an die Tat-Translokase. Mit Hilfe der Tat-abhängigen Reporterproteine TorA-ColV und TorA-MalE wurde gezeigt (Ize *et al.*, 2002a & 2002b; P. Kreutzenbeck, R. Freudl, unveröffentlichte Ergebnisse), dass ein vollständiger Exportblock der Reporterproteine erst bei einem Ladungsverlust bzw. einer Ladungsumkehr an einer der Positionen der zwei Argininreste erreicht wird (s. Kapitel 1.3.1.1). Um zu untersuchen, ob die Membrantranslokation der TorA-CGTase in *S. carnosus* tatsächlich Tat-abhängig ist, wurden im Folgenden deshalb die zwei Argininreste in der TorA-Signalsequenz des TorA-CGTase Fusionsproteins gegen ein Lysin-Glutamin (KQ)-Motiv ausgetauscht (TorA<sup>RR</sup> -> TorA<sup>KQ</sup>-CGTase, s. Abb. 37). In allen bislang untersuchten Tat-Systemen führt außerdem die Deletion von TatC, des putativen Rezeptors der Tat-Translokase, zum Exportblock aller Tat-Substrate. Daher wurde mit Hilfe der TorA-CGTase in einer TatC-Mutante von *S. carnosus* (D. Meissner, R. Freudl, unveröffentlichte Ergebnisse) der Einfluss des *S. carnosus* TatC-Proteins auf die Sekretion der TorA-CGTase untersucht.

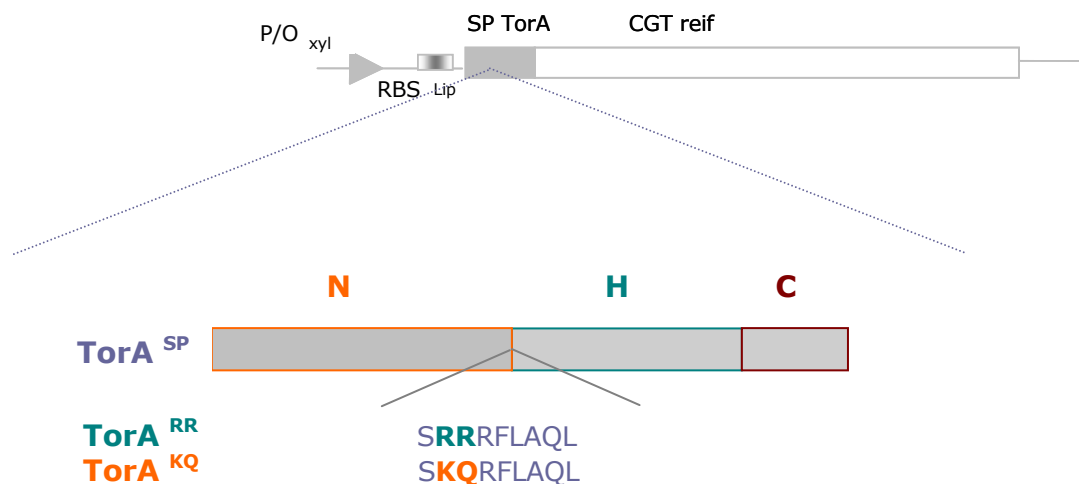
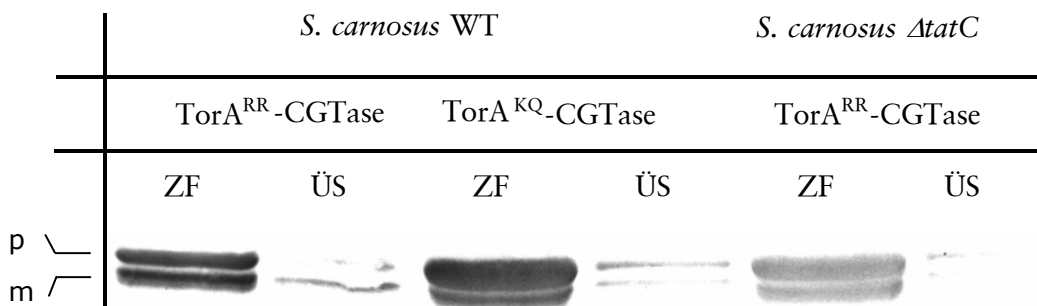


Abb. 37: Schematische Darstellung des TorA Signalpeptids vor und nach Veränderung des Konsensusmotivs. Die TorA<sup>RR</sup> -> TorA<sup>KQ</sup> Mutation wurde im Konsensusmotiv am Übergang der N- zur H-Region der TorA-Signalsequenz vorgenommen. Zur Konstruktion wurde eine Crossover PCR, wie in Abb. 34 dargestellt, durchgeführt. Ausgehend von der TorA-CGTase Genfusion wurden zwei Fragmente amplifiziert: mit den Primern AV 9 und AV 16 wurde der 5' UTR-Bereich der *S. hyicus* Lipase so amplifiziert, dass ein 3' Überhang

mit dem Anfang der veränderten TorA-Signalsequenz, die nun ein KQ-Motiv trug, entstand. Über die Primer AV 15 und AV 8 wurde die TorA-CGT Fusion so amplifiziert, dass am 5' Ende das KQ-Motiv in die Signalsequenz eingebaut wurde. In einer Crossover PCR wurden diese zwei PCR-Fragmente über ihre komplementären (TorA<sup>KQ</sup>) Überhänge miteinander fusioniert und über die Schnittstellen *SalI* und *SplI* in das Plasmid pXR100 kloniert (s. Abb. 7).

In Abbildung 38 sind die im Western Blot untersuchten Fraktionen von *S. carnosus* Wildtyp und  $\Delta$ *tatC* (pXR-TorA<sup>RR</sup>-CGT) und von *S. carnosus* Wildtyp (pXR-TorA<sup>KQ</sup>-CGT) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der TorA<sup>RR</sup>-CGTase Vorläufer sowie die reife CGTase im Zellextrakt des Wildtyps akkumulieren, während im Überstand vorrangig die reife CGTase vorliegt. Betrachtet man dagegen den Zellextrakt von *S. carnosus* Wildtyp (pXR-TorA<sup>KQ</sup>-CGT), bzw. von *S. carnosus*  $\Delta$ *tatC* (pXR-TorA<sup>RR</sup>-CGT), so ist in beiden Fällen eine deutliche Anreicherung von Vorläuferprotein im Zellextrakt festzustellen. Auf Grund der stark erhöhten Proteinmenge kommt es zu einer partiellen Zell-Lyse und zum Austritt geringer Mengen der beiden Proteine in den Kulturüberstand der jeweiligen Stämme. Die geringere Menge des TorA<sup>RR</sup>-CGTase Vorläufers in *S. carnosus* Wildtyp (pXR-TorA<sup>RR</sup>-CGT) ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass dieser beim Targeting an die Translokase in die Nähe einer Protease gelangt und bei zu langsamer Membrantranslokation abgebaut wird (s. Kapitel 4.7.1.).

A



B

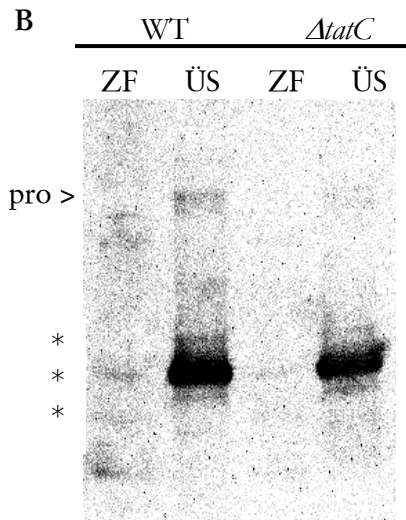
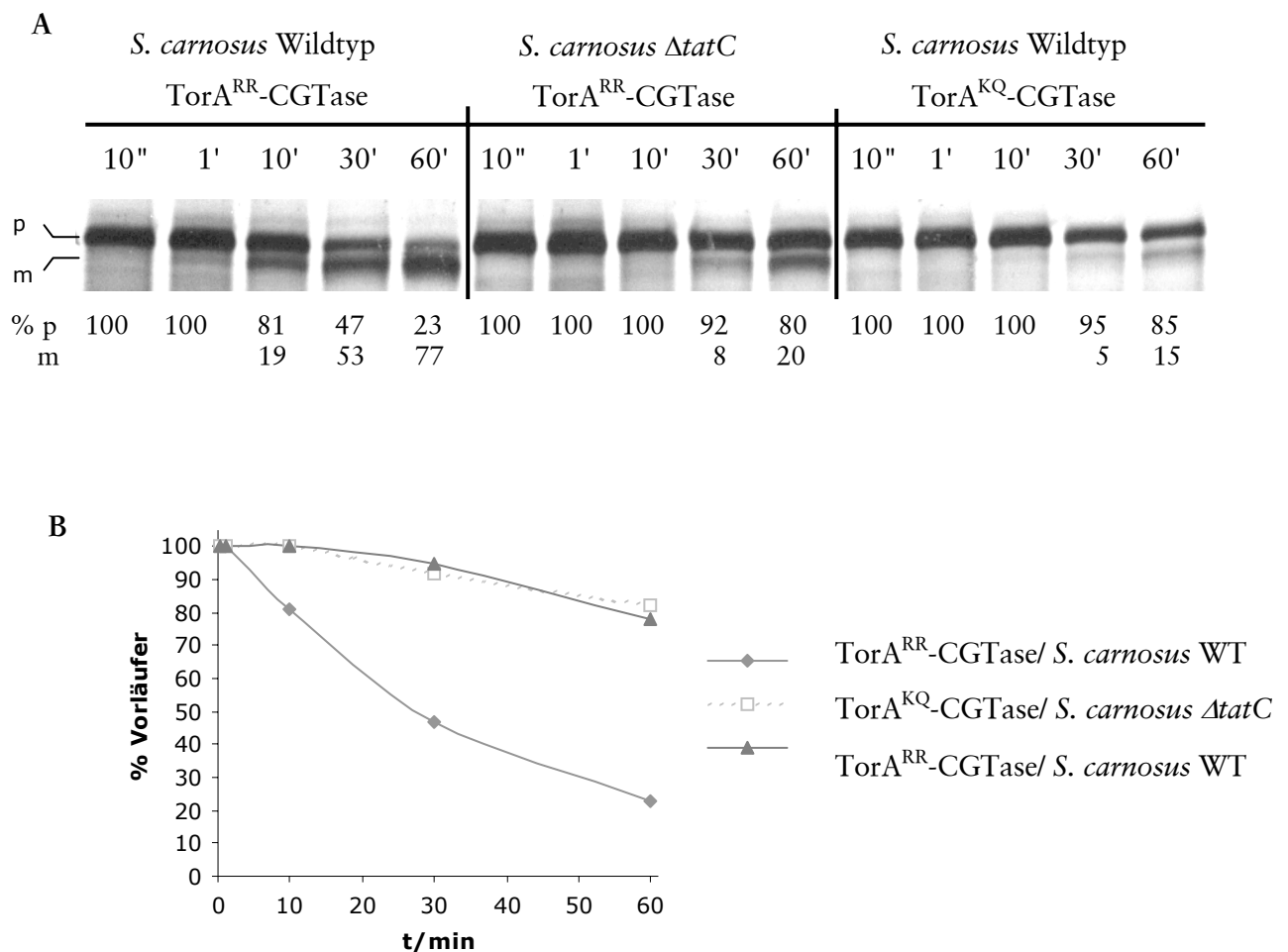


Abb. 38: A. Proteinverteilung der TorA<sup>RR</sup>-CGTase in *S. carnosus* Wildtyp (WT) und  $\Delta$ *tatC*, sowie des TorA<sup>KQ</sup>-CGTase Fusionsproteins in *S. carnosus* Wildtyp. Die im Zellextrakt aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.5, die Proteinmenge im Kulturüberstand 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1.5. Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen ist in Kapitel 2.5.2.2 und 2.5.2.3 beschrieben. Die Proben wurden nach ihrer Auftrennung in einem 10 % PA-SDS-Gel im Western Blot mit CGTase-Antiserum sichtbar gemacht. p, TorA<sup>RR</sup>-CGTase bzw. TorA<sup>KQ</sup>-CGTase Vorläufer; m, reife CGTase. B. Proteinverteilung des Sec-abhängigen Kontrollproteins Prepro-CGTase in *S. carnosus* Wildtyp und  $\Delta$ *tatC*. Aufgetragene Proteinmengen wie unter A beschrieben. pro, Pro-CGTase; \*, Abbauprodukte. Der Export der Sec-abhängigen Prepro-CGTase wird durch die Deletion des *tatC*-Gens nicht beeinflusst.

Nachfolgend wurde im Pulse Chase-Experiment der Einfluss des RR -> KQ Austauschs in der TorA-Signalsequenz sowie die Deletion des TatC-Proteins auf die Prozessierung der TorA-CGTase untersucht. Die Prozessierungskinetik des TorA<sup>KQ</sup>-CGTase Fusionsproteins zeigt im Vergleich zur TorA<sup>RR</sup>-CGTase im *S. carnosus* Wildtyp, dass der RR -> KQ Austausch in der TorA-Signalsequenz eine starke Hemmung der Prozessierung bewirkt (s. Abb. 39). Während beim TorA<sup>RR</sup>-CGTase Fusionsprotein über einen Zeitraum von 60 Minuten 77 % des Vorläufers in die reife CGTase prozessiert werden, findet bei der TorA<sup>KQ</sup>-CGTase Variante im gleichen Zeitraum eine deutlich geringere Abnahme des Vorläufers statt, die vom Auftreten relativ geringer Mengen eines Proteins mit dem Laufverhalten der reifen CGTase begleitet wird. Die Prozessierungskinetik des TorA<sup>KQ</sup>-CGTase Vorläuferproteins belegt, dass der Erkennungsmechanismus von Tat-Substraten, der auf einer spezifischen Wechselwirkung der Translokasekomponenten mit den zwei N-terminalen Argininresten im Konsensusmotiv der Signalsequenz beruht, auch im Tat-Weg von *S. carnosus* konserviert ist.

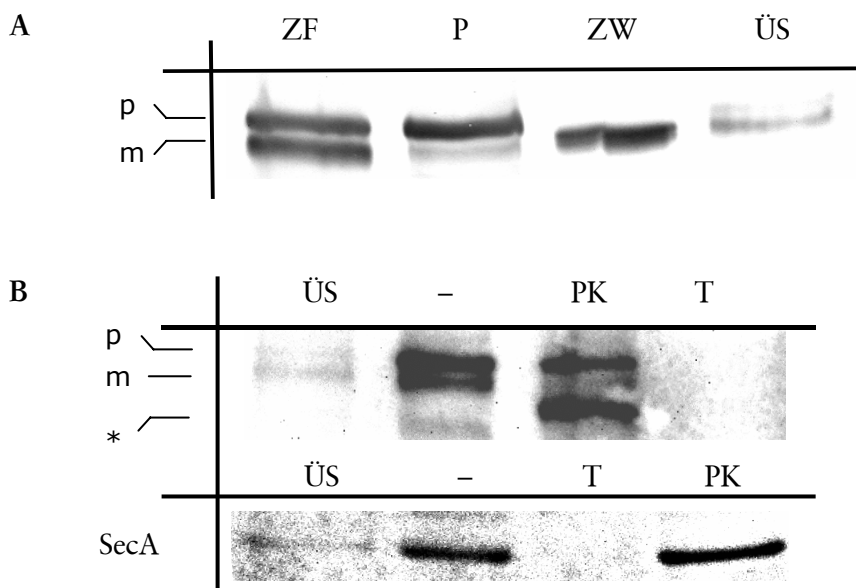


**Abb. 39:** A. Prozessierungskinetik der TorA<sup>RR</sup>-CGTase in *S. carnosus* Wildtyp und  $\Delta$ tatC, sowie des TorA<sup>KQ</sup>-CGTase Fusionsproteins in *S. carnosus* Wildtyp. Die Stämme wurden in einem Pulse Chase-Experiment mit <sup>35</sup>S-Methionin für 10 Minuten markiert und Proben wurden 10'', 1', 10', 30' und 60' nach Zugabe der Chase-Lösung genommen. Die Immunfällung wurde mit CGTase-Antiserum durchgeführt, die isolierten Proteine in einem 10 % PA-SDS-Gel aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht. p, TorA/TorA<sup>KQ</sup>-CGTase Vorläufer, m, reife CGTase. B. Quantitative Darstellung der TorA<sup>RR</sup>-CGTase bzw. TorA<sup>KQ</sup>-CGTase Translokation des in A dargestellten Pulse Chase-Experimentes.

Die Prozessierung des TorA<sup>RR</sup>-CGTase Vorläuferproteins in der TatC-Mutante von *S. carnosus* zeigt, dass das Fehlen des putativen Translokaserezeptors TatC eine ähnlich starke Hemmung der Prozessierung wie der RR -> KQ Austausch in der TorA Signalsequenz bewirkt. 60 Minuten nach dem Chase sind in *S. carnosus* *AtatC* (pXR-TorA<sup>RR</sup>-CGT) noch 80 % des Vorläufers im Vergleich zu 23 % im Wildtyp nachweisbar. Dies beweist, dass die TorA-CGTase tatsächlich über den Tat-Weg von *S. carnosus* in den Kulturüberstand sekretiert wird.

### 3.8.5 Ereignisse sowohl vor als auch nach der Membrantranslokation behindern die Sekretion der TorA-CGTase

Aus den vorangegangenen Ergebnissen geht hervor, dass es bei der Sekretion der TorA-CGTase zu einer Akkumulation von reifem Protein im Zellextrakt von *S. carnosus* kommt (s. Abb. 34). Zur Bestimmung der dafür verantwortlichen Faktoren wurde deshalb die genaue Lokalisierung der zellassozierten Proteine durch Fraktionierung des Zellextraktes in Protoplasten und Zellwandkompartiment untersucht. In Abbildung 40 A ist deutlich zu erkennen, dass das Vorläuferprotein ausschließlich in der Protoplastenfraction lokalisiert ist, während die reife CGTase fast vollständig im Zellwandkompartiment vorliegt.



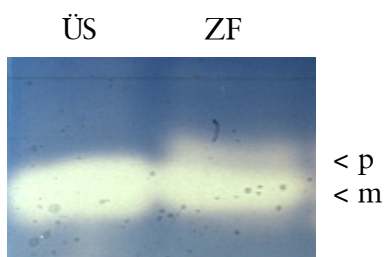
**Abb. 40:** A. Zellfraktionierung von *S. carnosus* (pXR-TorA-CGT) zur Lokalisierung der TorA-CGTase Genprodukte. Die Trennung des Zellextraktes (ZF) in die Protoplastenfraction (P) und das Zellwandkompartiment (ZW) sowie die Aufarbeitung der Proben ist in Kapitel 2.5.2.4 beschrieben. Die im Zellextrakt, der Protoplastenfraction und im Zellwandkompartiment aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.5, die Proteinmenge im Überstand (ÜS) 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1.5. B. Lokalisierung der TorA-CGTase Genprodukte durch Proteinase K- Behandlung von *S. carnosus* (pXR-TorA-CGT) Protoplasten. Der Stamm wurde wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben protoplastiert, jedoch ohne danach eine Trennung der Protoplasten- und Zellwandfraktionen vorzunehmen, und anschließend für 20 Minuten in Gegenwart von 50 µg/ml Proteinase K auf Eis inkubiert (PK). Der Aufschluss der Protoplasten (T) zum Verdau intrazellulär lokalisierter Proteine erfolgte durch Zugabe von Triton X-100 in einer Endkonzentration von 5 %, bevor Proteinase K zugesetzt wurde. (-), ohne Proteinase K oder Triton X-100 behandelte Probe. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie in Kapitel 2.5.2.4 beschrieben. Die für die mit (PK)

bzw. ohne (-) Proteinase K behandelten Protoplasten, sowie für die vor Proteinase K-Verdau durch Triton X-100 aufgeschlossenen Protoplasten (T) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.5, die Proteinmenge im Überstand (ÜS) einer OD<sub>600</sub> von 1.5. Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen ist in Kapitel 2.5.2.2 und 2.5.2.3 beschrieben. Die Proben wurden nach ihrer Auftrennung in einem 10 % PA-SDS-Gel im Western Blot mit CGTase-Antiserum sichtbar gemacht. Die Qualität der Protoplastierung sowie die Wirkung der Proteinase K wurden anhand des cytoplasmatischen Kontrollproteins SecA überprüft. p, TorA-CGTase Vorläufer; m, reife CGTase.

Der Proteinase K-Verdau protoplastierter Zellen (s. Abb. 40 B) beweist, dass das zellassoziierte Vorläuferprotein intrazellulär akkumuliert. Da durch die Fraktionierung (s. Abb. 40 A) bereits gezeigt wurde, dass die reife CGTase im Zellwandkompartiment und damit extracytosolisch lokalisiert ist, ist sie dem Verdau durch Proteinase K zugänglich und wird zu einer kleineren Proteinform abgebaut. Die Anreicherung der reifen CGTase im Zellwandkompartiment ist vermutlich auf die Größe des reifen Proteins zurückzuführen. Die Zellwand Gram-positiver Bakterien stellt eine für Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von bis zu etwa 50 kDa durchlässige Struktur dar (Demchick und Koch, 1996). Viele Sec-abhängige Proteine akkumulieren während ihrer Sekretion jedoch trotz Überschreitung dieses Molekulargewichts nicht in der Zellwand, weil sie offensichtlich in einer mit dem Durchmesser dieser Poren kompatiblen Konformation in den Überstand gelangen. Es ist daher höchst wahrscheinlich, dass die im gefalteten Zustand über die Membran translozierte reife CGTase (mit einem Molekulargewicht von etwa 75 kDa) durch den Siebeffekt der Zellwand im Zellwandkompartiment zurückgehalten wird. Das Peptidoglycan der Zellwand stellt eine sehr dynamische Struktur dar und wird während des Zellwachstums sowie für die Zellteilung ständig neu synthetisiert. Dabei wird altes Peptidoglycan für den Einbau von neu synthetisiertem Material hydrolysiert (Blackman *et al.*, 1998; Foster und Popham, 2002). Da die reife CGTase auf Grund ihrer Konformation nicht durch Diffusion in den Kulturüberstand gelangen kann, kommt es vermutlich nur bei diesem sog. Zellwandturnover zu ihrer Freisetzung aus der Zellhülle. Neben dem sekretionslimitierenden Siebeffekt der Zellwand beeinträchtigen aber auch Ereignisse vor der Membrantranslokation die Sekretion des TorA-CGTase Fusionsproteins. Durch die kontinuierliche Überexpression des TorA-CGTase Vorläuferproteins wird offensichtlich die Exportkapazität der Tat-Translokase von *S. carnosus* durch die Menge des Vorläufers überschritten, was an der starken intrazellulären Akkumulation des Vorläufers deutlich wird. Die Proteinverteilung des cytoplasmatischen Kontrollproteins SecA in den einzelnen Fraktionen belegt, dass SecA in den Kulturüberstand freigesetzt wird. Somit kommt es unter den Bedingungen der Überexpression der TorA-CGTase zu einer partiellen Zell-Lyse von *S. carnosus* (pXR-TorA-CGT), die neben dem Austritt von Vorläuferprotein auch zur Freisetzung von SecA in den Überstand führt.

### 3.8.6 Die Signalsequenz der TMAO-Reduktase vermittelt die Sekretion von aktiver CGTase in den Kulturüberstand von *S. carnosus*

Für Tat-Substrate ist bekannt, dass sie in gefaltetem Zustand über die Membran transloziert werden (Clark und Theg, 1997; Thomas *et al.*, 2001). Daher wurde nachfolgend mit Hilfe des nativen PAGE Aktivitätsnachweises untersucht, ob die TorA<sup>RR</sup>-CGTase in enzymatisch aktiver Form über den Tat-Weg von *S. carnosus* sekretiert wird. In Abbildung 41 ist die Verteilung aktiver Proteinformen in *S. carnosus* (pXR-TorA-CGT) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass im Zellextrakt zwei aktive Proteinformen vorhanden sind, und dass eine große Menge an aktiver CGTase im Kulturüberstand vorliegt. Die kleinere Proteinform im Zellextrakt ist auf Grund des gleichen Laufverhaltens wie die in den Überstand sekretierte CGTase vermutlich der reifen CGTase zuzuordnen. Die Mengen an aktiver reifer CGTase sind sowohl im Zellextrakt als auch im Kulturüberstand etwa gleich. Darüber hinaus übersteigt die Menge der zellassozierten aktiven reifen CGTase die Menge des aktiven TorA-CGTase Vorläufers deutlich. Folglich entfällt ein signifikanter Teil des zellassozierten aktiven Proteins auf die reife CGTase im Zellwandkompartiment. Laut Western Blot (s. Abb. 34) befinden sich, im Gegensatz zum Nachweis der aktiven Proteinformen, im Zellextrakt allerdings etwa gleiche Mengen des Vorläufers und der reifen CGTase. Daraus kann geschlossen werden, dass sich ein signifikanter Teil des TorA-CGTase Vorläuferproteins in einem enzymatisch inaktiven Zustand befindet. Auf Grund der Größe und des Faltungszustandes der reifen CGTase wird eine Diffusion des Proteins durch die Poren der Zellwand in den Kulturüberstand verhindert, so dass es zur Akkumulation von aktiver reifer CGTase im Zellwandkompartiment kommt. Die Menge der Tat-abhängig in den Überstand sekretierten aktiven CGTase wurde mit Hilfe des photometrischen Aktivitätstests quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass in *S. carnosus* (pXR-TorA-CGT) im Vergleich zu den Sec-abhängigen CGTase-Varianten mit 5 U/ml/OD<sub>600</sub> Enzymaktivität die höchste Ausbeute an aktiver CGTase im Kulturüberstand erzielt wurde. Im Zellextrakt dieses Stammes wurden 50 U/ml/OD<sub>600</sub> Enzymaktivität gemessen, wovon ein signifikanter Teil wahrscheinlich auf die extrazelluläre, zellassozierte reife CGTase entfällt.

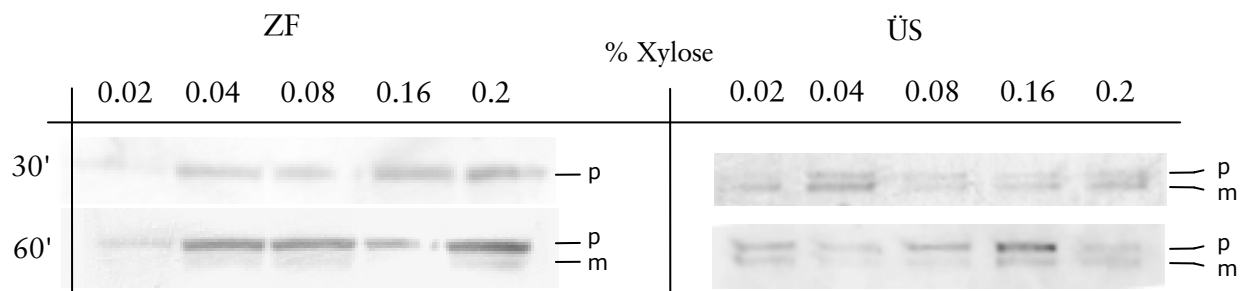


**Abb. 41: Aktivitätsnachweis der TorA-CGTase Genprodukte in *S. carnosus* (pXR-TorA-CGT) mittels nativer PAGE und Jodstärkereaktion.** Die Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen sowie der Aktivitätsnachweis sind in Kapitel 2.5.6 beschrieben. Zellextrakt (ZF) und Überstandsfraction (ÜS) wurden im nativen Zustand in einem nicht-denaturierenden 4-20 % PA-Gradientengel aufgetrennt und das Gel anschließend in einer 1 %igen Stärkelösung inkubiert. Durch aktive CGTase-Formen abgebaute Stärke wurde durch Anfärben des Gels mit Lugolscher Jodlösung sichtbar gemacht. Die in der Zellfraktion (ZF) aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.1 und die Proteinmenge im Kulturüberstand (ÜS) 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1. p, TorA-CGTase Vorläufer; m, reife CGTase.



### 3.8.7 Eine schnelle Sättigung der Tat-Translokase behindert die Sekretionseffizienz des *S. carnosus* Tat-Weges und führt zu einer partiellen Zell-Lyse

Unter den bisher gewählten Expressionsbedingungen der TorA-CGTase (Induktion der Expression mit 0.5 % Xylose über einen Zeitraum von vier Stunden) wurde eine partielle Zell-Lyse von *S. carnosus* (pXR-TorA-CGT) beobachtet (s. Kapitel 3.8.5), die auf einen unter diesen Bedingungen auftretenden Sekretionsstress deutet. Darüber hinaus wurde im vorangegangenen Kapitel gezeigt, dass es neben der intrazellulären Akkumulation großer Mengen des TorA-CGTase Vorläuferproteins auch zu einer starken Anreicherung der reifen CGTase in der Zellhülle kommt. Es wurde daher nachfolgend untersucht, ob diese sekretionslimitierenden Faktoren durch eine Variierung der Expressionsbedingungen der TorA-CGTase reduziert und die Expressionsstärke der TorA-CGTase somit an die Sekretionskapazität des *S. carnosus* Tat-Apparates angepasst werden kann. Hierzu wurden Expression und Sekretion der Tat-abhängigen TorA-CGTase durch Variierung der Xylosekonzentration und nach unterschiedlich langen Induktionszeiten untersucht. Abbildung 42 zeigt die Expression und Sekretion der TorA-CGTase in Abhängigkeit von der Xylosekonzentration sowie der Induktionsdauer. Es ist deutlich zu erkennen, dass im Verlauf der Zeit nach Induktion von 30 bis 60 Minuten eine Akkumulation des Vorläufers (p) im Zellextrakt stattfindet. Die Akkumulation signifikanter Mengen des TorA-CGTase Vorläufers in der Zelle bereits 30 Minuten nach Induktion und bei allen Xylosekonzentrationen über 0.02 % zeigt, dass die synthetisierte Menge an Vorläuferprotein sehr schnell die Exportkapazität der *S. carnosus* Tat-Translokase übersteigt. Darüber hinaus verdeutlicht die zunehmende Akkumulation von reifer CGTase (m) im Zellextrakt, dass das translozierte Protein auf Grund des Siebeffekes der Zellwand nicht in den Kulturüberstand freigesetzt und deshalb in der Zellhülle angereichert wird.



**Abb. 42: Sekretion der TorA-CGTase in *S. carnosus* (pXR-TorA-CGT) in Abhängigkeit der Zeit und Xylosekonzentration bei Wachstum in Vollmedium.** Nach ÜN-Wachstum unter reprimierenden Bedingungen (0.5 % Glucose) wurde der Stamm auf eine OD<sub>600</sub> von 0.5 überimpft und mit Xylosekonzentrationen von 0.02 bis 0.2 % induziert. Proben wurden 30' und 60' nach Induktion genommen und die Zellfraktionen wie in Kapitel 2.5.2.2 und 2.5.2.3 beschrieben aufgearbeitet. Die Proben wurden nach ihrer Auftrennung in einem 10 % PA-SDS-Gel im Western Blot mit CGTase-Antiserum sichtbar gemacht. Die in beiden Fraktionen aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.5. p, TorA-CGTase Vorläufer; m, reife CGTase.

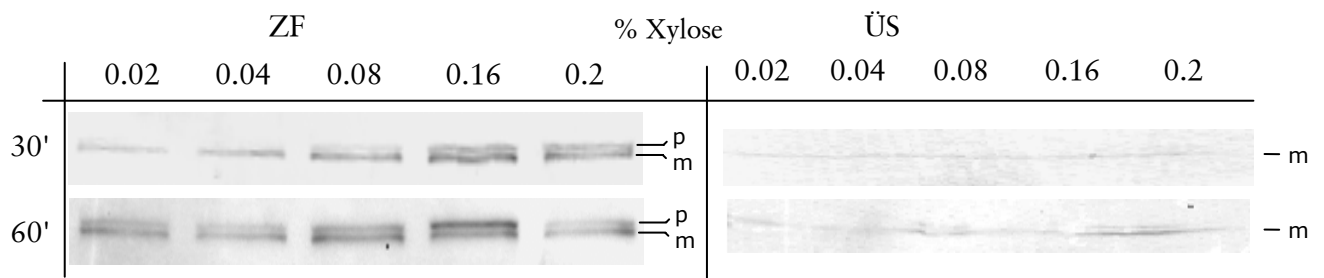
Die im Kulturüberstand insgesamt befindliche Proteinmenge ist offenbar unabhängig von der gewählten Xylosekonzentration, da sie im Verlauf der Zeit nach Induktion nicht ansteigt. Zu allen Zeitpunkten sind im Überstand sowohl die reife CGTase als auch das Vorläuferprotein nachweisbar. Interessanterweise ist jedoch nur bei einer Konzentration von 0.02 % Xylose im Zeitraum bis 30 Minuten nach Induktion ausschließlich reifes Protein im Kulturüberstand vorhanden. Nach 60 Minuten findet sich auch in diesem Fall Vorläuferprotein im Überstand. Die nach 30 Minuten bei allen anderen Xylosekonzentrationen beobachtete Sättigung der Tat-Translokase führt demnach zu einer partiellen Zell-Lyse und damit zum Austritt von Vorläuferprotein in den Überstand von *S. carnosus*.

### 3.8.8 Die Zellwand stellt ein zentrales Hindernis für die Sekretion von gefalteten Proteinen dar

Da in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt wurde, dass bei Wachstum von *S. carnosus* (pXR-TorA-CGT) in Vollmedium (LB) selbst bei geringen Konzentrationen des Induktors Xylose und kurzen Expressionszeiten eine partielle Zell-Lyse auftritt, wurde nachfolgend untersucht, ob ein verringertes Expressionsniveau bei verlangsamtem Wachstum dieses *S. carnosus* Stammes in Minimalmedium zu einer Verbesserung der Sekretionseffizienz der TorA-CGTase führt. Tatsächlich wird das TorA-CGTase Fusionsprotein unter diesen Bedingungen deutlich geringer exprimiert als bei Wachstum von *S. carnosus* (pXR-TorA-CGT) in Vollmedium (nicht gezeigt). In Abbildung 43 ist zu erkennen, dass im Verlauf der Zeit nach Induktion bei niedrigen Xylosekonzentrationen von 0.02 bis 0.08 % eine intrazelluläre Akkumulation des Vorläufers deutlich später auftritt als bei Wachstum in Vollmedium, wo der Vorläufer bereits ab 0.04 % Xylose in signifikanten Mengen akkumuliert (s. Abb. 42). Bis zu einer Konzentration von 0.04 % Xylose bei 30 Minuten Induktion in Minimalmedium ist ausschließlich reifes Protein im Zellextrakt zu erkennen, und bei Konzentrationen darüber (0.08 bis 0.2 %) treten nur geringfügige Mengen des Vorläufers auf (s. Abb. 44). Hierbei überwiegt die Menge der reifen CGTase deutlich. Während es zur Akkumulation größerer Mengen des Vorläufers im Zellextrakt ab einer Konzentration von 0.04 % Xylose und 60 Minuten Induktion kommt, überschreitet die Vorläufermenge den Anteil der reifen CGTase erst ab einer Xylosekonzentration von 0.16 %. Die Sättigung der Tat-Translokase wird bei Wachstum dieses *S. carnosus* Stammes in Minimalmedium demnach erst 60 Minuten nach Induktion der TorA-CGTase Expression bei einer Xylosekonzentration von 0.16 % erreicht. Im Gegensatz dazu tritt eine Sättigung bei Wachstum in Vollmedium bereits ab einer Xylosekonzentration von 0.04 % bei 30 Minuten Induktion auf. Der Befund, dass über einen Zeitraum von 60 Minuten bis zu einer Xylosekonzentration von 0.16 % vor allem reife und damit über die Membran translozierte CGTase im Zellextrakt auftritt, verdeutlicht die zentrale Rolle, die das Mengenverhältnis von Vorläuferprotein zu Tat-Translokase bei der Sekretionseffizienz der TorA-CGTase in *S. carnosus* spielt.

Allerdings fällt auch bei Wachstum von *S. carnosus* (pXR-TorA-CGT) und Expression der TorA-CGTase in Minimalmedium auf, dass die Menge des im Überstand befindlichen Proteins bei allen Xylosekonzentration kaum variiert und im Verlauf der Zeit nach Induktion nicht wesentlich ansteigt. Dafür scheint die Akkumulation von reifer CGTase in der Zellhülle verantwortlich zu sein, die auf Grund des Siebeffektes der Zellwand am Austritt in den Überstand gehindert wird. Beim langsameren Wachstum des

*S. carnosus* Stammes in Minimalmedium ist auch der Turnover von Zellwandmaterial geringer und stellt unter diesen Bedingungen den hauptsächlichen Engpass in der Sekretion der TorA-CGTase dar, die sehr wahrscheinlich erst bei Zellwandturnover in den Überstand freigesetzt werden kann. Interessanterweise stellt das in den Überstand freigesetzte Protein unter diesen Wachstumsbedingungen ausschließlich die reife CGTase dar. Offenbar wird durch das geringere Expressionsniveau des Proteins, das eine reduzierte intrazelluläre Akkumulation des TorA-CGTase Vorläufers und Anreicherung von reifer CGTase in der Zellhülle zur Folge hat, der zuvor beobachtete Sekretionsstress begleitet von partieller Zell-Lyse vermieden.



**Abb. 43: Sekretion der TorA-CGTase in *S. carnosus* (pXR-TorA-CGT) in Abhängigkeit der Zeit und Xylosekonzentration bei Wachstum in Minimalmedium.** Nach ÜN-Wachstum unter reprimierenden Bedingungen (0.5% Glucose) wurde der Stamm mit einer  $OD_{600}$  von 0.5 überimpft und mit Xylosekonzentrationen von 0.02 bis 0.2 % induziert. Proben wurden 30' und 60' nach Induktion genommen und die Zellfraktionen wie in Kapitel 2.5.2.2 und 2.5.2.3 beschrieben aufgearbeitet. Die Proben wurden nach ihrer Auftrennung in einem 10 % PA-SDS-Gel im Western Blot mit CGTase-Antiserum sichtbar gemacht. Die in beiden Fraktionen aufgetragene Proteinmenge entspricht 1 ml Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 0.5. p, TorA-CGTase Vorläufer; m, reife CGTase.

### 3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse zur sekretorischen Expression der CGTase in *S. carnosus*

Es konnte gezeigt werden, dass eine Sec-abhängige sekretorische Gewinnung des sekretorischen Modellproteins CGTase in seiner authentischen Zusammensetzung zur höchsten Ausbeute (3 U/ml/ $OD_{600}$ ) an aktivem Enzym im Kulturüberstand von *S. carnosus* führt, obwohl die Sekretion der authentischen CGTase durch die intrazelluläre Akkumulation von Vorläuferprotein stark eingeschränkt wird. Im Gegensatz dazu wird ein Fusionsprotein aus Lipase-Signalsequenz und reifer CGTase in *S. carnosus* nicht sekretiert, was eine Akkumulation des Vorläufers in aktiver Form im Cytoplasma zur Folge hat. Auf Grund einer partiellen Zell-Lyse kommt es zum Austritt eines Teils des aktiven Vorläuferproteins in den Überstand mit einer Ausbeute von 4.5 U/ml/ $OD_{600}$  Enzymaktivität. Die Fusion der reifen CGTase mit dem Prepro-Anteil der Lipase führt zu einer höchst effizienten Sekretion, ist aber für eine Gewinnung der CGTase ebenfalls nicht geeignet, da das Hybridprotein Pro-CGTase einem massiven Abbau durch zellassoziierte Proteasen unterliegt. Dennoch konnte eine Ausbeute von 1.5 U/ml/ $OD_{600}$  des aktiven Hybridproteins im Kulturüberstand von *S. carnosus* erzielt werden. Interessanterweise wird mit einer Tat-abhängigen Sekretion im Vergleich zu den Sec-abhängigen CGTase-Varianten mit 5 U/ml/ $OD_{600}$  die höchste Ausbeute an aktivem Enzym im Kulturüberstand erzielt. Eine Sekretion der CGTase über den Tat-Weg stellt demnach, wie auch im Falle des cytosolischen Modellproteins

Branching Enzyme, die Methode der Wahl zur Gewinnung der CGTase dar. Eine Untersuchung der Faktoren, die für die Sekretion der TorA-CGTase limitierend sind, zeigte, dass eine große Menge der reifen CGTase zwar aus der Zelle ausgeschleust wird, aber auf Grund des Siebeffektes der Zellwand in aktiver Form in der Zellhülle akkumuliert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Tat-Translokase von *S. carnosus* selbst bei sehr geringer Expression des TorA-CGTase Vorläuferproteins schnell gesättigt wird. Als Folge dessen kommt es zu einer starken intrazellulären Akkumulation des Vorläuferproteins. Mit Hilfe des TorA-CGTase Fusionsproteins wurde gezeigt, dass Erkennungsmechanismus der Tat-Translokase auch in *S. carnosus* konserviert ist, da der mit dem Austausch der zwei Argininreste im Konsensusmotiv der TorA-Signalsequenz verbundene Ladungsverlust die Prozessierung der TorA-CGTase sehr stark hemmt. Darüber hinaus erzeugt die Deletion des putativen Translokaserezeptors TatC ebenfalls eine starke Hemmung der TorA-CGTase Prozessierung, was beweist, dass TatC auch im Tat-Weg von *S. carnosus* eine zentrale Rolle spielt.

## 4. Diskussion

### Sekretorische Gewinnung von Extremozymen im mesophilen Wirt *Staphylococcus carnosus*

Für die sekretorische Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien stehen prinzipiell zwei Exportwege zur Verfügung. Dabei handelt es sich um den allgemeinen Sec-Weg, der bereits seit langem für die Sekretion heterologer Proteine in Gram-positiven Wirten wie *B. subtilis*, *L. lactis* und *S. carnosus* verwendet wird, und den erst kürzlich entdeckten Tat-Weg. Hauptmerkmal des Sec-Weges ist der Export von Proteinen in ungefalteter Form, die durch exportspezifische Chaperone im Cytosol gewährleistet werden muss. Hierbei kann es häufig zu Beeinträchtigungen in der Sekretion kommen, da heterologe Proteine nicht an Wechselwirkungen mit exportspezifischen Chaperonen und Komponenten der Sec-Translokase adaptiert sind. Darüber hinaus kann es u.a. oft auf Grund einer ineffizienten Faltung heterologer Proteine auf der *trans*-Seite der Membran zu einem Abbau durch Proteasen des extracytosolischen Qualitätskontrollsystems kommen (Meens *et al.*, 1997; Stephenson *et al.*, 1998; Stephenson und Harwood, 1998; Bolhuis *et al.*, 1999). Für die Faltung von Proteinen auf der *trans*-Seite der Membran stehen die Faltungsfaktoren PrsA, eine PPIase, sowie in einigen Organismen BdbB/C, welche die Ausbildung von Disulfidbrücken katalysieren, zur Verfügung. Bei der Sekretion heterologer Proteine kann die Menge dieser Faltungsfaktoren limitierend werden, bzw. können diese Faltungsfaktoren häufig eine korrekte Faltung heterologer Proteine nicht vermitteln (Stephenson *et al.*, 1998; Bolhuis *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2003), so dass die translozierten Proteine anfällig für proteolytischen Abbau in der Zellhülle werden. Die zentrale Eigenschaft des Tat-Weges ist der Export von Proteinen, die ihre native Konformation bereits im Cytosol einnehmen. Prinzipiell ist gezeigt worden, dass auch über den Tat-Weg heterologe Substrate über die Membran transloziert werden können. So wird das aus der Qualle *Aequoria victoria* stammende GFP-Protein in aktiver Form über den Tat-Weg ins Periplasma von *E. coli* exportiert, das beim Export über den Sec-Weg in inaktiver Form im Periplasma akkumuliert (Thomas *et al.*, 2001). Auch komplexe Antikörperfragmente können in aktiver Konformation Tat-abhängig über die Plasmamembran von *E. coli* exportiert werden (DeLisa *et al.*, 2003). Damit eröffnet der Tat-Weg zum ersten Mal die Möglichkeit, solche Proteine in Bakterien sekretorisch zu gewinnen, die mit einer Sekretion über den Sec-Weg bislang nicht oder mit nur geringer Effizienz produziert werden können. Prinzipiell können auch in Gram-positiven Bakterien heterologe Proteine über den Tat-Weg sekretiert werden (Schaerlaekens *et al.*, 2001; R. Freudl, unveröffentl. Ergebnisse). Für die sekretorische Proteingewinnung in Gram-positiven Wirten wurde bislang jedoch ausschließlich der allgemeine Sec-Proteinexportweg verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der Wirt *S. carnosus* einen funktionellen Tat-Weg besitzt, der für die Sekretion heterologer Proteine genutzt werden kann. Darüber hinaus wurden Expressionssysteme für die sekretorische Gewinnung von Extremozymen des thermoalkaliphilen Bakteriums *Anaerobranca gottschalkii* in *S. carnosus* etabliert. Durch vergleichende Analysen der Sekretion des intrazellulären Branching Enzyme sowie der extrazellulären CGTase über den Sec- und den Tat-Weg von *S. carnosus* wurde untersucht, ob der Tat-Weg generell zur sekretorischen Gewinnung heterologer Proteine in einem Gram-positiven Wirt genutzt werden kann.

#### 4.1 Das Pre-BE Fusionsprotein wird in *S. carnosus* nicht prozessiert und akkumuliert intrazellulär in aktiver Form

Das Exportverhalten des Fusionsproteins aus Lipase-Signalsequenz und Branching Enzyme Pre-BE wurde sowohl durch subzelluläre Lokalisierung als auch durch Untersuchung der Prozessierung, d.h. Abspaltung der Signalsequenz, in *S. carnosus* analysiert. In Pulse Chase-Experimenten wurde gezeigt, dass das Pre-BE Vorläuferprotein in *S. carnosus* über einen Zeitraum von 10 Minuten nicht prozessiert wird (s. Abb. 9). Da bei Sec-abhängigen Exportproteinen die Prozessierung schon innerhalb weniger Sekunden abgeschlossen ist, wurde deshalb durch Lokalisierung der Pre-BE Genprodukte in *S. carnosus* untersucht, warum eine Prozessierung des Pre-BE-Vorläufers ausbleibt. Zum Einen kann eine ausbleibende Prozessierung auf eine Membranverankerung des Vorläufers über dessen Signalsequenz zurückzuführen sein. Wenn die Signalpeptidase nicht in der Lage ist, die Signalsequenz des Vorläuferproteins abzuspalten, weil die Signalpeptidase-Schnittstelle der Signalsequenz dem Enzym nicht optimal zugänglich ist, bleibt das Vorläuferprotein so in der Membran verankert, dass der reife Teil des Proteins auf der *trans*-Seite der Membran exponiert ist. Zum Anderen kann die ausbleibende Prozessierung aber auch unproduktiven Wechselwirkungen des Vorläufers mit Komponenten des Sec-Weges zuzuschreiben sein, die eine Einschleusung des Vorläuferproteins in den Sec-Weg verhindern.

Die Lokalisierung der Pre-BE Genprodukte in *S. carnosus* lässt einerseits den Schluss zu, dass eine ausbleibende Prozessierung des Pre-BE Vorläuferproteins darauf zurückzuführen ist, dass das Pre-BE Fusionsprotein intrazellulär akkumuliert und damit kein Substrat für die Sec-Translokase von *S. carnosus* darstellt (s. Abb. 10). Andererseits könnten aber auch unproduktive Wechselwirkungen des Pre-BE Vorläufers mit Komponenten der Sec-Translokase, die nicht zu einer Einschleusung des Vorläuferproteins in die Translokase führen, für die intrazelluläre Akkumulation des Vorläufers verantwortlich sein. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass eine signifikante Menge des Pre-BE Vorläufers durch eine partielle Zell-Lyse in den Kulturüberstand austritt. Ein Protein mit der Größe des reifen Branching Enzyme konnte in keiner Fraktion von *S. carnosus* (pXR-pBE) identifiziert werden. Der Nachweis aktiver Pre-BE Genprodukte mit Hilfe der nativen PAGE zeigte, dass sich das intrazellulär akkumulierte Vorläuferprotein, das durch eine partielle Zell-Lyse teilweise in den Kulturüberstand austritt, in einer aktiven Konformation befindet (s. Abb. 11). Die im Western Blot sowohl im Zellextrakt als auch im Kulturüberstand nachweisbare Menge an Pre-BE Vorläuferprotein liegt deutlich über der Menge der TorA-BE Genprodukte von *S. carnosus* (pXR-TorA-BE) (Vgl. Abb. 10 und 16). Dennoch ist für das Pre-BE Vorläuferprotein im Überstand von *S. carnosus* (pXR-pBE) eine geringere Menge Enzymaktivität messbar, als für das reife Branching Enzyme im Überstand von *S. carnosus* (pXR-TorA-BE). Die Menge des aktiven reifen Branching Enzyme im Überstand von *S. carnosus* (pXR-TorA-BE) ist dabei so gering, dass sie unter der Nachweisgrenze der Western Blot-Methode liegt. Folglich befindet sich ein signifikanter Teil des durch Zell-Lyse in den Überstand ausgetretenen Pre-BE Vorläufers in einem enzymatisch inaktiven Zustand. Im Zellextrakt von *S. carnosus* (pXR-pBE) wird zwar die gleiche Enzymaktivität gemessen wie in *S. carnosus* (pXR-TorA-BE), doch befindet sich auch in diesem Fall eine größere Menge des Pre-BE Vorläuferproteins im Zellextrakt als im Falle des TorA-BE Vorläufers in *S. carnosus* (pXR-TorA-BE). Demnach kommt es nur bei einem Teil des insgesamt synthetisierten Pre-BE Vorläuferproteins

zu einer Faltung im Cytosol, während eine signifikante Menge in einem falsch gefalteten und möglicherweise aggregierten Zustand vorliegt.

Eine schnelle Einschleusung in den Sec-Weg ist deshalb wichtig, weil Sec-abhängige Exportproteine im ungefalteten Zustand über die Membran geschleust werden und ihre vorzeitige Faltung bzw. Aggregation in eine exportinkompetente Form verhindert werden muss. Beim Targeting von Exportproteinen in den Exportweg spielt das sog. *kinetic partitioning* des Vorläuferproteins zwischen seiner intrinsischen Faltungstendenz und seiner Wechselwirkung mit Chaperonen des Exportweges, die seine Faltung verhindern und es an die Translokase leiten, eine zentrale Rolle (Randall und Hardy, 2002). Bei einem ausbleibenden oder ineffizienten Targeting des Vorläufers an die Translokase kann es zur Faltung bzw. Aggregation des Vorläufers im Cytosol kommen. Das exportspezifische Chaperon SRP, das in Gram-positiven Bakterien für das Targeting von Exportproteinen an die Sec-Translokase verantwortlich ist, bindet kotranslational an Signalsequenzen. Da dies erst bei einer Länge der naszierenden Polypeptidkette zwischen 70 und 150 Aminosäuren geschieht (Fekkes und Driessen, 1999), wäre es denkbar, dass die Faltungstendenz des naszierenden Branching Enzyme eine Wegfaltung der Signalsequenz verursacht und eine Wechselwirkung mit dem exportspezifischen Chaperon SRP bereits während der Proteinsynthese verhindert. Ein Targeting des Pre-BE Fusionsproteins an die Sec-Translokase könnte demnach nicht mehr stattfinden.

Im Gegensatz zum eukaryotischen SRP-Protein verursacht das Signal recognition particle (SRP) in Bakterien keine an das Targeting des Vorläufers gekoppelte Unterbrechung der Translation. Diese Unterbrechung trägt zum korrekten Targeting von Vorläufern an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) bei, da verhindert wird, dass signifikante Teile der Vorläufer exportinkompetente Strukturen einnehmen können. Bei der Translokation von Vorläuferproteinen über die ER-Membran wird die Translation des Vorläufers erst dann fortgesetzt, wenn eine Wechselwirkung des Komplexes aus Ribosom und naszierendem Polypeptid (ribosome nascent chain complex, RNC) mit der Translokase stattgefunden hat. Während der Translokation bleibt das Ribosom mit der Translokase assoziiert. Das bakterielle SRP übergibt dagegen den RNC-Komplex bei fortlaufender Translation *via* den SRP-Rezeptor FtsY (in Gram-positiven Bakterien wird das FtsY-Homolog als *Srb* bezeichnet) an das SecA-Protein der Sec-Translokase, wobei die Signalsequenz Wechselwirkungen mit SecA eingeht. Sind diese Wechselwirkungen produktiv, so kommt es zur Initiation der Translokation und zum Einschleusen des Vorläuferproteins in die Sec-Translokase. Aus dem Umstand, dass die Synthese des Vorläuferproteins während dieser Wechselwirkungen andauert, wird ersichtlich, dass das Zeitfenster, in dem produktive Wechselwirkungen zwischen dem Vorläuferprotein und SecA und die Einleitung der Membrantranslokation stattfinden können, nur kurz ist, bevor der nachgeschaltete reife Teil des Vorläufers zu falten beginnt.

In vielen Arbeiten wurde gezeigt, dass heterologe Proteine grundsätzlich in präziser Fusion mit einem Sec-Signalpeptid sekretiert werden können. In einer präzisen Fusion einer Signalsequenz mit einem Fremdprotein wird der C-Terminus der Signalsequenz unmittelbar mit dem N-Terminus des reifen Teils, ohne eine zwischen beiden Teilen liegende Linkersequenz, fusioniert. So ist z.B. die Signalsequenz des Proteins OmpA in der Lage, den Export der *E. coli*  $\beta$ -Lactamase oder der Nuclease NucA aus *S. aureus* über die

Plasmamembran von *E. coli* zu vermitteln (Takahara, 1985; Bolla, 1987). Das NucA-Enzym ist in *Lactococcus lactis* mit unterschiedlichen Signalsequenzen ebenfalls erfolgreich sekretiert worden (Le Loir *et al.*, 2001, Ravn *et al.*, 2003). Auch präzise Fusionen der Signalsequenz der *S. hyicus* Lipase mit heterologen Proteinen sind für eine sekretorische Proteingewinnung in *S. carnosus* prinzipiell geeignet (Samuelson *et al.*, 1999). Andererseits gibt es auch viele Beispiele die zeigen, dass eine präzise Fusion von Signalsequenzen mit heterologen Proteinen nicht in jedem Fall zu einer erfolgreichen Sekretion führt. Während eine OmpA-NucA Fusion in *E. coli* sowohl mit als auch ohne einer zwischen OmpA-Signalsequenz und reifem NucA geschalteten 11 Aminosäuren langen Linkersequenz exportiert wird (Takahara *et al.*, 1985), ist der Export des cytoplasmatischen Proteins Triosephosphatisomerase aus Huhn mit der Signalsequenz der *E. coli*  $\beta$ -Lactamase auf die Anwesenheit mindestens der ersten drei Aminosäuren des reifen Teils der  $\beta$ -Lactamase angewiesen (Summers und Knowles, 1989). Die Sekretionseffizienz des Bla-Triosephosphatisomerase Fusionsproteins steigt mit der Anzahl der eingefügten Reste des reifen Teils der  $\beta$ -Lactamase, wobei ein Maximum beim Einfügen der ersten 12 Aminosäuren erzielt wird. Die genannten Befunde beruhen darauf, dass Signalsequenzen zusammen mit dem frühen reifen Teil (den ersten 30 Aminosäuren) einen auf die jeweiligen Eigenschaften des gesamten reifen Teils individuell abgestimmten Bereich bilden, der als "Export initiation domain" bezeichnet wird, und eine optimale Wechselwirkung des Vorläufers mit den Komponenten der Translokase garantiert (Andersson und von Heijne, 1991). Signalsequenzen besitzen dabei keine generischen Eigenschaften, die sich auf jedes nachfolgende Protein gleich auswirken (Kim *et al.*, 2002). Dies wird besonders am Beispiel des Exports einer humanen UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) mit verschiedenen Signalsequenzen in *E. coli* deutlich. Während eine präzise Fusion der PelB-Signalsequenz mit dem UGT-Protein den Export der UDP-Glucuronosyltransferase vermitteln kann, kann eine präzise Fusion aus OmpT-Signalsequenz und UGT nur dann einen Export vermitteln, wenn die ersten zwei Aminosäuren der reifen UDP-Glucuronosyltransferase verändert werden (Ouzzine *et al.*, 1994).

Die Tatsache, dass es zu einer Faltung eines erheblichen Teils des synthetisierten Pre-BE Vorläuferproteins in der Zelle kommt lässt, zusammen mit der ausbleibenden Prozessierung des Vorläufers, einerseits den Schluss zu, dass eine zu starke Faltungstendenz des cytosolischen Modellproteins Branching Enzyme tatsächlich eine vorzeitige Faltung eines Teils des Fusionsproteins bewirkt. Andererseits könnte die Akkumulation des Vorläufers auch darauf zurückzuführen sein, dass die aus Lipase-Signalsequenz und frühem reifen Teil des Branching Enzyme zusammengesetzte "Export initiation domain" keine produktiven Wechselwirkungen zwischen Pre-BE Vorläufer und Translokase ermöglicht, und eine Einschleusung des Vorläufers in die Sec-Translokase deshalb ausbleibt.



## 4.2 Der Prepro-Anteil der *S. hyicus* Lipase vermittelt eine sehr effiziente Sekretion des Branching Enzyme in *S. carnosus*, interferiert jedoch mit dessen Faltung

Obwohl das Propeptid der Lipase für eine effiziente Sekretion der Lipase essentiell ist (Demleitner und Götz, 1994), konnten Samuelson *et al.* (1999) zeigen, dass die Signalsequenz der *S. hyicus* Lipase grundsätzlich in der Lage ist, ohne das dazugehörige Propeptid eine effiziente Sekretion von einigen heterologen Proteinen in *S. carnosus* zu vermitteln. Allerdings zeigte sich, dass einige Fremdproteine auf die Anwesenheit des Lipase-Propeptides für eine effiziente Sekretion in *S. carnosus* angewiesen sind (Samuelson *et al.*, 1999; Sturmfels *et al.*, 2001). Auch das Branching Enzyme von *A. gottschalkii* wird als präzise Fusion mit der Lipase-Signalsequenz alleine in *S. carnosus* nicht sekretiert. Es wurde daher untersucht, ob das Einfügen des Propeptids der Lipase zu einer Sekretion des cytosolischen Modellproteins in *S. carnosus* führen würde. Propeptide können unterschiedliche Funktionen haben (Simonen und Palva, 1993; Freudl, 1998). Das Propeptid der *S. hyicus* Lipase verhindert auf Grund einer beschleunigten Zellwandpassage den Abbau heterologer Proteine durch zellassoziierte Proteasen, und trägt so zu deren Stabilisierung bei der Sekretion bei (Meens *et al.*, 1997). Darüber hinaus führt eine intakte "Export initiation domain" zwischen Lipase-Signalsequenz und Propeptid zu einer verbesserten Sekretion der Fusionsproteine und zu erhöhten Produktausbeuten im Kulturüberstand (Meens *et al.*, 1997; Dilsen *et al.*, 2000). Auch in anderen Produktionswirten, wie dem Gram-positiven Bakterium *L. lactis*, den Hefen *K. lactis* und *Pichia pastoris* oder dem Pilz *Aspergillus niger*, kann der Einsatz von Propeptiden zu dramatischen Ausbeutesteigerungen führen (Le Loir *et al.*, 2001; Record *et al.*, 2002; Swennen *et al.*, 2002; Soden *et al.*, 2002).

Das Exportverhalten des Prepro-BE Fusionsproteins in *S. carnosus* wurde durch Untersuchung der Prozessierungskinetik sowie durch subzelluläre Lokalisierung der Prepro-BE Genprodukte analysiert. In Pulse Chase-Experimenten wurde gezeigt, dass eine Sec-abhängige Membrantranslokation des Fusionsproteins stattfindet (s. Abb. 13). Die Tatsache, dass eine Membrantranslokation des Branching Enzyme nach Fusion mit dem Prepro-Anteil der *S. hyicus* Lipase stattfinden kann, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der authentische C-Terminus der Lipase-Signalsequenz, das Propeptid, im Prepro-BE Fusionsprotein intakt bleibt. Damit bleibt die authentische "Export initiation domain" der Lipase aus *S. hyicus* erhalten, was eine produktive Wechselwirkung des Vorläuferproteins mit Komponenten der Sec-Translokase und die nachfolgende Initiation der Translokation ermöglicht. Innerhalb von 30 Sekunden sind bereits etwa 50 % des Vorläufers in das Pro-BE Fusionsprotein überführt. Die Lokalisierung der Prepro-BE Genprodukte zeigte, dass die Fusion des Prepro-Anteils der *S. hyicus* Lipase mit dem Branching Enzyme die Sekretion einer großen Menge des Pro-BE Fusionsproteins in den Kulturüberstand von *S. carnosus* vermittelt (s. Abb. 14). Die Färbung extrazellulärer Proteine mit Coomassie Blau zeigte außerdem, dass die sekretierte Pro-BE Fusion in dieser Fraktion die dominante Proteinform darstellt (s. Abb. 12 C). Bei der Lokalisierung wurde jedoch auch festgestellt, dass eine signifikante Menge des Prepro-BE Vorläuferproteins intrazellulär akkumuliert und durch unspezifische Proteolyse zu einem Protein mit der Größe des Pro-BE Proteins abgebaut wird. Obwohl das Pro-BE Fusionsprotein in den Überstand von *S. carnosus* sekretiert wird, ist die Effizienz des Sekretionsverlaufs demnach nicht hoch genug, um eine Akkumulation des Vorläuferproteins vollständig zu verhindern.

*Kinetic partitioning* führt zu einer Verteilung der Population des Vorläuferproteins zwischen Sekretion und Faltung bzw. Aggregation. Während ein Teil des insgesamt synthetisierten Vorläuferproteins auf Grund von Wechselwirkungen mit exportspezifischen Chaperonen lange genug ungefaltet bleibt, um in die Sec-Translokase eingeschleust zu werden, kann eine Subpopulation des Vorläuferproteins auf Grund der irreversiblen Reaktionen von Faltung bzw. Aggregation exportinkompetent werden. Im Falle des Prepro-BE Fusionsproteins wird nicht die gesamte Menge des synthetisierten Vorläuferproteins in den Sec-Exportweg eingeschleust. Einerseits kann dies auf eine Sättigung exportspezifischer Chaperone zurückzuführen sein, andererseits wird die Sekretionseffizienz aber auch durch die Effizienz der Wechselwirkungen zwischen der Signalsequenz und Komponenten des Sec-Apparates beeinflusst. Die Beobachtung, dass Exportproteine bei Überexpression intrazellulär akkumulieren, trifft dabei nicht nur auf heterologe sondern auch auf homologe Proteine zu. So führt z.B. die Überexpression der homologen Exportproteine OmpA oder PhoS in *E. coli* zu einer Überschreitung der Exportkapazität der Sec-Translokase und hat eine Akkumulation der Vorläuferproteine im Cytosol zur Folge (Bremer *et al.*, 1980; Pages *et al.*, 1984). Die Sättigung der Sec-Translokase erfolgt je nach überexprimiertem Exportprotein bei einer unterschiedlich starken Expression des Proteins. Je effizienter die Membrantranslokation stattfinden kann, was sowohl von der Exportkompetenz der Struktur der Exportproteine als auch von effizienten Wechselwirkungen der Translokase mit der Signalsequenz abhängig ist (s. Kapitel 4.4), desto mehr Protein kann über die Membran transloziert werden bevor eine Sättigung eintritt. Bei einer  $\alpha$ -Amylase aus *B. stearothermophilus* ist die effiziente Sekretion in *B. subtilis* z.B. nur bei einer sehr geringen Plasmidkopienzahl möglich, während eine Integration des Gens für das aus *S. aureus* stammende Protein A in einer Kopie in das Chromosom von *B. subtilis* optimal für eine effiziente Sekretion ist (Simonen und Palva, 1993). Diese Befunde zeigen, dass eine effiziente Membrantranslokation oft nur bei sehr geringen Mengen an Vorläuferprotein möglich ist und lassen den Schluss zu, dass eine verringerte Expression des Prepro-BE Vorläuferproteins möglicherweise zu einer verbesserten Sekretionseffizienz führen würde.

In vielen Arbeiten wurde gezeigt, dass die generellen cytosolischen Chaperone eine wichtige Rolle bei der Sekretion von Proteinen spielen. So ist beispielsweise das Chaperon GroEL am Export der  $\beta$ -Lactamase in *E. coli* beteiligt (Kusukawa *et al.*, 1989), während die Chaperone DnaK/DnaJ/GrpE am Export der Proteine PhoA und Ribosebindeprotein (RBP) beteiligt sind (Wild *et al.*, 1996). Oft stellt die gezielte Überexpression von molekularen Chaperonen einen erfolgreichen Ansatz zur verbesserten Sekretion von heterologen Proteinen dar. So führt die Überexpression der Chaperone DnaK und DnaJ zu einem erhöhten Export von humanen Cytokinen in das Periplasma von *E. coli*, wobei der Einfluss der Chaperone abhängig von der gewählten Kombination von Signalsequenz und reifem Protein unterschiedlich stark ist (Berges *et al.*, 1996). Da es beim Export großer Mengen Protein im Periplasma Gram-negativer Bakterien zur Aggregation exportierter Proteine kommen kann, kann die Überexpression des periplasmatischen Chaperons Skp zu verbesserten Ausbeuten eines Antikörperfragmentes führen (Mavrangelos *et al.*, 2001). Für die sekretorische Gewinnung einer  $\alpha$ -Amylase in der Hefe *S. cerevisiae* führt die konstitutive Aktivierung der ER-Stressantwort "Unfolded protein response", die eine Erhöhung der Konzentration von molekularen Chaperonen im ER zur Folge hat, zu einer verbesserten Sekretion (Valkonen *et al.*, 2003). Der Ansatz der Überexpression intra- und extracytosolischer Chaperone ist

besonders konsequent für die Verbesserung der sekretorischen Überexpression eines Antikörperfragmentes in *B. subtilis* verfolgt worden, in dem die cytosolischen Chaperone GroEL/ES und DnaK/DnaJ/GrpE, sowie das extrazelluläre Chaperon PrsA überexprimiert wurden (Wu *et al.*, 2002).

Neben der Überexpression von molekularen Chaperonen kann allerdings auch die Beeinflussung weiterer Schritte der Translokation zu verbesserten Ausbeuten führen. So wurde gezeigt, dass die Überexpression der Translokase-ATPase SecA, die u.a. auch als cytosolisches Chaperon für Exportproteine fungiert (Eser und Ehrmann, 2003), in manchen Fällen zu einer verbesserten Sekretion führen kann (Leloup *et al.*, 1999). Die Überexpression von SecA führt bei der Sekretion einer  $\alpha$ -Amylase mit einer sehr hohen Sekretionseffizienz in *B. subtilis* zu keiner signifikanten Verbesserung der Sekretion. Dagegen wird die nur geringe Sekretionseffizienz einer Levansucrase in *B. subtilis* durch die Koüberexpression von SecA deutlich gesteigert. Aus diesen Befunden lässt sich schließen, dass eine Koüberexpression der generellen cytosolischen Chaperone von *S. carnosus* oder der Translokasekomponente SecA ebenfalls zu einer verbesserten Sekretion des Prepro-BE Proteins führen könnte. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Überexpression der Signalpeptidase SipS zu einer entscheidenden Erhöhung der Ausbeute an sekretierter *E. coli*  $\beta$ -Lactamase in *B. subtilis* führen kann (Bolhuis *et al.*, 1999). Da die Überexpression von Exportproteinen auch zu einer Konkurrenz für verfügbare Translokasen führt, die die Sekretion von wirtseigenen sekretorischen Proteinen beeinträchtigt, kann die Deletion von Exportproteinen des Produktionswirtes ebenfalls eine Verbesserung der Sekretionseffizienz bewirken (Simonen und Palva, 1993).

Aktivitätsnachweise von Prepro-BE Genprodukten zeigten, dass weder das cytosolisch vorliegende Prepro-BE Vorläuferprotein noch das sekretierte Pro-BE Fusionsprotein enzymatische Aktivität besitzen, da das dem Aminoterminus des reifen Branching Enzyme vorgeschaltete Propeptid sehr wahrscheinlich mit der korrekten Faltung des nachgeschalteten reifen Teils interferiert. Dies bedeutet, dass auch dieses Sec-abhängige Sekretionssystem zur Gewinnung des cytosolischen Branching Enzyme, trotz der Sekretion großer Mengen des Fusionsproteins in den Kulturüberstand von *S. carnosus*, in dieser Form nicht geeignet ist. Es ist denkbar, dass das Propeptid u.a. auf Grund seiner Länge von 207 Aminosäuren mit der Faltung des Branching Enzyme interferiert. Die Verwendung eines kürzeren Linkerfragments als Ersatz für das Lipase-Propeptid, wie dem von Samuelson *et al.* (1999) beschriebenen 58 Aminosäuren langen *S. aureus* Protein A-Fragment, oder der neun Aminosäuren langen synthetischen Linkersequenz LEISSTCDA, die die Sekretion mehrerer heterologer Proteine in *L. lactis* verbessert (Le Loir *et al.*, 1998), könnte eine sinnvolle Alternative für die Sekretion des Branching Enzyme mit *S. carnosus* darstellen. Allerdings könnte auch nach der Fusion mit einem kürzeren Linkerfragment eine Falschfaltung des Fusionsproteins nicht ausgeschlossen werden.

#### **4.3 Das Tat-Signalpeptid der *E. coli* TMAO-Reduktase vermittelt eine Tat-abhängige Sekretion des Branching Enzyme in *S. carnosus***

Aus der Diskussion der für den Sec-abhängigen Export bestimmten Branching Enzyme-Fusionsproteine geht hervor, dass einerseits die Faltungstendenz des cytosolischen Modellproteins oder die unproduktive Wechselwirkung von Vorläuferprotein mit der Sec-Translokase zentrale Hindernisse für eine erfolgreiche

Sekretion über den Sec-Weg von *S. carnosus* darstellen. Darüber hinaus stellt im Falle des Prepro-BE Fusionsproteins die Interferenz des Lipase-Propeptides mit der Faltung des Branching Enzyme eine Limitierung dar, da enzymatisch inaktives Pro-BE Fusionsprotein in den Überstand von *S. carnosus* sekretiert wird. Dagegen stellt die stabile Faltung von Tat-abhängigen Exportproteinen in ihre native Konformation eine Voraussetzung für ihren Export dar. In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass Tat-Signalsequenzen in der Lage sind, im Prinzip den Export heterologer Proteine sowohl in *E. coli* als auch in den Gram-positiven Bakterien *S. lividans* und *B. subtilis* zu vermitteln (Schaerlaekens *et al.*, 2001 Thomas *et al.*, 2001; Gerard *et al.*, 2002; DeLisa *et al.*, 2003; R. Freudl, unveröffentl. Ergebnisse). Zu Beginn dieser Arbeiten war unbekannt, ob *S. carnosus* einen Tat-Weg besitzt und wenn ja, ob dieser funktionell sein würde. Das Branching Enzyme wurde mit der Signalsequenz der *E. coli* TMAO-Reduktase fusioniert, da bekannt war, dass sie den Export von Fremdproteinen in heterologen Systemen vermitteln kann und da eine Signalsequenz eines authentischen Tat-Substrates von *S. carnosus* nicht zur Verfügung stand.

Das Exportverhalten des TorA-BE Fusionsproteins wurde sowohl im Western Blot als auch mit Untersuchungen aktiver TorA-BE Genprodukte mittels nativer PAGE analysiert. Die Lokalisierung der TorA-BE Genprodukte zeigte, dass das TorA-BE Vorläuferprotein intrazellulär akkumuliert und dass in der Überstandsfraction kein reifes Branching Enzyme im Western Blot nachweisbar ist (s. Abb. 17). Auf Grund der hohen Sensitivität des Nachweises aktiver Proteinformen mittels nativer PAGE konnte jedoch gezeigt werden, dass eine aktive Proteinform tatsächlich im Überstand vorliegt (s. Abb. 18). Durch N-terminale Sequenzierung wurde bestätigt, dass es sich hierbei um das reife Branching Enzyme ohne Signalsequenz handelt (Dr. C. Bertoldo, Techn. Universität Hamburg-Harburg). Diese Ergebnisse beweisen, dass das aus *E. coli* stammende Signalpeptid des Tat-Substrates TMAO-Reduktase (TorA) eine Sekretion des Branching Enzyme in *S. carnosus* vermitteln kann. Trotz der sehr geringen Menge an transloziertem Enzym wurde eine höhere Ausbeute an aktivem Protein im Überstand gemessen als im Vergleich zu dem in großen Mengen durch Zell-Lyse ausgetretenen, aktiven Pre-BE Vorläuferprotein (s. Kapitel 4.1). Demnach ist offenbar die gesamte Menge oder ein Großteil des Tat-abhängig sekretierten Branching Enzyme aktiv, während sich der Großteil des Pre-BE Vorläuferproteins in einem enzymatisch inaktiven Zustand befindet. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine Faltung des cytosolischen Branching Enzyme vor der Membrantranslokation offenbar die Methode der Wahl für eine sekretorische Gewinnung des Proteins mit *S. carnosus* als Wirtsorganismus darstellt.

Die für die Translokasekomponenten TatA und TatC kodierenden Gene, die im Gegensatz zu der aus *E. coli* bekannten TatA/B/C/E-Translokase für eine sog. "Minimal-Translokase" kodieren, wurden in *S. carnosus* identifiziert (A. Bida, R. Freudl, unveröffentl. Ergebnisse). Außerdem wurde eine *S. carnosus* Mutante konstruiert, in der der Translokaserezeptor TatC deletiert ist (D. Meissner, R. Freudl, unveröffentl. Ergebnisse). Um zu beweisen, dass das Branching Enzyme tatsächlich durch Sekretion über den Tat-Weg von *S. carnosus* in den Überstand gelangt ist, wurde das Exportverhalten des TorA-BE Fusionsproteins im *S. carnosus* Wildtyp und in der TatC-Mutante mit Hilfe der nativen PAGE und anschließender Aktivitätsfärbung untersucht (s. Abb. 19). Der Vergleich aktiver TorA-BE Genprodukte im *S. carnosus* Wildtyp und der TatC-Mutante verdeutlicht, dass ausschließlich das TorA-BE Vorläuferprotein im Zellextrakt der TatC-Mutante vorliegt, während das reife Branching Enzyme in keiner Fraction des  $\Delta$ tatC-Stammes

nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu befinden sich im Zellextrakt des Wildtyps sowohl der Vorläufer als auch das reife Branching Enzyme, sowie im Kulturüberstand ebenfalls das sekretierte reife Protein. Dieses Ergebnis beweist, dass das Branching Enzyme mit Hilfe der TorA Signalsequenz in *S. carnosus* Tat-abhängig sekretiert wird und *S. carnosus* damit einen funktionellen Tat-Weg besitzt, der prinzipiell für die Sekretion heterologer Proteine genutzt werden kann.

Aus den Ergebnissen geht allerdings auch hervor, dass verschiedene Aspekte die Tat-abhängige Sekretion des Branching Enzyme in *S. carnosus* beeinträchtigen. Sowohl im Western Blot (Abb. 17) als auch in der nativen PAGE (Abb. 18) ist zu erkennen, dass der Großteil des synthetisierten Proteins im Wildtyp in zellassoziierter Form vorliegt und dass insgesamt nur geringe Mengen des Branching Enzyme in den Überstand sekretiert werden. Dabei fällt auf, dass in der Zellfraktion neben dem TorA-BE Vorläufer auch das reife Branching Enzyme akkumuliert. Die Zellwand Gram-positiver Bakterien stellt eine für Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von etwa bis zu 50 kDa durchlässige Struktur dar (Demchick und Koch, 1996). Viele Sec-abhängige Proteine akkumulieren während ihrer Sekretion jedoch trotz Überschreitung dieses Molekulargewichts nicht in der Zellwand, weil sie offensichtlich in einer mit dem Durchmesser dieser Poren von etwa 4 nm kompatiblen Konformation in den Überstand gelangen. Es ist daher höchst wahrscheinlich, dass sich das im gefalteten Zustand über die Membran translozierte Branching Enzyme in einer Konformation befindet, die eine Diffusion durch die Zellwandporen nicht erlaubt, und durch den Siebeffekt der Zellwand im Zellwandkompartiment zurückgehalten wird. Das Peptidoglycan der Zellwand stellt eine sehr dynamische Struktur dar und unterliegt während des Zellwachstums einem ständigen Turnover, bei dem altes Peptidoglycan für den Einbau von neu synthetisiertem Material hydrolysiert wird (Blackman *et al.*, 1998; Foster und Popham, 2002). Da das Branching Enzyme auf Grund seiner Konformation vermutlich nicht durch Diffusion in den Kulturüberstand gelangen kann, wird es sehr wahrscheinlich nur bei diesem Turnover von Zellwandmaterial aus der Zellhülle in den Kulturüberstand freigesetzt.

Bei der Aktivitätsmessung zellassoziierter aktiver Proteinformen fällt auf, dass trotz einer deutlich höheren Menge an sichtbarem Protein im Western Blot nur etwa 3.5 Mal mehr Aktivität im Zellextrakt nachweisbar ist, als für das sekretierte reife Branching Enzyme, das in so geringen Mengen sekretiert wird, dass es unter der Nachweisgrenze des Western Blot liegt (Abb. 17). Daraus folgt, dass sich nur ein Teil des intrazellulär akkumulierten TorA-BE Vorläufers in einem korrekt gefalteten und damit exportkompetenten Zustand befinden kann. Es ist denkbar, dass für die Faltung des TorA-BE Vorläufers notwendige Chaperone auf Grund dessen Überexpression limitierend werden, und dass ein Teil des synthetisierten Vorläuferproteins deshalb entweder nicht korrekt falten kann oder sogar aggregiert. Die Tatsache, dass aktiver TorA-BE Vorläufer in der Zelle akkumuliert, kann verschiedene mögliche Ursachen haben. Die Akkumulation von TorA-BE Vorläuferprotein sowie die Sekretion nur geringer Mengen an Branching Enzyme sind daher möglicherweise auf eine nicht-optimale Zugänglichkeit der TorA-Signalsequenz des Hybridvorläufers zu Komponenten der Tat-Translokase von *S. carnosus* zurückzuführen. Vor diesem Hintergrund ist allerdings auch wichtig, dass in einigen Fällen eine Spezies-Spezifität bei der Erkennung von Tat-Substraten beobachtet worden ist. So wird das Tat-Substrat GFOR aus *Z. mobilis* in seiner authentischen Zusammensetzung nicht über den Tat-Weg von *E. coli* exportiert und akkumuliert in aktiver Form im Cytoplasma. Der Export des GFOR-Proteins kann nur

dann über den Tat-Weg von *E. coli* stattfinden, wenn die authentische GFOR-Signalsequenz durch die Signalsequenz des *E. coli* Tat-Substrates TorA ausgetauscht wird (Blaudeck *et al.*, 2001). Da die Signalsequenz des *E. coli* Tat-Substrates TorA, mit der das Branching Enzyme fusioniert wurde, eine für die *S. carnosus* Tat-Translokase fremde Signalsequenz ist, könnte die Akkumulation des TorA-BE Fusionsproteins auch auf ineffiziente Wechselwirkungen zwischen dem heterologen Vorläuferprotein und der Tat-Translokase von *S. carnosus* zurückzuführen sein.

Alami *et al.* (2003) zeigten, dass die Menge der Komponenten der Tat-Translokase für das Targeting des Vorläufers an die Translokase bei geringen Mengen an Vorläuferprotein nicht limitierend ist. Jedoch ist die anschließende Translokation des Vorläufers sehr wohl von der Menge der Tat-Proteine abhängig. Das bedeutet, dass die Assemblierung einer funktionellen, exportkompetenten Translokase der zentrale sekretionslimitierende Schritt ist, der nicht nur maßgeblich von der funktionellen Wechselwirkung zwischen Translokase und Vorläuferprotein, sondern auch von der Menge der für die Assemblierung einer funktionellen Translokase zur Verfügung stehenden Translokasekomponenten abhängig ist (Alami *et al.*, 2003). Bei der Überexpression von Vorläuferproteinen, die für eine Sekretion über den Tat-Weg bestimmt sind, ist demnach auch auf Grund der begrenzten Menge des Translokaserezeptors TatC sowie der wahrscheinlich aus TatA zusammengesetzten Tat-Pore eine Akkumulation von Vorläuferprotein möglich.

Ein bislang nur wenig untersuchter Aspekt der Proteintranslokation über den Tat-Weg ist die Effizienz der Signalpeptid-Abspaltung. Für *E. coli* wurde gezeigt, dass die Signalpeptidase Lep, die die Signalsequenzen von Sec-Substraten abspaltet, auch die Prozessierung von Substraten des Tat-Weges katalysiert (Yahr und Wickner, 2001; D. Meissner, R. Freudl, unveröffentl. Ergebnisse). Beim Export großer Proteinmengen über den Sec-Weg bzw. bei einer unzureichenden Wechselwirkung des Signalpeptides mit der Signalpeptidase kann die Prozessierung des Vorläuferproteins für die Sekretion limitierend werden und zu einer Membranverankerung des Vorläuferproteins führen. Es ist daher vorstellbar, dass die korrekte Positionierung der Signalpeptid-Schnittstelle eines über die Membran translozierten gefalteten Fremdproteins relativ zum aktiven Zentrum der Signalpeptidase einen sekretionslimitierenden Schritt bei der Sekretion über den Tat-Weg darstellt, der möglicherweise auch die Sekretionseffizienz des TorA-BE Fusionsproteins beeinflussen könnte.

#### **4.4 Die CGTase kann mit Hilfe ihrer eigenen Signalsequenz über den Sec-Weg von *S. carnosus* sekretiert werden**

Da Sec-Signalsequenzen verschiedener Organismengruppen das gleiche Bauprinzip besitzen und sich vor allem in ihrer Länge sowie in der Anzahl der positiven Aminosäuren in der N-Region unterscheiden, sind sie auch bei unterschiedlicher Herkunft in heterologen Systemen in der Regel funktionell. Die Ursache für solche Unterschiede sind sehr wahrscheinlich Anpassungen der sekretorischen Proteine an die Komponenten des jeweiligen Sec-Apparates. Bislang hat es jedoch nur wenige Ansätze gegeben, sekretorische Enzyme extremophiler Organismen durch Sekretion in mesophilen, bakteriellen Produktionswirten zu gewinnen (Thudt *et al.*, 1985; Tsukagoshi *et al.*, 1985; Jørgensen *et al.*, 1997). Es wurde daher untersucht, ob die Sec-

Signalsequenz der CGTase des thermoalkaliphilen Bakteriums *A. gottschalkii* produktive Wechselwirkungen mit der Sec-Translokase des mesophilen Wirtes *S. carnosus* eingehen und somit ob die CGTase in ihrer authentischen Zusammensetzung in *S. carnosus* sekretiert werden kann.

Das Exportverhalten der authentischen CGTase in *S. carnosus* wurde anhand der Prozessierungskinetik und der subzellulären Lokalisierung der Genprodukte der authentischen CGTase untersucht. In Pulse Chase-Experimenten wurde gezeigt, dass eine Sec-abhängige Prozessierung der authentischen CGTase in *S. carnosus* prinzipiell stattfindet (s. Abb. 23). Durch die subzelluläre Lokalisierung der Genprodukte der authentischen CGTase wurde jedoch festgestellt, dass nur eine sehr geringe Menge der reifen CGTase in den Überstand sekretiert wird, während der überwiegende Teil des synthetisierten Proteins in zellassoziierter Form vorliegt (s. Abb. 24). Dabei wurde festgestellt, dass das Vorläuferprotein intrazellulär akkumuliert und durch unspezifische Proteolyse u.a. zu einer Proteinform mit der Größe der reifen CGTase abgebaut wird. Der Nachweis aktiver Genprodukte der authentischen CGTase mittels nativer PAGE belegte, dass die in den Überstand sekretierte reife CGTase eine aktive Konformation einnimmt (s. Abb. 25). Trotz einer deutlich größeren Menge an sichtbaren Genprodukten der authentischen CGTase im Western Blot wurde im Zellextrakt von *S. carnosus* (pXR-aCGT) eine nur etwa 3-Mal höhere Enzymaktivität gemessen als im Kulturüberstand. Damit befindet sich offenbar nur ein sehr geringer Teil der intrazellulär lokalisierten reifen CGTase in einer aktiven Konformation. Von den intrazellulären Proteinformen weist tatsächlich nur das Protein mit der Größe der reifen CGTase enzymatische Aktivität auf. Obwohl eine Sekretion der reifen CGTase also grundsätzlich in *S. carnosus* stattfindet, ist die Effizienz des Sekretionsverlaufs stark beeinträchtigt.

Wie bereits in Kapitel 4.1 und 4.2 erläutert, bestimmt die individuelle Sekretionseffizienz eines Exportproteins, wann eine Sättigung der Sec-Translokase eintritt. Dies beruht maßgeblich auf der Fähigkeit, mit Hilfe von Chaperonen lange genug in einem exportkompatiblen Faltungszustand zu bleiben, sowie auf der Effizienz von Wechselwirkungen mit dem Sec-Apparat, die eine Membrantranslokation einleiten. Da eine Überexpression von Exportproteinen auf Grund einer Sättigung von exportspezifischen Chaperonen zum *kinetic partitioning* der Vorläuferproteine aus dem Exportweg heraus führen kann (Kusukawa *et al.*, 1989; Randall und Hardy, 2002; Wild *et al.*, 1996), ist die Koüberexpression molekularer Chaperone ein möglicher Ansatz zur Verbesserung der Sekretionseffizienz. Darüber hinaus stellt die optimale Zugänglichkeit der Signalpeptidase-Spaltstelle der Signalsequenz zur Signalpeptidase, bzw. deren Beschaffenheit, einen wichtigen Aspekt für eine effiziente Sekretion dar. Es wurde festgestellt, dass die Signalpeptidase-Spaltstelle der authentischen CGTase vom weitgehend konservierten Ala<sup>-3</sup>-X-Ala<sup>-1</sup> Motiv abweicht (wobei X eine beliebige Aminosäure sein kann), und stattdessen ein Thr<sup>-3</sup>-Asn-Ala<sup>-1</sup> Motiv besitzt (s. Abb. 20). Das Auftreten u.a. von Threoninresten an Position -3 relativ zur Spaltstelle gilt als sekretionslimitierend. So konnten Ravn *et al.* (2003) eine deutliche Verbesserung der Sekretion einer Nuclease in *L. lactis* erreichen, deren Signalpeptidase-Spaltstelle ebenfalls ein Thr<sup>-3</sup>-Asn-Ala<sup>-1</sup> Motiv aufweist, indem sie die Signalpeptidase-Spaltstelle der Nuclease zum Konsensusmotiv Ala<sup>-3</sup>-Asn-Ala<sup>-1</sup> veränderten.

Zur Initiation der Translokation geht der Motor der Sec-Translokase, das SecA-Protein, spezifische Wechselwirkungen sowohl mit der Signalsequenz als auch mit dem reifen Teil eines Vorläuferproteins ein (Lill *et al.*, 1990). Dabei stimuliert die Signalsequenz die ATPase-Aktivität von SecA und induziert eine Konformationsänderung, die zur Membraninsertion von SecA zusammen mit dem Vorläuferprotein führt (Cunningham *et al.*, 1989). Nach ATP-Hydrolyse deinsert SecA aus der Membran, bindet einen weiteren Abschnitt des Vorläuferproteins und inseriert damit zusammen erneut in die Membran. Durch wiederholte Zyklen der Insertion und Deinsertion von SecA in die Membran, die durch ATP-Hydrolyse getrieben werden, wird das Vorläuferprotein durch die Sec-Translokase geschleust. Dabei trägt das Membranpotential zu einer Optimierung dieser Zyklen bei (Shiozuka *et al.*, 1990; Nishiyama *et al.*, 1999). Aus der Isolierung von SecA-Mutanten, in denen die ATP-Hydrolyse von der Membrantranslokation entkoppelt ist, weiß man, dass die Wechselwirkung zwischen dem Vorläuferprotein und SecA so produktiv sein muss, dass sie eine funktionelle Aktivierung von SecA und damit die Membraninsertion des Vorläufers zur Folge hat (Karamanou *et al.*, 1999). Dabei sind die Beschaffenheit der Signalsequenz und der "Export initiation domain" von zentraler Bedeutung (Andersson und von Heijne, 1991; Wang *et al.*, 2000). So hat man mutierte Vorläuferproteine mit einer verbesserten Sekretionseffizienz isolieren können, deren Membrantranslokation auf Grund von Veränderungen in der Signalsequenz unabhängig vom Membranpotential ist (Nouwen *et al.*, 1996a). Die Wechselwirkungen zwischen SecA und den Signalsequenzen heterologer Proteine sind häufig nicht effizient genug, um eine hohe Sekretionseffizienz von Fremdproteinen zu vermitteln (O. Köberling, R. Freudl, unveröffentl. Ergebnisse), was wahrscheinlich auf die Anpassung von Sec-Signalsequenzen an ihre jeweiligen Sec-Apparate zurückzuführen ist (Lam *et al.*, 2003). Eine im SecY-Protein gelegene Mutation *prlA4* stellt den Export defekter Exportproteine wieder her und führt zur erhöhten Sekretion authentischer Exportproteine. Der Effekt der *prlA4*-Mutation ist auf eine weitgehende Entkopplung der Membrantranslokation vom Membranpotential zurückzuführen, was auf eine erhöhte Affinität der Translokase zu SecA, sowie einer größeren konformationellen Flexibilität der Translokase zurückgeführt werden kann (Nouwen *et al.*, 1996b; van der Wolk *et al.*, 1998). Auch ein Überschuss von SecA kann die Initiation der Translokation vom Membranpotential entkoppeln (Yamada *et al.*, 1989). Darüber hinaus hat man sog. "superaktive" SecA-Mutanten isolieren können, die auf Grund einer erhöhten ATPase-Aktivität nicht nur eine Sekretion exportdefekter Vorläufer wieder vermitteln können, sondern auch eine deutlich erhöhte Sekretion authentischer Exportproteine bewirken (Matsumo *et al.*, 2000; O. Köberling und R. Freudl, unveröffentl. Ergebnisse). Aus diesen Befunden wird ersichtlich, dass die optimale Wechselwirkung zwischen dem Exportprotein und SecA einen Schritt der Qualitätskontrolle darstellt, in dem eine Überwindung der energetischen Barriere für die Initiation der Translokation des Vorläufers erfolgen muss, und der so die Spezifität der Proteintranslokation garantiert. Da die Sekretionseffizienz der authentischen CGTase in *S. carnosus* stark eingeschränkt ist, wäre es denkbar, dass einerseits eine Überexpression von SecA bzw. eines pre-aktivierten SecA-Proteins, aber auch die Verwendung eines Stammes mit herabgesetzter Qualitätskontrolle an der Translokase zu einer Verbesserung ihrer Sekretionseffizienz führen könnten.



#### 4.5 Das Pre-CGTase Fusionsprotein wird in *S. carnosus* nicht sekretiert und akkumuliert intrazellulär in aktiver Form

Aus der Untersuchung des Exportverhaltens der authentischen CGTase in *S. carnosus* geht hervor, dass die Sekretion der CGTase wahrscheinlich auf Grund von unproduktiven Wechselwirkungen mit der Sec-Translokase stark beeinträchtigt wird. Es wurde daher untersucht, ob die Verwendung der Signalsequenz der *S. hyicus* Lipase auf Grund ihrer näheren Verwandtschaft zur Sec-Translokase von *S. carnosus* eine verbesserte Sekretion der CGTase vermitteln kann. Das Exportverhalten des Pre-CGTase Fusionsproteins wurde anhand der Prozessierungskinetik und subzellulären Lokalisierung der Pre-CGTase Genprodukte untersucht. In Pulse Chase-Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Prozessierung des Pre-CGTase Vorläuferproteins in *S. carnosus* nicht stattfindet (s. Abb. 27). Es wurde daher untersucht, worauf die ausbleibende Prozessierung zurückzuführen ist. Bei unproduktiven Wechselwirkungen der Signalsequenz mit der Signalpeptidase bzw. bei mangelnder Zugänglichkeit der Signalsequenz zur Signalpeptidase kann es dazu kommen, dass die Signalsequenz nicht abgespalten wird und es so zu einer Membranverankerung des Vorläuferproteins auf der Außenseite der Cytoplasmamembran kommt. Andererseits können unproduktive Wechselwirkungen des Pre-CGTase Vorläuferproteins mit der Sec-Translokase, die zur intrazellulären Akkumulation des Vorläufers führen, oder sogar eine vorzeitige Faltung des Vorläufers, die eine Wechselwirkung mit Komponenten des Sec-Exportweges verhindern kann, für eine ausbleibende Prozessierung verantwortlich sein. Durch die Lokalisierung des Pre-CGTase Vorläufers konnte nachgewiesen werden, dass es auf Grund einer intrazellulären Akkumulation des Vorläuferproteins nicht zu einer Prozessierung in *S. carnosus* kommt (s. Abb. 28). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass es auf Grund einer partiellen Zell-Lyse zum Austritt eines Teils des Pre-CGTase Vorläuferproteins in den Kulturüberstand kommt. Die Untersuchung aktiver Pre-CGTase Genprodukte mittels nativer PAGE zeigte, dass sich der intrazellulär akkumulierte Vorläufer in einer aktiven Konformation befindet und teilweise durch cytosolische Proteasen zu zwei verkürzten, aktiven Proteinformen abgebaut wird, die in einem großen Überschuss zu den im Überstand befindlichen aktiven Proteinformen vorliegen (s. Abb. 29). Ein Teil der drei aktiven Proteinformen gelangt durch partielle Zell-Lyse in den Überstand von *S. carnosus*. Diese Ergebnisse beweisen, dass die Signalsequenz der Lipase, ebenso wie im Falle des Pre-BE Fusionsproteins nicht in der Lage ist, alleine eine Sekretion der CGTase in *S. carnosus* zu vermitteln. Analog zum Pre-BE Fusionsprotein ist es möglich, dass es auf Grund einer zu starken Faltungstendenz zu einem frühen Zeitpunkt im Sekretionsverlauf zu einer Wegfaltung der Signalsequenz in das Innere der Struktur und damit einem *kinetic partitioning* des Vorläufers aus dem Exportweg kommt. Es ist aber ebenso denkbar, dass es auf Grund unproduktiver Wechselwirkungen des Pre-CGTase Vorläuferproteins mit der Sec-Translokase von *S. carnosus*, die nicht zu einer Initiation der Translokation führen, zu einer Faltung des Vorläufers kommt. Da die Signalsequenz der Lipase nachweislich funktionelle Wechselwirkungen mit der Sec-Translokase von *S. carnosus* eingeht, und eine Sec-abhängige Sekretion der CGTase mit der authentischen CGTase-Signalsequenz in *S. carnosus* prinzipiell möglich ist, muss eine Inkompatibilität zwischen Lipase-Signalsequenz und reifer CGTase bestehen, die eine Sekretion des Vorläuferproteins verhindert. Wie in Kapitel 4.1 erläutert, führen präzise Fusionen von Signalsequenz und fremden Proteinen oft nicht zu einer Sekretion. Die Signalsequenz bildet zusammen mit dem frühen reifen Teil eine auf die jeweiligen Eigenschaften des gesamten reifen Proteins abgestimmte "Export initiation domain", die eine optimale Wechselwirkung des Vorläuferproteins mit der

Translokase ermöglicht. Nur bei einer funktionellen Aktivierung von SecA kann es zur Initiation der Translokation, also der Membraninsertion des Vorläufers, kommen. Die Signalsequenz besitzt jedoch keine allgemeinen Eigenschaften, die sich auf jedes Fremdprotein übertragen lassen und eine Sekretion erlauben. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die aus der präzisen Fusion der Lipase-Signalsequenz und dem frühen reifen Teil der CGTase resultierende, heterologe "Export initiation domain" zu produktiven Wechselwirkungen mit der Sec-Translokase von *S. carnosus* nicht in der Lage ist, und eine Membrantranslokation der Pre-CGTase deshalb ausbleibt.

#### **4.6 Der Prepro-Anteil der Lipase vermittelt eine hoch effiziente Sekretion der CGTase in *S. carnosus*, kann aber den Abbau durch zellassozierte Proteasen nicht verhindern**

Für die bisher untersuchte authentische CGTase sowie das Pre-CGTase Fusionsprotein wurde gezeigt, dass eine Sekretion der CGTase in ihrer authentischen Zusammensetzung, nicht aber mit der heterologen Signalsequenz der *S. hyicus* Lipase möglich ist. Daher wurde untersucht, ob das Einfügen des Lipase-Propeptids zwischen die Signalsequenz der Lipase und dem reifen Teil der CGTase eine Sekretion der CGTase in *S. carnosus* ermöglichen würde. Das Exportverhalten des Prepro-CGTase Fusionsproteins in *S. carnosus* wurde anhand der Prozessierungskinetik und subzellulären Lokalisierung der Prepro-CGTase Genprodukte untersucht. Die Lokalisierung der Prepro-CGTase Genprodukte zeigt, dass das Fusionsprotein mit einer so hohen Effizienz in *S. carnosus* sekretiert wird, dass sich das gesamte synthetisierte Protein im Kulturüberstand befindet und das Vorläuferprotein zu keiner Zeit nachweisbar ist (s. Abb. 30). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass der Wirtsorganismus *S. carnosus* prinzipiell in der Lage ist, sehr große Mengen an heterologem Protein zu sekretieren. Auffällig dabei war allerdings, dass nur ein sehr geringer Teil des insgesamt sekretierten Proteins dem intakten Pro-CGTase Fusionsprotein entspricht. Der überwiegende Teil der sekretierten CGTase Produkte liegt in Form mehrerer Abbauprodukte vor. Der Nachweis aktiver Prepro-CGTase Genprodukte belegt, dass nur die intakte Pro-CGTase enzymatisch aktiv ist, wobei auf Grund des massiven proteolytischen Abbaus nur eine geringe Enzymaktivität gemessen wurde (s. Abb. 32). In Pulse Chase-Experimenten wurde gezeigt, dass bereits innerhalb von 10 Sekunden nicht nur das gesamte Vorläuferprotein über die Plasmamembran transloziert ist, sondern auch, dass die Pro-CGTase zu diesem Zeitpunkt schon vollständig abgebaut ist (s. Abb. 31). Da in *S. carnosus* keine Proteasen in den Kulturüberstand sekretiert werden, müssen für den massiven Abbau der Pro-CGTase zellassozierte Proteasen verantwortlich sein. Bei der Sekretion einer  $\alpha$ -Amylase aus *B. licheniformis* in *B. subtilis* kommt es durch die zellwandassozierte Protease CWBP52 zu einem massiven Abbau des Proteins in der Zellhülle. Durch Deletion des für die Protease kodierenden Gens *wprA* konnten signifikante Ausbeutesteigerungen erzielt werden (Stephenson und Harwood, 1998). Die Ausbeute an sekretiertem OmpA-Protein aus *E. coli* wird sowohl in *B. subtilis* als auch in *S. carnosus* durch den Abbau durch zellassozierte Proteasen stark beeinträchtigt. Eine deutliche Verbesserung der Ausbeuten an sekretiertem OmpA in beiden Organismen wurde durch Einsatz des Prepro-Anteils der *S. hyicus* Lipase erzielt. Auf Grund einer durch das Propeptid der Lipase beschleunigten Zellwandpassage wird das Zeitfenster, in dem das Fusionsprotein aus Propeptid und OmpA zellassozierten Proteasen ausgesetzt ist, deutlich reduziert, was eine Stabilisierung des OmpA-Proteins zur Folge hat (Meens *et al.*, 1997). Auch in anderen Beispielen ist eine stabilisierende Wirkung des Lipase-Propeptids auf sekretierte heterologe Proteine beobachtet worden

(Samuelson *et al.*, 1999). Im Fall des Pro-CGTase Fusionsproteins ist allerdings die reife CGTase dominant gegenüber dem Propeptid-Anteil, so dass die positive Wirkung des Propeptids nicht zum Tragen kommt.

Jacobs *et al.* (1993) konnten zeigen, dass das Lipoprotein PrsA an der korrekten Faltung von Exportproteinen nach ihrer Membrantranslokation in *B. subtilis* beteiligt ist. Bei der Überexpression der Protease Subtilisin in einer PrsA-Mutante (PrsA3) kommt es zu einem massiven Abbau der translozierten Protease in der Zellhülle (Jacobs *et al.*, 1993). Vor allem bei der Überexpression von heterologen Exportproteinen hat man beobachtet, dass eine Koüberexpression von PrsA die Sekretion dieser Proteine in den Kulturüberstand deutlich erhöhen kann (Kontinen und Sarvas, 1993; Williams *et al.*, 2003). Außerdem ist bekannt, dass eine Korrelation zwischen der PrsA-Menge in der Zellhülle und der sekretierten Proteinausbeute besteht, so dass eine Reduktion der PrsA-Menge auch die Proteinmenge im Überstand negativ beeinflusst (Vitikainen *et al.*, 2001). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass PrsA als extracytosolisches Chaperon für Exportproteine fungiert. Dass die Beschaffenheit der Zellhülle große Auswirkungen auf die Faltung Sec-abhängig über die Membran translozierter Proteine hat, wird daraus ersichtlich, dass Suppressormutationen des *prsA3*-Allels im *dlt*-Operon isoliert werden konnten, dessen Produkte die Nettoladung der Zellwand durch Alanylierung von Teichonsäuren der Zellwand beeinflussen (Hyyryläinen *et al.*, 2000). Teichonsäuren tragen auf Grund ihrer negativen Ladung zur Akkumulation von hohen Konzentrationen von Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  in der Zellwand bei, die für die Faltung vieler authentischer sekretorischer Proteine essentiell sind. Für die Faltung mancher heterologer Proteine stellen sie dagegen ein Hindernis dar. Bei Inaktivierung des *dlt*-Operons können auf Grund der erhöhten negativen Ladung der Zellwand verstärkt Kationen durch die Teichonsäuren gebunden werden, was die Faltung solcher Proteine, die auf die Anwesenheit der Kationen angewiesen sind, begünstigt (Hyyryläinen *et al.*, 2000). Für die  $\alpha$ -Amylase AmyQ wurde tatsächlich gezeigt, dass deren Faltung in Protoplasten, also in der Abwesenheit der Zellwand, unabhängig vom Chaperon PrsA stattfinden kann, während die Faltung von AmyQ in ganzen Zellen in Gegenwart der Zellwand auf die Anwesenheit von PrsA angewiesen ist (Wahlstrom *et al.*, 2003). Hyyryläinen *et al.* (2001) konnten darüber hinaus belegen, dass durch Überexpression eines Exportproteins bzw. durch Reduzierung der PrsA-Menge in der Zellhülle ein Sekretionsstress verursacht wird. Als Folge des Sekretionsstresses kommt es vermutlich zu einer Sättigung des Chaperons PrsA und zum vermehrten Auftreten falsch gefalteter Proteine in der Zellhülle, was zur Aktivierung des Zwei-Komponenten-Systems CssSR in *B. subtilis* führt. Das CssSR-System führt zur Erhöhung der Menge der membranständigen Protease HtrA, deren aktives Zentrum zur *trans*-Seite der Membran gerichtet ist und die durch Abbau falsch gefalteter Proteine eine extracytosolische Qualitätskontrolle translozierter Proteine vermittelt. *B. subtilis* besitzt insgesamt drei HtrA-Homologe, von denen die Transkription der Gene *htrA* und *htrB* bei Hitzeschock und Überexpression von Fremdproteinen aktiviert wird (Darmon *et al.*, 2002). Diese Regulationsmechanismen verdeutlichen, dass auch die extracytosolische Qualitätskontrolle exportierter Proteine eine wichtige Rolle für die Ausbeute an sekretiertem Protein darstellt. Es erscheint daher durchaus möglich, dass der unmittelbar nach der Membrantranslokation auftretende Abbau der Pro-CGTase in der Zellhülle von *S. carnosus* auf eine Sättigung des Chaperons PrsA durch die große Proteinmenge zurückzuführen ist. Allerdings wurde bei der sekretorischen Gewinnung von humanem Calcitonin mit dem Prepro-Anteil der *S. hyicus* Lipase als Sekretionscarrier ein solcher Abbau des sekretiertem Fusionsprotein durch extracytosolische Proteasen nicht beobachtet (Dilsen *et al.*, 2000). Der Abbau der Pro-CGTase ist

möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die reife CGTase Wechselwirkungen mit der Zellwand von *S. carnosus* eingeht, die mit der Faltung des Fusionsproteins interferieren, und somit dominant gegenüber den bisher bekannten positiven Eigenschaften des Lipase-Propeptides sind. Auf Grund von falsch oder langsam faltendem Protein entsteht dabei Sekretionsstress, der zur Erhöhung der Menge der Protease HtrA und damit zum Abbau des Großteils der Pro-CGTase in der Zellhülle führt. In *L. lactis* wurde gezeigt, dass die Inaktivierung von HtrA zu verbesserten Proteinausbeuten im Kulturüberstand führen kann (Miyoshi *et al.*, 2002). Die Deletion des *S. carnosus htrA*-Gens sowie eine Koüberexpression des Chaperons PrsA wären sinnvolle Ansätze, um eine Erhöhung der Ausbeute an intakter Pro-CGTase im Kulturüberstand von *S. carnosus* zu erreichen.

#### 4.7 Die TorA-Signalsequenz vermittelt eine Tat-abhängige Sekretion der CGTase in *S. carnosus*

Aus der Diskussion der für den Sec-abhängigen Export bestimmten CGTase-Varianten geht hervor, dass verschiedene Aspekte des Sec-Exportweges, wie die intrazelluläre Akkumulation von Vorläufern und der Abbau von sekretiertem Protein durch extracytosolische Proteasen, für deren Sekretion limitierend sind. Es wurde daher untersucht, ob eine Tat-abhängige Sekretion der CGTase in *S. carnosus* eine sinnvolle Alternative zur Sekretion über den Sec-Weg darstellt. Hierbei entfallen die im Sec-Weg limitierenden Faktoren wie eine vorzeitige stabile Faltung im Cytosol sowie die Abhängigkeit von extracytosolischen Faltungsfaktoren wie PrsA. Das Exportverhalten des TorA-CGTase Fusionsproteins in *S. carnosus* wurde anhand der Prozessierungskinetik und subzellulären Lokalisierung der TorA-CGTase Genprodukte untersucht. In Pulse Chase-Experimenten wurde gezeigt, dass eine Prozessierung des TorA-CGTase Vorläuferproteins mit einer für den Tat-Weg typischen Kinetik stattfindet (s. Abb. 35). So werden im Verlauf von 30 Minuten 50 % des Vorläufers in die reife Form überführt, bis nach 90 Minuten der Großteil des synthetisierten Vorläuferproteins in prozessierter Form vorliegt. Substrate des Tat-Weges weisen meist sehr viel langsamere Exportkinetiken auf als Sec-abhängige Exportproteine, was darauf zurückzuführen ist, dass sie vor ihrer Membrantranslokation ihre native Konformation einnehmen müssen. Dennoch verläuft die Umwandlung der insgesamt synthetisierten Menge des TorA-CGTase Vorläuferproteins in die reife Form deutlich langsamer, als bei der Prozessierung bisher bekannter Tat-Substrate beobachtet worden ist. So werden 50 % des  $\Delta$ pH-Weg abhängigen Substrates tOE17 innerhalb von 5 Minuten in die reife Form umgewandelt, während das ebenfalls  $\Delta$ pH-Weg abhängige Thylakoidprotein DT23 eine ähnliche Prozessierungskinetik aufweist (Mori und Cline, 2002; Dabney-Smith *et al.*, 2003). Bei den nicht-authentischen Tat-Substraten TorA-MalE und TorA-P2 variiert der Zeitraum, in dem etwa 50 % der Vorläufermenge prozessiert wird, zwischen einer Minute für TorA-P2 (Cristóbal *et al.*, 1999) und 10 Minuten für TorA-MalE (Blaudeck *et al.*, 2003). Im Zeitraum von 30 Minuten, in dem nur etwa 50 % des TorA-CGTase Vorläufers prozessiert werden, ist die Prozessierung dieser Tat-Substrate bereits fast vollständig abgeschlossen. Da ein Vergleich mit der Prozessierung eines authentischen Tat-Substrates von *S. carnosus* nicht möglich ist, kann nicht festgestellt werden, ob die Translokation über den Tat-Weg von *S. carnosus* an sich langsamer verläuft, als in anderen Organismen. Es ist jedoch denkbar, dass es auf Grund von ineffizienten Wechselwirkungen zwischen dem Hybridvorläufer und der Translokase zu einer nur langsamen Membrantranslokation der TorA-CGTase kommt.

Wie bereits erwähnt, erfolgt die Assemblierung der Tat-Translokase nachdem das Vorläuferprotein über das RR-Konsensusmotiv in der Signalsequenz Wechselwirkungen mit dem putativen Rezeptor TatC und anschließend mit TatB und TatA eingegangen ist (Alami *et al.*, 2003). Dabei ist die optimale Zugänglichkeit der Signalsequenz zu allen Translokasekomponenten die zentrale Voraussetzung für eine Assemblierung der Tat-Translokase und eine anschließende Membrantranslokation. Eine nur langsame Membrantranslokation des TorA-CGTase Fusionsproteins könnte einerseits auf einer nicht-optimalen Zugänglichkeit der TorA-Signalsequenz zu einer oder mehreren Translokasekomponenten beruhen. Andererseits ist auch denkbar, dass die aus *E. coli* stammende TorA-Signalsequenz auf Grund von speziesspezifischen Eigenschaften nicht in der Lage ist, optimale Wechselwirkungen mit der Tat-Translokase von *S. carnosus* einzugehen. Vor diesem Hintergrund ist ein kürzlich von Alami *et al.* (2003) vorgestelltes Modell von Interesse, welches postuliert, dass das TatB-Protein an der Qualitätskontrolle von Tat-Vorläuferproteinen beteiligt ist. Während alle Translokasekomponenten spezifisch mit dem RR-Motiv der Signalsequenz wechselwirken, besitzt TatB darüber hinaus die Fähigkeit, auch mit dem frühen reifen Teil von Tat-Substraten Wechselwirkungen einzugehen. Darüber hinaus ist TatB in der Lage, mit der hydrophoben H-Region von Signalsequenzen auch von exportinkompetenten Vorläuferproteinen, deren RR-Motiv gegen ein ladungsgleiches KK-Motiv ausgetauscht wurde, zu wechselwirken. Das TatA-Protein, aus dem die Tat-Pore vermutlich zusammengesetzt ist, geht Wechselwirkungen mit dem RR-Konsensusmotiv des Vorläuferproteins erst ein, nachdem ein Targeting des Vorläufers an die Translokasekomponenten TatC und TatB stattgefunden hat. Analog zu den Wechselwirkungen zwischen der "Export initiation domain" Sec-abhängiger Vorläuferproteine und den Komponenten der Sec-Translokase (s. Kapitel 4.4) wird hierbei möglicherweise eine Qualitätskontrolle des Tat-Substrates vorgenommen, bevor es an die Translokationspore übergeben wird. Bei der Übertragung dieses Modells auf die nur aus dem Komponenten TatA und TatC zusammengesetzten "Minimal-Translokasen" ist das TatA-Protein vermutlich bifunktionell und damit in der Lage, vor der Membrantranslokation eine Qualitätskontrolle der Vorläuferproteine durchzuführen.

In Thylakoiden ist der  $\Delta$ pH-Weg im Gegensatz zum Sec-Weg vollständig insensitiv gegenüber dem ATPase-Inhibitor Azid und ist ausschließlich von einem intakten Membranpotential über der Membran abhängig. Während der bakterielle Tat-Weg in *Zymomonas mobilis* extrem azidsensitiv ist (Wiegert *et al.*, 1997), scheint es in *E. coli* substratspezifische Unterschiede dabei zu geben, wie azidsensitiv die Tat-abhängige Membrantranslokation der entsprechenden Substrate ist. Während das nicht-authentische Fusionsprotein TorA-MalE vollkommen insensitiv gegenüber Azid ist (Blaudeck *et al.*, 2003), findet mit 50 % eine auffällig starke Hemmung der Prozessierung des authentischen Substrats TorA durch Azid statt (Santini *et al.*, 1998). Durch die Zugabe des SecA-Inhibitors Azid bzw. des Protonophors CCCP bei der Untersuchung der Membrantranslokation kann so zwischen den Substraten des  $\Delta$ pH-Weges und des Sec-Weges unterschieden werden. Es wurde daher nachfolgend untersucht, inwieweit der Tat-Weg von *S. carnosus* azidsensitiv ist.

In Pulse Chase-Experimenten wurde gezeigt, dass die Membrantranslokation der TorA-CGTase in *S. carnosus* in Gegenwart von Azid partiell gehemmt wird (s. Abb. 36). Während in Abwesenheit von Azid nach 60 Minuten 76 % des Vorläuferproteins prozessiert waren, findet im gleichen Zeitraum in Gegenwart von Azid eine Prozessierung von 62 % des Vorläuferproteins statt. Die Zugabe des Protonophors CCCP hat einen

stärkeren Einfluss auf die Prozessierung der TorA-CGTase in *S. carnosus*, da nur 48 % des Vorläufers nach 60 Minuten prozessiert waren. Der Befund, dass eine vollständige Inhibierung der Membrantranslokation durch CCCP nicht möglich ist, kann darauf zurückgeführt werden, dass die Wirkung beider genannter Inhibitoren in *S. carnosus* insgesamt nur schwach ausgeprägt ist. Allerdings wird deutlich, dass *S. carnosus*, ebenso wie *Z. mobilis*, einen azidsensitiven Tat-Weg besitzt. Diese Azidsensitivität ist einerseits mit einem indirekten Effekt durch eine Hemmung von SecA und einer Verhinderung des Einbaus von Komponenten des Tat-Apparates erklärt worden (Halbig *et al.*, 1999). Andererseits ist auch denkbar, dass eine noch unbekannte azidsensitive Komponente an der Tat-abhängigen Proteintranslokation beteiligt ist.

#### 4.7.1 Die Sekretion des TorA-CGTase Fusionsproteins ist abhängig von der Anwesenheit des Zwillingsarginin-Motivs in der Signalsequenz und dem TatC-Protein

Das Konsensusmotiv S/TRRXFLK in der Signalsequenz von Tat-Substraten besitzt in allen bisher untersuchten Organismen eine zentrale Rolle für deren Targeting an die Tat-Translokase. Selbst ein konservativer Austausch der zwei hoch konservierten Argininreste durch Lysinreste führt bei den meisten Tat-Substraten zu einem vollständigen Exportblock. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass konservative Veränderungen des RR-Motives zu KR, RK bzw. KK in der Signalsequenz der Reporterproteine TorA-ColV und TorA-MalE nur zu einer Beeinträchtigung, nicht aber einem vollständigen Exportblock führen (Ize *et al.*, 2002a, P. Kreutzenbeck, R. Freudl, unveröffentl. Ergebnisse). Erst ein Ladungsverlust an mindestens einer der beiden Positionen der zwei Argininreste zu QQ (Ize *et al.*, 2002b) oder KQ, bzw. einer Ladungsumkehr durch Austausch durch zwei Aspartatreste (P. Kreutzenbeck, R. Freudl, unveröffentl. Ergebnisse), hat bei diesen Reporterproteinen einen totalen Exportblock zur Folge. Inzwischen wurde gezeigt, dass alle Komponenten der *E. coli* Tat-Translokase spezifische Wechselwirkungen mit dem RR-Motiv in Tat-Signalsequenzen eingehen, wobei das Targeting des Vorläuferproteins an die Translokase durch Wechselwirkung mit dem Translokaserezeptor TatC beginnt und weitere Wechselwirkungen mit den anderen Komponenten folgen (Alami *et al.*, 2003). Zum Beweis der Tat-Abhängigkeit der Sekretion der TorA-CGTase in *S. carnosus* und zur Untersuchung, ob das RR-Motiv bei der Erkennung des Fusionsproteins TorA-CGTase durch die Tat-Translokase von *S. carnosus* ebenfalls eine zentrale Rolle spielt, wurden die zwei Argininreste in der TorA-Signalsequenz gegen ein Lysin-Glutamin (KQ)-Motiv ausgetauscht. Da in allen bislang untersuchten Organismen die Deletion von TatC zu einem Exportblock aller Tat-Substrate führt, wurde weiterhin untersucht, ob die Abwesenheit des Translokaserezeptors TatC zu einer Blockierung der Sekretion der TorA-CGTase in *S. carnosus* führen würde.

Die Lokalisierung der TorA<sup>RR</sup>-CGTase sowie TorA<sup>KQ</sup>-CGTase Genprodukte in *S. carnosus* Wildtyp zeigt, dass es zu einer massiven Akkumulation des TorA<sup>KQ</sup>-CGTase Vorläufers kommt (s. Abb. 38). Dabei tritt eine partielle Zell-Lyse auf, die zum Austritt eines Teils des TorA<sup>KQ</sup>-CGTase Vorläufers und einer zusätzlichen kleineren Proteinform in den Kulturüberstand führt. In Pulse Chase-Experimenten wurde gezeigt, dass die Prozessierung des TorA<sup>KQ</sup>-CGTase Vorläufers stark gehemmt ist (s. Abb. 39). Während nach 60 Minuten mehr als 75 % des TorA<sup>RR</sup>-CGTase Vorläufers in *S. carnosus* Wildtyp prozessiert vorliegen, liegen im gleichen Zeitraum noch 85 % des TorA<sup>KQ</sup>-CGTase Fusionsproteins in der unprozessierten Vorläuferform vor. Auch bei

der Lokalisierung der TorA<sup>RR</sup>-CGTase Genprodukte in der TatC-Mutante ist eine deutliche Akkumulation des TorA<sup>RR</sup>-CGTase Vorläufers in der TatC-Mutante im Vergleich zu *S. carnosus* Wildtyp feststellbar, der ebenso wie der TorA<sup>KQ</sup>-CGTase Vorläufer in geringen Mengen durch eine partielle Zell-Lyse in den Kulturüberstand gelangt. Im Pulse Chase-Experiment wird deutlich, dass in der Abwesenheit des Translokaserezeptors TatC eine deutliche Hemmung der Prozessierung des TorA<sup>RR</sup>-CGTase Fusionsproteins auftritt, da im Gegensatz zu *S. carnosus* Wildtyp 60 Minuten nach dem Chase der überwiegende Teil des Vorläuferproteins in der TatC-Mutante in der Vorläuferform vorliegt. Diese Ergebnisse beweisen, dass die Membrantranslokation des TorA<sup>RR</sup>-CGTase Fusionsproteins über den Tat-Weg von *S. carnosus* Wildtyp stattfindet. Sie zeigen darüber hinaus, dass die zentralen Merkmale der Tat-abhängigen Proteintranslokation, d.h. die Erkennung von Tat-Substraten über die zwei Argininreste in der Signalsequenz sowie die zentrale Rolle des TatC-Proteins, auch im Tat-Weg von *S. carnosus* konserviert sind.

Auffällig ist, dass sowohl beim TorA<sup>KQ</sup>-CGTase Vorläuferprotein im *S. carnosus* Wildtyp als auch beim TorA<sup>RR</sup>-CGTase Vorläuferprotein in der TatC-Mutante nach einer gewissen Zeit eine verkürzte Proteinform mit der Größe der reifen CGTase auftritt (s. Abb. 39). In mehreren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass ein cytosolischer Abbau von Tat-Vorläuferproteinen in *tat*-Deletionsmutanten bzw. von Tat-Vorläuferproteinen mit exportdefekten Signalsequenzen stattfindet (Angelini *et al.*, 2001; Blaudeck, 2001). Das Fusionsprotein TorA-GFOR wird in einer *tat*-Deletionsmutante von *E. coli* nicht exportiert, was eine massive Akkumulation des Vorläuferproteins sowie dessen Abbau zu einer verkürzten Proteinform mit der Größe der reifen GFOR zur Folge hat (Blaudeck, 2001). Ein Fusionsprotein aus der TorA-Signalsequenz und der löslichen periplasmatischen P2-Domäne des Sec-abhängigen Lep-Proteins, TorA-P2, das in *E. coli* Tat-abhängig exportiert wird, unterliegt in einer *tat*-Deletionsmutante ebenfalls einem Abbau im Cytosol. Darüber hinaus führt auch der Austausch der zwei Argininreste in der TorA-Signalsequenz durch zwei Lysinreste zu einem Abbau des TorA<sup>KK</sup>-P2 Proteins durch cytosolische Proteasen (Cristóbal *et al.*, 1999). Dieser Abbau durch cytosolische Proteasen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass ein Targeting der Vorläuferproteine zur Tat-Translokase nicht möglich ist.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass ein exportinkompetentes SufI<sup>KK</sup>-Vorläuferprotein in der Lage ist, Wechselwirkungen mit TatB einzugehen, die jedoch nicht zur Translokation des Proteins führen (Alami *et al.*, 2003). Die Autoren spekulieren, dass TatB eine Qualitätskontrolle von Exportproteinen ausübt, bevor eine Translokation stattfinden kann (siehe oben). Es wurde außerdem gezeigt, dass Vorläuferproteine beim Targeting an die Translokase offenbar in die Nähe einer Protease gelangen, die zusätzlich zu cytosolischen Proteasen zum Abbau von Tat-Vorläuferproteinen führt, deren Export blockiert ist (D. Meissner, R. Freudl, unveröffentl. Ergebnisse). Der Befund, dass Vorläuferproteine auch nach Targeting an die Translokase proteolytisch abgebaut werden können, wenn der Export nicht oder nicht schnell genug stattfinden kann, würde auch die in Western Blot-Analysen auffällig geringere Menge des TorA<sup>RR</sup>-CGTase Fusionsproteins im Wildtyp im Vergleich zum TorA<sup>KQ</sup>-CGTase Fusionsprotein im Wildtyp bzw. dem TorA<sup>RR</sup>-CGTase Fusionsprotein in der TatC-Mutante erklären.

#### 4.7.2 Der Großteil der translozierten reifen CGTase akkumuliert in aktiver Form in der Zellwand von *S. carnosus*

Die Lokalisierung der TorA-CGTase Genprodukte in *S. carnosus* Wildtyp zeigte, dass der Großteil des synthetisierten Proteins in zwei zellassozierten Formen vorliegt, die dem Vorläuferprotein und der reifen CGTase entsprechen. Dabei ist die reife CGTase in Protoplasten von *S. carnosus* dem Abbau zu einer kleineren Proteinform durch Proteinase K zugänglich, und somit extracytosolisch lokalisiert. Durch Fraktionierung des Zellextraktes in Protoplasten und Zellwandkompartiment konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sich die reife CGTase im Zellwandkompartiment befindet (s. Abb. 40 A). Wie bereits erwähnt, stellt die Zellwand Gram-positiver Bakterien eine für Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von etwa bis zu 50 kDa durchlässige Struktur dar (Demchick und Koch, 1996). Sec-abhängige Proteine akkumulieren während ihrer Sekretion trotz Überschreitung dieses Molekulargewichts dennoch nicht in der Zellwand, weil sie sich in einer mit dem Durchmesser dieser Poren von etwa 4 nm kompatiblen Konformation befinden. Es ist daher höchst wahrscheinlich, dass sich die im gefalteten Zustand über die Membran translozierte reife CGTase in einer Konformation befindet, die eine Diffusion durch die Zellwandporen nicht erlaubt, und durch den Siebeffekt der Zellwand im Zellwandkompartiment zurückgehalten wird. Das Peptidoglycan der Zellwand unterliegt während des Zellwachstums einem ständigen Turnover, bei dem altes Peptidoglycan für den Einbau von neu synthetisiertem Material hydrolysiert wird (Blackman *et al.*, 1998; Foster und Popham, 2002). Es ist also sehr wahrscheinlich, dass die reife CGTase auf Grund ihrer Konformation nicht durch Diffusion in den Kulturüberstand gelangt, sondern erst bei diesem Turnover von Zellwandmaterial aus der Zellhülle in den Überstand freigesetzt wird.

Laut Western Blot (s. Abb. 40 A) befinden sich im Zellextrakt etwa gleiche Mengen des Vorläufers und der reifen CGTase. Der Nachweis aktiver TorA-CGTase Proteinformen (s. Abb. 41) lässt allerdings den Schluss zu, dass sich ein Teil des synthetisierten Vorläuferproteins in einem enzymatisch inaktiven und damit exportinkompetenten Zustand befindet. Wie auch im Falle des TorA-BE Fusionsproteins ist es denkbar, dass Chaperone, die für die Faltung des TorA-CGTase Vorläufers notwendig sind, auf Grund der Menge des synthetisierten Vorläuferproteins limitierend werden und dass das Vorläuferprotein deshalb teilweise nicht korrekt gefaltet oder in aggregiertem Zustand vorliegt.

Da ein Teil des TorA-CGTase Vorläuferproteins auf Grund von Sekretionsstress in den Kulturüberstand austritt, wurde abschließend untersucht, ob der Sekretionsstress durch Anpassung des TorA-CGTase Expressionsniveaus an die Sekretionskapazität der Tat-Translokase von *S. carnosus* vermieden werden kann. Hierzu wurde die Proteinexpression durch Variierung der Xylosekonzentration verändert und die Sekretionseffizienz abhängig von der Induktionsdauer bei Wachstum des Stammes in Vollmedium untersucht (s. Abb. 42). Dabei zeigte sich, dass eine sehr schnelle Sättigung der Exportkapazität der *S. carnosus* Tat-Translokase durch die Menge des synthetisierten Vorläuferproteins stattfindet, was zu einer Akkumulation signifikanter Mengen an Vorläuferprotein und schließlich zu einer partiellen Zell-Lyse führt. Allein bei der geringsten Xylosekonzentration von 0.02 % befand sich 30 Minuten nach Induktion der Genexpression ausschließlich reife CGTase im Überstand. Bereits nach 60 Minuten trat auf Grund der starken intrazellulären



Akkumulation des Vorläuferproteins eine partielle Zell-Lyse auf, die den Austritt eines Teils des Vorläuferproteins in den Kulturüberstand zur Folge hatte. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass vor allem eine schnelle Sättigung der Tat-Translokase die Sekretionseffizienz der TorA-CGTase beeinträchtigt und zu von partieller Zell-Lyse begleitetem Sekretionsstress führt. Alami *et al.* (2003) zeigten, dass die Menge der Tat-Proteine nicht für das Targeting des Vorläufers an die Translokase, sondern für die Membrantranslokation an sich limitierend ist. Das bedeutet, dass die Membrantranslokation selbst für geringe Mengen an Vorläuferprotein ein zentraler sekretionslimitierender Schritt ist, der bei der Überexpression des Vorläufers zwangsläufig zu dessen Akkumulation führen muss. Die hier beobachtete Sättigung der Tat-abhängigen Proteintranslokation ist daher sehr wahrscheinlich auf die limitierte Menge der Komponenten der *S. carnosus* Tat-Translokase zurückzuführen. Zur Verbesserung der Sekretionseffizienz stellt deshalb die Koüberexpression der Translokasekomponenten einen möglichen Ansatz dar. In der Tat ist für den Tat-abhängigen Export des Fusionsproteins TorA-GFP in *E. coli* gezeigt worden, dass die Koüberexpression der Tat-Proteine eine 3-4-fache Ausbeutesteigerung bewirkt (Barrett *et al.*, 2003).

Die Untersuchung der Sekretionseffizienz der TorA-CGTase bei Wachstum von *S. carnosus* (pXR-TorA-CGT) in Minimalmedium bestätigte die Ergebnisse der Lokalisierung der TorA-CGTase Genprodukte (s. Abb. 40) und zeigte, dass die Zellwand neben einer raschen Sättigung der Tat-Translokase durch Überexpression des Vorläuferproteins einen zentralen sekretionslimitierenden Aspekt der Tat-abhängigen Sekretion heterologer Proteine in *S. carnosus* darstellt (s. Abb. 43). Es wurde festgestellt, dass das Expressionsniveau der TorA-CGTase bei Wachstum in Minimalmedium bei gleicher Xylosekonzentration geringer ist als bei Wachstum in Vollmedium. Dies führt dazu, dass eine Sättigung des Tat-Apparates deutlich später auftritt. Im Gegensatz zur Sättigung des Tat-Apparates 30 Minuten nach Induktion der Genexpression bei Wachstum in Vollmedium, trat eine Sättigung der Translokase auf Grund der geringeren Mengen an Vorläuferprotein bei Wachstum in Minimalmedium erst nach 60 Minuten und bei einer 4-fach höheren Xylosekonzentration auf. Verglichen mit dem Wachstum in Vollmedium gelangt allerdings eine erheblich geringere Proteinmenge bei Wachstum in Minimalmedium in den Überstand von *S. carnosus*, wobei es sich hier ausschließlich um die reife CGTase handelt. Demnach wird bei der deutlich geringeren intrazellulären Akkumulation des TorA-CGTase Vorläufers der von Zell-Lyse begleitete Sekretionsstress vermieden. Bis zur Sättigung der Translokase bei Wachstum in Minimalmedium dominiert bei allen Xylosekonzentrationen die reife Form der CGTase im Zellextrakt. Den hauptsächlichen sekretionslimitierenden Parameter unter diesen Wachstumsbedingungen stellt daher die Zellwand dar, die den Austritt des über die Membran translozierten reifen Proteins effektiv verhindert. Hier wird besonders deutlich, dass die Zellwand das zentrale Hindernis für die Tat-abhängige Sekretion von Proteinen ist, die nicht durch die Zellwandporen diffundieren können. Daraus folgt weiterhin, dass eine Koüberexpression der Tat-Proteine letztendlich nur zu einer verstärkten Akkumulation von transloziertem Protein in der Zellhülle führen würde.

## 4.8 Biotechnologische Bedeutung der erzielten Ergebnisse

Obwohl der allgemeine Sec-Weg bereits seit langem für die sekretorische Proteingewinnung eingesetzt wird, ist deren Effizienz häufig durch Aspekte wie die intrazelluläre Akkumulation von Vorläufern und dem Abbau von sekretiertem Protein durch in der Zellhülle lokalisierte Proteasen limitiert. Diese Probleme sind darauf zurückzuführen, dass Proteine über den Sec-Weg in ungefalteter Form aus der Zelle ausgeschleust werden und dazu im Cytosol produktive Wechselwirkungen mit exportspezifischen Chaperonen eingehen müssen, die eine vorzeitige Faltung der Vorläufer verhindern, und nach erfolgter Membrantranslokation mit Hilfe von extracytosolischen Faltungshelfern ihre native Konformation einnehmen müssen. Allerdings verläuft die extracytosolische Faltung oft u.a. auf Grund von Wechselwirkungen zwischen der Zellwand und den faltenden Proteinen nicht schnell genug, um zu verhindern, dass ein proteolytischer Abbau der sekretierten Proteine stattfindet. Im Falle des Tat-Weges stellt eine Faltung der Vorläuferproteine im Cytosol jedoch erst die Voraussetzung für eine Membrantranslokation dar, und vermeidet deshalb die Probleme, die die Sec-abhängige Sekretion heterologer Proteine beeinträchtigen. Damit bietet sich die Möglichkeit, solche Proteine in Bakterien sekretorisch zu gewinnen, die mit einer Sekretion über den Sec-Weg bislang nicht oder nur mit geringer Effizienz produziert werden können.

Die biotechnologische Nutzbarkeit des Tat-Weges wurde durch eine vergleichende Sec- bzw. Tat-abhängige Sekretion der Modellenzyme Branching Enzyme und CGTase aus *A. gottschalkii* in *S. carnosus* evaluiert. Dabei zeigte sich, dass eine Sec-abhängige Produktion von intrazellulärem Branching Enzyme und extrazellulärer CGTase in *S. carnosus* auf Grund der genannten Probleme nur bedingt geeignet ist. Im Vergleich zur Sec-abhängigen Sekretion der Modellproteine wurden mit einer Tat-abhängigen Sekretion von Branching Enzyme und CGTase dagegen jeweils die höchsten Enzymaktivitäten im Kulturüberstand erzielt. Offensichtlich ist es sowohl für intra- als auch für extrazelluläre heterologe Proteine vorteilhaft, ihre native Konformation unter Ausnutzung der cytosolischen Chaperone einzunehmen und erst anschließend im gefalteten Zustand über den Tat-Weg aus der Zelle ausgeschleust werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Tat-Weg eine vielversprechende Alternative zur Sec-abhängigen Proteingewinnung darstellt. Allerdings wird das Potential der Tat-abhängigen Sekretion heterologer Proteine durch den Siebeffekt der Zellwand limitiert. An Hand der Tat-abhängig sekretierten CGTase wurde gezeigt, dass der Grossteil des translozierten Enzyms im Zellwandkompartiment akkumuliert und sehr wahrscheinlich nur durch Zellwandturnover in den Kulturüberstand freigesetzt wird. Eine Tat-abhängige Gewinnung heterologer Proteine in Gram-positiven Bakterien bietet sich daher vor allem für kleinere Proteine an, für die eine Diffusion durch die Poren der Zellwand möglich ist.

## 5. Zusammenfassung

Enzyme extremophiler Mikroorganismen besitzen ein großes Potential als Biokatalysatoren für industrielle Anwendungen. Für die Gewinnung solcher "Extremozyme" fehlen bislang allerdings überzeugende Expressionssysteme. Im Gegensatz zu Ansätzen zu einer intrazellulären Enzymproduktion bietet eine sekretorische Proteingewinnung mit mesophilen Gram-positiven Bakterien wie *Staphylococcus carnosus* den Vorteil, dass die gewünschten Proteine direkt in den Kulturüberstand sekretiert werden. *S. carnosus* eignet sich als Produktionswirt deshalb besonders, weil dieser im Gegensatz zu den meisten anderen Gram-positiven Bakterien keine Proteasen in den Kulturüberstand sezerniert, die die Ausbeute an sekretierten heterologen Proteinen beeinträchtigen können. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Expressionssysteme für eine sekretorische Produktion von Extremozymen des thermoalkaliphilen Bakteriums *Anaerobranca gottschalkii* im Wirt *S. carnosus* etabliert. Prinzipiell stehen in den meisten Gram-positiven Bakterien zwei Sekretionswege zur Verfügung. Dabei handelt es sich einerseits um den allgemeinen Sec-Weg, der bereits seit langem für die sekretorische Proteingewinnung verwendet wird. Die Sec-abhängige Sekretion von heterologen Proteinen, bei der diese in ungefalteter Form über die Plasmamembran transloziert werden und außerhalb des Cytosols ihre korrekte Konformation einnehmen müssen, verläuft allerdings häufig ineffizient. Fremdproteine sind oft nicht in der Lage, nach erfolgter Membrantranslokation in der Zellhülle schnell genug zu falten, um einem Abbau durch in der Zellwand lokalisierte Proteasen zu entgehen. Der erst kürzlich entdeckte Tat-Weg, für den eine biotechnologische Anwendung in Gram-positiven Bakterien bislang noch nicht beschrieben wurde, besitzt dagegen die herausragende Eigenschaft, bereits fertig gefaltete Proteine aus der Zelle auszuschleusen. Die für die Tat-abhängige Membrantranslokation notwendige Faltung von Vorläuferproteinen im Cytosol vermeidet dabei die genannten Probleme, die die Sec-abhängige Gewinnung heterologer Proteine beeinträchtigen. Dieser neue Exportweg eröffnet zum ersten Mal die Möglichkeit, solche Proteine in Bakterien sekretorisch zu gewinnen, die mit einer Sekretion über den Sec-Weg bislang nicht oder mit nur geringer Effizienz produziert werden können.

Um die Nutzung des Tat-Weges für eine heterologe Proteinsekretion im Wirt *S. carnosus* zu erschließen, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst untersucht, ob *S. carnosus* einen funktionellen Tat-Weg besitzt, und ob dieser in der Lage ist, Fremdproteine aus der Zelle zu sekretieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Fusion zweier Modellproteine aus *A. gottschalkii*, eines intrazellulären Branching Enzyme und einer extrazellulären CGTase, mit der Signalsequenz des *E. coli* Tat-Substrates TorA zur Sekretion beider Enzyme in aktiver Konformation in den Kulturüberstand von *S. carnosus* führte. Die Inaktivierung des putativen Rezeptors der Tat-Translokase, TatC, führte zur Inhibierung der Sekretion der beiden Enzyme in *S. carnosus*. Damit wurde erstmalig nachgewiesen, dass *S. carnosus* einen funktionellen Tat-Weg besitzt, der grundsätzlich für die heterologe Proteingewinnung geeignet ist. Die biotechnologische Nutzbarkeit des Tat-Weges wurde daraufhin durch eine vergleichende Sec- bzw. Tat-abhängige Sekretion der Modellenzyme Branching Enzyme und CGTase aus *A. gottschalkii* in *S. carnosus* evaluiert. Dabei zeigte sich, dass eine Sec-abhängige Produktion von Branching Enzyme und CGTase in *S. carnosus* nur bedingt geeignet ist. Die alleinige Fusion der Modellproteine mit der Signalsequenz einer Sec-abhängigen Lipase aus *S. hyicus* führte in beiden Fällen nicht zur Sekretion über den Sec-Weg von *S. carnosus*. Eine Sec-abhängige Sekretion wurde erst durch zusätzliches Einfügen eines Propeptides möglich, für das bekannt ist, dass es sich positiv auf die Sekretion heterologer Proteine auswirkt. Allerdings war der Einsatz des Propeptids für eine sekretorische Gewinnung der Modellenzyme trotz der Sekretion großer Mengen an Propeptid-Fusionsprotein ebenfalls ungeeignet. Das Propeptid interferierte mit der korrekten Faltung des Branching Enzyme, so dass ausschließlich enzymatisch inaktives Protein in den Kulturüberstand gelangte, während im Falle der CGTase das sekretierte Pro-CGTase Fusionsprotein durch zellassoziierte Proteasen in der Zellhülle abgebaut wurde und nur geringe Mengen des intakten Fusionsproteins in den Überstand gelangten. Eine Sekretion der authentischen CGTase mit ihrer eigenen Signalsequenz über den Sec-Weg von *S. carnosus* war zwar prinzipiell möglich, führte jedoch zur Sekretion nur sehr geringer Mengen an reifer CGTase in den Kulturüberstand. Dennoch zeigte dieser Befund, dass Sec-Signalsequenzen aus extremophilen Bakterien mit dem Sec-Apparat mesophiler Bakterien produktive Wechselwirkungen eingehen können.

Im Vergleich zu den Ansätzen zur Sec-abhängigen Sekretion der Modellproteine konnten mit einer Tat-abhängigen Sekretion von Branching Enzyme und CGTase jeweils die höchsten Enzymaktivitäten im Kulturüberstand erzielt werden. Dieser Weg stellt demnach die Methode der Wahl für eine sekretorische Gewinnung dieser Enzyme in *S. carnosus* dar. Die erfolgreiche Tat-abhängige Gewinnung je eines heterologen intra- und extrazellulären Enzyms, deren Sekretion über den Sec-Weg in *S. carnosus* nur mit geringer Effizienz stattfand beweist, dass der Tat-Weg eine vielversprechende Alternative zur Sec-abhängigen Proteingewinnung

darstellt. Offensichtlich ist es vorteilhaft, wenn heterologe Proteine ihre native Konformation unter Ausnutzung der cytosolischen Chaperone einnehmen können und erst anschließend im gefalteten Zustand über den Tat-Weg aus der Zelle ausgeschleust werden. Es wurde jedoch auch nachgewiesen, dass das Potential der Tat-abhängigen Sekretion heterologer Proteine durch den Siebeffekt der Zellwand limitiert wird. An Hand der Tat-abhängig sekretierten CGTase wurde gezeigt, dass der Grossteil des translozierten Enzyms im Zellwandkompartiment akkumuliert und sehr wahrscheinlich nur durch Zellwandturnover in den Kulturüberstand freigesetzt wird. Eine Tat-abhängige Gewinnung heterologer Proteine in Gram-positiven Bakterien bietet sich daher vor allem für kleinere Proteine an, für die eine Diffusion durch die Poren der Zellwand möglich ist.

## 6. Literatur

- Alami, M., Luke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H. G., Brunner, J., Müller, M. (2003). "Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*." *Mol. Cell* 12(4): 937-46.
- Alder, N. N., Theg, S. M. (2003a). "Protein transport via the cpTat pathway displays cooperativity and is stimulated by transport-incompetent substrate." *FEBS Lett.* 540(1-3): 96-100.
- Alder, N. N., Theg, S. M. (2003b). "Energy use by biological protein transport pathways." *Trends Biochem. Sci.* 28(8): 442-51.
- Allegre, M., Deratani, A. (1994). "Cyclodextrin uses: from concept to industrial reality". *Agro. Fd. Ind.:* 9-17
- Andersson, H., von Heijne, G. (1991). "A 30-residue-long 'export initiation domain' adjacent to the signal sequence is critical for protein translocation across the inner membrane of *Escherichia coli*." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88(21): 9751-4.
- Angelini, S., Moreno, R., Gouffi, K., Santini, C., Yamagishi, A., Berenguer, J., Wu, L. (2001). "Export of *Thermus thermophilus* alkaline phosphatase via the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli*." *FEBS Lett.* 506(2): 103-7.
- Antranikian, G. (2000) "Herstellung hochwertiger Kohlenhydrate durch den Einsatz von Biokatalysatoren aus dem thermoalkaliphilen anaeroben Bakterium *Anaerobranca gottschalkii*." Projektantrag, Deutsche Bundesstiftung Umwelt.
- Barrett, C. M., Mathers, J. E., Robinson, C. (2003). "Identification of key regions within the *Escherichia coli* TatAB subunits." *FEBS Lett.* 537(1-3): 42-6.
- Barrett, C. M., Ray, N., Thomas, J. D., Robinson, C., Bolhuis, A. (2003). "Quantitative export of a reporter protein, GFP, by the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli*." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304(2): 279-84.
- Berges, H., Joseph-Liauzun, E., Fayet, O. (1996). "Combined effects of the signal sequence and the major chaperone proteins on the export of human cytokines in *Escherichia coli*." *Appl. Environ. Microbiol.* 62(1): 55-60.
- Berks, B. C. (1996). "A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors?" *Mol. Microbiol.* 22(3): 393-404.

- Berks, B. C., Sargent, F., Palmer, T. (2000). "The Tat protein export pathway." *Mol. Microbiol.* **35**(2): 260-74.
- Bernhardt, T. G., de Boer, P. A. (2003). "The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway." *Mol. Microbiol.* **48**(5): 1171-82.
- Bertoldo, C., Antranikian, G. (2002). "Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria." *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**(2): 151-60.
- Bieker, K. L., Phillips, G. J., Silhavy, T. J. (1990). "The sec and prl genes of *Escherichia coli*." *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**(3): 291-310.
- Biwer, A., Antranikian, G., Heinzle, E. (2002). "Enzymatic production of cyclodextrins." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**(6): 609-17.
- Blackman, S. A., Smith, T. J., Foster, S. J. (1998). "The role of autolysins during vegetative growth of *Bacillus subtilis* 168." *Microbiology* **144** (Pt 1): 73-82.
- Blaudeck, N. (2001). "Charakterisierung der Tat-abhängigen Proteintranslokation in Gram-negativen Bakterien.", Dissertation, Universität Düsseldorf.
- Blaudeck, N., Kreutzenbeck, P., Freudl, R., Sprenger, G. A. (2003). "Genetic analysis of pathway specificity during posttranslational protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane." *J. Bacteriol.* **185**(9): 2811-9.
- Bogsch, E., Brink, S., Robinson, C. (1997). "Pathway specificity for a delta pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein." *EMBO J.* **16**(13): 3851-9.
- Bogsch, E. G., Sargent, F., Stanley, N. R., Berks, B. C., Robinson, C., Palmer, T. (1998). "An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria." *J. Biol. Chem.* **273**(29): 18003-6.
- Bolhuis, A., Tjalsma, H., Smith, H. E., de Jong, A., Meima, R., Venema, G., Bron, S., van Dijl, J. M. (1999). "Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*." *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(7): 2934-41.
- Bolhuis, A., Mathers, J. E., Thomas, J. D., Barrett, C. M., Robinson, C. (2001). "TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*." *J. Biol. Chem.* **276**(23): 20213-9.

- Bolhuis, A. (2002). "Protein transport in the halophilic archaeon *Halobacterium* sp. NRC-1: a major role for the twin-arginine translocation pathway?" *Microbiology* **148**(Pt 11): 3335-46.
- Bolla, J. M., Lazdunski, C., Inouye, M., Pages, J. M. (1987). "Export and secretion of overproduced OmpA-beta-lactamase in *Escherichia coli*." *FEBS Lett.* **224**(1): 213-8.
- Bost, S., Belin, D. (1997). "*prl* mutations in the *Escherichia coli* *secG* gene." *J. Biol. Chem.* **272**(7): 4087-93.
- Bremer, E., Beck, E., Hindennach, I., Sonntag, I., Henning, U. (1980). "Cloned structural gene (*ompA*) for an integral outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12: localization on hybrid plasmid pTU100 and expression of a fragment of the gene." *Mol Gen Genet.* **179**(1): 13-20.
- Brink, S., Bogsch, E. G., Edwards, W. R., Hynds, P. J., Robinson, C. (1998). "Targeting of thylakoid proteins by the delta pH-driven twin-arginine translocation pathway requires a specific signal in the hydrophobic domain in conjunction with the twin-arginine motif." *FEBS Lett.* **434**(3): 425-30.
- Bruinenberg, P. M., Hulst, A. C., Faber, A., Voogd, R.H. (1996). "A process for surface sizing or coating of paper." European patent application EP 0 690 170 A1.
- Brüser, T., Deutzmann, R., Dahl, C. (1998). "Evidence against the double-arginine motif as the only determinant for protein translocation by a novel Sec-independent pathway in *Escherichia coli*." *FEMS Microbiol. Lett.* **164**(2): 329-36.
- Chaddock, A. M., Mant, A., Karnauchoy, I., Brink, S., Herrmann, R. G., Klösgen, R. B., Robinson, C. (1995). "A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase." *EMBO J.* **14**(12): 2715-22.
- Chen, M., Xie, K., Jiang, F., Yi, L., Dalbey, R. E. (2002). "YidC, a newly defined evolutionarily conserved protein, mediates membrane protein assembly in bacteria." *Biol. Chem.* **383**(10): 1565-72.
- Clark, S. A., Theg, S. M. (1997). "A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes." *Mol. Biol. Cell* **8**(5): 923-34.
- Cline, K., Mori, H. (2001). "Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport." *J. Cell. Biol.* **154**(4): 719-29.
- Crabb, W. D., Shetty, J. K. (1999). "Commodity scale production of sugars from starches." *Curr. Opin. Microbiol.* **2**(3): 252-6.

Cristóbal, S., de Gier, J. W., Nielsen, H., von Heijne, G. (1999). "Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*." *EMBO J.* **18**(11): 2982-90.

Cunningham K, Wickner W. (1989). "Specific recognition of the leader region of precursor proteins is required for the activation of translocation ATPase of *Escherichia coli*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**(22): 8630-4.

Dabney-Smith, C., Mori, H., Cline, K. (2003). "Requirement of a Tha4 conserved transmembrane glutamate in thylakoid Tat translocase assembly revealed by biochemical complementation." *J. Biol. Chem.* **278**: 43027-33.

Dalbey, R. E., Wickner, W. (1985). "Leader peptidase catalyzes the release of exported proteins from the outer surface of the *Escherichia coli* plasma membrane." *J. Biol. Chem.* **260**(29): 15925-31.

Darmon, E., Noone, D., Masson, A., Bron, S., Kuipers, O. P., Devine, K. M., van Dijl, J. M. (2002). "A novel class of heat and secretion stress-responsive genes is controlled by the autoregulated CsaRS two-component system of *Bacillus subtilis*." *J. Bacteriol.* **184**(20): 5661-71.

De Keyzer, J., Van Der Does, C., Driessen, A. J. (2002). "Kinetic analysis of the translocation of fluorescent precursor proteins into *Escherichia coli* membrane vesicles." *J. Biol. Chem.* **277**(48): 46059-65.

de Leeuw, E., Granjon, T., Porcelli, I., Alami, M., Carr, S. B., Müller, M., Sargent, F., Palmer, T., Berks, B. C. (2002). "Oligomeric properties and signal peptide binding by *Escherichia coli* Tat protein transport complexes." *J. Mol. Biol.* **322**(5): 1135-46.

De Leeuw, E., Porcelli, I., Sargent, F., Palmer, T., Berks, B. C. (2001). "Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway." *FEBS Lett.* **506**(2): 143-8.

DeLisa, M. P., Tullman, D., Georgiou, G. (2003). "Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**(10): 6115-20.

Demchick, P., Koch, A. L. (1996). "The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*." *J. Bacteriol.* **178**(3): 768-73.

Demirjian, D. C., Moris-Varas, F., Cassidy, C. S. (2001). "Enzymes from extremophiles." *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**(2): 144-51.

Demleitner, G., Götz, F. (1994). "Evidence for importance of the *Staphylococcus hyicus* lipase propeptide in lipase secretion, stability, and activity." *FEMS Microbiol. Lett.* **121**(2): 189-197.



- Diamond, D. L., Randall, L. L. (1997). "Kinetic partitioning. Poising SecB to favor association with a rapidly folding ligand." *J. Biol. Chem.* **272**(46): 28994-8.
- Dilks, K., Rose, R. W., Hartmann, E., Pohlschröder, M. (2003). "Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey." *J. Bacteriol.* **185**(4): 1478-83.
- Dilsen, S., Paul, W., Sandgathe, A., Tippe, D., Freudl, R., Thommes, J., Kula, M. R., Takors, R., Wandrey, C., Weuster-Botz, D. (2000). "Fed-batch production of recombinant human calcitonin precursor fusion protein using *Staphylococcus carnosus* as an expression-secretion system." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**(3): 361-9.
- Ding, Z., Christie, P. J. (2003). "*Agrobacterium tumefaciens* twin-arginine-dependent translocation is important for virulence, flagellation, and chemotaxis but not type IV secretion." *J. Bacteriol.* **185**(3): 760-71.
- Driessen, A. J., Manting, E. H., van der Does, C. (2001). "The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria." *Nat. Struct. Biol.* **8**(6): 492-8.
- Dubini, A., Sargent, F. (2003). "Assembly of Tat-dependent [NiFe] hydrogenases: identification of precursor-binding accessory proteins." *FEBS Lett.* **549**(1-3): 141-6.
- Duong, F., Wickner, W. (1999). "The PrlA and PrlG phenotypes are caused by a loosened association among the translocase SecYEG subunits." *EMBO J.* **18**(12): 3263-70.
- Eser, M., Ehrmann, M. (2003). "SecA-dependent quality control of intracellular protein localization." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **3**: 13231-13234.
- Fekkes, P., Driessen, A. J. (1999). "Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**(1): 161-73.
- Ferrari, E., Jarnagin, A. S., Schmidt, B. F. (1993). "Commercial production of extracellular enzymes" In *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics*. ASM Press: 917-937.
- Flower, A. M., Doebele, R. C., Silhavy, T. J. (1994). "PrlA and PrlG suppressors reduce the requirement for signal sequence recognition." *J. Bacteriol.* **176**(18): 5607-14.
- Foster, S. J., Popham, D.L. (2002). "Structure and Synthesis of Cell Wall, Spore Cortex, Teichoic Acids, S-Layers, and Capsules." In *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives*. ASM Press: 21-41.
- Freudl, R. (1998). "Proteinsekretion bei Gram-positiven Bakterien: Molekulare Grundlagen und biotechnologische Aspekte." *Biospektrum* **1**: 29-33.

- Gebert, J. F., Overhoff, B., Manson, M. D., Boos, W. (1988). "The Tsr chemosensory transducer of *Escherichia coli* assembles into the cytoplasmic membrane via a SecA-dependent process." *J. Biol. Chem.* **263**(32): 16652-60.
- Gerard, F., Angelini, S., Wu, L. F. (2002). "Export of *Thermus thermophilus* cytoplasmic beta-glycosidase via the *E. coli* Tat pathway." *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**(6): 533-8.
- Götz, F., Ahrne, S., Lindberg, M. (1981). "Plasmid transfer and genetic recombination by protoplast fusion in staphylococci." *J. Bacteriol.* **145**(1): 74-81.
- Götz, F., Schumacher, B. (1987). "Improvements of protoplast transformation in *Staphylococcus carnosus*." *FEMS Microbiol. Lett.* **40**: 285-288
- Gunneriusson, E., Samuelson, P., Uhlen, M., Nygren, P. A., Ståhl, S. (1996). "Surface display of a functional single-chain Fv antibody on staphylococci." *J. Bacteriol.* **178**(5): 1341-6.
- Gunneriusson, E., Samuelson, P., Ringdahl, J., Gronlund, H., Nygren, P. A., Ståhl, S. (1999). "Staphylococcal surface display of immunoglobulin A (IgA) and IgE-specific in vitro-selected binding proteins (affibodies) based on *Staphylococcus aureus* protein A." *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(9): 4134-40.
- Halbig, D., Wiegert, T., Blaudeck, N., Freudl, R., Sprenger, G. A. (1999). "The efficient export of NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase to the periplasm of *Zymomonas mobilis* depends both on an intact twin-arginine motif in the signal peptide and on the generation of a structural export signal induced by cofactor binding." *Eur. J. Biochem.* **263**(2): 543-51.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on the transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Harwood, C. R. (1992). "*Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological workhorses." *TIBTECH* **10**: 247-256.
- Henry, R., Carrigan, M., McCaffrey, M., Ma, X., Cline, K. (1997). "Targeting determinants and proposed evolutionary basis for the Sec and the Delta pH protein transport systems in chloroplast thylakoid membranes." *J. Cell Biol.* **136**(4): 823-32.
- Hinsley, A. P., Stanley, N.R., Palmer, T., Berks, B. C. (2001). "A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the 'invariant' arginine residues of the consensus targeting motif." *FEBS Lett.* **497**(1): 45-9.
- Horikoshi, K. (1999). "Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**(4): 735-50.

- Houben, E. N., Urbanus, M. L., Van Der Laan, M., Ten Hagen-Jongman, C. M., Driessen, A. J., Brunner, J., Oudega, B., Luirink, J. (2002). "YidC and SecY mediate membrane insertion of a Type I transmembrane domain." *J. Biol. Chem.* **277**(39): 35880-6.
- Hough, D. W., Danson, M. J. (1999). "Extremozymes." *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**(1): 39-46.
- Hynds, P. J., Robinson, D., Robinson, C. (1998). "The sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malfolded proteins across the thylakoid membrane." *J. Biol. Chem.* **273**(52): 34868-74.
- Hyryläinen, H. L., Vitikainen, M., Thwaite, J., Wu, H., Sarvas, M., Harwood, C. R., Kontinen, V. P., Stephenson, K. (2000). "D-Alanine substitution of teichoic acids as a modulator of protein folding and stability at the cytoplasmic membrane/cell wall interface of *Bacillus subtilis*." *J. Biol. Chem.* **275**(35): 26696-703.
- Hyryläinen, H. L., Bolhuis, A., Darmon, E., Muukkonen, L., Koski, P., Vitikainen, M., Sarvas, M., Pragai, Z., Bron, S., van Dijl, J. M. (2001). "A novel two-component regulatory system in *Bacillus subtilis* for the survival of severe secretion stress." *Mol. Microbiol.* **41**(5): 1159-72.
- Ignatova, Z., Hornle, C., Nurk, A., Kasche, V. (2002). "Unusual signal peptide directs penicillin amidase from *Escherichia coli* to the Tat translocation machinery." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**(1): 146-9.
- Ito, K., Bassford, P. J., Beckwith, J. (1981) "Protein localization in *E.coli*: is there a common step in the secretion of periplasmic and outer membrane proteins?" *Cell* **24**: 707-717.
- Ize, B., Gerard, F., Zhang, M., Chanal, A., Voulhoux, R., Palmer, T., Filloux, A., Wu, L. F. (2002a). "In vivo dissection of the Tat translocation pathway in *Escherichia coli*." *J. Mol. Biol.* **317**(3): 327-35.
- Ize, B., Gerard, F., Wu, L. F. (2002b). "In vivo assessment of the Tat signal peptide specificity in *Escherichia coli*." *Arch. Microbiol.* **178**(6): 548-53.
- Ize, B., Stanley, N. R., Buchanan, G., Palmer, T. (2003). "Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity." *Mol. Microbiol.* **48**(5): 1183-93.
- Jack, R. L., Sargent, F., Berks, B. C., Sawers, G., Palmer, T. (2001). "Constitutive expression of *Escherichia coli* tat genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth." *J. Bacteriol.* **183**(5): 1801-4.

- Jacobs, M., Andersen, J. B., Kontinen, V., Sarvas, M. (1993). "*Bacillus subtilis* PrsA is required in vivo as an extracytoplasmic chaperone for secretion of active enzymes synthesized either with or without pro-sequences." *Mol. Microbiol.* 8(5): 957-66.
- Joly, J. C., Wickner, W. (1993). "The SecA and SecY subunits of translocase are the nearest neighbors of a translocating preprotein, shielding it from phospholipids." *EMBO J.* 12(1): 255-63.
- Jongbloed, J. D., Martin, U., Antelmann, H., Hecker, M., Tjalsma, H., Venema, G., Bron, S., van Dijk, J. M., Müller, J. (2000). "TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway." *J. Biol. Chem.* 275(52): 41350-7.
- Jørgensen, S., Vorgias, C. E., Antranikian, G. (1997). "Cloning, sequencing, characterization, and expression of an extracellular alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*." *J. Biol. Chem.* 272(26): 16335-42.
- Karamanou, S., Vrontou, E., Sianidis, G., Baud, C., Roos, T., Kuhn, A., Politou, A. S., Economou A. (1999). "A molecular switch in SecA protein couples ATP hydrolysis to protein translocation." *Mol. Microbiol.* 34(5): 1133-45.
- Kebir, M.O., Kendall, D.A. (2002). "SecA specificity for different signal peptides." *Biochemistry* 41: 5573-5580-
- Kim, J., Kendall, D. A. (1998). "Identification of a sequence motif that confers SecB dependence on a SecB-independent secretory protein in vivo." *J. Bacteriol.* 180(6): 1396-401.
- Kim, S. J., Mitra, D., Salerno, J. R., Hegde, R. S. (2002). "Signal sequences control gating of the protein translocation channel in a substrate-specific manner." *Dev. Cell.* 2(2): 207-17.
- Knoblauch, N. T., Rudiger, S., Schonfeld, H. J., Driessen, A. J., Schneider-Mergener, J., Bukau, B. (1999). "Substrate specificity of the SecB chaperone." *J. Biol. Chem.* 274(48): 34219-25.
- Kontinen, V. P., Sarvas, M. (1993). "The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high-level secretion." *Mol. Microbiol.* 8(4): 727-37.
- Kusukawa, N., Yura, T., Ueguchi, C., Akiyama, Y., Ito, K. (1989). "Effects of mutations in heat-shock genes groES and groEL on protein export in *Escherichia coli*." *EMBO J.* 8(11): 3517-21.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(259): 680-5.

- Lam, S. L., Kirby, S., Schryvers, A. B. (2003). "Foreign signal peptides can constitute a barrier to functional expression of periplasmic proteins in *Haemophilus influenzae*." *Microbiology*. **49**(Pt 11): 3155-64.
- Langer, T. (2000). "AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins." *Trends Biochem. Sci.* **25**(5): 247-51.
- Le Loir, Y., Gruss, A., Ehrlich, S. D., Langella, P. (1998). "A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*." *J. Bacteriol.* **180**(7): 1895-903.
- Le Loir, Y., Nouaille, S., Commissaire, J., Bretigny, L., Gruss, A., Langella, P. (2001). "Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*." *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(9): 4119-27.
- Lehtio, J., Wernerus, H., Samuelson, P., Teeri, T. T., Ståhl, S. (2001). "Directed immobilization of recombinant staphylococci on cotton fibers by functional display of a fungal cellulose-binding domain." *FEMS Microbiol. Lett.* **195**(2): 197-204.
- Leloup, L., Driessen, A. J., Freudl, R., Chambert, R., 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): 1820-6.
- Liebl, W., Götz, F. (1986). "Studies on lipase directed export of Escherichia coli beta-lactamase in *Staphylococcus carnosus*." *Mol. Gen. Genet.* **204**(1): 166-73.
- Liepe, H.-U. (1982). "Starter cultures and dry sausage." *Forum Mikrobiologie* **5**: 10-15.
- Liljeqvist, S., Samuelson, P., Hansson, M., Nguyen, T. N., Binz, H., Ståhl, S. (1997). "Surface display of the cholera toxin B subunit on *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus*." *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(7): 2481-8.
- Lill R., Dowhan W., Wickner, W. (1990). "The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins." *Cell* **60**(2): 271-80.
- Liu, G., Topping, T. B., Randall, L. L. (1989). "Physiological role during export for the retardation of folding by the leader peptide of maltose-binding protein". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9213-9217.
- MacGregor, E. A., Janecek, S., Svensson, B. (2001). "Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes." *Biochim. Biophys. Acta* **1546**(1): 1-20.

- Manting, E. H., Driessen, A. J. (2000). "*Escherichia coli* translocase: the unravelling of a molecular machine." *Mol. Microbiol.* **37**(2): 226-38.
- Matsumoto, G., Nakatogawa, H., Mori, H., Ito, K. (2000). "Genetic dissection of SecA: suppressor mutations against the secY205 translocase defect." *Genes Cells* **5**(12): 991-9.
- Mavrangelos, C., Thiel, M., Adamson, P. J., Millard, D. J., Nobbs, S., Zola, H., Nicholson, I. C. (2001). "Increased yield and activity of soluble single-chain antibody fragments by combining high-level expression and the Skp periplasmic chaperonin." *Protein Expr. Purif.* **23**(2): 289-95.
- Meens, J., Herbort, M., Klein, M., Freudl, R. (1997). "Use of the pre-pro part of *Staphylococcus hyicus* lipase as a carrier for secretion of *Escherichia coli* outer membrane protein A (OmpA) prevents proteolytic degradation of OmpA by cell-associated protease(s) in two different gram-positive bacteria." *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(7): 2814-20.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Miyoshi, A., Poquet I., Azevedo, V., Commissaire, J., Bermudez-Humaran, L., Domakova, E., Le Loir, Y., Oliveira, S.C., Gruss, A., Langella, P. (2002). "Controlled production of stable heterologous proteins in *Lactococcus lactis*." *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(6): 3141-6.
- Meloni, S., Rey, L., Sidler, S., Imperial, J., Ruiz-Argueso, T., Palacios, J. M. (2003). "The twin-arginine translocation (Tat) system is essential for *Rhizobium*-legume symbiosis." *Mol. Microbiol.* **48**(5): 1195-207.
- Mori, H., Cline, K. (2002). "A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid  $\Delta$ pH/Tat translocase." *J. Cell Biol.* **157**(2): 205-10.
- Navarre, W. W., Daefler, S., Schneewind, O. (1996). "Cell wall sorting of lipoproteins in *Staphylococcus aureus*." *J. Bacteriol.* **178**(2): 441-6.
- Nishiyama, K., Fukuda, A., Morita, K., Tokuda, H. (1999). "Membrane deinsertion of SecA underlying proton motive force-dependent stimulation of protein translocation." *EMBO J.* **18**(4): 1049-58.
- Nouwen, N., de Kruijff, B., Tommassen, J. (1996a). "Delta muH<sup>+</sup> dependency of in vitro protein translocation into *Escherichia coli* inner-membrane vesicles varies with the signal-sequence core-region composition." *Mol. Microbiol.* **19**(6): 1205-14.

- Nouwen, N., de Kruijff, B., Tommassen, J. (1996b). "*prlA* suppressors in *Escherichia coli* relieve the proton electrochemical gradient dependency of translocation of wild-type precursors." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(12): 5953-7.
- Nouwen, N., Driessen, A. J. (2002). "SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC." *Mol. Microbiol.* **44**(5): 1397-405.
- Oates, J., Mathers, J., Mangels, D., Kuhlbrandt, W., Robinson, C., Model, K. (2003). "Consensus structural features of purified bacterial TatABC complexes." *J. Mol. Biol.* **330**(2): 277-86.
- Ochsner, U. A., Snyder, A., Vasil, A. I., Vasil, M. L. (2002). "Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**(12): 8312-7.
- Or, E., Navon, A., Rapoport, T. (2002). "Dissociation of the dimeric SecA ATPase during protein translocation across the bacterial membrane." *EMBO J.* **21**(17): 4470-9.
- Ouzzine, M., Fournel-Gigleux, S., Pillot, T., Burchell, B., Siest, G., Magdalou, J. (1994). "Expression of the human UDP-glucuronosyltransferase UGT1\*6 in *Escherichia coli*. Influence of bacterial signal peptides on the production and localization of the recombinant protein." *FEBS Lett.* **339**(1-2): 195-9.
- Pages, J.M., Anba, J., Bernadac, A., Shinagawa, H., Nakata, A., Lazdunski, C. (1984). "Normal precursors of periplasmic proteins accumulated in the cytoplasm are not exported post-translationally in *Escherichia coli*." *Eur. J. Biochem.* **143**(3): 499-505.
- Papish, A. L., Ladner, C. L., Turner, R. J. (2003). "The twin-arginine leader binding protein, DmsD, interacts with the TatB and TatC subunits of the *Escherichia coli* twin arginine translocase." *J. Biol. Chem.* **17**: 32501-6.
- Park, S., Liu, G., Topping, T. B., Cover, H. W., Randall, L. L. (1988). "Modulation of the folding pathways of exported proteins by the leader sequence" *Science* **239**: 1033-1035.
- Perez-Perez, J., Marquez, G., Barbero, J. L., Gutierrez, J. (1994). "Increasing the efficiency of protein export in *Escherichia coli*." *Biotechnology (NY)* **12**(2): 178-80.
- Porcelli, I., de Leeuw, E., Wallis, R., van den Brink-van der Laan, E., de Kruijff, B., Wallace, B. A., Palmer, T., Berks, B. C. (2002). "Characterization and membrane assembly of the TatA component of the *Escherichia coli* twin-arginine protein transport system." *Biochemistry* **41**(46): 13690-7.

- Pradel, N., Santini, C. L., Ye, C. Y., Fevat, L., Gerard, F., Alami, M., Wu, L. F. (2003). "Influence of tat mutations on the ribose-binding protein translocation in *Escherichia coli*." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**(3): 786-91.
- Pradel, N., Ye, C., Livrelli, V., Xu, J., Joly, B., Wu, L. F. (2003). "Contribution of the Twin Arginine Translocation System to the Virulence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." *Infect. Immun.* **71**(9): 4908-4916.
- Prowe, S. G., Antranikian, G. (2001). "*Anaerobranca gottschalkii* sp. nov., a novel thermoalkaliphilic bacterium that grows anaerobically at high pH and temperature." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**(Pt 2): 457-65.
- Prowe, S. G., van de Vossenberg, J. L., Driessen, A. J., Antranikian, G., Konings, W. N. (1996). "Sodium-coupled energy transduction in the newly isolated thermoalkaliphilic strain LBS3." *J. Bacteriol.* **178**(14): 4099-104.
- Pschorr, J., Bieseler, B., Fritz, H. J. (1994). "Production of the immunoglobulin variable domain REIv via a fusion protein synthesized and secreted by *Staphylococcus carnosus*." *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **375**(4): 271-80.
- Raffa, R. G., Raivio, T. L. (2002). "A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*." *Mol. Microbiol.* **45**(6): 1599-611.
- Raivio, T. L., Silhavy, T. J. (1999). "The sigmaE and Cpx regulatory pathways: overlapping but distinct envelope stress responses." *Curr. Opin. Microbiol.* **2**(2): 159-65.
- Randall, L. L., Hardy, S. J. (2002). "SecB, one small chaperone in the complex milieu of the cell." *Cell. Mol. Life Sci.* **59**(10): 1617-23.
- Ravn, P., Arnau, J., Madsen, S. M., Vrang, A., Israelsen, H. (2003). "Optimization of signal peptide SP310 for heterologous protein production in *Lactococcus lactis*." *Microbiology* **149**(Pt. 8): 2193-201.
- Record, E., Punt, P. J., Chamkha, M., Labat, M., van Den Hondel, C. A., Asther, M. (2002). "Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme." *Eur. J. Biochem.* **269**(2): 602-9.
- Robinson, C., Bolhuis, A. (2001). "Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway." *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**(5): 350-6.
- Rodrigue, A., Chanal, A., Beck, K., Müller, M., Wu, L. F. (1999). "Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway." *J. Biol. Chem.* **274**(19): 13223-8.



- Samuelson, P., Cano, F., Robert, A., Ståhl, S. (1999). "Engineering of a *Staphylococcus carnosus* surface display system by substitution or deletion of a *Staphylococcus hyicus* lipase propeptide." *FEMS Microbiol. Lett.* **179**: 131-139.
- Samuelson, P., Hansson, M., Ahlberg, N., Andreoni, C., Götz, F., Bachi, T., Nguyen, T. N., Binz, H., Uhlen, M., Ståhl, S. (1995). "Cell surface display of recombinant proteins on *Staphylococcus carnosus*." *J. Bacteriol.* **177**(6): 1470-6.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Sankaran, K., Wu, H. C. (1994). "Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol." *J. Biol. Chem.* **269**(31):19701-6.
- Santini, C. L., Ize, B., Chanal, A., Müller, M., Giordano, G., Wu, L. F. (1998). "A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*." *EMBO J.* **17**(1): 101-12.
- Sargent, F., Bogesch, E. G., Stanley, N. R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B. C., Palmer T. (1998). "Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway." *EMBO J.* **17**(13): 3640-50.
- Sargent, F., Stanley, N. R., Berks, B. C., Palmer, T. (1999). "Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. A distinct and pivotal role for the TatB protein." *J. Biol. Chem.* **274**(51): 36073-82.
- Sargent, F., Gohlke, U., De Leeuw, E., Stanley, N. R., Palmer, T., Saibil, H. R., Berks, B. C. (2001). "Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure." *Eur. J. Biochem.* **268**(12): 3361-7.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., Engel, P. C. (1998). "Protein thermostability in extremophiles." *Biochimie* **80**(11): 933-41.
- Schaerlaekens, K., Schierova, M., Lammertyn, E., Geukens, N., Anne, J., Van Mellaert, L. (2001). "Twin-arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*." *J. Bacteriol.* **183**(23): 6727-32.
- Schiraldi, C., De Rosa, M. (2002). "The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles." *Trends Biotechnol.* **20**(12): 515-21.
- Schleifer, K.H., Fischer, U. (1982), "Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*." *Int. Syst. Bacteriol.* **32**: 153-156.

Schnappinger, D., Geissdorfer, W., Sizemore, C., Hillen, W. (1995). "Extracellular expression of native human anti-lysozyme fragments in *Staphylococcus carnosus*." *FEMS Microbiol. Lett.* **129**(2-3): 121-7.

Schumann, W. (1999). "FtsH-a single-chain charonin?" *FEMS Microbiol. Rev.* **23**(1): 1-11.

Settles, A. M., Yonetani, A., Baron A., Bush, D. R., Cline, K., Martienssen, R. (1997). "Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein." *Science* **278**(5342): 1467-70.

Shiozuka, K., Tani, K., Mizushima, S., Tokuda, H. (1990). "The proton motive force lowers the level of ATP required for the in vitro translocation of a secretory protein in *Escherichia coli*." *J. Biol. Chem.* **265**(31): 18843-7.

Shuman, H. A., Silhavy, T. J., Beckwith, J. R. (1980). "Labeling of proteins with beta-galactosidase by gene fusion. Identification of a cytoplasmic membrane component of the *Escherichia coli* maltose transport system." *J. Biol. Chem.* **255**(1): 168-74.

Simonen, M., Palva, I. (1993). "Protein secretion in *Bacillus* species." *Microbiol. Rev.* **57**(1): 109-37.

Soden, D. M., O'Callaghan, J., Dobson, A. D. (2002). "Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host." *Microbiology* **148**(Pt 12): 4003-14.

Stephenson, K., Carter, N. M., Harwood, C. R., Petit-Glatron, M. F., Chambert, R. (1998). "The influence of protein folding on late stages of the secretion of alpha-amylases from *Bacillus subtilis*." *FEBS Lett.* **430**(3): 385-9.

Stephenson, K., Harwood, C. R. (1998). "Influence of a cell-wall-associated protease on production of alpha-amylase by *Bacillus subtilis*." *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(8): 2875-81.

Studier, F. W., Moffatt, B. A. (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J. Mol. Biol.* **189**(1): 113-30.

Sturmfels, A., Götz, F., Peschel, A. (2001). "Secretion of human growth hormone by the food-grade bacterium *Staphylococcus carnosus* requires a propeptide irrespective of the signal peptide used." *Arch. Microbiol.* **178**: 295-300.

Summers, R. G., Knowles, J. R. (1989). "Illicit secretion of a cytoplasmic protein into the periplasm of *Escherichia coli* requires a signal peptide plus a portion of the cognate secreted protein. Demarcation of the critical region of the mature protein." *J. Biol. Chem.* **264**(33): 20074-81.

- Swennen, D., Paul, M. F., Vernis, L., Beckerich, J. M., Fournier, A., Gaillardin, C. (2002). "Secretion of active anti-Ras single-chain Fv antibody by the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Kluyveromyces lactis*." *Microbiology* 148(Pt. 1): 41-50.
- Takahara, M., Hibler, D. W., Barr, P. J., Gerlt, J. A., Inouye, M. (1985). "The ompA signal peptide directed secretion of Staphylococcal nuclease A by *Escherichia coli*." *J. Biol. Chem.* 260(5): 2670-4.
- Takata, H., Takaha, T., Kuriki, T., Okada, S., Takagi, M., Imanaka, T. (1994). "Properties and active center of the thermostable branching enzyme from *Bacillus stearothermophilus*." *Appl. Environ. Microbiol.* 60(9): 3096-104.
- Thomas, J. D., Daniel, R. A., Errington, J., Robinson, C. (2001). "Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*." *Mol. Microbiol.* 39(1): 47-53.
- Thudt, K., Schleifer, K. H., Götz, F. (1985). "Cloning and expression of the alpha-amylase gene from *Bacillus stearothermophilus* in several staphylococcal species." *Gene* 37(1-3): 163-9.
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S., van Dijl, J. M. (2000). "Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(3): 515-47.
- Topping, T. B., Randall, L. L. (1997). "Chaperone SecB from *Escherichia coli* mediates kinetic partitioning via a dynamic equilibrium with its ligands." *J. Biol. Chem.* 272(31): 19314-8.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Tsukagoshi, N., Iritani, S., Sasaki, T., Takemura, T., Ihara, H., Idota, Y., Yamagata, H., Udaka, S. (1985). "Efficient synthesis and secretion of a thermophilic alpha-amylase by protein-producing *Bacillus brevis* 47 carrying the *Bacillus stearothermophilus* amylase gene." *J. Bacteriol.* 164(3): 1182-7.
- Valent, Q. A., de Gier, J. W., von Heijne, G., Kendall, D. A., ten Hagen-Jongman, C. M., Oudega, B., Luirink, J. (1997). "Nascent membrane and presecretory proteins synthesized in *Escherichia coli* associate with signal recognition particle and trigger factor." *Mol. Microbiol.* 25(1): 53-64.
- Valent, Q. A., Scotti, P. A., High, S., de Gier, J. W., von Heijne, G., Lentzen, G., Wintermeyer, W., Oudega, B., Luirink, J. (1998). "The *Escherichia coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon." *EMBO J.* 17(9): 2504-12.

- Valkonen, M., Penttila, M., Saloheimo, M. (2003). "Effects of inactivation and constitutive expression of the unfolded- protein response pathway on protein production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(4): 2065-72.
- Van den Burg, B. (2003). "Extremophiles as a source for novel enzymes." *Curr. Opin. Microbiol.* **6**(3): 213-8.
- Van der Maarel, M. J., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. (2002). "Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family." *J. Biotechnol.* **94**(2): 137-55.
- Van der Veen, B. A., Uitdehaag, J. C., Dijkstra, B. W., Dijkhuizen, L. (2000). "Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity." *Biochim. Biophys. Acta* **1543**(2): 336-360.
- Van Wely, K. H., Swaving, J., Freudl, R., Driessen, A. J. (2001). "Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria." *FEMS Microbiol. Rev.* **25**(4): 437-54.
- Van der Wolk, J. P., Fekkes, P., Boorsma, A., Huie, J. L., Silhavy, T. J., Driessen, A. J. (1998). "PrlA4 prevents the rejection of signal sequence defective preproteins by stabilizing the SecA-SecY interaction during the initiation of translocation." *EMBO J.* **17**(13):3631-9. Erratum in: *EMBO J.* **17**(18):5519.
- Vieille, C., Zeikus, G. J. (2001). "Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**(1): 1-43.
- Vitikainen, M., Pummi, T., Airaksinen, U., Wahlstrom, E., Wu, H., Sarvas, M., Kontinen, V. P. (2001). "Quantitation of the capacity of the secretion apparatus and requirement for PrsA in growth and secretion of alpha-amylase in *Bacillus subtilis*." *J. Bacteriol.* **183**(6): 1881-90.
- Von Heijne, G. (1984). "How signal sequences maintain cleavage specificity." *J. Mol. Biol.* **173**(2): 243-51.
- Von Heijne, G. (1985). "Signal sequences. The limits of variation." *J. Mol. Biol.* **184**(1): 99-105.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F., Filloux, A. (2001). "Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway." *EMBO J.* **20**(23): 6735-41.
- Wahlstrom, E., Vitikainen, M., Kontinen, V. P., Sarvas, M. (2003). "The extracytoplasmic folding factor PrsA is required for protein secretion only in the presence of the cell wall in *Bacillus subtilis*." *Microbiology* **149**(Pt 3): 569-77.

- Walsh, N. P., Alba, B. M., Bose, B., Gross, C. A., Sauer, R. T. (2003). "OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain." *Cell* **113**(1): 61-71.
- Wang, L., Miller, A., Kendall, D. A. (2000). "Signal peptide determinants of SecA binding and stimulation of ATPase activity." *J. Biol. Chem.* **275**(14): 10154-9.
- Weiner, J. H., Bilous, P. T., Shaw, G. M., Lubitz, S. P., Frost, L., Thomas, G. H., Cole, J. A., Turner, R. J. (1998). "A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins." *Cell* **93**(1): 93-101.
- Wernerus, H., Lehtio, J., Teeri, T., Nygren, P. A., Ståhl, S. (2001). "Generation of metal-binding staphylococci through surface display of combinatorially engineered cellulose-binding domains." *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(10): 4678-84.
- Wernerus, H., Lehtio, J., Samuelson, P., Ståhl, S. (2002). "Engineering of staphylococcal surfaces for biotechnological applications." *J. Biotechnol.* **96**(1): 67-78.
- Wexler, M., Sargent, F., Jack, R. L., Stanley, N. R., Bogsch, E. G., Robinson, C., Berks, B. C., Palmer, T. (2000). "TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export." *J. Biol. Chem.* **275**(22): 16717-22.
- Wiegert, T., Sahm, H., Sprenger, G. A. (1997). "Expression of the *Zymomonas mobilis* gfo gene or NADP-containing glucose:fructose oxidoreductase (GFOR) in *Escherichia coli*. Formation of enzymatically active preGFOR but lack of processing into a stable periplasmic protein." *Eur. J. Biochem.* **244**(1): 107-12.
- Wieland, K. P., Wieland, B., Götz, F. (1995). "A promoter-screening plasmid and xylose-inducible, glucose-repressible expression vectors for *Staphylococcus carnosus*." *Gene* **158**(1): 91-6.
- Wild, J., Rossmeissl, P., Walter, W. A., Gross, C. A. (1996). "Involvement of the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone team in protein secretion in *Escherichia coli*." *J. Bacteriol.* **178**(12): 3608-13.
- Williams, R. C., Rees, M. L., Jacobs, M. F., Pragai, Z., Thwaite, J. E., Baillie, L. W., Emmerson, P. T., Harwood, C. R. (2003). "Production of *Bacillus anthracis* protective antigen is dependent on the extracellular chaperone, PrsA." *J. Biol. Chem.* **278**(20): 18056-62.
- Wu, L. F., Ize, B., Chanal, A., Quentin, Y., Fichant, G. (2000). "Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism." *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**(2): 179-89.

Wu, S. C., Yeung, J. C., Duan, Y., Ye, R., Szarka, S. J., Habibi, H. R., Wong, S. L. (2002). "Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production." *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(7): 3261-9.

Yahr, T. L., Wickner, W. T. (2001). "Functional reconstitution of bacterial Tat translocation in vitro." *EMBO J.* **20**(10): 2472-9.

Yamada, H., Matsuyama, S., Tokuda H., Mizushima, S. (1989). "A high concentration of SecA allows proton motive force-independent translocation of a model secretory protein into *Escherichia coli* membrane vesicles." *J. Biol. Chem.* **264**(31): 18577-81.

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

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 im Forschungszentrum Jülich GmbH angefertigt.

Zuallererst danke ich Herrn Prof. R. Freudl für die Überlassung des spannenden Themas, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen Ratschläge, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. C. P. Hollenberg danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

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

Mein Dank gilt Herrn Dr. Karlo Schimz und Gaby Decker für die Bereitstellung der Lipase-Antikörper und für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Astrid Bida möchte ich dafür danken, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat, auch wenn es erst sieben Uhr morgens war, und dafür, dass sie das *S. carnosus* Tat-Operon identifizierte.

Daniel Meissner bin ich für die "just-in-time"-Konstruktion der *S. carnosus* TatC-Mutante "Heartbreaker" zu Dank verpflichtet.

Peter Kreutzenbeck und Michael Caspers danke ich sehr für das Korrekturlesen in letzter Minute.

Weiterhin möchte ich natürlich Henrike Brundiek, Maren Hintz, Oliver Köberling, und auch den ehemaligen Mitgliedern der Gruppe Natascha Blaudeck und Stephanie Schnicke für das sehr gute Arbeitsklima in der Arbeitsgruppe "Proteinsekretion", ihre Hilfsbereitschaft und so manche anregende Diskussion danken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie 1 danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und für das allgemein sehr gute Arbeitsklima im Haus.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich während meiner Ausbildung in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

And last but not least, a big thank you to James who held everything together and put up with it all so patiently.

