

**Untersuchungen zur Subtilisin-Produktion
mit *Bacillus licheniformis*
und
Konstruktion eines alternativen Selektionssystems**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von
Maren Hintz
aus Düsseldorf

Forschungszentrum Jülich GmbH, 52425 Jülich

2003

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

Referent: Prof. Dr. R. Freidl

Korreferent: Prof. Dr. K.-E. Jäger

Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2003

**Untersuchungen zur Subtilisin-Produktion
mit *Bacillus licheniformis* und Konstruktion
eines alternativen Selektionssystems**

Maren Hintz

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4128

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-4128

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2003)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Investigation of subtilisin production with *Bacillus licheniformis* and construction of an alternative selection system

Bacillus licheniformis is used by the detergent industry for the production of proteases of the subtilisin type. Producer strains are obtained by multiple cycles of undirected mutagenesis followed by screening for high enzyme yield in the supernatant. The genetic reason for the good secretion property is not known. In the present work, differences between the DNA sequences of the industrial strain *B. licheniformis* “E” and the wild-type (wt) strain *B. licheniformis* DSM13 that contribute to the good secretion properties of the industrial strain are to be identified. It is likely that such mutations are localized in the genes of the protein biosynthesis or the protein translocation. One possible gene locus for such mutations is the *secA* gene locus, which harbors one gene of the protein translocation (*secA*) and also one gene of the protein biosynthesis (*prfB*). In comparison to the wt strain, the *secA* gene locus of the industrial strain shows 41 point mutations. Only one of these mutations is localized within the *secA* gene whereas the remaining 40 mutations are found in the much shorter *prfB* gene. The point mutation within the *secA* gene is silent and has therefore no influence on the amino acid sequence of the SecA protein. Because in the late stationary growth phase the industrial strain has 4 times more SecA protein than the wt strain, it is assumed that the mutations lead to a stabilization of the bicistronic *secA-prfB*-mRNA. The resulting increase of the SecA concentration could be one reason for the good secretion property of the industrial strain. Two of the mutations localized within the *prfB* gene each lead to an amino acid change in the corresponding RF2 (release factor 2) protein. By varying the expression strength of the unchanged and the mutated *prfB* gene it was possible to investigate the influence of the amino acid changes as well as the influence of a higher amount of RF2 on the subtilisin yield obtained with the wt or the industrial strain. Because both the nature and the concentration of the RF2 protein have an influence on the subtilisin yield, it is very likely that the identified mutations within the *secA* gene locus together with additional mutations in other components of the protein biosynthesis machinery lead to an increased capacity for protein biosynthesis. It is assumed that this is one reason for the high subtilisin yields that are obtained with the industrial strain.

For the industrial production of subtilisin, the subtilisin gene is expressed from a high copy plasmid, which harbors an antibiotic resistance cassette for the initial selection. In contrast, the real fermentation is carried out without adding antibiotics, therefore some of the cells from the culture will lose their plasmid. In the present work, an alternative selection system was constructed with the *secA* gene as a selection marker. The constructed subtilisin-SecA-plasmid was stable in the *secA* deletion strain throughout the entire cultivation period. In shaking flask experiments this strain secretes amounts of subtilisin into the supernatant at least similar to those obtained with the original strain without selection pressure by antibiotics. The perfect stability of the subtilisin-SecA-plasmid indicates that especially under the fermentative conditions of industrial subtilisin production a significant increase in yield can be reached.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1. Der bakterielle Protein-Export über den generellen Sekretionsweg (Sec-Weg)	1
1.1. Das N-terminale Signalpeptid.....	1
1.2. Der Proteinexport über den Sec-Weg	4
1.3. Das „Targeting“ der Proteine.....	4
1.4. Das SecA-Protein.....	6
1.5. Die Proteine SecY, SecE und SecG.....	11
1.6. Die Proteine SecD, SecF, YajC, YidC und PrsA.....	12
2. Enzym-Produktion mit Gram-positiven Bakterien.....	13
3. Der <i>secA</i> -Genlocus von <i>B. licheniformis</i> enthält sowohl ein Gen der Proteinsekretion als auch eines der Proteinbiosynthese	14
4. Die Rolle von „Release“-Faktoren der Klasse 1 bei der bakteriellen Proteinbiosynthese	16
4.1. Die bakterielle Proteinbiosynthese - ein Überblick	16
4.2. „Release“-Faktoren der Klasse 1: Struktur und Funktion.....	18
5. Zielsetzung der Arbeit.....	21
II. Material und Methoden	22
1. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	22
2. Medien.....	27
3. Verwendete Reagenzien und Bezugsquellen.....	30
4. Mikrobiologische Methoden	31
4.1. Kultivierung von Bakterien.....	31
4.1.1. Allgemeine Kultivierungsbedingungen.....	31
4.1.2. Kultivierung von <i>Bacillus</i> -Stämmen zur vergleichenden Bestimmung der Subtilisin-Ausbeuten im Kulturüberstand.....	31
4.2. Stammhaltung	32
4.3. Transformation von Bakterien	32
4.4. Präparation von DNA	33
4.4.1. Präparation chromosomaler DNA aus <i>B. subtilis</i> und <i>B. licheniformis</i>	33
4.4.2. Präparation von Plasmid-DNA	34
4.5. Allgemeine gentechnische Methoden	35
4.5.1. Agarose-Gelelektrophorese.....	35
4.5.2. Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	35
4.5.3. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	35
4.5.4. Behandlung mit alkalischer Phosphatase	36
4.5.5. Umwandlung von überhängenden 5'-Enden in glatte Enden.....	36
4.5.6. Entsalzen von DNA-Lösungen	36
4.5.7. Ligation von DNA-Fragmenten	36
4.6. Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
4.7. Gezielte Mutagenese von Plasmid-DNA	37
4.8. Nicht radioaktive DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode	37
4.9. DNA-DNA Hybridisierung nach Southern.....	39
4.9.1. Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde.....	39
4.9.2. Hybridisierung von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA	39

5. Proteinchemische Methoden	40
5.1. Bestimmung der Subtilisin-Aktivitäten mittels AAPF-Test	40
5.2. Isolierung von Proteinen aus Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen	41
5.2.1. Induktion der Genexpression	41
5.2.2. Herstellung von Gesamtzellextrakten von <i>B. subtilis</i>	41
5.2.3. Aufarbeitung von Kulturüberständen.....	42
5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).....	42
5.4. Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Schägger <i>et al.</i> ,1987)	43
5.5. Coomassie-Färbung von Proteingelen	43
5.6. Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern (Western-Blot).....	43
5.7. „Pulse-Chase“-Experiment mit <i>B. subtilis</i> (variiert nach van Dijn, 1991)	44

III. Ergebnisse 47

1. Untersuchungen zur Ursache der hohen Sekretionsleistung des industrierelevanten Stammes <i>B. licheniformis</i> „E“	47
1.1. Der <i>secA</i> -Genlocus als potentieller Genort für Mutationen, die zur guten Sekretionsleistung von <i>B. licheniformis</i> „E“ führen	50
1.2. Das <i>secA</i> -Strukturgen von <i>B. licheniformis</i> „E“ unterscheidet sich in einem Basenpaar vom <i>secA</i> -Gen des Wildtypstammes DSM13	51
1.3. Die SecA-Menge in <i>B. licheniformis</i> „E“ ist im Vergleich zum Wildtypstamm <i>B. licheniformis</i> DSM13 während der stationären Wachstumsphase deutlich erhöht	54
1.4. Funktionelle Charakterisierung des <i>B. licheniformis</i> „E“ SecA-Proteins in einer <i>B. subtilis</i> <i>secA</i> -Mutante	55
1.4.1. Subklonierung des <i>secA</i> -Gens aus <i>Bacillus licheniformis</i> „E“ in einen Expressionsvektor für <i>Bacillus</i>	56
1.4.2. Das SecA-Protein von <i>B. licheniformis</i> kann den Exportdefekt der temperatursensitiven <i>B. subtilis</i> Mutante NIG1152 komplementieren	57
1.5. Die Überexpression der <i>secA</i> -Gene von <i>B. subtilis</i> und <i>B. licheniformis</i> hat keinen Einfluss auf den OmpA-Export in <i>B. subtilis</i> DB104.....	58
1.6. Vergleich der <i>prfB</i> -DNA-Sequenzen von <i>B. licheniformis</i> DSM13 (Wt) und <i>B. licheniformis</i> „E“	61
1.6.1. Einteilung des RF2 von <i>E. coli</i> in funktionelle Domänen.....	64
1.6.2. Vergleich der Aminosäuresequenzen der RF2-Proteine von <i>B. licheniformis</i> „E“ und <i>B. licheniformis</i> DSM13 und der RF2-Proteine anderer Organismen.....	65
1.7. Einfluss der <i>prfB</i> Expression auf die Subtilisin-Ausbeuten.....	69
1.7.1. Konstruktion der <i>prfB</i> -Expressionsvektoren mit und ohne Autoregulation.....	70
1.7.1.1. Ausschalten der Autoregulation der <i>prfB</i> -Gene	71
1.7.1.2. Austausch des Resistenzgens für Transformation in <i>B. licheniformis</i>	71
1.7.2. Einfluss der Expression der <i>prfB</i> -Gene von <i>B. licheniformis</i> Wt und <i>B. licheniformis</i> „E“ auf die Subtilisin-Ausbeute.....	72
1.7.2.1. Die RF2-Proteine von <i>B. licheniformis</i> DSM13 und <i>B. licheniformis</i> „E“ werden in <i>B. subtilis</i> und <i>B. licheniformis</i> exprimiert	73
1.7.2.2. Vergleich der Subtilisin-Ausbeuten bei Koexpression der <i>prfB</i> -Gene von <i>B. licheniformis</i> DSM13 oder <i>B. licheniformis</i> „E“	75
2. Untersuchung des <i>secA</i> -Gens auf seine Verwendbarkeit als Selektionsmarker für die Subtilisin-Produktion mit <i>B. licheniformis</i>	80
2.1. Konstruktion des <i>secA</i> -Selektionssystems	80
2.1.1. Klonierung des <i>secA</i> -Gens in das Subtilisin-Plasmid	80
2.1.2. Konstruktion des <i>secA</i> -Deletionsvektors	83
2.1.3. Deletion des chromosomalen <i>secA</i> -Gens	86

2.2. Charakterisierung der <i>secA</i> -Deletionsmutante <i>B. licheniformis</i> „E“ $\Delta secA$ pSubSecA.....	92
2.2.1. Das auf dem Plasmid pSubSecA lokalisierte <i>secA</i> -Gen führt zu einer Erhöhung der SecA-Proteinkonzentration in <i>B. licheniformis</i> „E“.....	92
2.2.2. Das Plasmid pSubSecA ist in der <i>secA</i> -Deletionsmutante <i>B. licheniformis</i> „E“ $\Delta secA$ stabil.....	94
2.2.3. Charakterisierung des <i>secA</i> -Selektionssystems bezüglich der Subtilisin-Ausbeuten.....	98
IV. Diskussion	104
1. Untersuchungen zur Ursache der hohen Sekretionsleistung des industrierelevanten Stammes <i>B. licheniformis</i> „E“.....	104
1.1. Möglicher Einfluss der im <i>secA</i> -Gen von <i>B. licheniformis</i> „E“ identifizierten Mutation auf den Proteinexport.....	105
1.1.1. Das SecA-Protein von <i>B. licheniformis</i> ist in <i>B. subtilis</i> funktionell.....	106
1.1.2. Die SecA-Konzentration in <i>B. subtilis</i> DB104 ist für den Export des OmpA-Proteins nicht limitierend.....	107
1.2. Möglicher Einfluss der im <i>prfB</i> -Gen von <i>B. licheniformis</i> „E“ identifizierten Mutationen auf die Proteinbiosynthese.....	109
1.2.1. Die Koexpression der <i>B. licheniformis</i> <i>prfB</i> -Gene beeinflusst die von <i>B. subtilis</i> DB104, <i>B. licheniformis</i> DSM13 und <i>B. licheniformis</i> „E“ sekretierten Subtilisin-Mengen.....	110
1.2.1.1. Die Synthese der <i>B. licheniformis</i> RF2-Proteine führt bei <i>B. subtilis</i> DB104 zu einer Verringerung der Subtilisin-Ausbeute.....	112
1.2.1.2. Eine leichte Erhöhung der RF2-Konzentration führt bei <i>B. licheniformis</i> DSM13 (Wt) zu einer Steigerung der Subtilisin-Ausbeute.....	113
1.2.1.3. Die Überproduktion des eigenen RF2-Proteins führt bei <i>B. licheniformis</i> „E“ zu einer Steigerung der Subtilisin-Ausbeute.....	116
1.2.1.4. Die Mutationen im <i>prfBE</i> -Gen sind wahrscheinlich mitverantwortlich für die mit <i>B. licheniformis</i> „E“ erzielte hohe Subtilisin-Ausbeute.....	118
2. Untersuchungen des <i>secA</i> -Gens auf seine Verwendbarkeit als Selektionsmarker für die Subtilisin-Produktion mit <i>B. licheniformis</i>	119
2.1. Das <i>secA</i> -Selektionssystem führt zu einer erhöhten SecA-Konzentration in den Zellen.....	120
2.2. Das Plasmid pSubSecA ist in der <i>secA</i> -Deletionsmutante <i>B. licheniformis</i> „E“ $\Delta secA$ stabil.....	122
2.3. Mit <i>B. licheniformis</i> „E“ $\Delta secA$ pSubSecA werden bei Kultivierung im Schüttelkolben vergleichbar hohe Subtilisin-Ausbeuten erzielt wie mit dem Ausgangsstamm <i>B. licheniformis</i> „E“ pSub.....	123
2.3.1. Die Überexpression des <i>secA</i> -Gens hat einen positiven Einfluss auf die Subtilisin-Ausbeute mit <i>B. licheniformis</i> „E“.....	124
2.3.2. Im Schüttelkolbenexperiment ohne Antibiotika werden mit <i>B. licheniformis</i> „E“ $\Delta secA$ pSubSecA und <i>B. licheniformis</i> „E“ pSub vergleichbare Subtilisin-Ausbeuten erhalten.....	125
2.4. Abschließende Betrachtung des <i>secA</i> -Selektionssystems für die industrielle Subtilisin-Produktion mit <i>B. licheniformis</i>	128
V. Zusammenfassung	129
VI. Literatur	131

Abkürzungen

A	Adenin
Å	Ångström
AAPF	suc-AAPF-para-Nitroanilid (Peptidsubstrat)
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
amp	Ampicillin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (X-Phosphat)
bidest.	zweifach destilliert
Bp	Basenpaar
C	Cytosin
cm	Chloramphenicol
CSPD	3-(4-Metoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'(5'-chloro)Tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl) Phenylphosphat, Dinatriumsalz
C-terminal	carboxyterminal
cpm	counts per minute
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat (N steht für eines der Nukleoside A: Adenosin, C: Cytidin, G: Guanosin, T: Thymidin)
ddNTP	Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylen-Diamino-Tetra-Essigsäure
EMK	Erlenmeyerkolben
ery	Erythromycin
G	Guanin
g	Gramm
g/l	Gramm/Liter
h	Stunden
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
kan	Kanamycin
kB	Kilobasen (=1000 Basenpaare)
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LB	Luria Broth (Medium)
M	molar
mA	Milliampère
min	Minuten
mJ	Millijoule
µl/ml	Microliter/Milliliter
µg/ml	Microgramm/Milliliter
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NBS	„Nukleotide Binding Site“, ATP-Bindestelle des SecA-Proteins
NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid
ng	Nanogramm
N-terminal	aminoterminal
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PCR	Polymerasekettenreaktion

RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
<i>prfB</i>	„protein release factor B“; Gen welches für den „Release“-Faktor 2 kodiert
RF	„Release“-Faktor
RRF	Ribosomen-Recycling-Faktor
RSA	Rinderserum-Albumin
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>sub</i>	Subtilisin-Gen von <i>Bacillus lentus</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tet	Tetracyclin
TMS	Transmembransegment
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UE	Untereinheit
U/ml	Units/Milliliter (Enzymaktivität)
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
ü.N.	über Nacht
ÜNK	Über-Nacht-Kultur(en)
V	Volt
W	Watt
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-d-Galactopyranosid

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
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

I. Einleitung

Alle Zellen sind von mindestens einer Biomembran umschlossen, die aus einer Phospholipid-doppelschicht besteht und als Permeabilitätsbarriere für geladene und größere Moleküle wirkt. Der gezielte Stoffaustausch mit dem äußeren Milieu über die Membran wird über spezifische Transporter und Kanäle in der Membran vermittelt. Durch Membranen wird die Zelle in funktionell unterschiedliche Reaktionsräume unterteilt, was als Kompartimentierung bezeichnet wird. Prokaryontische Zellen lassen sich in mindestens drei solche Kompartimente einteilen, in das Cytoplasma, die Cytoplasmamembran und den extrazellulären Raum. Weitere Kompartimente sind bei Gram-negativen Bakterien die zusätzliche äußere Membran und der als Periplasma bezeichnete Bereich zwischen äußerer Membran und Cytoplasmamembran. Proteine, die nicht im Cytoplasma verbleiben sollen, müssen zunächst als solche erkannt und schließlich zu ihrem Bestimmungsort über die jeweilige Membran transportiert oder als Membranprotein in diese integriert werden. Spezifische Erkennungssignale innerhalb der Primärstruktur des jeweiligen Proteins stellen hierbei sicher, dass jedes Protein zum richtigen Ort gelangt. Den Transport über die jeweilige Membran vermitteln membranständige Multienzymkomplexe (Translokasen). Bei Bakterien erfolgt der Transport der meisten sekretorischen, periplasmatischen oder membranständigen Proteine über den sogenannten Sec-Exportweg. Bestimmte Proteine werden über einen alternativen Exportweg, den Zwillings-Arginin-Weg (TAT-Weg), exportiert. Bezeichnend für den Export über den TAT-Weg ist, dass dieser die Proteine in gefalteter Konformation exportiert, während die Substrate des Sec-Weges nur in einer nicht gefalteten Form in die Sec-Translokase eingeschleust werden können. Im Folgenden wird der Proteinexport über den Sec-Exportweg beschrieben, der vor allem bei dem Gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* und dem Gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* gut untersucht ist. Beide Bakterienstämme sind als Modellorganismen für den Sec-Proteinexport der jeweiligen Klasse anzusehen (den Blaauwen & Driessen, 1996; Driessen *et al.*, 1998; Simonen & Palva, 1993; van Wely *et al.*, 2001).

1. Der bakterielle Protein-Export über den generellen Sekretionsweg (Sec-Weg)

1.1. Das N-terminale Signalpeptid

Proteine, die nicht im Cytoplasma verbleiben sollen, werden als sogenannte Vorläuferproteine mit einer aminoterminalen (N-terminalen) Erkennungssequenz, dem Signalpeptid, synthetisiert. Das Signalpeptid sorgt für das Einschleusen des Proteins in den Exportweg. Hierbei dient es nicht nur als Erkennungssequenz für den Export, sondern es verzögert auch

die Faltung des reifen Proteinteils (Park *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1989) und ermöglicht so die Bindung des exportspezifischen Chaperons SecB (s. I.1.3.), welches das Protein in einer ungefalteten exportkompatiblen Konformation hält. Noch während oder kurz nach dem Transport über die Membran (Translokation) wird das Signalpeptid von spezifischen Enzymen (Signalpeptidasen) abgespalten.

Verschiedene Signalpeptide weisen trotz gleicher Funktion keine Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz auf, jedoch ist ein gemeinsames Bauprinzip zu erkennen. Alle Signalpeptide lassen sich in drei Bereiche unterteilen (von Heijne, 1985; von Heijne, 1990), die als n-, h- und c-Region bezeichnet werden (s. Abb. 1). Die N-terminal lokalisierte n-Region weist eine positive Nettoladung auf. Aufgrund dieser positiven Ladung kann die n-Region mit den sauren Phospholipiden der Cytoplasmamembran und mit dem SecA-Protein des Exportapparates wechselwirken. Weiterhin sorgt die positive Ladung dafür, dass das Signalpeptid in der richtigen Orientierung in die Membran inseriert und zwar so, dass die positive n-Region auf der cytoplasmatischen Seite verbleibt (Kusters *et al.*, 1991; van Klompenburg *et al.*, 1997). An die n-Region schließt sich ein als h-Region bezeichneter hydrophober Bereich an. Für die h-Region wurde die Sekundärstruktur einer α -Helix vorhergesagt, und es konnte nachgewiesen werden, dass dieser Bereich spontan in Membranen inserieren kann (Briggs *et al.*, 1986). Nach der „Helical-Hairpin“-Hypothese bildet die h-Region zur Initiation der Translokation eine haarnadelförmige Schlaufe aus und inseriert so in die innere Hälfte der Lipiddoppelschicht, um sich anschließend zu entfalten. Nach Abschluss der Initiation durchspannt dann das gesamte Signalpeptid die Membran vollständig (Nouwen *et al.*, 1998). An der Initiation der Translokation ist außerdem das SecA-Protein beteiligt, das an das Signalpeptid und den reifen Teil des Vorläuferproteins bindet und zusammen mit diesem in die Membran inseriert (s. I.1.4.). Die polare c-Region enthält die Erkennungssequenz für die Signalpeptidase, die das Signalpeptid nach erfolgter Translokation vom Vorläuferprotein abtrennt. Dieser Vorgang wird als Prozessierung bezeichnet. In generellen Signalpeptiden (Typ I) befindet sich diese Erkennungssequenz an Position -3 und -1 relativ zur Spaltstelle (von Heijne & Abrahmsen, 1989; IZARD & Kendall, 1994) mit der Konsensussequenz Ala-X-Ala. Signalpeptide von Lipoproteinen (Typ II) enthalten in der c-Region dagegen eine sogenannte Lipoprotein-Box mit der Konsensussequenz -3 Leu-Ala-Gly-Cys +1 (Hayashi *et al.*, 1985). Trotz dieser konservierten Regionen gibt es Unterschiede zwischen Signalpeptiden von Exportproteinen Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien. Bei Gram-positiven Bakterien sind alle drei Regionen deutlich länger, wobei die durchschnittliche Länge des gesamten Signalpeptids etwa 30 Aminosäuren (AS) beträgt. Signalpeptide von Exportproteinen Gram-negativer Bakterien sind im Durchschnitt nur 24 AS lang. Zusätzlich besitzt die n-Region bei Gram-positiven Bakterien häufig eine höhere Anzahl der positiv geladenen Reste Lysin und Arginin (von Heijne & Abrahmsen, 1989). Viele sekretorische Proteine Gram-positiver Bakterien, wie zum Beispiel die Serinprotease Subtilisin „Carlsberg“ aus *Bacillus licheniformis*, werden als sogenannte

Präproteine synthetisiert und besitzen zusätzlich zwischen Signalpeptid und reifem Teil einen als Propeptid bezeichneten Bereich (s. Abb. 1). Das Propeptid sorgt nach der Sekretion für die richtige Faltung des Enzyms (intramolekulares Chaperon; Braun *et al.*, 1996) und wirkt außerdem als kompetitiver Inhibitor, um eine verfrühte cytosolische Proteaseaktivität zu verhindern (Kessler & Safrin, 1994). Das Propeptid wird nach erfolgter Translokation über die Membran autokatalytisch abgespalten.

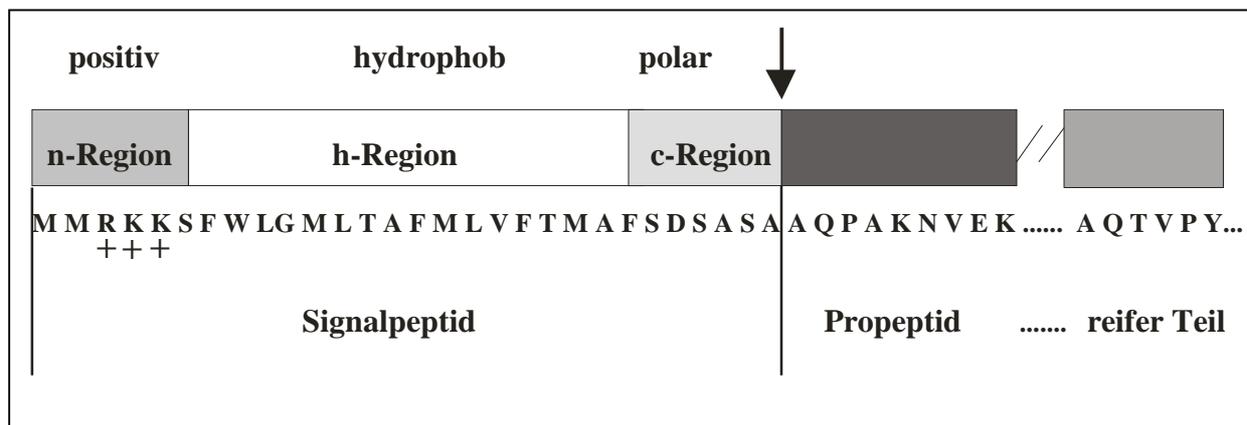


Abb. 1: Die Organisation einer Signalsequenz mit Propeptid ist am Beispiel des Subtilisin „Carlsberg“ (Swiss Prot. Datenbank) aus dem Gram-positiven Bakterium *B. licheniformis* schematisch dargestellt. Die Spaltstelle der Signalpeptidase ist durch einen Pfeil markiert.

Für die Faltung und Aktivierung des Subtilisins wird folgendes Modell angenommen. Das Propeptid katalysiert die Faltung über ein zunächst teilgefaltetes Intermediat zu einem nativ gefalteten aber nicht prozessierten Pro-Subtilisin. Anschließend erfolgt die Autoprozessierung durch die katalytische Triade, die aus den Aminosäuren Asp32, His63 und Ser220 (Subtilisin „Carlsberg“) gebildet wird. Hierbei entsteht ein relativ stabiler Komplex aus abgespaltenem Propeptid und reifem Subtilisin. Über Wechselwirkungen des jetzt freien carboxyterminalen (C-terminalen) Endes des Propeptids mit dem katalytischen Zentrum des Subtilisins wird die proteolytische Aktivität des reifen Subtilisins weiter gehemmt. Zur Aktivierung muss sich das katalytische Zentrum aus dieser Hemmung lösen, damit das Propeptid schließlich proteolytisch abgebaut werden kann. Die Freisetzung des katalytischen Zentrums des ersten Subtilisin-Moleküls aus der Hemmung durch das Propeptid stellt dabei den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des gesamten Reifungsprozesses dar. Der Propeptidabbau zur Aktivierung weiterer Subtilisin-Moleküle kann anschließend mit Hilfe schon aktivierter Subtilisin-Moleküle in *trans* erfolgen. Dieser Mechanismus sorgt für eine schnelle exponentielle Aktivierung aller weiteren Subtilisin-Moleküle (Shinde *et al.*, 1993; Yabuta *et al.*, 2001, 2002).

1.2. Der Proteinexport über den Sec-Weg

Die meisten sekretorischen Proteine werden über den sogenannten Sec-Weg exportiert. Der Mechanismus und die an diesem Export beteiligten Komponenten sind am besten im Gram-negativen Bakterium *E. coli* untersucht (Driessen, 1994; Driessen *et al.*, 1998; Pugsley, 1993; den Blaauwen & Driessen, 1996). Der Translokationsapparat besteht aus den membranintegralen Proteinen SecY, SecE, SecG, SecD, SecF, YajC und YidC und dem sowohl cytoplasmatisch als auch membranassoziiert und membranintegriert vorkommenden SecA-Protein. Bei dem Gram-positiven Bakterium *B. subtilis* konnten homologe Proteine zu den meisten in *E. coli* an der Proteintranslokation beteiligten Komponenten identifiziert werden (Nakamura *et al.*, 1990; Overhoff *et al.*, 1991; Sadaie *et al.*, 1991; Jeong *et al.*, 1993; Murakami *et al.*, 2002; Oguro *et al.*, 1995; Oguro *et al.*, 1996; van Wely *et al.*, 1999). Es ist daher anzunehmen, dass der generelle Proteinexportweg zwischen beiden Bakterienklassen hoch konserviert ist. Trotz der vorhandenen Ähnlichkeiten sind jedoch auch signifikante Unterschiede zu beobachten. Der Aufbau und die Funktionsweise des Exportapparates von Gram-positiven Bakterien (s. Abb. 2) im Vergleich zu Gram-negativen Bakterien soll im Folgenden genau beschrieben werden (van Wely *et al.*, 2001).

1.3. Das „Targeting“ der Proteine

Für den Export bestimmte Proteine werden mit einem N-terminalen Signalpeptid synthetisiert (s. I.1.1.) und durch spezifische Proteine in einer entfalteten, transportkompetenten Konformation gehalten. In *E. coli* wurden hierfür zwei unterschiedliche Systeme identifiziert. Die Aufgabe wird entweder von dem exportspezifischen Chaperon SecB oder alternativ von dem bakteriellen Signalerkennungspartikel (b-SRP) übernommen (Müller *et al.*, 2001).

Das SecB-Protein verhindert die Faltung des Vorläuferproteins, indem es an den reifen Teil bindet und anschließend den Vorläufer zum Translokator geleitet (Kumamoto, 1990; Kumamoto & Francetic, 1993). Bei *B. subtilis* konnte auch nach Kenntnis der gesamten genomischen Sequenz kein Homolog des *E. coli* SecB-Proteins identifiziert werden. Screening einer *B. subtilis* Genbank nach einem Gen, das die *E. coli* *secA51(ts)* Mutation komplementieren kann, führte zur Identifizierung des Gens *csaA* (Müller *et al.*, 1992). Das CsaA-Protein verhindert in *E. coli* *secA51(ts)* die Akkumulation von Vorläuferproteinen im Cytoplasma bei nicht permissiver Temperatur. Da es mit ungefalteten Vorläuferproteinen wechselwirkt und analog zu SecB an das SecA-Protein (s. I.1.4.) bindet, könnte es als exportspezifisches Chaperon in *B. subtilis* fungieren (Müller *et al.*, 2000a,b).

Das b-SRP ist homolog zum eukaryontischen SRP (Signal-Recognition-Particle; Miller *et al.*, 1994). Bei Eukaryonten ist das SRP, das aus 6 Proteinuntereinheiten (u.a. SRP54) und der

7S RNA besteht, am kotranslationalen Transport von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum (ER) beteiligt (Walter & Blobel, 1982; Bernstein *et al.*, 1989; Römisch *et al.*, 1990). Das SRP bindet noch während der Proteinbiosynthese an das Signalpeptid und geleitet den Komplex aus Vorläufer und Ribosom (RNC: Ribosome Nascent Chain Complex) zum SRP-Rezeptor in der ER-Membran. Nachdem die Signalsequenz in die Translokationsmaschinerie inseriert ist, löst sich das SRP vom Signalpeptid und das Ribosom translatiert das Protein direkt in das ER-Lumen (Nunnari & Walter, 1992; Rapoport, 1992).

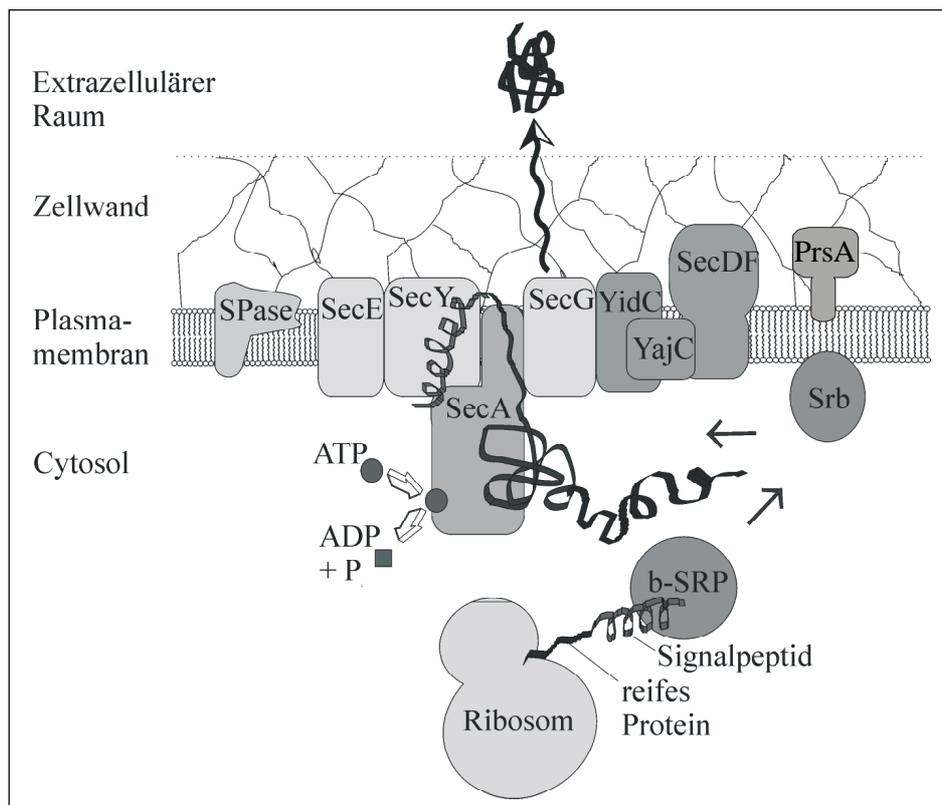


Abb. 2: Schematische Darstellung des Proteinexportapparates von *B. subtilis*.

Die am Ribosom synthetisierten Vorläuferproteine werden aufgrund ihrer Signalsequenz wahrscheinlich vom b-SRP/Srb-System erkannt, in den Translokator eingeschleust und über die Membran transloziert. Der Translokator besteht aus dem energieliefernden SecA-Protein und den membranintegralen Proteinen SecY, SecE, SecG, YidC, YajC und SecDF. Nach erfolgter Translokation wird das Signalpeptid durch spezifische Signalpeptidasen (SPasen) abgetrennt und das Protein vom Translokator freigesetzt. Das extracytoplasmatische PrsA hilft vermutlich bei der Faltung der exportierten Proteine (verändert nach Freudl, 1998).

Das bakterielle SRP ist weniger komplex aufgebaut. Das b-SRP von *E. coli* besteht aus dem als „Fifty-Four-Homologue“ bezeichneten Ffh-Protein und einer 4,5S RNA, die homolog zum eukaryontischen SRP54-Protein bzw. der 7S RNA sind. Analog zum eukaryontischen SRP-Weg bindet das b-SRP an naszierende Proteine und leitet den RNC-Komplex zum

membrangebundenen Rezeptor FtsY, der homolog zur α -Untereinheit des eukaryontischen SRP-Rezeptors ist (Römisch *et al.*, 1989; Poritz *et al.*, 1990). Das Vorläuferprotein wird schließlich an den Translokator übergeben. Zum SRP-Weg wurden homologe Komponenten in *B. subtilis* gefunden. Wie bei *E. coli* besteht das b-SRP von *B. subtilis* aus einem Ffh-Protein und einer kurzen RNA, der sc-RNA (small cytoplasmic RNA). Das Srb-Protein von *B. subtilis* ist homolog zur eukaryontischen α -Untereinheit des SRP-Rezeptors und zum FtsY-Protein von *E. coli* (Nakamura *et al.*, 1992; Honda *et al.*, 1993; Oguro *et al.*, 1995; Oguro *et al.*, 1996). Darüber hinaus wurde eine weitere Komponente des b-SRP in *B. subtilis* identifiziert, das essentielle, Histon-ähnliche HBSu-Protein, welches an die Alu-Domäne der sc-RNA bindet (Nakamura *et al.*, 1999).

In *E. coli* werden die meisten sekretorischen Proteine und Proteine der äußeren Membran über den SecB-Weg posttranslational an den Translokator geleitet, während über den b-SRP-Weg hauptsächlich integrale Proteine der Cytoplasmamembran transloziert werden (Seluanov & Bibi, 1997; Ulbrandt *et al.*, 1997). Das b-SRP erkennt spezifisch längere Signalpeptide mit einer größeren Anzahl hydrophober AS und Transmembransequenzen im reifen Teil des Proteins (Lee & Bernstein, 2001). Die Bindung an weniger hydrophobe Signalpeptide wird wahrscheinlich durch ein Ribosom-assoziiertes Chaperon, den Triggerfaktor (TF), verhindert (Beck *et al.*, 2000). In *B. subtilis* scheint das Ffh-Protein dagegen als genereller „Targeting“-Faktor zu fungieren. Die längeren Signalpeptide Gram-positiver Bakterien begünstigen vermutlich das Einschleusen der am Ribosom entstehenden Vorläuferproteine über den b-SRP-Weg. Die Beteiligung des CsaA-Proteins oder weiterer noch unbekannter Proteine an der Aufrechterhaltung der transportkompetenten Konformation ist denkbar. Für *E. coli* konnte außerdem gezeigt werden, dass auch unspezifisch wirkende Chaperone, wie die zu den Hitzeschockproteinen zählenden DnaK- und DnaJ- und die GroEL/ES-Proteine, an der Aufrechterhaltung der transportkompetenten Konformation beteiligt sind (Wild *et al.*, 1992). Für das GroEL-Protein wurden sogar Wechselwirkungen mit dem SecA-Protein nachgewiesen (Bochkareva *et al.*, 1998), so dass dieses vielleicht analog zum SecB Vorläuferproteine zum Translokator leiten kann. Es wäre daher möglich, dass auch in Gram-positiven Bakterien die generellen Chaperonsysteme an der Aufrechterhaltung einer entfalteten Konformation von zu exportierenden Proteinen beteiligt sind.

1.4. Das SecA-Protein

Das essentielle SecA-Protein ist die zentrale Komponente des Translokationsapparates. Seine Aufgabe ist es, das Vorläuferprotein in den Translokator einzuschleusen (Initiation) und den Vorgang der Translokation voranzutreiben. Mit seiner Fähigkeit, ATP zu binden und zu

hydrolysieren ist es die energieliefernde Komponente der Proteintranslokation (Mitchell & Oliver, 1993; den Blaauwen & Driessen, 1996; Economou, 1998, 2000).

SecA kommt in der Zelle sowohl in cytosolischer, membranassoziierter oder auch membranintegraler Form vor (Economou & Wickner, 1994; Ramamurthy & Oliver, 1997). Bisher wurde angenommen, dass das SecA-Protein in der Zelle als stabiles Dimer vorliegt und auch während der Translokation als Dimer fungiert. Neuere Daten deuten aber darauf hin, dass das Homodimer sich im Gleichgewicht mit der monomeren Form befindet und dass beide Formen für die Proteintranslokation wichtig sind (Or *et al.*, 2002; Benach *et al.*, 2003).

Das SecA-Protein besitzt zwei ATP-Bindungsstellen, die N-terminal lokalisierte hochaffine NBS-I (NBS: „Nucleotide Binding Site“) und die weiter C-terminal befindliche, niederaffine NBS-II. Beide Bindungsstellen weisen die für ATP-Bindungsstellen typische Konsensussequenz (Walker-Motiv) auf (Walker *et al.*, 1982). ATP-Bindung und Hydrolyse an NBS-I ist direkt für die Translokation des Vorläuferproteins verantwortlich, während der NBS-II regulatorische Funktionen zugeschrieben werden. Um eine permanente ATP-Hydrolyse durch das SecA-Protein zu verhindern, wird die intrinsische ATPase-Aktivität durch zwei unabhängige regulatorische Elemente, den C-terminalen IRA-I (Intramolekular Regulator of ATP Hydrolysis) und den in der NBS-II Region lokalisierten IRA-II reguliert. Intramolekulare Wechselwirkungen von IRA-I und IRA-II mit der NBS-I vermindern wahrscheinlich die ATPase-Aktivität von cytosolischem SecA. Diese Hemmung wird erst aufgehoben, wenn das SecA-Protein Wechselwirkungen mit dem Vorläuferprotein, den sauren Phospholipiden der Cytoplasmamembran und den integralen Bestandteilen des Translokators (SecY, SecE, SecG; s. I.1.5.) eingeht. Das Zusammenspiel aller Wechselwirkungen führt dann zum Ablösen beider IRA-Elemente von der NBS-I, woraus eine deutliche Erhöhung der ATPase-Aktivität zur sogenannten Translokations-ATPase-Aktivität resultiert (Karamanou *et al.*, 1999; Nakatogawa *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2000; Baud *et al.*, 2002; Chou *et al.*, 2002).

Die Bindung von ADP oder ATP an NBS-I hat entgegengesetzte Auswirkungen auf die Konformation des SecA-Proteins. Ist ADP gebunden, so nimmt das SecA-Protein eine kompakte Konformation ein. Wird ADP durch ATP ersetzt, so ändert sich die Konformation des SecA-Proteins zu einer ausladenden, offenen Struktur, was die Insertion des SecA-Proteins zusammen mit dem gebundenen Vorläuferprotein in die Membran zur Folge hat (s. Abb. 3). Bei diesem Vorgang werden etwa 20-30 AS über die Membran transloziert. Anschließende ATP-Hydrolyse führt zur Übergabe des Vorläufers an den Translokationskanal (SecYEG, s. I.1.5.) und zur Deinsertion von SecA aus der Membran (den Blaauwen *et al.*, 1996). Das jetzt peripher an die Membran angelagerte SecA kann nun erneut an das Vorläuferprotein binden, was die Translokation von weiteren 20-30 AS bewirkt. Durch wiederholte ATP-getriebene Insertions- und Deinsertionszyklen wird das Vorläuferprotein durch den Membrankanal geschleust (Nähnadel-Modell; Manting & Driessen, 2000). Für eine effiziente Translokation ist außerdem das Membranpotential $\Delta\mu\text{H}^+$ nötig, welches nach

Initiation der Translokation diese weiter vorantreiben kann (Schiebel *et al.*, 1991). Das Membranpotential verhindert zudem ein Zurückrutschen des teilweise translozierten Vorläufers und sorgt somit für eine unidirektionale Translokation (Driessen, 1992).

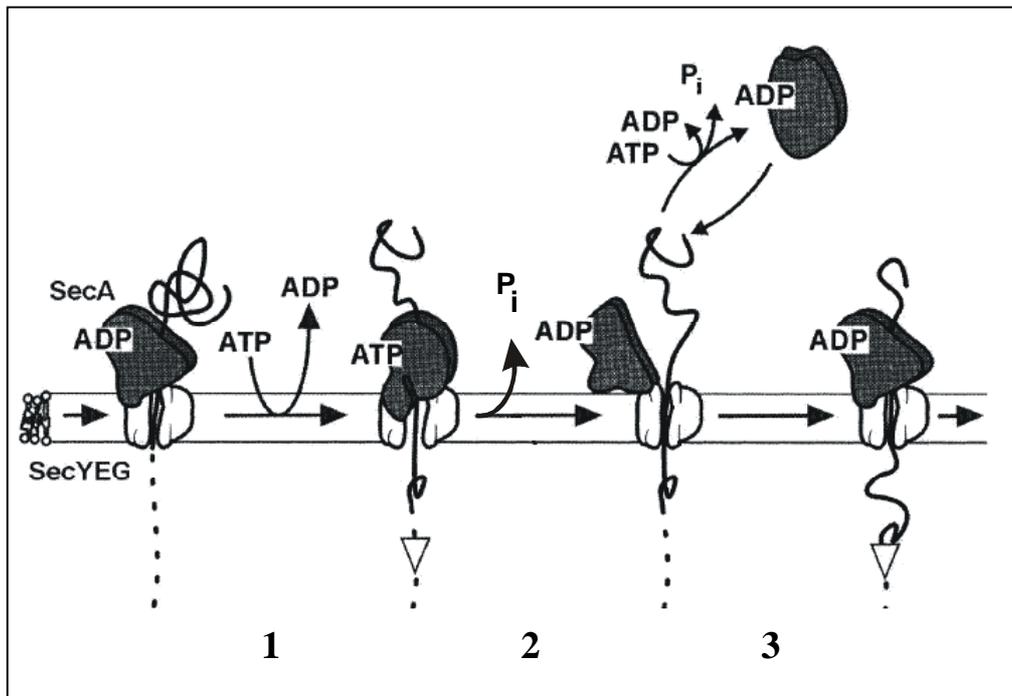


Abb. 3: Katalytischer Zyklus des SecA-Proteins. 1) Der Austausch von ADP gegen ATP an der NBS-I des SecA-Proteins bewirkt eine Konformationsänderung des SecA-Proteins von einer kompakten zu einer ausladenden, offenen Konformation. Als Folge dessen inseriert das SecA mit dem gebundenen Vorläuferprotein in die Membran, wobei 20-30 Aminosäuren über die Membran transloziert werden. 2) ATP-Hydrolyse an NBS-I bewirkt die Übergabe des Vorläuferproteins an den SecYEG-Komplex und den Konformationswechsel des SecA-Proteins zurück zu seiner kompakten Konformation, was die Deinsertion des SecA aus der Membran zur Folge hat. Das membrangebundene SecA kann nun durch cytosolisches SecA ersetzt werden, wobei dieser Schritt die Hydrolyse eines weiteren ATP-Moleküls erfordert. 3) Durch erneutes Binden des SecA-Proteins an das zum Teil translozierte Vorläuferprotein werden weitere 20 bis 30 Aminosäuren über die Membran geschleust (verändert nach van Wely *et al.*, 2001).

Erst kürzlich ist es gelungen, die Kristallstruktur der SecA-Proteine von *B. subtilis* (s. Abb. 4) und von *Mycobakterium tuberculosis* in löslicher freier Form oder mit gebundenem ADP zu bestimmen (Hunt *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2003). Aufgrund der *B. subtilis* Strukturdaten und früherer biochemischer Ergebnisse wurde das SecA-Protein in sieben funktionelle Domänen unterteilt. Die Nukleotidbindungsdomänen NBF-I und NBF-II (Nucleotide Binding Fold) enthalten die hochaffine NBS-I bzw. die niederaffine NBS-II und zeigen Ähnlichkeiten zu den Tandem-Motordomänen von ATP-abhängigen Helikasen der Superfamilie I und II.

Die Präproteinbindestelle, die aufgrund von „Crosslinking“-Experimenten von Vorläuferproteinen und SecA ermittelt wurde, ist in den Subdomänen PPXD(N) und PPXD(C) (N- und C-Terminus der Pre-Protein X-linking Domain) lokalisiert.

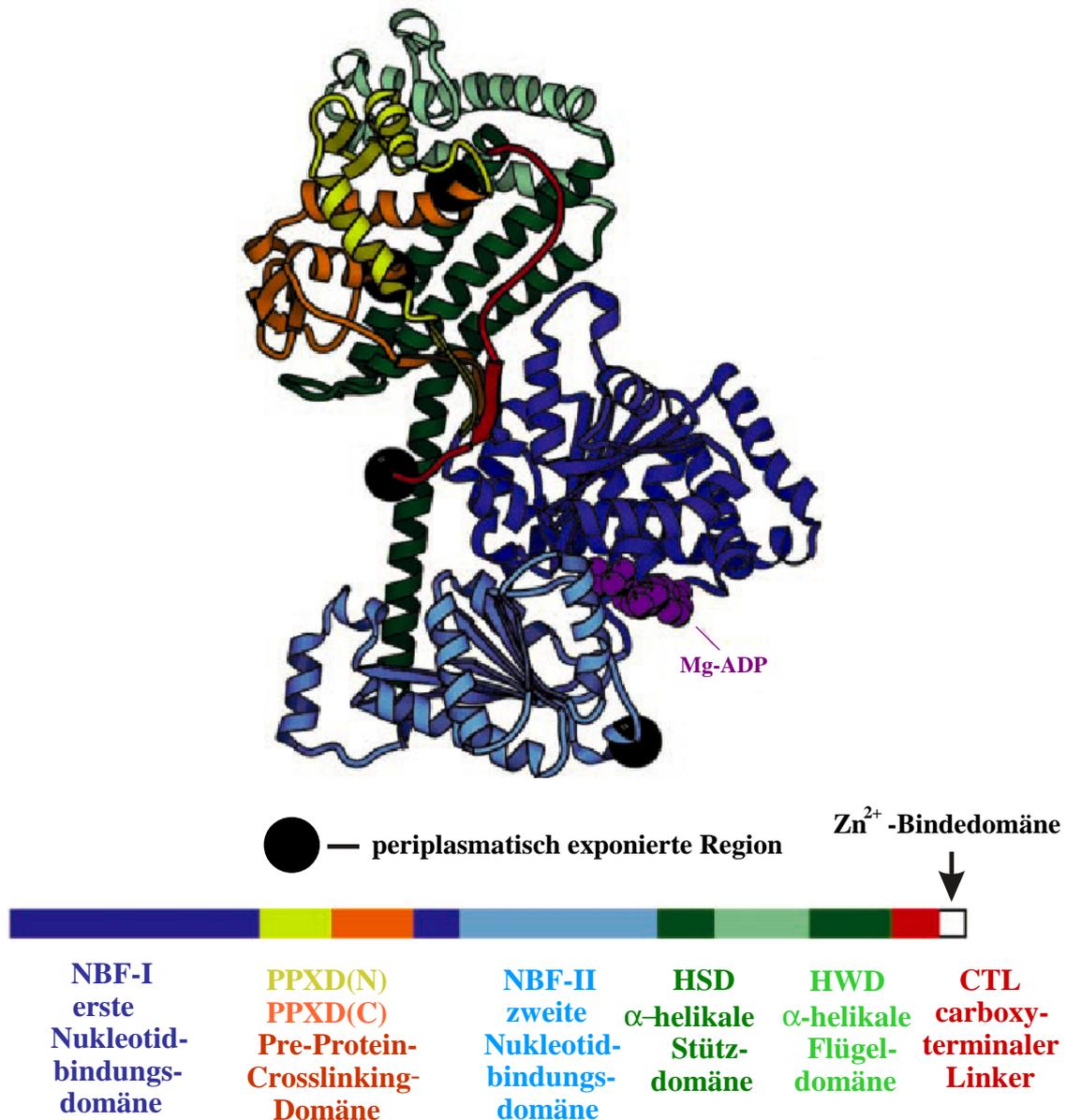


Abb. 4: Die Kristallstruktur eines SecA-Protomers von *B. subtilis* mit gebundenem Mg-ADP. Die unterschiedlichen Farben kennzeichnen die sieben unterschiedlichen Proteindomänen. Der Balken unterhalb der Kristallstruktur zeigt die Lage der Proteindomänen in der linearen Sequenz von SecA (verändert nach Hunt *et al.*, 2002).

Der 30 kDa große C-terminale Bereich des SecA-Proteins bildet zwei α -helikale Domänen aus. Die erste als HSD (α -Helical Scaffold Domain) bezeichnete Domäne geht Wechselwirkungen mit den Domänen NBF-I, NBF-II, PPXD(N) und PPXD(C) ein und sorgt so für die Aufrechterhaltung der Gesamtstruktur des SecA-Proteins. Sie ist wahrscheinlich

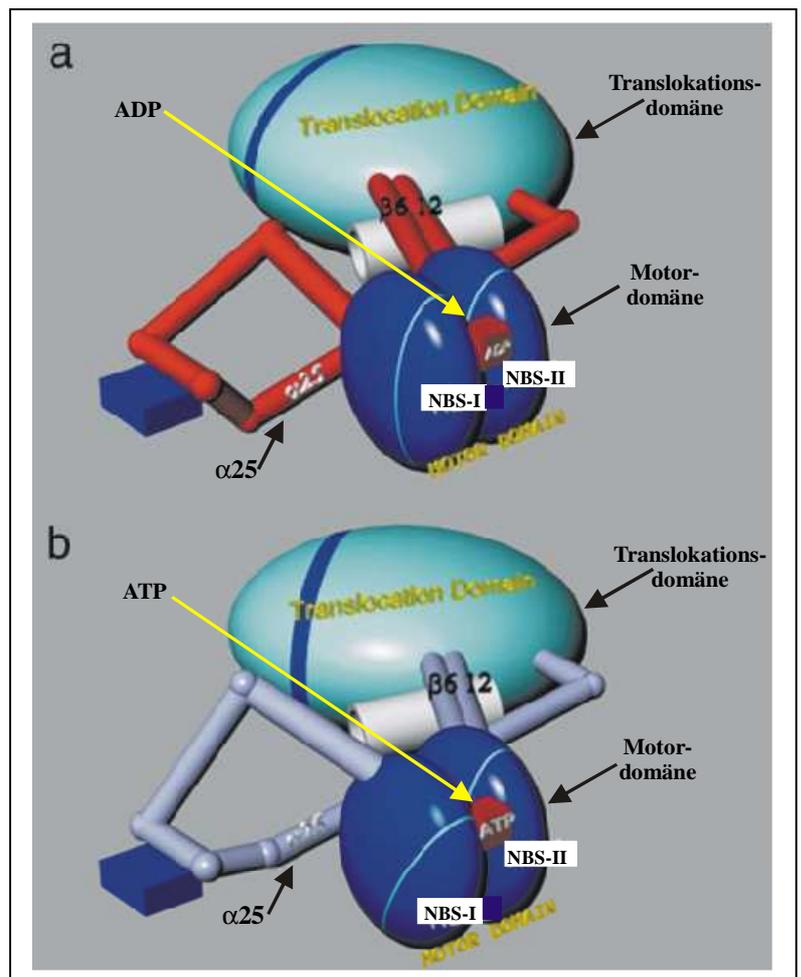
auch an der Dimerbildung beteiligt. Die zweite α -helikale Domäne ist in die HSD eingebettet und wird als HWD bezeichnet (α -Helical Wing Domain). Die HS- und HW-Domäne des SecA-Proteins inserieren wahrscheinlich während der Translokation in den Translokationskanal. Ganz am C-terminalen Ende des *B. subtilis* SecA-Proteins befindet sich eine Zn^{2+} -Bindedomäne. Dieser Bereich ist bei *E. coli* für die SecB-Bindung verantwortlich. Da *B. subtilis* wie erwähnt kein SecB-homologes Protein besitzt, ist es erstaunlich, dass das *B. subtilis* SecA trotzdem das konservierte SecB-Bindemotiv aufweist.

Weil ADP-Bindung sowohl im SecA-Monomer als auch im Dimer keine signifikante Strukturveränderung zu bewirken scheint, wurde ein zum „Nähnadel-Modell“ alternativer Mechanismus postuliert. Nach diesem sitzt das SecA-Dimer mit einer eigenen porenförmigen Struktur auf der membranintegralen Translokationspore auf und schleust durch intramolekulare Verschiebung der sogenannten SecA-Motordomäne (bestehend aus den beiden NBF-Domänen pro Monomer) relativ zur SecA-Translokationsdomäne (bestehend aus den PPX-Domänen und dem 30 kDa großen C-terminalen Abschnitt pro Monomer) das Vorläuferprotein durch die Translokationspore (s. Abb. 5).

Abb. 5:

Das SecA-Protein als molekularer Motor (Sharma *et al.*, 2003).

a) Das SecA-Monomer mit an die Motordomäne gebundenem ADP (bestehend aus NBS-I und NBS-II, dunkelblau) oder b) mit gebundenem ATP. Die Bindung von ATP bewirkt eine relative Verschiebung der NBS zueinander. Diese Bewegung wird über die lange α -Helix $\alpha 25$ (rote bzw. hellblaue Röhre) auf die zwei β -Stränge übertragen, die an der Bindung des Vorläuferproteins beteiligt sind. Die β -Stränge werden bei ATP-Bindung nach außen verschoben (b) und bei ATP-Hydrolyse wieder auf ihre ursprüngliche Position zurückgezogen (a). Bei ATP-Hydrolyse wird das Vorläuferprotein durch den postulierten Kanal des SecA-Proteins (weißes Rohrstück) geschoben, der auf dem eigentlichen Translokationskanal sitzt. Auf diese Weise kann durch wiederholtes Verschieben der β -Stränge das Vorläuferprotein über die Membran geschleust werden.



Die ATP-Bindung an der NBS-I bewirkt eine geringe Verschiebung der NBS-I zur NBS-II (s. Abb. 5). Die NBS-II ist über eine Reihe von kurzen Strukturelementen mit einer 50 Aminosäuren langen α -Helix ($\alpha 25$) verbunden, die wiederum über Wasserstoffbrücken mit zwei β -Strängen der postulierten Präproteinbindestelle verknüpft ist. Die α -Helix fungiert als Verbindungsstück zwischen Motor- und Translokationsdomäne und wirkt wie ein Hebelarm. Die aufgrund der ATP-Bindung geringe relative Verschiebung beider NBS zueinander wird mittels dieser α -Helix in eine viel größere relative Verschiebung von Motor- und Translokationsdomäne umgewandelt. Die mit der α -Helix verknüpften β -Stränge werden ihrerseits nach außen bewegt. Anschließende ATP-Hydrolyse bewirkt eine entgegengesetzte Bewegung von α -Helix und der damit verknüpften β -Stränge zurück zum Ausgangsstatus. Diese Bewegung schiebt das Vorläuferprotein ein Stück weit in die im Zentrum des Dimers lokalisierte SecA-Pore, die vermutlich in direkter Verbindung mit der membranintegralen Translokationspore steht. Auf diese Weise kann durch wiederholtes Verschieben der β -Stränge das Vorläuferprotein über die Membran geschleust werden.

1.5. Die Proteine SecY, SecE und SecG

SecY, SecE und SecG bilden die hydrophile Pore, durch welche die für den Export bestimmten Proteine über die Membran geschleust werden (Brundage *et al.*, 1990; Akimaru *et al.*, 1991; Manting *et al.*, 2000). Das SecY-Protein ist in *E. coli* und *B. subtilis* über 10 Transmembransegmente (TMS) in der Cytoplasmamembran verankert. Das sehr viel kleinere SecE-Protein besitzt in *E. coli* drei und in *B. subtilis* nur ein TMS. SecY und SecE bilden zusammen den essentiellen Kernkomplex, der Ähnlichkeiten zur eukaryontischen Translokationspore Sec61p im ER aufweist und in der Membran eine ähnliche oligomere Ringstruktur bildet (Meyer *et al.*, 1999). Bei der Initiation der Translokation bindet das SecA an den SecY/E-Komplex, um anschließend mit dem gebundenen Vorläuferprotein in die Membran zu inserieren (Manting *et al.*, 1997, 1999; Snyders *et al.*, 1997; van der Wolk *et al.*, 1998).

Das nicht essentielle SecG ist in *E. coli* und in *B. subtilis* mit zwei TMS in der Membran verankert (Nishiyama *et al.*, 1993; van Wely *et al.*, 1999). Es sorgt für eine bessere Translokationseffizienz, indem es seine Membrantopologie in Abhängigkeit vom SecA-Insertions-Deinsertions-Zyklus umkehrt (Nishiyama *et al.*, 1994, 1996). Es wird angenommen, dass SecG als eine Art „Schmiermittel“ der Translokation wirkt, indem es durch seine an den SecA-Zyklus gekoppelten Topologieinversionen diesen Vorgang energetisch erleichtert.

Verschiedenste experimentelle Ansätze lieferten unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Anzahl an SecYEG-Proteinen, die einen aktiven Translokationskomplex bilden. Es wurde

postuliert, dass der aktive Translokationskanal aus einem monomeren, dimeren oder sogar tetrameren SecYEG-Heterotrimer-Komplex besteht (Manting *et al.*, 2000; Yahr & Wickner, 2000; Collinson *et al.*, 2001; Bessonneau *et al.*, 2002; Breyton *et al.*, 2002).

1.6. Die Proteine SecD, SecF, YajC, YidC und PrsA

Die in *E. coli* einzeln vorliegenden Proteine SecD und SecF mit je 6 TMS sind in *B. subtilis* zu einem einzigen SecDF-Protein mit 12 TMS verschmolzen (Bolhuis *et al.*, 1998). SecD und SecF sind in *E. coli* nicht essentiell, doch sind Stämme mit einer Deletion der entsprechenden Gene bezüglich Proteinexport und Wachstum stark beeinträchtigt (Pogliano & Beckwith, 1994). *B. subtilis* Zellen ohne SecDF zeigen hauptsächlich unter Überproduktionsbedingungen einen stark kältesensitiven Phänotyp. SecD und SecF (bzw. SecDF) bilden einen Komplex mit YajC, einem Membranprotein unbekannter Funktion. Da YajC auch Wechselwirkungen mit SecYEG eingeht, bildet es möglicherweise das Bindeglied zwischen diesen beiden Teilkomplexen der Translokase (Duong & Wickner, 1997a). Der SecDF-YajC-Komplex scheint in *E. coli* eine Aufgabe bei der Regulierung des katalytischen Zyklus von SecA zu übernehmen. Es wird postuliert, dass SecDF-YajC die membranintegrale Form des SecA-Proteins stabilisiert und so ein „Zurückrutschen“ bereits translozierter Abschnitte des Vorläuferproteins verhindert (Economou *et al.*, 1995; Duong & Wickner, 1997b).

Das essentielle membranintegrale YidC-Protein ist an der Integration hydrophober Sequenzen von Membranproteinen in die Cytoplasmamembran beteiligt (Samuelson *et al.*, 2000). Diese Integration erfolgt je nach Membranprotein mit Hilfe der Sec-Translokase oder Sec-unabhängig, aber in jedem Fall unter YidC-Beteiligung (Chen *et al.*, 2002a,b). Für *E. coli* wurde gezeigt, dass YidC mit dem SecDF-YajC-Komplex wechselwirkt (Nouwen & Driessen, 2002). Der SecDF-YajC-Komplex vermittelt so eine Wechselwirkung von YidC mit dem SecYEG-Komplex. Somit hat die SecDF-YajC-Menge in der Zelle einen direkten Einfluss auf die YidC-SecYEG-Wechselwirkungen. Die zuvor beobachteten und dem SecDF-YajC-Komplex zugeschriebenen Effekte sind daher möglicherweise nur eine indirekte Folge verbesserter oder verschlechterter YidC-SecYEG-Wechselwirkungen (Beck *et al.*, 2001; Nouwen & Driessen, 2002).

Nach erfolgter Translokation über die Membran sorgen meist spezielle Faltungshelfer dafür, dass die Proteine ihre native Konformation einnehmen können. Bei *B. subtilis* konnte im Gegensatz zu *E. coli* nur ein einziger extracytoplasmatischer Faltungshelfer identifiziert werden, das essentielle PrsA-Protein. Das PrsA ist ein Lipoprotein, das an der Außenseite der Cytoplasmamembran verankert ist. Hier sorgt es wahrscheinlich dafür, dass die sekretierten Proteine keine unproduktiven Wechselwirkungen mit der Zellwand eingehen und so in ihre native Konformation falten können (Wahlström *et al.*, 2003). Bei Überproduktion von

α -Amylase und Subtilisin „Carlsberg“ in *B. subtilis* wurde gezeigt, dass die Verfügbarkeit des PrsA-Proteins limitierend für die Freisetzung der reifen Enzyme in den Kulturüberstand ist (Kontinen & Sarvas, 1993; Vitikainen *et al.*, 2001).

2. Enzym-Produktion mit Gram-positiven Bakterien

Gram-positive Bakterien, vor allem einige *Bacillus*-Arten, werden aufgrund ihrer Fähigkeit, große Mengen Protein in den Kulturüberstand zu sekretieren seit langer Zeit zur industriellen Enzymproduktion eingesetzt. Ein weiterer Vorteil bei der Enzymgewinnung mit Gram-positiven Bakterien ist, dass diese im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien keine zusätzliche äußere Zellmembran besitzen. Während bei Gram-negativen Bakterien über die Cytoplasmamembran transportierte Proteine zunächst in das Periplasma gelangen, werden diese Proteine in Gram-positiven Bakterien sofort in den Kulturüberstand sekretiert. Zur sekretorischen Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien ist daher kein Zellaufschluss nötig und eine aufwendige Aufreinigung der Enzyme aus dem komplexen Gemisch von cytoplasmatischen und periplasmatischen Proteinen entfällt. Durch den direkten Transport der Proteine in den Kulturüberstand wird die Entstehung von „inclusion bodies“, wie man sie bei massiver Überproduktion von Proteinen in Cytoplasma und Periplasma von Gram-negativen Bakterien findet, vermieden. Eine aufwendige Renaturierung von inaktiven akkumulierten Proteinen ist daher nicht nötig.

Die von den *Bacillen* natürlicherweise sekretierten Enzyme wie Proteasen, Amylasen und Lipasen dienen dem Bakterium zum Aufschluss komplexer Nahrungsquellen. Industriell werden diese Enzyme in den verschiedensten Bereichen eingesetzt. Alle drei Enzymarten finden als Wasch- und Reinigungsmittelzusatz Verwendung. Proteasen mit einem Weltmarktanteil von mehr als 65 % aller kommerziell vertriebenen Enzyme dienen außerdem zur Herstellung von Lebens- und Futtermitteln (Gewinnung von Proteinhydrolysaten aus Casein, Soja, Molke oder sogar Keratin) und zur Produktion von Textil- und Lederwaren (Oberflächenveredelung, Biostoning von Jeans; Weichen und Beizen von Rohleder; Gupta *et al.*, 2002; Haki & Rakshit, 2003). Amylasen werden von der Lebensmittel-, Pharma-, Chemie-, Kosmetik- und Papierindustrie zur Stärkehydrolyse und -modifikation eingesetzt und von der Textilindustrie zum Entschlichten von Garnen verwendet (Nielsen & Borchert, 2000). Aufgrund ihrer Regio- und Stereospezifität vereinfachen Lipasen die Synthese von Biopolymeren und chiralen Verbindungen. Letztere werden zur Herstellung von Therapeutika, Agrochemikalien und Aromen benötigt (Schmidt-Dannert, 1999; Jäger & Eggert, 2002). Lipasen werden weiterhin in der Papierindustrie (Abtrennung von Harzen, Abbau von ölhaltigen Druckfarben beim Altpapierrecycling), der Textil- und Lederindustrie (Reinigung von Rohbaumwolle; Entfernung von subkutanem Fett) und in der

Lebensmittelindustrie eingesetzt (Hydrolyse von Milchfett bei der Käseherstellung oder Herstellung von Spezialfetten wie Kakaobutteraustauschstoff).

Die von der Industrie zur Enzymproduktion eingesetzten *Bacillus*-Stämme zeichnen sich durch besonders hohe Sekretionsleistungen aus. Da diese Stämme über wiederholte Zyklen ungerichteter Mutagenese und anschließendem Screening auf hohe Enzymausbeuten erhalten wurden, ist die Ursache der erhöhten Sekretionsleistung zumeist unbekannt. Um die Proteinsekretion bei Gram-positiven Bakterien gezielt verbessern zu können, ist eine genaue Kenntnis der bei der Proteinsekretion stattfindenden Vorgänge nötig. Hinweise zur gezielten Verbesserung könnten auch über eine Genom-Analyse der industriellen Produktionsstämme und einen anschließenden Sequenzvergleich mit den entsprechenden Wildtyp- (Wt) Stämmen erhalten werden. Während das Genom von *B. subtilis* vollständig sequenziert vorliegt (Kunst *et al.*, 1997), sind die Genome von anderen zur Enzymproduktion eingesetzten *Bacillus*-Gattungen wie *B. licheniformis* und *B. amyloliquefaciens* noch nicht entschlüsselt. Es gibt jedoch bereits Bestrebungen der Industrie (Novozym, Denmark) bzw. Kooperationen von Industrie und Forschung (z. B. Kompetenznetzwerk "GenoMik Netzwerk Göttingen"), die Genome zu sequenzieren und eine vergleichende Analyse industrieller *Bacillus*-Stämme mit den entsprechenden Wt-Stämmen durchzuführen. Es bleibt abzuwarten, ob Veränderungen im Sekretionsapparat selbst oder das Zusammenspiel einer Vielzahl anderer Mutationen zu den hohen Enzymausbeuten führen. Beispielsweise könnten auch Mutationen in Genen der Proteinbiosynthese zu einer gesteigerten Synthese von Vorläuferproteinen und somit zu einer erhöhten Sekretion des entsprechenden Proteins führen.

3. Der *secA*-Genlocus von *B. licheniformis* enthält sowohl ein Gen der Proteinsekretion als auch eines der Proteinbiosynthese

Da der *secA*-Genlocus von *B. licheniformis* sowohl ein Gen der Proteinsekretion als auch eines der Proteinbiosynthese enthält, ist dieser Genlocus ein potentieller Ort für Mutationen, die zu einer verbesserten Ausbeute von sekretorischen Proteinen führen könnten. Der *secA*-Genlocus von *B. licheniformis* ist in gleicher Weise wie der von *B. subtilis* organisiert (s. Abb. 6) und soll im Folgenden näher beschrieben werden. Das *secA*-Gen liegt im Chromosom zwischen dem *orf189* und dem *prfB*-Gen (SubtiList-Datenbank; Hintz, 1999). Das Genprodukt des stromaufwärts vom *secA*-Gen gelegenen *orf189* ist wahrscheinlich an der Regulation von σ^{54} -abhängigen Promotoren beteiligt (Merrick & Coppard, 1989), während das stromabwärts lokalisierte *prfB*-Gen für den „Release“-Faktor 2 (RF2) kodiert, der nach vollständiger Proteinbiosynthese für das Ablösen des neu synthetisierten Proteins vom Ribosom sorgt (s. I.4.). In *B. subtilis* sind die Gene *secA* und *prfB* in einem Operon lokalisiert und werden als ein zusammenhängendes Transkript von einem vor dem *secA*-Gen

befindlichen σ^A -abhängigen Promotor transkribiert (Herbort, 1996; Herbort *et al.*, 1999). Im intergenen Bereich von *secA* und *prfB* von *B. licheniformis* sind keine Promotor- oder Terminatorstrukturen zu erkennen, was darauf hindeutet, dass beide Gene auch in *B. licheniformis* in einem Operon lokalisiert sind, so dass ein zusammenhängendes mRNA-Transkript beider Gene synthetisiert wird (Hintz, 1999). Von *B. subtilis* und *E. coli* ist bekannt, dass das *prfB*-Gen autoreguliert wird (Donly & Tate, 1991; Herbort *et al.*, 1999). Zur Autoregulation befindet sich kurz hinter dem Start-Codon ein Stop-Codon im offenen Leserahmen. Bei ausreichender RF2-Konzentration in der Zelle wird an dieser Stelle die Translation beendet und die zu kurze Aminosäurekette vom Ribosom freigesetzt. Geringe RF2-Konzentrationen in der Zelle erlauben dagegen keine Freisetzung, sondern führen zu einer Translokation des Ribosoms um eine Base („+1 frameshift“), so dass die Translation im korrekten Leserahmen von *prfB* fortgesetzt und das vollständige Protein synthetisiert werden kann (Farabaugh, 1996). Auch bei *B. licheniformis* ist von einer Autoregulation der Translation auszugehen, da der Leserahmen des *prfB*-Gens von *B. licheniformis* nach dem 24. Codon durch ein UGA Stop-Codon unterbrochen wird.

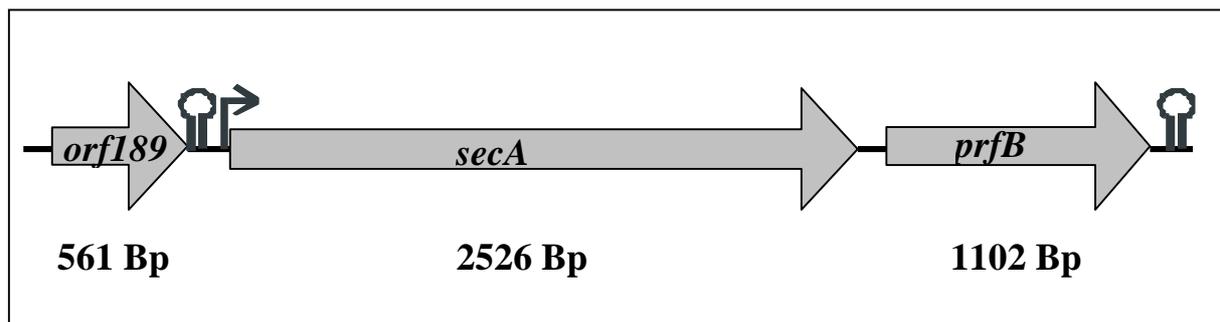


Abb. 6: Schematische Darstellung des *secA*-Genlocus von *B. licheniformis* mit den postulierten Promotor- \rightarrow und Terminator- Ω Bereichen. Das *secA*-Gen bildet mit dem stromabwärts lokalisierten *prfB*-Gen ein Operon.

Die SecA-Proteine von *B. subtilis* und *B. licheniformis* bestehen aus 841 Aminosäuren und weisen zueinander eine Identität von 91% auf (Hintz, 1999). Die Expression des *B. subtilis* *secA*-Gens ist zeitlich reguliert und erreicht ihr Maximum mit dem Einsetzen der Proteinsekretion exakt beim Übergang des exponentiellen Wachstums in die stationäre Phase (definiert als Zeitpunkt t_0) und sinkt danach wieder auf ein niedriges Niveau ab. Die größte Menge an SecA-Protein liegt also genau zu Beginn der hohen Proteinsekretionsaktivität und nicht während der eigentlichen Sekretionsphase vor (Herbort *et al.*, 1999). Zusammen mit dem Befund, dass SecA-Überproduktion in *B. subtilis* zu einer erhöhten Menge an sekretierter Levansucrase führt (Leloup *et al.*, 1999), deuten diese Daten darauf hin, dass das SecA möglicherweise zusätzlich zu seiner Funktion als energieliefernde Komponente als exportspezifisches Chaperon fungiert. Nach diesem Modell würde das cytosolisch vorliegende SecA die zum Zeitpunkt t_0 in großer Menge synthetisierten sekretorischen

Vorläuferproteine binden und in einer entfalteten und somit exportkompetenten Konformation halten. Da durch Überproduktion von SecA vor allem die Menge an cytosolischem SecA erhöht wird, könnte so der bei Überproduktion von sekretorischen Proteinen erhöhte Bedarf an Chaperonen gedeckt werden. Die Sekretionsleistung eines Stammes könnte demnach durch Mutationen, die eine Erhöhung der SecA-Proteinmenge zur Folge haben, verbessert werden.

Bei der Gewinnung von heterologen Proteinen stellt zusätzlich die ineffiziente Initiation der Translokation einen Engpass während des Sekretionsvorgangs dar, weil die heterologen Proteine nicht optimal an den Translokationsapparat des Wirtsbakteriums angepasst sind. Die Initiation der Translokation erfordert die Ausbildung eines mindestens trimeren funktionellen Komplexes aus SecA, SecY und dem Vorläuferprotein (Tippe, 2001). Daher wäre es denkbar, dass *Bacillus*-Stämme, die besonders große Mengen eines heterologen Proteins sekretieren können, Aminosäureaustausche im SecA bzw. SecY tragen, welche die Wechselwirkungen zwischen SecA bzw. SecY und dem heterologen Vorläuferprotein optimieren und so wieder eine effiziente Initiation der Translokation ermöglichen.

Neben einer verbesserten Translokation könnte auch eine effizientere Proteinbiosynthese und somit eine gesteigerte Synthese von Vorläuferproteinen für die bei Produktionsstämmen verbesserte Sekretionsleistung verantwortlich sein. Das *prfB*-Gen kodiert wie bereits erwähnt für den RF2, der nach vollständiger Proteinbiosynthese für das Ablösen des neu synthetisierten Proteins vom Ribosom sorgt. Auch eine verbesserte Termination der Translation könnte zu einer beschleunigten Proteinbiosynthese beitragen. Um die Funktion des RF2 in der Termination der Proteinbiosynthese näher zu beschreiben, soll im Folgenden zunächst ein Überblick über die bakterielle Proteinbiosynthese gegeben und im Anschluss die Funktion des RF2 detaillierter beschrieben werden.

4. Die Rolle von „Release“-Faktoren der Klasse 1 bei der bakteriellen Proteinbiosynthese

4.1. Die bakterielle Proteinbiosynthese - ein Überblick

Bei der Proteinbiosynthese übersetzt das Ribosom die mRNA-Information in eine definierte Aminosäureabfolge (Translation; Ramakrishnan, 2002). Die Aminosäuren gelangen durch tRNA-Moleküle als aktivierte Aminoacyl-tRNAs zum Ribosom, wobei jede Aminosäure an ein spezifisches tRNA-Molekül geheftet ist. Die charakteristische Sekundärstruktur jeder tRNA ist kleeblattförmig. Das 5'- und 3'-Ende der tRNA sind über einen 7-Basenpaar-Stamm miteinander verknüpft, wobei das 3'-Ende den Stamm mit der charakteristischen Basenfolge CCA überragt. An diesen endständigen Adenosin-Baustein des sogenannten Akzeptor-Arms wird die Aminosäure gebunden. Die Nukleotidschleife im gegenüberliegenden Arm des

Kleeblatts wird als Anticodon-Arm bezeichnet. Hier sind die drei Nukleotide lokalisiert (Anticodon), die mit dem Codon der mRNA wechselwirken, wobei für jedes Codon eine bestimmte tRNA mit dem passenden Anticodon existiert. Das Beladen der tRNAs wird durch eine für jede tRNA spezifische Aminoacyl-tRNA-Synthetase katalysiert.

Start- und Endpunkt des zu synthetisierenden Proteins sind durch ein AUG Start-Codon (selten GUG oder UUG) bzw. durch eines der Stop-Codons UAA, UAG oder UGA festgelegt. Bei der Initiation der Translation entsteht unter Mithilfe von drei Initiationsfaktoren (IF1-3) ein Komplex aus den beiden Ribosomen-Untereinheiten (30S und 50S bei Prokaryonten), der mRNA und der Initiations-Aminoacyl-tRNA (N-Formylmethionyl-tRNA bei Prokaryonten). Hierbei wechselwirkt die sogenannte „Shine-Dalgarno“-Sequenz im 5'-Nichtkodierungsbereich der mRNA mit der 16S rRNA der 30S Untereinheit des Ribosoms, so dass ein stabiler Initiationskomplex entsteht. Am Ribosom sind verschiedene Bindungsstellen für die Aminoacyl-tRNAs zu unterscheiden. Die Initiations-Aminoacyl-tRNA befindet sich nach der Initiation in der Peptidylbindestelle (P-Stelle). Das nachfolgende Triplett der mRNA liegt jetzt in der Aminoacylbindestelle (A-Stelle), an die nun die nächste Aminoacyl-tRNA mit dem dazu komplementären Anticodon binden kann. Die Aminoacyl-tRNAs gelangen als ternärer Komplex zusammen mit dem G-Protein EF-Tu und GTP in die A-Stelle des Ribosoms. Eine korrekte Codon-Anticodon-Wechselwirkung löst eine Konformationsänderung des Ribosoms aus, was zu einer Stabilisierung der tRNA-Bindung und zur Aktivierung der GTPase-Aktivität des EF-Tu führt. Die GTP-Hydrolyse ermöglicht schließlich das Ablösen des EF-Tu vom Ribosom. In der nachfolgenden Peptidyltransferase-Reaktion, die sehr wahrscheinlich durch die 23S rRNA der 50S Untereinheit des Ribosoms katalysiert wird, wird das N-Formylmethionin von seiner tRNA in der P-Stelle auf die Aminogruppe der neuen Aminosäure in der A-Stelle übertragen. In der A-Stelle befindet sich dann die Dipeptidyl-tRNA, während in der P-Stelle das deacylierte (entladene) tRNA-Molekül zurückbleibt.

Nach GTP-Hydrolyse, die von dem Elongationsfaktor EF-G, einem weiteren G-Protein, katalysiert wird, wandert das Ribosom nun um ein Codon weiter in Richtung des 3'-Endes der mRNA. Durch diese Bewegung verschiebt sich das Anticodon der Dipeptidyl-tRNA mit dem daran gebundenen Codon der mRNA von der A-Stelle in die P-Stelle des Ribosoms. Die entladene t-RNA gelangt ihrerseits von der P-Stelle zur E-Stelle (Exit-Stelle), von der aus sie schließlich ins Cytosol freigesetzt wird. Jetzt liegt das dritte Codon der mRNA in der A-Stelle, wo eine neue Aminoacyl-tRNA gebunden werden kann und der Zyklus von neuem beginnt.

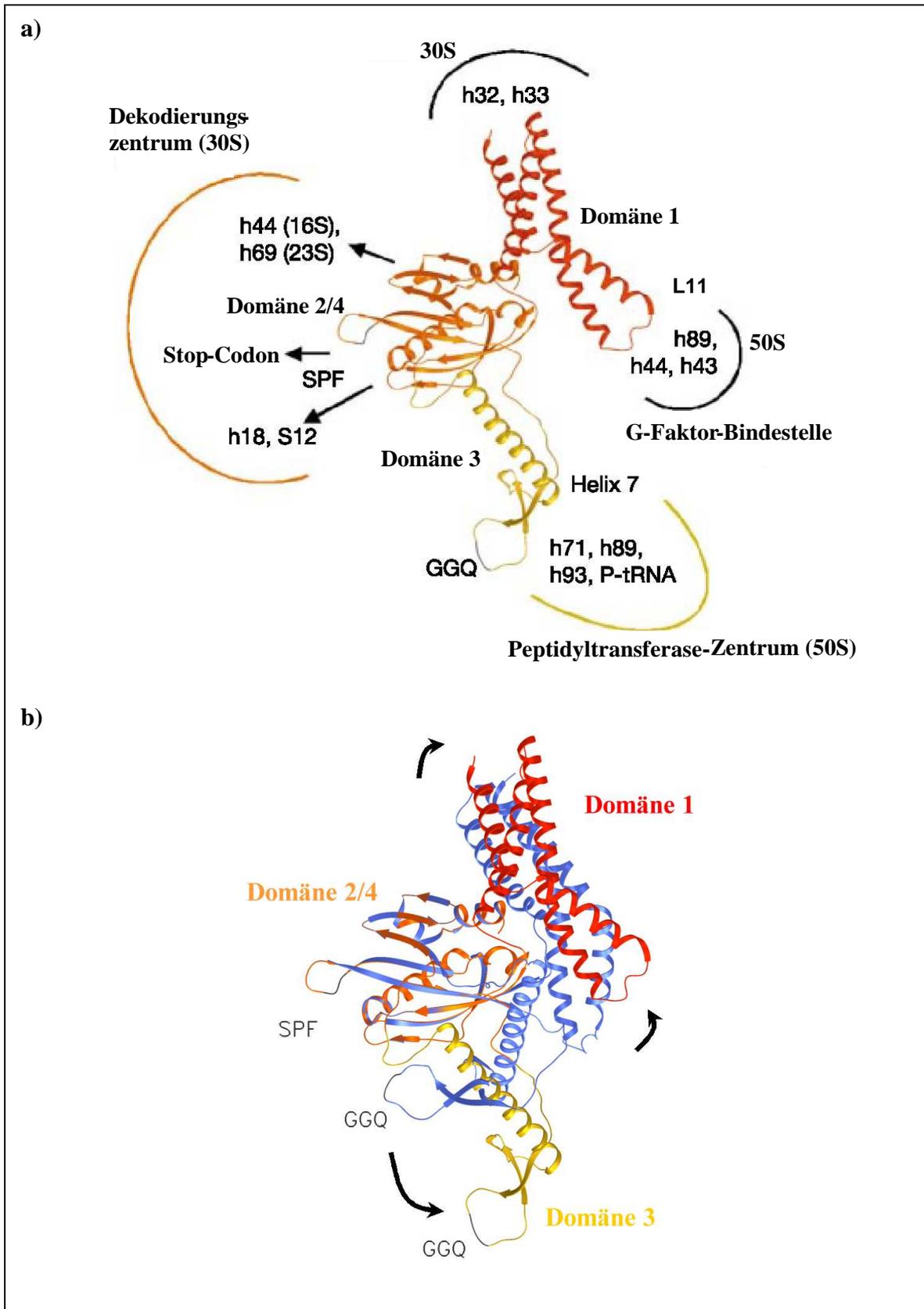
Die Kettenverlängerung setzt sich so lange fort bis ein Stop-Codon auf der mRNA das Ende des Proteins anzeigt. Die „Release“-Faktoren RF1 oder RF2 (Klasse 1) wechselwirken mit dem Stop-Codon an der ribosomalen A-Stelle und bewirken über weitere Wechselwirkungen mit dem Peptidyltransferase-Zentrum am Ribosom die Hydrolyse der Peptidyl-tRNA-Bindung und schließlich die Freisetzung des fertigen Proteins. RF1 erkennt hierbei spezifisch

die Codons UAG und UAA, während RF2 UGA und UAA erkennt. Der Klasse 2 „Release“-Faktor RF3 fungiert als GTPase und sorgt nach Proteinfreisetzung für das Ablösen der Klasse 1 „Release“-Faktoren vom Ribosom. Im Gegensatz zu *E. coli* besitzt *B. subtilis* kein RF3-Protein, so dass das Ablösen der Klasse 1 „Release“-Faktoren hier auf andere Weise erfolgen muss. Anschließend wird der Komplex aus Ribosom, mRNA und der in der P-Stelle gebundenen deacetylierten tRNA aufgelöst. Diese Dissoziation wird unter GTP-Hydrolyse durch den Ribosomen-Recycling-Faktor (RRF) und den Elongationsfaktor EF-G katalysiert.

4.2. „Release“-Faktoren der Klasse 1: Struktur und Funktion

Alle „Release“-Faktoren der Klasse 1 von Pro- und Eukaryonten besitzen das konservierte Aminosäuremotiv GGQ, von dem gezeigt wurde, dass es für die Spaltung der Ester-Brücke zwischen Peptidkette und tRNA wichtig ist (Frolova *et al.*, 1999). Biochemische Daten zeigen, dass die GGQ-Region Wechselwirkungen mit dem Peptidyltransferase-Zentrum am Ribosom eingeht (Scarlett *et al.*, 2003). Weiterhin wurde in RF1 und RF2 ein Sequenzabschnitt identifiziert, der mit der ribosomalen A-Stelle wechselwirkt und die spezifische Anticodonerkennung vermittelt (Ito *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2000). Diese sogenannten Peptid-Anticodons sind in *E. coli* das ¹⁸⁸PAT¹⁹⁰ im RF1 und das ²⁰⁵SPF²⁰⁷ im RF2, wobei die erste und dritte Aminosäure für die richtige Erkennung der zweiten und dritten Purinbase des Stop-Codons sorgen. Das Prolin des RF1-Anticodons interagiert spezifisch mit Adenin an der zweiten Stelle des Stop-Codons, während Serin (RF2) mit Adenin und Guanin wechselwirken kann. Threonin (RF1) interagiert mit Adenin und Guanin, während Phenylalanin (RF2) nur Wechselwirkungen mit Adenin an der dritten Stelle des Stop-Codons eingeht (Nakamura & Ito, 2002).

Abb. 7: Durch Kryo-Elektronenmikroskopie erhaltene Struktur des ribosomal gebundenen RF2 (verändert nach Klaholz *et al.*, 2003). Die Einteilung des RF2 in 4 Domänen wurde aufgrund der Kristallstrukturdaten vorgenommen (Domäne 1: rot, Domäne 2 und 4: orange, Domäne 3: gelb). Die elektronenmikroskopischen Daten zeigen, dass Domäne 2 und 4 eine funktionelle Einheit bilden. Diese werden daher als Domäne 2/4 zusammengefasst. Das für die Stop-Codon-Erkennung wichtige SPF-Motiv und das die Peptidyltransferase stimulierende GGQ-Motiv sind eingezeichnet. **a)** Wechselwirkungen von RF2 mit dem Ribosom. Hierfür wichtige ribosomale Protein- und rRNA-Positionen sind angegeben. **b)** Superposition der RF2 Kristallstruktur (blau) und der Struktur von ribosomal gebundenem RF2 (einzelne Domänen rot, orange und gelb gekennzeichnet, s.o.), die mittels Kryo-Elektronenmikroskopie erhalten wurde. Domäne 2/4 wurde als Anker zur Überlagerung verwendet. Die Pfeile zeigen die Konformationsänderung an, die wahrscheinlich bei Bindung von RF2 an das Ribosom erfolgt. Diese Konformationsänderung ermöglicht dem RF2, gleichzeitig die ribosomale A-Stelle mit dem SPF-Motiv und das Peptidyltransferase-Zentrum mit dem GGQ-Motiv zu kontaktieren.



„Release“-Faktoren stehen mit der Bindung an die ribosomale A-Stelle in direkter Konkurrenz zur Bindung durch Aminoacyl-tRNAs (Eggertsson & Soll, 1988; Elliott & Wang, 1991; Ryden & Isaksson, 1984). Beide wechselwirken außerdem mit der Peptidyl-tRNA in der P-Stelle und aktivieren die Peptidyltransferase-Aktivität des Ribosoms. „Release“-Faktoren der Klasse 1 und Aminoacyl-tRNAs gehen außerdem Wechselwirkungen mit den für die Termination bzw. die Elongation benötigten G-Proteinen RF3 bzw. EF-Tu ein (s.o.), die ihrerseits jeweils an die G-Faktorbindestelle der ribosomalen 50S UE binden. Während das G-Protein EF-Tu das Anlagern der Aminoacyl-tRNA an das Ribosom ermöglicht, sorgt das G-Protein RF3 für das Ablösen der Klasse 1 „Release“-Faktoren vom Ribosom (s. I.4.1.). Aufgrund dieser ähnlichen funktionellen Wechselwirkungen wurde das tRNA-Mimikry-Modell vorgeschlagen, nach dem RF1 und RF2 das tRNA-Molekül nicht nur funktionell, sondern auch strukturell nachahmen (Moffat & Tate, 1994; Ito *et al.*, 1996). Die veröffentlichte Kristallstruktur des eukaryontischen eRF1 bestätigte zunächst diese These (Song *et al.*, 2000). Hiernach entspricht die Domäne 1 des eRF1 der tRNA-Anticodonschleife mit dem eukaryontischen Anticodon-Motiv NIKS (SPF-Motiv im RF2). Der Akzeptorstamm der tRNA wird von der Domäne 2 nachgeahmt, wobei das 3'CCA-Ende der t-RNA zu dem für die Aktivierung der Peptidyltransferase-Aktivität wichtigen GGQ-Motiv äquivalent ist. Das GGQ-Motiv befindet sich an der äußersten Spitze der Domäne 2 und hat einen Abstand von 80 Å zum konservierten NIKS Anticodon-Motiv. Die Anticodonschleife und der Akzeptorstamm der tRNA liegen 75 Å auseinander. Vorstellbar wäre daher, dass der eRF1 an das Ribosom in einer tRNA ähnlichen Weise bindet, also das GGQ-Motiv mit dem Peptidyltransferase-Zentrum interagiert und gleichzeitig das Anticodon-Motiv Wechselwirkungen mit dem Stop-Codon in der A-Stelle des Ribosoms eingeht.

Die im Jahr 2001 von Vestergaard *et al.* entschlüsselte Kristallstruktur des *E. coli* RF2 unterscheidet sich allerdings deutlich von der Struktur des eRF1. Hier befindet sich das SPF-Anticodon-Motiv nur in einem 23 Å Abstand zum konservierten GGQ-Motiv. Der geringe Abstand macht einen gleichzeitigen Kontakt zum Peptidyltransferase-Zentrum und zur A-Bindestelle unmöglich. Kürzlich erhaltene Strukturdaten aus verschiedenen kryoelektronenmikroskopischen Untersuchungen (Klaholz *et al.*, 2003; Rawat *et al.*, 2003) zeigen jedoch, dass der RF2 bei der Bindung an das Ribosom seine Konformation zu einer offeneren Struktur verändert (s. Abb. 7) und so doch mit den postulierten Regionen gleichzeitig das Peptidyltransferase-Zentrum und die A-Bindestelle kontaktieren kann. Es wurde folgendes mechanistische Modell vorgeschlagen: Der RF2 lagert sich über eine relativ schwache Bindung an die A-Stelle des Ribosoms an und kontrolliert so die eintretenden Codons der mRNA. Gelangt ein Sinn-Codon in die A-Bindestelle, dissoziiert der RF2, während ein Stop-Codon eine Konformationsänderung des RF2 zur Folge hat. Der RF2 nimmt eine offene ausladende Struktur ein, die eine hohe Bindungsaffinität zum Ribosom besitzt. Die Konformationsänderung erhöht außerdem den Abstand von SPF- und GGQ-Motiv, so dass die A-Bindestelle und das Peptidyltransferase-Zentrum jetzt gleichzeitig kontaktiert werden

können. So wird die Information über das Stop-Codon in der A-Bindestelle an das Peptidyltransferase-Zentrum weitergeleitet, damit das Protein schließlich durch Hydrolyse von der tRNA freigesetzt werden kann (Rawat *et al.*, 2003).

5. Zielsetzung der Arbeit

B. licheniformis wird von der Waschmittelindustrie unter anderem zur Gewinnung von Proteasen des Subtilisin-Typs eingesetzt. Die zur Produktion eingesetzten Stämme werden zumeist über wiederholte Zyklen mehrfach ungerichteter Mutagenese und anschließendem Screening auf hohe Sekretionsleistung erhalten, weshalb die Ursachen für die guten Sekretionseigenschaften in der Regel nicht bekannt sind. Anzunehmen ist, dass Mutationen in Genen der Proteinbiosynthese oder des Proteinexports für die guten Sekretionseigenschaften der Industriestämme verantwortlich sind. Da das SecA-Protein die zentrale und energieliefernde Komponente der Proteintranslokation darstellt, sollte untersucht werden, ob Mutationen im *secA*-Gen für die hohe Sekretionsleistung des Subtilisin-Produzentenstammes *B. licheniformis* „E“ mitverantwortlich sein könnten. Hierbei ist auch der Promotorbereich von *secA* von Interesse, da Überexpression von *secA* zu einer erhöhten Menge an sekretiertem Protein führen kann. Im *secA*-Genlocus von *B. licheniformis* befindet sich stromabwärts vom *secA*- das *prfB*-Gen, welches für den „Release“-Faktor 2 (RF2) kodiert. Der RF2 ist bei der Termination der Proteinbiosynthese wichtig und sorgt für das Ablösen der fertig synthetisierten Proteine vom Ribosom. Da eine effizientere Termination zu einer insgesamt verbesserten Proteinbiosynthese führen kann, sollte auch untersucht werden, ob der industrierelevante Stamm *B. licheniformis* „E“ Mutationen im *prfB*-Gen trägt, die ebenfalls zu den hohen Subtilisin-Ausbeuten beitragen könnten.

Bei der industriellen Subtilisin-Produktion erfolgt die Expression des Subtilisin-Gens zumeist von einem Plasmid, welches zur Selektion eine Antibiotikaresistenzkassette beinhaltet. Die eigentliche Fermentation wird jedoch ohne Antibiotika im Medium durchgeführt, so dass im Laufe der Fermentation ein Teil der Zellen das Plasmid verliert und so nicht mehr zur Subtilisin-Produktion beitragen kann. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob sich das essentielle *secA*-Gen als alternativer Selektionsmarker zur Subtilisin-Produktion eignet. Bleibt das Plasmid mit dem *secA*-Gen als Selektionsmarker bis zum Ende der Fermentation stabil, so kann dies zu einer erhöhten Subtilisin-Ausbeute führen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die aufgrund der Anwesenheit des Subtilisin-SecA-Plasmids erhöhte *secA*-Gendosis zu einer größeren Menge an SecA-Protein in der Zelle führt, welche die Sekretionsleistung des Produzentenstammes noch zusätzlich erhöhen kann.

II. Material und Methoden

1. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Tab. 1: Bakterienstämme

Art	Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM13	Wildtyp	Smith <i>et al.</i> (1964)
	„E“		Henkel KGaA
	„E“ $\Delta secA$	$\Delta secA$	diese Arbeit
<i>Bacillus subtilis</i>	DB104	<i>his, nprR2, nprE18, $\Delta aprA3$</i>	Kawamura & Doi (1984)
	NIG1152	<i>met, his, div341^{ts}</i>	Miyakawa & Komano (1981)
<i>Escherichia coli</i>	JM109	<i>mcrA, recA1, endA1, gyrA96, thi1, hsdR17, supE44, relA1, $\Delta(lac-proAB)$, F'[traD36,proAB⁺], laqIqZΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)

Tab. 2: Plasmide

a) Plasmide für *E. coli*

Plasmid	Resistenz	klonierte Gene	Referenz
pUC18	amp	-	Vieira & Messing (1982)
pUCprfBE	amp	<i>prfB</i> _{B.l.E}	diese Arbeit
pBBRMCS-2	kan	-	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pBBorf189	kan	orf189' _{B.l.E}	diese Arbeit
pBBorf189prfB	kan	orf189' <i>prfB</i> ' _{B.l.E}	diese Arbeit
pHSG575	cm	-	Takeshita <i>et al.</i> (1987)
pHSGsecAE	cm	<i>secA</i> _{B.l.E}	diese Arbeit

b) „Shuttle“-Plasmide für *E. coli* und *B. subtilis* bzw. *B. licheniformis*

Plasmid	Resistenz	klonierte Gene	Referenz
pWH1520	amp (<i>E. coli</i>) tet (<i>B. subtilis</i>)	-	Rygus und Hillen (1991)
pWMKL1	amp (<i>E. coli</i>) tet (<i>B. subtilis</i>)	<i>secA</i> _{B.s.}	Klein <i>et al.</i> (1995)
pWMH1	amp (<i>E. coli</i>) tet (<i>B. subtilis</i>)	<i>secA</i> _{B.l.Wt}	Hintz (1999)
pWMH2	amp (<i>E. coli</i>) tet (<i>B. subtilis</i>)	<i>secA</i> _{B.l.E}	diese Arbeit
pCU3	amp (<i>E. coli</i>) cm (<i>B. subtilis</i>)	-	Meens <i>et al.</i> (1993)
pCU3OmpAkan (pJM20kan)	amp (<i>E. coli</i>) kan (<i>B. subtilis</i>)	<i>ompA</i> _{E.c.}	Meens <i>et al.</i> (1993)
pCU3- Kontrollvektor	amp (<i>E. coli</i>) cm (<i>B. subtilis</i>)	<i>prfB</i> ' _{B.l.Wt}	diese Arbeit
pCU3 <i>prfB</i> Wt	amp (<i>E. coli</i>) cm (<i>B. subtilis</i>)	<i>prfB</i> _{B.l.Wt}	diese Arbeit
pCU3 <i>prfB</i> E	amp (<i>E. coli</i>) cm (<i>B. subtilis</i>)	<i>prfB</i> _{B.l.E}	diese Arbeit
pCU3 <i>prfB</i> Wt*	amp (<i>E. coli</i>) cm (<i>B. subtilis</i>)	<i>prfB</i> * _{B.l.Wt}	diese Arbeit
pCU3 <i>prfB</i> E*	amp (<i>E. coli</i>) cm (<i>B. subtilis</i>)	<i>prfB</i> * _{B.l.E}	diese Arbeit
pCU3-Ery	amp (<i>E. coli</i>) ery (<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>)	-	diese Arbeit
pCU3 <i>prfB</i> Wt-Ery	amp (<i>E. coli</i>) ery (<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>)	<i>prfB</i> _{B.l.Wt}	diese Arbeit
pCU3 <i>prfB</i> E-Ery	amp (<i>E. coli</i>) ery (<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>)	<i>prfB</i> _{B.l.E}	diese Arbeit
pCU3 <i>prfB</i> E*-Ery	amp (<i>E. coli</i>) ery (<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>)	<i>prfB</i> * _{B.l.E}	diese Arbeit

c) Plasmide für *B. subtilis* und *B. licheniformis*

Plasmid	Resistenz	klonierte Gene	Referenz
pSub	tet (<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>)	Subtilisin aus <i>B. lentus</i>	Henkel KGaA
pSubSecA	tet (<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>)	<i>secA</i> _{B.l.E}	diese Arbeit
pE194	ery (<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>)	-	Villafane <i>et al.</i> (1987)
pEorf189' <i>prfB</i> '	ery (<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>)	<i>orf189'</i> _{B.l.E} - <i>prfB'</i> _{B.l.E}	diese Arbeit

Resistenz gegen amp: Ampicillin, cm: Chloramphenicol, tet: Tetracyclin, ery: Erythromycin;
B.s.: *Bacillus subtilis*, *B.l.Wt*: *Bacillus licheniformis* DSM13, *B.l.E*: *B. licheniformis* „E“;
*prfB**: *prfB*-Gen ohne Autoregulation

Die Konstruktion der in dieser Arbeit entstandenen Plasmide ist im Folgenden kurz dargestellt (verwendete Primer s. Tab. 3, S. 26):

pUC*prfBE*: Ausgehend von chromosomaler DNA von *B. licheniformis* „E“ wurde mittels PCR und den Primern Nr. 4 und Nr. 5 das *prfB*-Gen amplifiziert und in die *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle von pUC18 ligiert.

pHSG*secAE*: Ausgehend von chromosomaler DNA von *B. licheniformis* „E“ wurde mittels PCR und den Primern Nr. 1 und Nr. 2 das *secA*-Strukturgen mit zugehörigem Promotorbereich amplifiziert und in die *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle von pHSG575 ligiert.

pWMH2: Aus pHSG*secAE* wurde mittels PCR und den Primern Nr. 2 und Nr. 3 ein 2,577 kB großes, das *secA*-Gen von *B. licheniformis* „E“ tragende Fragment amplifiziert und in den *Sma*I-*Bam*HI geschnittenen Vektor pWH1520 ligiert. Ausgehend von diesem Konstrukt kann das *secA*_{B.l.E}-Gen in *B. subtilis* exprimiert werden. Es unterliegt im pWMH2 der Kontrolle des *xylA*-Promotor/Operatorsystems.

pCU3*prfBWt*: Ausgehend von chromosomaler DNA von *B. licheniformis* Wt bzw. von **pCU3*prfBE*:** *B. licheniformis* „E“ wurde mittels PCR und den Primern Nr. 4 und Nr. 6 das jeweilige *prfB*-Gen amplifiziert und zur Expression jeweils in den *Bam*HI-*Sal*I geschnittenen Vektor pCU3 ligiert. Die *prfB*-Gene unterliegen jetzt der Kontrolle des Bakteriophagen-T5-Promotors P25 und des *lac*-Operators.

- pCU3-Kontrolle: Ausgehend von chromosomaler DNA von *B. licheniformis* Wt wurde ein verkürztes *prfB*-Gen mit den Primern Nr. 5 und Nr. 7 amplifiziert und als Abstandshalter in zum Promotor umgekehrter Orientierung in die Restriktionsschnittstellen *SaI*I und *Bam*HI vom Vektors pCU3 kloniert.
- pCU3*prfB*Wt*: Ausgehend von den Vektoren pCU3*prfB*Wt und pCU3*prfB*E wurde mittels PCR und den Primern Nr. 9 und Nr. 10 die Base an Position 73 im jeweiligen *prfB*-Gen deletiert und so dessen Autoregulationsmechanismus ausgeschaltet.
- pCU3-Ery: Aus den Vektoren pCU3-Kontrolle, pCU3*prfB*Wt, pCU3*prfB*E und pCU3*prfB*Wt-Ery: pCU3*prfB*E* wurde mit den Restriktionsenzymen *Mun*I und *Nco*I die Chloramphenicol-Resistenzkassette herausgeschnitten und durch die pCU3*prfB*E-Ery: mittels PCR und den Primern Nr. 11 und Nr. 12 amplifizierte Erythromycin-Resistenzkassette ersetzt.
- pSubSecA: Das *secA*-Gen von *B. licheniformis* „E“ wurde mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI aus dem Vektor pHSG*secAE* geschnitten und in die *Bam*HI-Schnittstelle des pSub ligiert.
- pBBorf189': Ausgehend von chromosomaler DNA von *B. licheniformis* „E“ wurde mittels PCR mit den Primern Nr. 13 und Nr. 14 der 3'-Bereich vom *orf189*-Gen und der nachfolgend lokalisierte *secA*-Promotor amplifiziert und das Fragment in die *Xba*I- und *Bam*HI-Schnittstellen von pBBRMCS2 kloniert.
- pBBorf189'*prfB*': Ausgehend von chromosomaler DNA von *B. licheniformis* „E“ wurde mittels PCR mit den Primern Nr. 4 und Nr. 8 ein 581 Bp großer 5'-Bereich vom *prfB*-Gen amplifiziert und das Fragment in die *Bam*HI- und *EcoRV*-Schnittstellen von pBBorf189' kloniert.
- pEorf189'*prfB*': Das 1231 Bp große *orf189'prfB'*-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *Xba*I-*EcoRV* aus dem Vektor pBBorf189'*prfB'* geschnitten und in die mit Klenow-Enzym aufgefüllte *Acc*I- und die *Xba*I-Schnittstelle von pE194 ligiert.

Tab. 3: Oligonukelotide

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
1	<i>B.l.sec</i> AupBamHI	ATG GAT CCC CCT CCC GGA TCT TCC	Konstruktion von pHSG <i>sec</i> AE
2	<i>B.l.sec</i> AdownBamHI	GCC GGA TCC AAA TAA AAA GAG GCG TGC	Konstruktion von pHSG <i>sec</i> AE und pWMH2
3	<i>B.l.sec</i> AupSmaI	AAA CCC GGG AAT TAA AGA GGA GCG TTA TTC	Konstruktion von pWMH2
4	<i>prfB</i> upBamHI	TTG GAT CCG GCT GAA ATA TAT GAT GAG GTG	Konstruktion von pUC <i>prfB</i> E, pCU3 <i>prfB</i> Wt, pCU3 <i>prfB</i> E und pBBorf189' <i>prfB</i> '
5	<i>prfB</i> downBamHI	CTG GGA TCC TCC GCA CGA TTC ATT ACC	Konstruktion von pUC <i>prfB</i> E und pCU3-Kontrolle
6	<i>prfB</i> downSalI	TTT AGT CGA CTG TAA GTA AAT AAC AGC CAA ATA ACG	Konstruktion von pCU3 <i>prfB</i> Wt, pCU3 <i>prfB</i> E
7	<i>prfB</i> 'upSalI	TGA CGT CGA CTT TTG GGG AGA TCA GCA G	Konstruktion von pCU3- Kontrolle
8	<i>prfB</i> downEcoRV	CTG ATA TCA GGA GAG TGA CAG ACT TGA TTC	Konstruktion von pBBorf189' <i>prfB</i> '
9	<i>prfB</i> Change1	CGGG ACT TCA GGG GGT TCT TTG ACC TCG AAA CAA AGG AAG C	Deletion der „frameshift“- Base im <i>prfB</i> -Gen von <i>B. licheniformis</i> Wt und „E“
10	<i>prfB</i> Change2	GCT TCC TTT GTT TCG AGG TCA AGA GAC CCC CTG AAG TCC G	Deletion der „frameshift“- Base im <i>prfB</i> -Gen von <i>B. licheniformis</i> Wt und „E“
11	Ery-upMunI	TAC TTC GCA ATT GAG TCG TTA AAC CGT GTG CTC TAC G	Amplifizierung der Erythromycin-Resistenz- kassette ausgehend von pE194
12	Ery-downNcoI	CAC AAA ACC ATG GCA CAC GAA AAA CAA GTT AAG GGA TGC	Amplifizierung der Erythromycin-Resistenz- kassette ausgehend von pE194
13	<i>orf189</i> downBamHI	AAG GAT CCT CTT TAA TTT CCT TGT TTA AGC	Konstruktion von pBBorf189'

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
14	<i>orf189upXbaI</i>	CGT CTA GAA GAA GAT TGG AAA GCT TGA GCG	Konstruktion von pBBorf189'
15	<i>orf189insert</i>	GAG GAG AAA ATA TTG AGG TAA CAC CAG CG	PCR zur Überprüfung der <i>secA</i> -Deletion
16	<i>prfBnachPstI</i>	GCC CTG CAG AGT CAA ACG GAG	PCR zur Überprüfung der <i>secA</i> -Deletion
17	<i>orf189</i>	TAT TGA GGT AAC ACC AGC G	Sequenzierprimer zur Überprüfung der <i>secA</i> -Deletion
18	<i>prfB</i>	ATT CTG ACG AGC CTG TGC	Sequenzierprimer zur Überprüfung der <i>secA</i> -Deletion

2. Medien

LB (Luria Broth-) Medium (Miller, 1972): pro l: 10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
ad H₂O (bidest.)

Agarplatten enthielten 1,5% Agar.

LB-Medium mit Kaliumphosphat-Puffer

pro l LB-Medium: 21 g K₂HPO₄
9 g KH₂PO₄
pH 7,2

Medien zur Transformation von *B. subtilis*

Natürliche Kompetenz (Hardy, 1985):

4 x SP-Medium: pro l: 56,0 g K₂HPO₄
24,0 g KH₂PO₄
8,0 g (NH₄)₂SO₄
4,0 g Na₃-Citrat*2H₂O
4,0 g Hefeextrakt
0,8 g MgSO₄*7H₂O
0,8 g Casamino Acids
ad H₂O (bidest.); pH 7,2

SP-I-Medium: pro 100 ml:	25,0 ml 4 x SP-Medium
	50,0 µl 1 M CaCl ₂
	250,0 µl 1 M MgCl ₂
	2,5 ml 0,2 % Tryptophan
	100,0 µl 5,0 % Histidin
	1,0 ml 0,5 % Glukose
	71,1 ml H ₂ O (bidest.)

Die Lösungen der Aminosäuren wurden sterilfiltriert, alle anderen Lösungen autoklaviert und anschließend steril gemischt.

Medien zur Transformation von *B. subtilis* und *B. licheniformis*

Protoplastentransformation (variiert nach Cohen und Chang, 1978)

TYS-Medium: pro l	20 g Trypton
	10 g Hefeextrakt
	10 g NaCl
	100 ml 2 M Sucrose

Trypton, Hefeextrakt und NaCl wurden in 900 ml H₂O (bidest.) gelöst und autoklaviert. Die Sucrose wurde einzeln autoklaviert und dem Medium steril zugesetzt.

4 x PAB: pro l	70 g Bacto-antibiotic Medium III
-----------------------	----------------------------------

2 x SMM: pro l	500 ml 2 M Sucrose
	20 ml 1 M MgCl ₂
	480 ml 40 mM Maleinsäure
	mit NaOH auf pH 6,5 eingestellt

Alle Lösungen wurden einzeln autoklaviert und anschließend steril gemischt.

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

SMMP /RSA: Es wurden 2g RSA (Rinderserumalbumin) in 100 ml SMMP gelöst und sterilfiltriert.

40 % PEG/SMM Lösung: Pro l wurden 1,15 g Maleinsäure in 250 ml H₂O (bidest.) gelöst, mit 1 M NaOH auf pH 6,5 eingestellt, anschließend 400 g PEG₆₀₀₀ zugegeben und unter Wärmezufuhr gelöst, auf 740 ml H₂O aufgefüllt und autoklaviert. Nachträglich wurden 250 ml 2 M Sucrose und 10 ml 1 M MgCl₂ zugegeben.

DM3-Agar:

DM3-Agarplatten (500 ml)

100,0 ml geschmolzener Agar 4 %
250,0 ml 1 M Na-Succinat (mit Bernsteinsäure auf pH 7,3 eingestellt)
50,0 ml Casamino Acids 5 %
25,0 ml Hefeextrakt 1
50,0 ml Phosphatpuffer (Phosphatpuffer: 35 g K₂HPO₄, 15 g KH₂PO₄ pro l)
15,0 ml Glukose 20 %
10,0 ml MgCl₂
2,5 ml RSA 2 %

DM3-Weichagar (50ml)

Zusammensetzung wie DM3-Agarplatten, nur mit 100 ml geschmolzenem 3,5 %igem Agar.

Die Lösungen wurden einzeln angesetzt. Die RSA-Lösung wurde sterilfiltriert, die restlichen Lösungen autoklaviert und bei 60 °C warmgehalten. Vor dem Gießen der Platten wurden die Lösungen steril gemischt und das jeweils benötigte Antibiotikum zugegeben (Tetracyclin 15 µg/ml, Chloramphenicol 15 µg/ml oder Erythromycin 5 µg/ml).

Lösungen zur Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli*

RF1: pro l: 12,0 g RbCl
9,9 g MnCl₂
1,5 g CaCl₂ x H₂O
2,9 g Kaliumacetat
121,0 ml Glyzerin 87%
ad H₂O (bidest.); pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt; sterilfiltriert

RF2: pro l: 2,1 g MOPS
1,2 g RbCl
11,0 g CaCl₂ x 2H₂O
121,0 ml Glyzerin 87 %
ad H₂O (bidest.); pH 6,8; sterilfiltriert

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

100 x Metallmix: pro 100 ml: 20 ml 1 M MgCl₂
7 ml 1 M CaCl₂
5 ml 10 mM FeCl₃
1 ml 10 mM ZnCl₂
5 ml 100 mM MnCl₂
ad H₂O (bidest.)

II. Material und Methoden

20 x Aminosäuremix:

Sämtliche Aminosäuren außer Methionin und Tryptophan wurden zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml eingewogen und in 0,1 N HCl bei 60 °C in Lösung gebracht.

<u>S7 Minimalmedium:</u> pro l:	20,0 ml 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0
	10,0 ml 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄
	10,0 ml 100 x Metallmix
	1,0 ml Thiamin (50 mg/ml)
	20,0 ml 1 M Natriumglutamat pH 7,0
	50,0 ml 20 x Aminosäuremix
	4,0 ml Riboflavin (100 µg/ml)
	2,8 ml Uridin (10 mg/ml)
	50,0 ml Tryptophan (1 mg/ml)
	25,0 ml Methionin (1 mg/ml)
	1,0 ml Hefeextrakt 50 %
	ad H ₂ O (bidest.)

3. Verwendete Reagenzien und Bezugsquellen

Biochemikalien inkl. Puffer:	- Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, England - Clontech Laboratories, Palo Alto, USA - MBI Fermentas, St. Leon-Rot - Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen - Stratagene, La Jolla, USA
Analysenreine Chemikalien:	- Bethesda Research Laboratories, Bethesda, USA - Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe - Merck AG, Darmstadt - Serva GmbH & Co.KG, Heidelberg - Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Fertigmedien/Medienkomponenten:	- Difco Laboratories, Detroit, USA.
Oligonukleotide:	- MWG Biotech AG, Ebersberg
radioaktives ³⁵ S-L-Methionin:	- NEN DuPont (Deutschland), Bad Homburg
Nitrocellulose-/Nylon-/PVDF-	- Schleicher und Schüll, Dassel
Membranen:	- Millipore, Billerica, USA

4. Mikrobiologische Methoden

4.1. Kultivierung von Bakterien

4.1.1. Allgemeine Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung aller verwendeten Stämme erfolgte, wenn nicht gesondert aufgeführt, in LB-Vollmedium. Die für die Selektion auf Antibiotikaresistenz verwendeten Konzentrationen der Antibiotika lagen für Tetracyclin bei 15 µg/ml, für Erythromycin bei 5 µg/ml, für Chloramphenicol bei 15 µg/ml und für Ampicillin bei 100 µg/ml. Die Inkubation in Flüssigmedium wurde bei einem Volumen bis zu 5 ml in einem Reagenzglasschüttler bei 170 upm durchgeführt.

4.1.2. Kultivierung von *Bacillus*-Stämmen zur vergleichenden Bestimmung der Subtilisin-Ausbeuten im Kulturüberstand

Schüttelkolben ohne pH-Kontrolle

Zur vergleichenden Bestimmung der Subtilisin-Ausbeuten im Kulturüberstand wurde ausgehend von einer einzelnen Kolonie je Stamm eine Vorkultur angezogen. Dazu wurden jeweils 20 ml gepuffertes LB-Medium (pH 7,2) in einem 100 ml EMK mit 2 Schikanen beimpft und die Kultur ü.N. bei 210 upm und 37 °C kultiviert. Mit der Vorkultur wurden 30 ml gepuffertes LB-Medium (pH 7,2) zu einer OD₆₀₀ von 0,06 beimpft. Die Kultivierung der Hauptkulturen erfolgte in 500 ml EMK mit 4 Schikanen bei 210 upm über einen Zeitraum von 72 h. Nach 48 h und 72 h wurden Proben entnommen und die Überstände durch Zentrifugation bei 12000 upm für 15 min bei 4 °C von den Zellen getrennt. Die Überstände wurden zur Bestimmung der Subtilisin-Aktivitäten mittels AAPF-Test (s. II.5.1.) verwendet.

pH-kontrollierbare Schüttelkolben

Die Kultivierung von *Bacillus*-Stämmen zur vergleichenden Bestimmung der Subtilisin-Ausbeuten im Kulturüberstand wurde alternativ in der „fedbatch-pro“-Anlage (DASGIP, Jülich) durchgeführt. Diese Anlage ermöglicht es, den pH-Wert der Kulturen konstant zu halten, indem dieser in jedem einzelnen Schüttelkolben über den gesamten Zeitraum des Experiments gemessen und gegebenenfalls auf den vorher eingestellten Sollwert mittels automatischer Titration korrigiert wird.

Ausgehend von einer ÜNK wurden 100 ml gepuffertes LB-Medium (pH 7,2) zu einer OD₆₀₀ von 0,06 beimpft und bei 37 °C und 170 upm in 500 ml EMK mit 2 Schikanen über einen Zeitraum von 72 h geschüttelt. Nach 2-3 h Inkubation wurde die pH-Kontrolle eingeschaltet und der pH durch Titration mit 8 % HCl-Lösung konstant auf pH 7,2 gehalten. Der pH-Wert wurde zusätzlich durch Probennahme und Messung mit einer externen pH-Elektrode

kontrolliert und der Wert falls erforderlich in den Messdaten der Anlage korrigiert. Nach 48 h und 72 h wurden Proben entnommen und die Überstände durch Zentrifugation bei 12000 upm für 15 min bei 4 °C von den Zellen getrennt. Die Überstände wurden zur Bestimmung der Subtilisin-Aktivitäten mittels AAPF-Test (s. II.5.1.) verwendet.

4.2. Stammhaltung

Die langfristige Stammhaltung erfolgte in Form von Glycerinkulturen. ÜNK wurden auf 50 % Glycerin eingestellt und bei -70 °C gelagert. Die kurzfristige Aufbewahrung von Stämmen erfolgte auf LB-Agarplatten bei 4 °C.

4.3. Transformation von Bakterien

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

50 ml LB-Medium wurde mit einer ÜNK zu einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bis zur OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert und durch 10-minütige Zentrifugation bei 3500 upm und 4 °C geerntet. Das Zellpellet wurde in 15 ml eiskaltem RF1-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden dann bei 3500 upm für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert, in 4 ml RF2-Puffer resuspendiert und für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden in 100 µl Aliquots in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

Zur Transformation wurden ca. 100 ng Plasmid-DNA mit 100 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock wurde für 90 sek bei 42 °C durchgeführt. Zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz wurde der Ansatz nach Zugabe von 900 µl LB-Medium für 60 min bei 37 °C inkubiert. Aliquots (50-100 µl) wurden auf Selektionsagarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert.

Transformation von *B. subtilis* Stämmen

Natürliche Kompetenz (verändert nach Sadaie und Kada, 1983)

Zur Transformation von *B. subtilis* Stämmen über die Methode der natürlichen Kompetenz wurden ausgehend von einer ÜNK 10 ml SP-I-Medium zu einer OD₆₀₀ von 0,05 beimpft. Für die Transformation des Stammes NIG1152 wurde das SP-I-Medium zusätzlich mit 50 µg/ml Methionin und Histidin supplementiert. Die Kultur wurde bis zum Übergang von exponentieller zu stationärer Wachstumsphase bei 130 upm im 100ml EMK mit Schikanen inkubiert. Je 1 ml der kompetenten Zellen wurden mit ca. 1 µg Plasmid-DNA beim Stamm DB104 und mit 5-10 µg Plasmid-DNA bei NIG1152 gemischt und 1 h bei 110 upm weiter

inkubiert. Dem Ansatz wurde 1 ml LB-Medium sowie 0,5 % Glukose zugesetzt und dieser bei 130 upm für eine weitere Stunde inkubiert. Die Zellen wurden nach Zentrifugation (Heraeus, 15 min, RT, 5000 upm) in 0,5 ml LB-Medium aufgenommen und in 50-100 µl Aliquots auf Selektionsagarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert.

Transformation von *B. subtilis* und *B. licheniformis* Stämmen:

Protoplastentransformation (verändert nach Chang und Cohen, 1979)

Zur Herstellung von *B. subtilis* und *B. licheniformis* Protoplasten wurde jeweils ausgehend von einer einzelnen Kolonie eine ÜNK in 30 ml TYS-Medium in einem 100 ml EMK ohne Schikane bei der erforderlichen Temperatur und 230 upm angezogen und damit die Hauptkultur, 40 ml TYS-Medium in einem 500 ml EMK ohne Schikane zu einer OD₆₀₀ von 0,18 beimpft. Die Hauptkultur wurde bei 230 upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 kultiviert und die Zellen anschließend durch Zentrifugation bei 7000 upm für 15 min geerntet. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 5 ml SMMP resuspendiert und die Suspension in einen Zentrifugenbecher mit rundem Boden überführt. Anschließend wurden 200 µl frisch angesetzte Lysozymlösung (10 mg/ml Lysozym in SMMP) zugesetzt und die Zellen zur Protoplastierung bei 37 °C für 30 bis 40 min im Wasserbad unter sanftem Schütteln inkubiert. Die Protoplastierung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und dem Ansatz bei einem Anteil von 80 % - 90 % protoplastierter Zellen sofort 9 ml SMMP zugesetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Protoplasten bei RT für 15 min bei 5000 upm abzentrifugiert und das Pellet in 2,5 ml SMMP resuspendiert. Zur Transformation wurden 0,5 ml Aliquots eingesetzt. Die zu transformierende Plasmid-DNA in maximal 25 µl H₂O wurde zunächst 1:1 mit 2 x SMM und das Gemisch anschließend mit den Protoplasten gemischt. Das DNA/Protoplasten-Gemisch (1-2 µg DNA) wurde zu 1,5 ml 40 % PEG-Lösung gegeben, gemischt und 2 min bei RT inkubiert. Es wurden dann 5 ml SMMP/RSA dazugegeben, der Ansatz gemischt und bei RT und 3100 upm für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml SMMP/RSA gelöst und für 1 h bei der erforderlichen Temperatur und 150 upm geschüttelt. Je 200 µl des Transformationsansatzes wurden mit 4-5 ml Weichagar (mit dem erforderlichen Antibiotikum) gemischt und auf eine DM3-Agar-Platte gegossen. Die Platten wurden bei 30 °C oder 37 °C für 3-5 Tage inkubiert.

4.4. Präparation von DNA

4.4.1. Präparation chromosomaler DNA aus *B. subtilis* und *B. licheniformis*

Die Präparation chromosomaler DNA erfolgte mit Hilfe des „DNeasy Tissue Kit“ nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden).

4.4.2. Präparation von Plasmid-DNA

Präparation von Plasmid-DNA I

Minilysat von *E. coli* (verändert nach Birnboim und Doly, 1979)

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* zur Kontrolle von Klonierungen erfolgte nach der Methode von Birnboim und Doly. Dazu wurden die Zellen aus 5 ml ÜNK für 10 min (Heraeus, 4000 upm, RT) abzentrifugiert, zur Lyse in 150 µl Lösung A resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Lösung B wurden die Zellen weitere 3 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 225 µl Lösung C und nochmaliger 5-minütiger Inkubation bei RT wurden chromosomale DNA und Proteine gefällt und anschließend das Lysat für 10 min (Eppendorf, 14000 upm, RT) zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 0,8 Volumen Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml 70 % EtOH gewaschen und in 50 µl EB-Puffer gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese.

verwendete Lösungen und Puffer:

Lösung A:	50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl pH 8 10 mM EDTA(Na ₂ -Salz) +RNase 133 µg/ml
Lösung B:	0,2 N NaOH 1 % SDS
Lösung C:	3 M K-Acetat pH 4,8
EB-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8,5

Präparation von Plasmid-DNA II

Minilysat von *B. subtilis*, *B. licheniformis* und *E. coli*

Die Isolierung von kleinen Mengen Plasmid-DNA aus *B. subtilis* und *B. licheniformis* erfolgte immer über das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden die Zellen nach Resuspension in P1-Puffer durch Zugabe von 5 µg/ml Lysozym und Inkubation für 30 min bei 37 °C enzymatisch aufgeschlossen. Auch Plasmid-DNA von *E. coli*, die zur Sequenzierung oder für Klonierungen eingesetzt werden sollte, wurde mit diesem Kit nach Anleitung des Herstellers präpariert.

Präparation von Plasmid-DNA III

Isolierung im präparativen Maßstab aus *B. subtilis*, *B. licheniformis* und *E. coli*

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA (z.B. mehr als 1 µg Plasmid-DNA aus *B. subtilis* und *B. licheniformis* oder Isolierung des low-copy Vektor pHSG575 aus *E. coli*) wurde das „Nucleobond-Kit 500“ (Macherey und Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet. *B. subtilis* und *B. licheniformis* Zellen wurden in S1-Puffer resuspendiert und vor Zugabe des Lysepuffers (N2) für 30 min enzymatisch mit 5 µg/ml Lysozym aufgeschlossen.

4.5. Allgemeine gentechnische Methoden

4.5.1. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe im elektrischen Feld wurden für Fragmente bis 1,5 kB Gele von 1,5-2 % Agarose und für Fragmente über 1,5 kB Gele von 0,8 % Agarose angefertigt. Hierzu wurde die Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen (55-60 °C) auf Gelträger gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10 x Probenpuffer versetzt und die Elektrophorese in TAE-Puffer durchgeführt. Zum Anfärben der DNA wurde eine 1 % Ethidiumbromidlösung verwendet.

10 x TAE-Puffer: pro l:	48,40 g Tris-Base 11,42 ml Essigsäure (96%) 7,44 g EDTA(Na ₂ -Salz) ad H ₂ O (bidest.)
10 x Probenpuffer:	0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylencyanol 50 % Glycerin

4.5.2. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers.

4.5.3. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die DNA wurde in den vom Enzymhersteller mitgelieferten Puffern unter den angegebenen Bedingungen verdaut.

4.5.4. Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Zur Verhinderung von Religierungen der linearisierten Vektoren wurden vor der Ligation die 5'-Phosphatreste mit alkalischer Phosphatase entfernt. Hierzu wurde die alkalische Phosphatase aus Garnelen ("shrimp alkaline phosphatase", Roche, Mannheim) gemäß Anleitung des Herstellers verwendet.

4.5.5. Umwandlung von überhängenden 5'-Enden in glatte Enden

Zum Auffüllen von überhängenden 5'-Enden wurde die „Klenow“-DNA Polymerase (Roche, Mannheim) verwendet. Bis zu 300 ng DNA wurde in 1 x Puffer H (Roche, Mannheim) mit 0,2 mM dNTPs und 4 Units Klenow-Enzym aufgenommen (40 µl Endvolumen) und 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend für 15 min bei 70 °C inaktiviert und die DNA aus dem Reaktionsansatz gereinigt (s. II.4.5.6.).

4.5.6. Entsalzen von DNA-Lösungen

Zum Entsalzen von DNA, z.B. nach Restriktionsverdau oder PCR wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach der Vorschrift des „QIAquick PCR Purification Kit Protocol“ verwendet.

4.5.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurden die T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim) und der dazugehörige Ligationspuffer verwendet. Im Ligationsansatz wurde ein molares Verhältnis von Fragment zu Vektor von 3:1 bzw. von 1:1 (letzteres bei einem Größenverhältnis von kB Fragment / kB Vektor > 1) eingestellt. Der Ansatz enthielt 1/10 Volumen 10 x Ligationspuffer und die vorher in H₂O gelöste DNA. Die Ligation erfolgte ü.N. bei 16 °C mit 0,5 Einheiten T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µl.

4.6. Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Reaktion erfolgte im T3 Thermocycler (Biometra) mit dem „Advantage HF2 PCR-Kit“ der Firma Clontech (Palo Alto, USA). Der Reaktionsansatz (50 µl - 100 µl) enthielt 1/10 Volumen 10 x Puffer, 1/10 Volumen Nukleotid-Mix (dATP, dGTP, dTTP, dCTP je 1,25 mM), je 60-90 pmol der Oligonukleotide, 3 Units/100 µl der DNA-Polymerase (High-fidelity-Polymerase von Clontech) und von der zu amplifizierenden DNA 5-10 ng bei Plasmiden bzw. 300 ng bei chromosomaler DNA. Durch die Zugabe des Enzyms wurde die Reaktion gestartet. Bei der Synthese wurden 30 Zyklen durchlaufen, die jeweils mit der Denaturierung der Ziel-DNA bei 94°C für 1 min bzw. bei der ersten Denaturierung für 4 min

begannen, worauf das Anlagern der Primer bei 45-55 °C für 1 min erfolgte. Die Anlagerungstemperatur wurde so gewählt, dass sie 1 °C unter der Schmelztemperatur (T_m) der Primer lag. Die Synthese der DNA wurde bei 68 °C für 1,5 – 3,5 min (1 min pro kB des zu amplifizierenden Fragments) durchgeführt, wobei sich die Synthesezeit nach jedem Zyklus um 5 sek verlängerte. Das gewünschte PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel von Nebenprodukten getrennt und aufgereinigt (s. II. 4.5.1. und 4.5.2.).

4.7. Gezielte Mutagenese von Plasmid-DNA

Die gezielte Deletion einer Base in einem Plasmid wurde mit Hilfe des „QuickChange Site-Directed Mutagenesis“ Kits der Firma Stratagene (La Jolla, USA) vorgenommen. Dazu wurde das Plasmid mit Primern, welche die gewünschte Deletion trugen, mittels PCR-Reaktion amplifiziert. Die Ausgangs-DNA wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym *DpnI*, das nur methylierte DNA als Substrat erkennt, verdaut. Mit der amplifizierten Plasmid-DNA wurden schließlich kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Die Auswahl der Primer, die PCR-Reaktion und die anschließende Transformation des PCR-Produkts erfolgte nach Angaben des Herstellers.

4.8. Nicht radioaktive DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode

Die nicht radioaktive Sequenzierung wurde mit der Apparatur (LI-COR) der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt und die Enzyme, Puffer und Terminationsmixe aus dem “Sequenzier-Kit” der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Amersham, England) verwendet. Wie bei der klassischen radioaktiven Sequenzieretechnik nach Sanger wird auch bei dieser Methode der Abbruch der DNA-Polymerasereaktion beim Einbau von Didesoxynukleotiden genutzt. Hierzu wurden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide als Primer verwendet, die sich zum Start der Polymerasereaktion an die denaturierte Ziel-DNA anlagern. Die Synthese der DNA erfolgte in vier Ansätzen, die außer den vier Desoxynukleotiden (dNTPs) zusätzlich je eines der Didesoxynukleotide ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP enthielten. In jedem Ansatz erfolgte der Kettenabbruch an jeder möglichen Einbauposition des jeweilig zugesetzten ddNTPs. Nach Auftrennung der vier Synthese-Ansätze in nebeneinander gelegenen Spuren im Polyacrylamidgel lässt sich die Nukleotidsequenz anhand der Kettenabbrüche bestimmen.

Denaturierung der DNA und Anlagerung des Primers

Zur Sequenzierung wurde doppelsträngige, zirkuläre Plasmid-DNA eingesetzt. 5 µg Ziel-DNA in 18 µl H₂O wurde zur Denaturierung mit 6 µl 1 N NaOH und 6 µl 1 mM EDTA (Na₂-Salz) versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die denaturierte DNA wurde nach

Zugabe von 3 μl Neutralisierungslösung (3 M Ammoniumacetat pH 4,8) und 90 μl Ethanol (absolut, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min gefällt. Danach wurde der Ansatz zentrifugiert (Eppendorf, 13000 upm, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und der Niederschlag mit 90 μl Ethanol (absolut) gewaschen. Die DNA wurde dann in 19,3 μl H_2O aufgenommen und zur Sequenzreaktion eingesetzt.

Sequenzreaktion: Markierung und Termination

Die in 19,3 μl H_2O aufgenommene denaturierte DNA wurde mit 2 pmol eines fluoreszenzmarkierten Primers (MWG Biotech, Ebersberg) und 0,7 μl DMSO versetzt. Anschließend wurde das DNA/Primer-Gemisch auf vier Ansätze von je 4,5 μl aufgeteilt und dazu je 1,5 μl eines der Terminationsmixe mit dem jeweiligen ddNTP (A, C, G, T) gegeben. Die DNA-Polymerase war bereits in den Terminationsmischen enthalten. Die Sequenzierreaktion erfolgte im T3 Thermocycler (Biometra). Der Ansatz wurde vor dem ersten Sequenzierzyklus für 3 min bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert. Zunächst wurden 30 Zyklen mit dem folgenden Temperaturprofil durchlaufen. Denaturierung für 15 sek bei $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, Anlagern der Primer für 30 sek bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ und Synthese der DNA für 40 sek bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hieran schlossen sich 15 weitere Zyklen mit einer veränderten Denaturierungszeit von je 20 sek und einer veränderten Syntheszeit von je 30 sek an. Die Proben wurden anschließend mit je 3 μl Blaumarker (95 % Formamid, 20 mM EDTA (Na_2 -Salz), 0,05 % Bromphenol-Blau, 0,05 % Xylen-Cyanol) versetzt und vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel für 5 min bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Sequenzbestimmung

Die Gelelektrophorese zur Sequenzbestimmung wurde mit der Apparatur (LI-COR) der Firma MWG Biotech, Ebersberg durchgeführt. Dazu wurde ein 4,6 %, 66 cm langes und 0,25 mm dickes "Long-Ranger" Polyacrylamidgel angefertigt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte ü.N. ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 50 W, 2200 V, 37 mA) mit 1 x TBE als Laufpuffer.

Zusammensetzung des Sequenzgels:	4,6 ml Acrylamid (LongRanger)
	21 g Harnstoff,
	5 ml 10xTBE-Puffer (Long Run)
	32 ml H_2O (bidest.)
	500 μl DMSO
	350 μl 10% APS
	60 μl TEMED

10x TBE-Puffer: pro l:	108 g Tris
	55 g Borsäure
	40 ml 0,5M EDTA(Na ₂ -Salz)
	ad H ₂ O (bidest.); pH 8

4.9. DNA-DNA Hybridisierung nach Southern

Zur Hybridisierung wurde entsprechend der Vorschrift des "DNA-Labeling and Detection-Kits" (Roche, Grenzach-Wyhlen) vorgegangen, der die Methode von Southern (1975) zugrunde liegt.

4.9.1. Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde

Die Digoxigenin-markierte DNA-Sonde wurde mittels PCR-Reaktion (s. II.4.6.) hergestellt. Dazu wurde der zur DNA-DNA-Hybridisierung ausgewählte DNA-Bereich mit geeigneten Primern unter Zusatz von 20 µM Digoxigenin-markierten dUTP (DIG-11-dUTP) amplifiziert. Die Digoxigenin-Markierung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft, da das markierte PCR-Fragment im Vergleich zum nicht markierten Fragment ein langsames Laufverhalten aufweist. Die Sonde wurde schließlich über ein Agarosegel aufgereinigt (s. II.4.5.1. und 4.5.2.).

4.9.2. Hybridisierung von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA

Transfer der DNA auf Nylonmembranen

Die mit Restriktionsenzymen verdaute DNA wurde in einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt und mit einer Vakuum-Blot-Apparatur (LKB 2016 VacuGene, Pharmacia/LKB) auf Nylonmembranen übertragen. Dabei wurde das Gel abhängig von der Dicke jeweils für 20 bis 60 min mit Depurinierungslösung (0,25 N HCl), Denaturierungslösung (1,5M NaCl, 0,5 M NaOH) und Neutralisierungslösung (1M NH₄Ac) überschichtet. Die DNA wurde anschließend zur Fixierung auf der Membran mit einem Gerät der Firma Stratagene mit UV-Licht (Stratalinker: 1200 mJ) bestrahlt.

Hybridisierung der Ziel-DNA mit der Sonde

Für die im Folgenden beschriebenen Prähybridisierungs-, Hybridisierungs- und Waschschrte wurden die Membranen mit der jeweiligen Lösung in einem Glasröhrchen inkubiert. Das Glasröhrchen wurde dazu in einem Hybridisierungssofen gerollt.

Das Abdecken unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Prähybridisierung der Membranen für 4 h bei 42 °C in Prähybridisierungslösung (5 x SSC, 40 % Formamid, 0,1 % N-Laurylsarkosinat, 0,02 % SDS, 0,5 % Blocking Reagenz [Roche]). Zur Hybridisierung

wurde die Membran in Hybridisierungslösung (wie Prähybridisierungslösung mit 5 ng -10 ng DNA-Sonde pro ml) ü.N. bei 42 ° inkubiert. Die Sonde wurde vor der Zugabe in die Hybridisierungslösung für 10 min bei 95 °C denaturiert und in Eiswasser abgekühlt.

Nachweis der Sonde

Um ungebundene Sonde zu entfernen, wurden die Membranen zweimal für 10 min bei RT in 2 x SSC, 0,1 % SDS und zweimal für 25 min bei 42 °C mit 0,1 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Zur Vermeidung der unspezifischen Bindung des Antikörperkonjugates (s.u.) wurden die Membranen kurz in Puffer 1 (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5) äquilibriert und für 60 min in Blocking-Puffer (Puffer 1 mit 1 % Blocking Reagenz) im Hybridisierungsöfen bei RT gerollt. Die Lösung wurde entfernt und durch Blocking-Puffer, der Anti-Digoxigenin-Antikörper gekoppelt an alkalische Phosphatase (1:10000, Roche) enthielt, ersetzt und die Membranen für 30 min weiter inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimal 30-minütiges Waschen mit Puffer 2 (Puffer 1 mit 0,3 % Tween20) bei RT entfernt. Nach 2-minütiger Äquilibrierung in Puffer 3 (100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100mM NaCl, 50 mM MgCl₂) wurden die Membranen mit 10 µl CSPD in 1,5 ml Puffer 3 überschichtet und in einen Hybridisierungsbeutel eingeschweißt. CSPD ist ein Chemilumineszenz-Substrat für die alkalische Phosphatase. Das als Folge der CSPD-Dephosphorylierung emittierte Licht kann mit einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte jeweils für 12 min und für 1h.

5. Proteinchemische Methoden

5.1. Bestimmung der Subtilisin-Aktivitäten mittels AAPF-Test

Die Bestimmung der Subtilisin-Aktivitäten im Kulturüberstand erfolgte mit Hilfe des Peptidsubstrats suc-AAPF-para-Nitroanilid (kurz: AAPF-pNA). Das AAPF-pNA wird durch das Subtilisin in AAPF und p-Nitroanilin gespalten. Die Freisetzung des p-Nitroanilins aus dem Peptidsubstrat verursacht eine Zunahme der Extinktion bei 410 nm, die über einen Zeitraum von 5 min verfolgt wird. Anhand der Geschwindigkeit der Extinktionszunahme lässt sich die Aktivität pro ml Kulturüberstand bestimmen.

Testansatz: 10 µl 110 mM AAPF-pNA (70 mg in 1 ml DMSO gelöst)
1 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,6
10 µl Kulturüberstand

Es wurde 1 ml Tris/HCl Puffer pH 8,6 in eine 1 ml Küvette gefüllt und 10 µl AAPF-pNA Substratlösung zugegeben. Die Zugabe des Kulturüberstandes startet die Reaktion. Der Reaktionsansatz wurde unverzüglich gemischt und die Kinetik mit einem Photometer

aufgezeichnet. Die Messung erfolgte bei 410 nm und 25 °C über 5 Minuten. Alle 30 sek wurde ein Messpunkt aufgezeichnet. Als Nullwert wurde ein Testansatz mit LB-Medium anstelle von Kulturüberstand verwendet.

Die Subtilisin-Aktivität berechnet sich wie folgt:

$$C = U/ml = \frac{dE/min \times V \text{ (Küvette)} \times F \text{ (Verdünnung)}}{e_{410} \times V \text{ (KÜ)} \times d} \quad [\mu\text{mol} / \text{min} \times \text{ml}]$$

dE/ min:	Extinktionsänderung pro Minute
V (Küvette):	Gesamtvolumen der Lösung in der Küvette = 1,02 ml
F (Verdünnung):	Verdünnungsfaktor des Kulturüberstands
e ₄₁₀ :	Extinktionskoeffizient bei 410 nm = 8,48 cm ² /μmol
d:	Lichtweg durch die Küvette = 1cm
V (KÜ):	Volumen des verwendeten Kulturüberstands = 10 μl

Um in einem linearen Bereich zu messen, wurden nur Extinktionsänderungen pro Minute berücksichtigt, die zwischen 0,01 und 0,1 lagen.

5.2. Isolierung von Proteinen aus Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen

5.2.1. Induktion der Genexpression

Zellen aus 2 ml einer ÜNK wurden bei RT für 10 min bei 13.000 upm abzentrifugiert, zweimal mit 1 ml LB-Medium gewaschen und in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Mit der gewaschenen Kultur wurden 4 ml LB-Medium zu einer OD₆₀₀ von 0,4 angeimpft und 4 h unter Zusatz des erforderlichen Induktors bzw. Repressors bei 170 upm inkubiert.

Gene, die in die Klonierungsstelle (Multiple-Kloning-Site) des Plasmids pWH1520 ligiert wurden, unterliegen in *B. subtilis* der Kontrolle des XylA-Promotor/Operator-Systems und wurden durch Zugabe von 0,5 % Xylose induziert bzw. durch Zugabe von 0,5 % Glukose reprimiert. In die Klonierungsstelle des Vektors pCU3 transformierte Gene unterliegen der Kontrolle des Bakteriophagen T5 Promotors P₂₅ und des *lac*-Operators und wurden mit 1 mM IPTG induziert.

5.2.2. Herstellung von Gesamtzellextrakten von *B. subtilis*

2 ml einer Kultur wurden 10 min zentrifugiert (Eppendorf, 13000 upm, 4 °C) und der Überstand gründlich entfernt. Die Zellen wurden in 50 μl Lysispuffer (10 mM Tris/HCl, 25 mM MgCl₂, 200 mM NaCl, 5 mg/ml Lysozym) resuspendiert und in Anwesenheit des Proteaseinhibitors „Complete“ (1 x konzentriert; Roche, Grenzach) 30 min bei 37 °C

inkubiert. Das Lysat wurde anschließend mit 50 µl 2 x Laemmlipuffer (125 mM Tris/HCl pH 6,8, 4 % SDS, 20 % Glycerin, 10 % β-Mercaptoethanol, 0,04 % Bromphenolblau) versetzt und 10 min bei 95 °C denaturiert.

5.2.3. Aufarbeitung von Kulturüberständen

Die Zellen von 2 ml Kultur wurden durch 10-minütiges Zentrifugieren vom Kulturüberstand getrennt (Eppendorf, 13000 upm, 4 °C) und die Proteine aus 1,8 ml Kulturüberstand mit 200 µl TCA (100 %) ü.N. gefällt. Die Proteine wurden 30 min (Eppendorf, 13.000 upm, 4 °C) abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit Aceton (80 %) gewaschen. Danach wurde das Pellet bei 50 °C getrocknet und in einem geeigneten Volumen 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen und die Proteine bei 95 °C für 10 min denaturiert.

5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

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

Trenngel: pro 30 ml: (12,5 %)	12,5 ml Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8) 7,5 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,3 ml 10 % SDS 3,2 ml 87 % Glycerin 6,2 ml H ₂ O 0,3 ml 10 % APS 20 µl TEMED
----------------------------------	---

Sammelgel: pro 15 ml: (6 %)	2,5 ml Acrylamid:Bisacrylamid 3,75 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,15 ml 10 % SDS 8,45 ml H ₂ O 0,15 ml 10 % APS 10 µl TEMED
--------------------------------	---

Die Elektrophorese wurde bei 20 mA pro Gel für 1 h – 2 h in 1 x Laufpuffer (pro 1 10 x Laufpuffer: 30 g Tris-Base, 144 g Glycin) mit 0,1 % SDS durchgeführt.

5.4. Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Schägger *et al.*, 1987)

Die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Größe zum Nachweis von RF2-Proteinen erfolgte mit der Gel-Apparatur der Firma Renner (Dannstadt) nach der Methode von Schägger *et al.*, da mit großen Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelen im Größenbereich des RF2 (42 kDa) die beste Auftrennung erreicht wurde.

Trenngel: pro 30ml:
(8%)

8,0 ml Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)
8,4 ml H ₂ O (bidest.)
7,5 ml Tris/SDS Lösung (3 M Tris/HCl pH 8,45; 0,3 % SDS)
3,4 ml 87 % Glycerin
0,15 ml 10 % APS
15 µl TEMED

Sammelgel: pro 15ml:
(6%)

2,5 ml Acrylamid:Bisacrylamid
8,5 ml H ₂ O (bidest.)
3,75 ml Tris/SDS Lösung (3 M Tris/HCl pH 8,45; 0,3 % SDS)
0,12 ml 10 % APS
12 µl TEMED

Die Elektrophorese wurde mit zwei unterschiedlichen Puffern durchgeführt:

Anodenpuffer 10 x: 2 M Tris /HCl pH 8,9

Kathodenpuffer 10 x, pro l: 121 g Tris-Base; 179,2 g Tricin; 10 g SDS; ad H₂O (bidest.)

Die Auftrennung erfolgte ü.N. bei 24 mA pro Gel.

5.5. Coomassie-Färbung von Proteingelen

Das zu färbende Gel wurde 1 h in Coomassie-Brilliant-Blue-Lösung (pro l: 0,5 g Serva Blau R, 250 ml Isopropanol, 50 ml Eisessig) geschwenkt und der überschüssige Farbstoff mit Entfärber (30 % Ethanol, 10 % Eisessig) entfernt. Das Gel wurde anschließend in einem Gel-trocknungsrahmen (Gel Drying Frames; Diversified Biotech) nach Anleitung des Herstellers getrocknet.

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

Die zu untersuchenden Proteine wurden vor der Übertragung auf PVDF-Membranen (Immobilon-P-Transfer-Membrane, Milipore, Billerica, USA) im denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt (s. II.5.3.). Der Transfer erfolgte im Elektrobplot-Verfahren unter Verwendung der mini-Trans-BlotTM Kammer der Firma Biorad in Tris/Glycin-Puffer (1 x Laufpuffer ohne SDS, s. II.5.3.) bei 100 V für 1 h. Danach wurden die Membranen zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen in Blot-Lösung I (10 mM Tris/HCL pH 7,5, 0,9 % NaCl, 3 % RSA) für 1 h bei 37°C geschwenkt. Anschließend wurden die Membranen in Blot-Lösung II (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,9 % NaCl, 0,3 % RSA) mit den primären Antikörpern (1:1000)

gegen das Zielprotein überführt und noch einmal für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörper wurden durch zweimaliges je 30-minütiges Waschen mit Blot-Lösung II entfernt. Der Nachweis der primären Antikörper (aus Kaninchen) erfolgte durch Bindung von Peroxidase-Antikörperkonjugaten gegen Kaninchen IgG (sekundärer Antikörper). Dazu wurden die Membranen für 1 h bei 37 °C in Blot-Lösung II mit den sekundären Antikörpern (1:6000) inkubiert. Nun wurden die Membranen erneut zweimal für je 30 min gewaschen und zur Farbentwicklung in 10 ml Reaktionspuffer (100mM Tris/HCl pH 9,5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂) gebracht. Nach Zugabe von 66µl NBT (5 % NBT in 70 % DMF) und 66µl BCIP (2,5 % Bromo-Chloro-Indolylphosphat in 50% DMF) katalysiert die alkalische Phosphatase die Farbreaktion. Diese wurde 5 -10 min später durch Waschen der Membran in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,8; 1 mM EDTA (Na₂-Salz)) gestoppt (Towbin *et al.*, 1979, Hawkes *et al.*, 1982).

5.7. „Pulse-Chase“-Experiment mit *B. subtilis* (variiert nach van Dijl, 1991)

Im „Pulse-Chase“-Experiment kann die Exportkinetik von sekretorischen Proteinen anhand der Prozessierung, d.h. der Umwandlung des Proteinvorläufers in seine reife Form, untersucht werden. Hierzu wurden alle neu synthetisierten Proteine über einen kurzen Zeitraum mit radioaktivem ³⁵S-Methionin markiert (Pulse) und anschließend der weitere Einbau von radioaktivem Methionin durch Zugabe eines Überschusses von nicht radioaktiv markiertem Methionin gestoppt (Chase). So entsteht ein definierter Pool von markierten Proteinen. Nach Zugabe der Chase-Lösung wurden zu bestimmten Zeiten Proben entnommen, um den Export des markierten Protein-Pools anhand der Prozessierung zu verfolgen. Die zu untersuchenden Proteine wurden nach Zellaufschluss mittels Immunfällung isoliert und im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Da das Signalpeptid nach erfolgter Translokation vom Vorläuferprotein abgespalten wird, lässt sich nach Auftrennung im Gel der Vorläufer vom reifen Protein anhand der Größe unterscheiden. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Autoradiographie.

Markierung von *B. subtilis* NIG1152

Mit der temperatursensitiven *B. subtilis* *secA*-Mutante NIG1152 bei der für diesen Stamm nicht permissiven Temperatur von 42 °C wurde der Export des heterologen OmpA-Proteins ohne oder unter zusätzlicher Expression eines *secA*-Gens, ausgehend von einem Derivat des Plasmids pWH1520 (pWMKL1, pWMH1, pWMH2), untersucht. Dazu wurde je eine ÜNK von NIG1152 mit den Plasmiden pCU3OmpAkan und einem der pWH1520-Derivate in S7-Medium (mit Kanamycin, Tetracyclin und 50 µg/ml Methionin) angezogen und ausgehend von dieser je 6 ml frisches S7-Medium zu einer OD₆₀₀ von 0,3 beimpft. Die Kultur wurde bei 30 °C und 170 upm in einem 100 ml EMK mit Schikanen geschüttelt. Die Induktion der

secA-Gene erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,2 mit 0,5 % Xylose. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,9-1,0 wurde der Kultur ein so großes Zellvolumen entnommen, dass nach zweimaligem Waschen der Zellen in je 5 ml S7 Medium (ohne Methionin, ohne Antibiotika) und anschließendem Resuspendieren in 2 ml S7-Medium (ohne Methionin, ohne Antibiotika) eine OD₆₀₀ von 1,0 erhalten wurde. Die gewaschenen und resuspendierten Zellen wurden 90 min bei der nicht permissiven Temperatur von 42 °C inkubiert und anschließend sofort markiert. Die Synthese des OmpA-Proteins wurde 10 min vor der Markierung mit 1 mM IPTG induziert. Zur Markierung wurden zu den Zellen 200 µCi ³⁵S-Methionin gegeben und die Markierungsreaktion nach 1 min durch Zugabe von 100 µl Chase-Lösung (45 mg/ml Methionin, 2,5 mg/ml Puromycin) gestoppt. 1 min, 2 min und 3 min nach dem Chase wurden je 600 µl Proben entnommen und diese sofort mit 150 µl eiskalter TCA (40 %) gemischt (Vortex). Die Fällung erfolgt ü.N. bei 4 °C.

Immunfällung

Die Proben wurden 20 min bei RT und 13000 upm (Eppendorf) abzentrifugiert, das Pellet dreimal mit eiskaltem Aceton (80 %) gewaschen und 5 -10 min bei 50 °C getrocknet. Für den Zellaufschluss wurde das Pellet in 100 µl Lysispuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 25 mM MgCl₂, 200 mM NaCl, 5 mg/ml Lysozym) resuspendiert und 45-60 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl SDS (10 %) erfolgte der Zellaufschluss für 10 min bei 95 °C. Anschließend wurde dem Ansatz 1 ml IP-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,92 % Triton-X-100, 5 mM EDTA) zugefügt und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation für 20 min bei RT und 13000 upm (Eppendorf) abgetrennt. 1 ml des Überstandes wurden zur Immunfällung in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 10 µl des OmpA-spezifischen Antikörpers dazugegeben. Die Bindung des OmpA-Proteins erfolgte unter leichtem Schwenken für 1 h bei 30 °C. Zur Fällung des OmpA-Protein/Antikörper-Komplexes wurden 100 µl Pansorbinzellen (10 %, fixierte *Staphylococcus aureus* Zellen mit exponiertem Protein A; Calbiochem, San Diego, USA) zugefügt und der Ansatz für eine weitere Stunde bei 30 °C leicht geschwenkt. Die Pansorbinzellen wurden anschließend für 1 min bei 13000 upm abzentrifugiert, nacheinander in je 1 ml Waschlösung I (50 mM Tris/HCl pH 8, 1 M NaCl, 1 % Triton-X-100), Waschlösung II (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 M LiCl, 0,1 % SDS) und Waschlösung III (50 mM Tris/HCl pH 7,5) gewaschen. Das Pellet wurde schließlich in 50 µl Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und die Proben 10 min bei 95 °C denaturiert. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden 5 µl der Probe in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold XR, Packard Bioscience / PerkinElmer, Boston) in einem Kunststoff-Szintillationsgefäß verdünnt und in einem Szintillationszähler vermessen. Die Probenvolumina wurden auf einen Wert zwischen 10000 und 15000 cpm normiert und in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Gelaufarbeitung und Nachweis der markierten Proteine

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine 30 min mit 45 % Isopropanol und 10 % Essigsäure im Gel fixiert und anschließend weitere 30 min mit EN³HANCE (NENTMLife Science Products / PerkinElmer, Boston) unter leichtem Schwenken imprägniert. Das Gel wurde dreimal 15 min mit Wasser gewaschen und dann in einer Vakuum-Trocknungsapparatur auf Filterpapier für 1,5 h bei 80 °C getrocknet. Der Nachweis der Proteine erfolgte entweder durch Exposition eines Röntgenfilms für mehrere Tage bei -70 °C oder mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fuji BAS 1800 Bio Image Analyser). Zum Nachweis der Proteine mit dem Phosphoimager wurde für einige Stunden oder ü.N. ein Screen (Fuji BAS-MP Imaging Plate) exponiert, der anschließend mit dem Gerät „Fuji BAS 1800 Bio Image Analyser“ ausgelesen wurde.

III. Ergebnisse

1. Untersuchungen zur Ursache der hohen Sekretionsleistung des industrierelevanten Stammes *B. licheniformis* „E“

B. licheniformis wird von der Waschmittelindustrie unter anderem zur Gewinnung von Proteasen vom Subtilisin-Typ eingesetzt. Die zur Produktion eingesetzten Stämme werden zumeist über wiederholte Zyklen von ungerichteter Mutagenese und anschließendem Screening auf hohe Sekretionsleistung erhalten, weshalb die Ursachen für die guten Sekretionseigenschaften oft unbekannt sind. Um die Produktivität bei anderen Stämmen gezielt steigern zu können, wäre es nützlich, Mutationen zu identifizieren, die zu den hohen Sekretionsleistungen der Industriestämme beitragen. Anzunehmen ist, dass diese Mutationen entweder die Proteinbiosynthese oder die anschließende Sekretion der Enzyme in den Kulturüberstand verbessern. Ein potentieller Genort für solche Mutationen ist der *secA*-Genlocus von *B. licheniformis*, der sowohl ein Gen der Proteinsekretion (*secA*) als auch eines der Proteinbiosynthese (*prfB*) enthält (s. I.3.). Der *secA*-Genlocus des industrierelevanten Stammes *B. licheniformis* „E“ wurde daher mit dem des Wt-Stammes *B. licheniformis* DSM13 verglichen. Die identifizierten Mutationen wurden anschließend daraufhin untersucht, ob sie für die guten Sekretionseigenschaften des *B. licheniformis* „E“ mitverantwortlich sein könnten.

B. licheniformis „E“ ist auf hohe Sekretionsleistung optimiert

Um zunächst einen Eindruck über die Höhe der mit *B. licheniformis* „E“ erzielten Subtilisin-Ausbeute zu gewinnen, wurde die Ausbeute an Subtilisin zwischen dem industrierelevanten Stamm *B. licheniformis* „E“, dem Wt-Stamm *B. licheniformis* DSM13 und dem Stamm *B. subtilis* DB104 verglichen. *B. subtilis* DB104 wurde neben dem Wt-Stamm *B. licheniformis* DSM13 für diesen Vergleich ausgewählt, da *B. subtilis* DB104 als ein typischer „Laborstamm“ zur Klonierung und Expression der verschiedensten Gene im Labor Verwendung findet und daher im völligen Gegensatz zu dem auf Sekretion hoher Subtilisin-Mengen optimierten *B. licheniformis* „E“ steht. Bei *B. subtilis* DB104 sind Teile der Strukturgene, die für die extrazelluläre Metalloprotease Bacillolysin (*nprE*) und für die extrazelluläre Serinprotease Subtilisin E (*aprE*) kodieren, deletiert, weshalb dieser Stamm nur sehr geringe Mengen Protease in den Kulturüberstand sekretiert.

Zur industriellen Subtilisin-Gewinnung wird das Subtilisin-Gen zumeist von einem Plasmid hoher Kopienzahl exprimiert. Daher wurde der Vergleich der Subtilisin-Ausbeuten zwischen den drei Stämmen auch unter zusätzlicher Expression des Subtilisin-Gens (*sub*) von *Bacillus lentus* ausgehend von dem „high-copy“ Plasmid pSub durchgeführt.

Die drei Stämme wurden jeweils mit und ohne das Plasmid pSub über drei Tage in gepuffertem LB-Medium in der pH-Schüttelkolben-Anlage der Firma DASGIP bei pH 7,2, wie im Kapitel II.4.1.2. beschrieben, kultiviert. Die Kultivierung der Stämme mit Plasmid erfolgte unter Zugabe von Tetracyclin. Da die maximale Subtilisin-Menge im Überstand erfahrungsgemäß zwischen 48 h und 72 h Kultivierungszeit erreicht wird, wurden zu diesen Zeitpunkten Proben entnommen und nach Zentrifugation die Subtilisin-Aktivitäten der Überstände mittels AAPF-Test (s. II.5.1.) bestimmt. Die maximale Subtilisin-Aktivität im Kulturüberstand wurde bei den Stämmen ohne plasmidkodiertes Subtilisin bereits nach 48-stündiger Kultivierung, bei den Stämmen mit zusätzlicher Expression des plasmidkodierten Subtilisins erst nach 72-stündiger Kultivierung erreicht. In Abb. 8 ist die jeweils ermittelte maximale Subtilisin-Aktivität pro ml Kulturüberstand dargestellt.

Beim Vergleich der maximalen Subtilisin-Aktivitäten der drei Stämme wird deutlich, dass *B. licheniformis* „E“ im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen mit und ohne zusätzlich plasmidkodiertes Subtilisin eine wesentlich höhere Subtilisin-Aktivität pro ml Kulturüberstand besitzt. Die chromosomal kodierten Proteasen des *B. licheniformis* „E“ sorgen bereits für eine sehr hohe Grundaktivität von 83,8 U/ml Kulturüberstand. *B. subtilis* DB104 und *B. licheniformis* DSM13 zeigen dagegen ohne zusätzliche Expression des plasmidkodierten Subtilisins eine sehr geringe Aktivität von nur 0,1 U/ml bzw. 3,1 U/ml Kulturüberstand. Durch Expression des Subtilisin-Gens von *B. lentus*, ausgehend von dem Plasmid pSub, wird bei *B. licheniformis* DSM13 (Wt) und *B. subtilis* DB104 die Aktivität pro ml Kulturüberstand deutlich erhöht. Die zusätzliche Expression des Subtilisin-Gens führt bei *B. subtilis* DB104 zu einer 305-fachen (30,5 U/ml) und bei *B. licheniformis* DSM13 zu einer 7,5-fachen (23,3 U/ml) Steigerung der Aktivität. Bei *B. licheniformis* „E“ lässt sich dagegen nur eine vergleichbar geringe Steigerung um den Faktor 1,1 zu einer Aktivität von 94,1 U/ml feststellen. Beim Vergleich der Subtilisin-Ausbeuten mit und ohne zusätzliche Expression des Subtilisin-Gens, ausgehend vom Plasmid pSub muss berücksichtigt werden, dass die Stämme mit dem Plasmid hier unter Zusatz von Tetracyclin im Medium kultiviert wurden. Tetracyclin greift in die Proteinbiosynthese ein und bewirkt so möglicherweise auch eine Verringerung der in den Zellen synthetisierten Subtilisin-Menge. Da der Stamm *B. licheniformis* „E“ für die Subtilisin-Produktion optimiert wurde, haben geringe Störungen der Proteinbiosynthese oder Proteinsekretion wahrscheinlich eine sehr viel höhere Auswirkung auf die Ausbeute als beim Wt-Stamm *B. licheniformis* DSM13 oder bei *B. subtilis* DB104. Dies würde erklären, warum trotz zusätzlicher Expression des auf dem Plasmid lokalisierten Subtilisin-Gens in tetracyclinhaltigem Medium mit *B. licheniformis* „E“ insgesamt nur eine geringfügige Aktivitätszunahme beobachtet wurde. Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, dass *B. licheniformis* „E“ mit dem Plasmid pSub aber ohne Tetracyclin im Medium mit 155 U/ml Kulturüberstand eine deutlich höhere Subtilisin-Aktivität aufweist (s. Abb. 8 und III.2.2.3.) als mit Antibiotikum. Trotz Tetracyclin im Medium und unter Expression des Subtilisins von

B. lentus sekretiert *B. licheniformis* „E“ im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen dreibis viermal mehr Subtilisin in den Kulturüberstand.

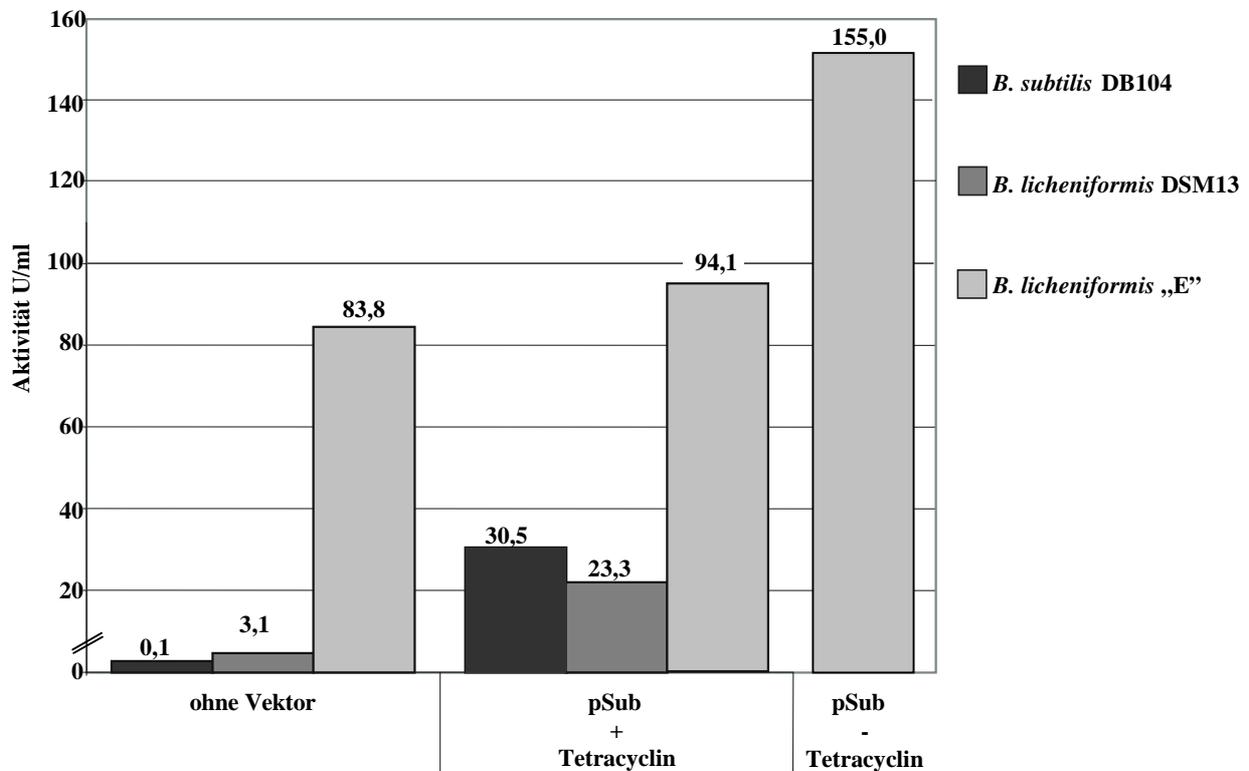


Abb. 8: Vergleich der maximalen Subtilisin-Aktivitäten der Stämme *B. subtilis* DB104, *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* „E“. Links: Kultivierung der Stämme ohne Plasmid; Mitte: zusätzliche Expression des Subtilisin-Gens von *B. lentus*, ausgehend vom Plasmid pSub mit Tetracyclin im Medium; Rechts: Kultivierung von *B. licheniformis* „E“ unter Expression des Subtilisin-Gens von *B. lentus*, ausgehend vom Plasmid pSub aber ohne Tetracyclin im Medium

Der Vergleich der Subtilisin-Ausbeute des industrierelevanten Stammes *B. licheniformis* „E“ mit der des *B. licheniformis* Wt-Stammes und der des Laborstammes *B. subtilis* DB104 macht deutlich, dass *B. licheniformis* „E“ tatsächlich auf eine hohe Sekretionsleistung optimiert wurde. Die Ursache für diese gute Sekretionseigenschaft ist unbekannt, doch lässt sich vermuten, dass *B. licheniformis* „E“ aufgrund von Mutationen in Genen der Proteinbiosynthese oder in Genen des Translokationsapparates mehr Subtilisin in den Überstand sekretieren kann.

1.1. Der *secA*-Genlocus als potentieller Genort für Mutationen, die zur guten Sekretionsleistung von *B. licheniformis* „E“ führen

Der *secA*-Genlocus von *B. licheniformis* besteht aus dem *secA*-Gen, das für die zentrale energieliefernde Komponente der Proteinsekretion kodiert und dem stromabwärts liegenden *prfB*-Gen, das für den bei der Termination der Proteinbiosynthese wichtigen „Release“-Faktor 2 (RF2) kodiert. Da anzunehmen ist, dass die hohe Sekretionsleistung von *B. licheniformis* „E“ durch Mutationen in Genen der Proteinbiosynthese oder in solchen der Proteinsekretion verursacht wird, wurde der *secA*-Genlocus von *B. licheniformis* „E“ kloniert und sequenziert und die Sequenz mit der bereits bekannten Sequenz des 3732 Bp großen *secA*-Genlocus vom Wt-Stamm *B. licheniformis* DSM13 verglichen (Hintz, 1999).

Klonierung und Sequenzierung des *secA*- und *prfB*-Gens von *B. licheniformis* „E“

Zur Sequenzierung des *secA*-Genlocus von *B. licheniformis* „E“ wurde zunächst die chromosomale DNA dieses Stammes präpariert. Zur besseren Handhabung (zur Amplifizierung, Klonierung und Sequenzierung des *secA*-Genlocus) wurde der Genlocus in zwei Teilbereiche unterteilt, in das *secA*-Gen mit zugehörigem Promotorbereich sowie das *prfB*-Gen mit nachfolgendem Terminator. Beide Sequenzabschnitte wurden ausgehend von chromosomaler DNA mittels PCR-Technik amplifiziert. Die für die PCR verwendeten Primer wurden anhand des bekannten *B. licheniformis* DSM13 *secA*-Genlocus ausgewählt und waren zur Vereinfachung der Klonierung mit je einer *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle versehen (*secA*-Primer: Primer Nr.1 und 2; *prfB*-Primer: Primer Nr. 4 und 5, s. Tab. 3, S. 26). Zur Klonierung des *secA*-tragenden Sequenzabschnittes wurde ein „low-copy“-Vektor verwendet, da eine frühere Klonierung des *secA*-Gens von *B. licheniformis* DSM13 mit dem „high-copy“-Vektor pUC18 nicht zum Erfolg geführt hatte (Hintz, 1999). Der von der chromosomalen DNA des *B. licheniformis* „E“ amplifizierte *secA*-tragende Sequenzabschnitt wurde daher in den „low-copy“-Vektor pHSG575 und der amplifizierte *prfB*-tragende Sequenzabschnitt in den „high-copy“-Vektor pUC18 kloniert. Dazu wurden Vektor und Fragment jeweils mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI verdaut und nach Ligation in *E. coli* JM109 transformiert. Die fertigen Vektoren wurden als pHSG*secAE* bzw. pUC*prfBE* bezeichnet. Beide Gene wurden sequenziert, mit dem entsprechenden Wt-Gen verglichen und die identifizierten Mutationen daraufhin untersucht, ob sie einen Einfluss auf die Sekretionsleistung des *B. licheniformis* „E“ haben könnten.

1.2. Das *secA*-Strukturgen von *B. licheniformis* „E“ unterscheidet sich in einem Basenpaar vom *secA*-Gen des Wildtypstammes DSM13

Falls Mutationen im *secA*-Gen für die gute Sekretionsleistung des *B. licheniformis* „E“ verantwortlich sind, könnte diese Verbesserung entweder durch veränderte Aminosäuren und daraus resultierende Strukturveränderungen des SecA-Proteins oder durch eine in der Zelle veränderte Menge an SecA-Protein entstehen. Für *B. subtilis* wurde gezeigt, dass die SecA-Menge einen Engpass für die Sekretion bestimmter Enzyme, insbesondere für solche mit geringer Affinität zu SecA, darstellen kann. So lässt sich bei gleichzeitiger Überexpression von *secA* die Ausbeute an sekretierter Levansucrase bei *B. subtilis* um 40 % steigern (Leloup *et al.*, 1999). Die Erhöhung der SecA-Menge in der Zelle könnte z. B. aus Mutationen im *secA*-Promotorbereich resultieren, die zu einer erhöhten Transkription des *secA*-Gens führen (Promotor „up“ Mutationen). Da das *secA*-Gen mit dem *prfB*-Gen in einem Operon lokalisiert ist, wird ein zusammenhängendes mRNA-Transkript beider Gene synthetisiert. Auch Mutationen, die die *secA-prfB*-mRNA-Stabilität verbessern und so zu einer erhöhten Translation des *secA*-Gens führen, könnten eine Erhöhung der SecA-Menge in der Zelle bewirken.

Der Sequenzvergleich ergab, dass die Sequenzen der *secA*-Promotorbereiche von *B. licheniformis* DSM13 (Wt) und *B. licheniformis* „E“ identisch sind. Die verbesserte Sekretionsleistung des *B. licheniformis* „E“ beruht somit nicht auf einer verstärkten *secA*-Transkription und einer dadurch bedingten Erhöhung der SecA-Menge in der Zelle. Im *secA*-Strukturgen befindet sich dagegen ein verändertes Basenpaar an Position 1104, was aber keine Veränderung der Aminosäuresequenz bewirkt (GCT -> GCC, Alanin, s. Abb. 9). Die SecA-Proteine von *B. licheniformis* Wt- und „E“-Stamm sind also identisch, doch könnte die stille Mutation an Bp Position 1104 Einfluss auf die mRNA-Stabilität und somit auf die SecA-Menge in der Zelle haben. Um dies zu untersuchen, wurde ein Vergleich der SecA-Proteinmengen zwischen *B. licheniformis* DSM13 (Wt) und *B. licheniformis* „E“ durchgeführt, der im nächsten Abschnitt (s. III.1.3.) beschrieben ist.

Abb. 9: Sequenzvergleich der *secA*-Promotorbereiche und eines Teils der *secA*-Strukturgene von *B. licheniformis* „E“ und Wt-Stamm DSM13. Der ausgewählte 1447 Bp große 5'-Bereich der *secA*-Strukturgene enthält die stille Mutation an Bp Position 1104. Die entsprechende Base ist grau hinterlegt und das gesamte Codon eingerahmt. Der potentielle σ^A -abhängige Promotor (P) mit der -10 und -35 Region (→) und die Ribosomenbindestelle (RBS) sind eingezeichnet. Oberhalb der DNA-Sequenz ist die entsprechende Aminosäuresequenz angegeben. Die Walker-Motive A und B der ersten Nukleotidbindestelle (NBS-I) des SecA-Proteins sind grau hinterlegt. Außerdem sind die postulierten Bindedomänen des SecA-Proteins für das Signalpeptid (SPBD, Signalpeptidbindestelle) und für den reifen Teil des Vorläuferproteins (PPBD Präproteinbindestelle) eingezeichnet.

	PSPB	
<i>secAWt</i>	I S G Q A A K S T K L Y V Q A N A F V R	
<i>secAE</i>	TTTCTGGACAAGCGGCCAAATCCACCAAGCTTTATGTTTCAGGCCAATGCGTTTGTCCGCA	727
	PPBS	
<i>secAWt</i>	T L K A D Q D Y T Y D V K T K G V Q L T	
<i>secAE</i>	CGCTAAAAGCGGATCAGGACTACACATACGATGTGAAAAAAAAGGCGTTCAGCTGACTG	787
	PPBS	
<i>secAWt</i>	E E G M T K A E K A F G I E N L F D V R	
<i>secAE</i>	AAGAGGGGATGACAAAAGCTGAAAAGGCATTTGGCATCGAAAACCTTGTTCGACGTCCGCC	847
	PPBS	
<i>secAWt</i>	H V A L N H H I A Q A L K A H A A M H K	
<i>secAE</i>	ATGTCGCCTTAAACCATCATATTGCCAGGCGCTGAAAGCCCATGCGGCGATGCATAAAG	907
	PPBS	
<i>secAWt</i>	D V D Y V V E D G Q V V I V D S F T G R	
<i>secAE</i>	ACGTCGACTACGTCGTCGAAGACGGTCAGGTCGTTATCGTCGACTCTTTTACAGGCCGTT	967
	PPBS	
<i>secAWt</i>	L M K G R R Y S D G L H Q A I E A K E G	
<i>secAE</i>	TGATGAAAGGCCGCCGCTACAGCGACGGACTTCACCAGGCCATTGAAGCGAAGGAAGGCC	1027
	PPBS	
<i>secAWt</i>	L E I Q N E S M T L A T I T F Q N Y F R	
<i>secAE</i>	TTGAGATCCAAAATGAGAGCATGACGCTCGCGACGATCACCTTCAGAACTATTTCCGAA	1087
	PPBS	
<i>secAWt</i>	M Y E K L A G M T G T A K T E E E E F R	
<i>secAE</i>	TGTATGAAAAATTGGCTGGGAATGACGGGTACCGCAAAAACGGAAGAAGAATTCCGCA	1147
	PPBS	
<i>secAWt</i>	N I Y N M Q V V T I P T N K P I A R D D	
<i>secAE</i>	ACATCTACAACATGCAGGTTGTTACGATTCCGACCAACAAGCCGATTGCCCGCGATGACC	1207
	PPBS	
<i>secAWt</i>	R P D L I Y R T M E G K F K A V A E D V	
<i>secAE</i>	GACCGGATTTAATTTACCGGACCATGGAAGGAAAATTTAAAGCTGTTGCAGAGGATGTCG	1267
	PPBS	
<i>secAWt</i>	A Q R Y M V G Q P V L V G T V A V E T S	
<i>secAE</i>	CCCAGCGCTATATGGTCGGACAGCCGGTACTTGTTCGGTACGGTTGCGGTTGAAACATCTG	1327
	PPBS	
<i>secAWt</i>	E L I S R L L K N K G I P H Q V L N A K	
<i>secAE</i>	AATTGATATCAAGGCTCCTTAAAAATAAAGGAATCCCGCATCAAGTGTGAACGCGAAAA	1387
	PPBS	
<i>secAWt</i>	N H E R E A Q I I E D A G Q K G A V T I	
<i>secAE</i>	ACCATGAGCGGGAAGCTCAGATTATCGAAGATGCCGGGCAAAAAGGCGCGGTACCATCG	1447

1.3. Die SecA-Menge in *B. licheniformis* „E“ ist im Vergleich zum Wildtypstamm *B. licheniformis* DSM13 während der stationären Wachstumsphase deutlich erhöht

Die Expression des *secA*-Gens ist in *B. subtilis* zeitlich reguliert und erreicht ihr Maximum mit dem Einsetzen der Proteinsekretion exakt beim Übergang des exponentiellen Wachstums in die stationäre Phase (Herbort *et al.*, 1999). Dieser Zeitpunkt wird mit t_0 bezeichnet. Mit dem Einsetzen der stationären Wachstumsphase fällt die Transkription des *secA-prfB*-Operons auf ein niedriges, basales Niveau ab. Die bereits exprimierten SecA-Proteine bleiben zwar über viele Stunden stabil, doch kommt es im Verlauf der stationären Wachstumsphase in Folge des normalen Proteinumsatzes trotzdem zur kontinuierlichen Abnahme der SecA-Konzentration. Aufgrund der nahen Verwandtschaft zu *B. subtilis* ist bei *B. licheniformis* von einer ähnlichen zeitlichen Regulation der *secA*-Expression auszugehen. Um zu überprüfen, ob die stille Mutation im *secA*-Genlocus einen Einfluss auf die SecA-Proteinmenge in den Zellen haben könnte, wurden die SecA-Mengen von *B. licheniformis* „E“ und Wt-Stamm zum Zeitpunkt der maximalen *secA*-Expression (t_0) und zusätzlich eine (t_1), zwei (t_2) und drei Stunden später (t_3) miteinander verglichen. Dazu wurden ausgehend von einer ÜNK des jeweiligen Stammes je 20 ml LB-Medium beimpft, die Kulturen bei 37 °C und 160 upm inkubiert und zu den entsprechenden Zeiten Proben entnommen. Aus den Zellfraktionen wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und diese im denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Entsprechend der OD₆₀₀ der Kulturen zum jeweiligen Zeitpunkt wurden Proteinmengen gleicher Zellzahlen aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend mittels Western-Blot-Technik auf einer Membran fixiert und die SecA-Proteine mit Antikörpern gegen das *B. subtilis* SecA-Protein nachgewiesen (Abb. 10). Der Nachweis des *B. licheniformis* SecA-Proteins mit Antikörpern gegen das *B. subtilis* SecA-Protein ist aufgrund der hohen Homologie von 91 % beider Proteine möglich (Hintz, 1999).

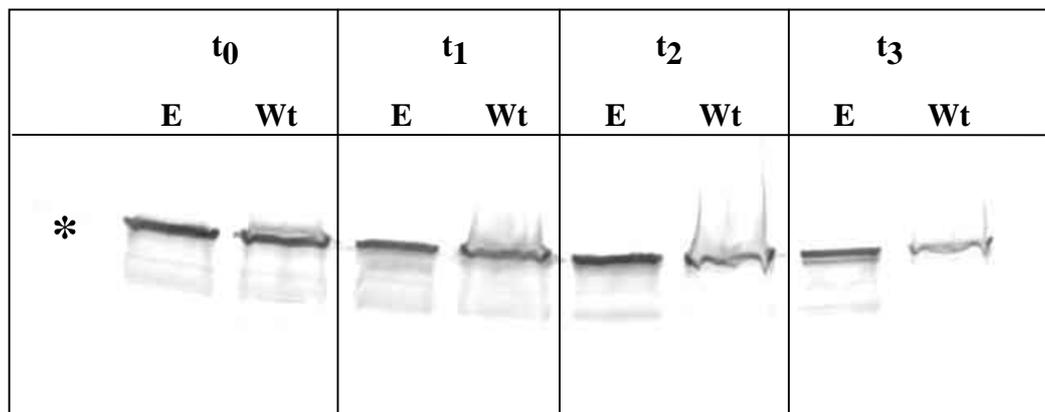


Abb. 10: Vergleich der SecA-Mengen zwischen *B. licheniformis* DSM13 (Wt) und *B. licheniformis* „E“ (E) zu den Zeitpunkten t_0 , t_1 , t_2 und t_3 im Western-Blot-Experiment. Entsprechend der OD₆₀₀ der Ausgangskulturen wurden Proteinmengen gleicher Zellzahlen aufgetrennt. Die Bandenhöhe der SecA-Proteine (95 kDa) ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Das chromosomal kodierte SecA-Protein ist in beiden Stämmen zu allen Zeitpunkten deutlich in dem erwarteten Bereich von ca. 95 kDa zu erkennen. Zum Zeitpunkt t_0 ist das SecA-Protein in beiden Stämmen in einer vergleichbaren Menge vorhanden. Über den gesamten Zeitraum nimmt die SecA-Menge vom Wt-Stamm jedoch deutlich stärker ab als die des „E“-Stammes. Zum Zeitpunkt t_3 besitzen die Zellen des *B. licheniformis* „E“ noch ca. viermal mehr SecA als die des Wt-Stammes. Dieser Befund deutet darauf hin, dass *B. licheniformis* „E“ im Vergleich zum Wt-Stamm tatsächlich ein stabileres *secA-prfB*-mRNA-Transkript besitzt, was demzufolge auch über einen längeren Zeitraum translatiert werden kann. So lässt sich erklären, dass insbesondere nach Absinken der maximalen Transkription des *secA-prfB*-Operons nach dem Zeitpunkt t_0 auf ein basales Niveau, Zellen von *B. licheniformis* „E“ eine deutlich höhere SecA-Menge aufweisen als Zellen vom Wt-Stamm *B. licheniformis* DSM13.

1.4. Funktionelle Charakterisierung des *B. licheniformis* „E“ SecA-Proteins in einer *B. subtilis secA*-Mutante

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss einer erhöhten SecA-Konzentration auf den Proteinexport untersucht. Die Untersuchungen mit dem *B. licheniformis* SecA-Protein wurden dazu nicht in *B. licheniformis* selbst, sondern in dem genetisch besser zugänglichen *B. subtilis* DB104 durchgeführt. Dazu musste zunächst sichergestellt werden, dass das SecA-Protein von *B. licheniformis* auch in *B. subtilis* funktionell ist. Da sich zwar die *secA*-Gene von *B. licheniformis* DSM13 und „E“, nicht aber die SecA-Proteine unterscheiden und eine aufgrund der stillen Mutation veränderte mRNA-Stabilität unter Überexpressionsbedingungen keinen großen Einfluss auf die SecA-Menge in der Zelle haben sollte, wurde während dieser und der folgenden Untersuchungen jeweils nur das *secA*-Gen von *B. licheniformis* „E“ überexprimiert.

Um die Funktionalität des SecA-Proteins von *B. licheniformis* in *B. subtilis* zu überprüfen, wurde untersucht, ob dessen Expression den Exportdefekt der *B. subtilis secA*-Mutante NIG1152 komplementieren kann. Die temperatursensitive *B. subtilis secA*-Mutante NIG1152 zeigt einen Wachstums- und Exportdefekt bei 42 °C. Der Defekt dieser Mutante beruht auf einem Basenpaaraustausch im *secA*-Gen, der im SecA-Protein einen Aminosäureaustausch an Position 431 von Prolin nach Leucin zur Folge hat (Takamatsu *et al.*, 1992). Der Austausch der Aminosäure hat Auswirkungen auf die Konformation des SecA-Proteins, welches bei der nicht permissiven Temperatur von 42 °C instabil ist und schnell abgebaut wird (Takamatsu *et al.*, 1994). In früheren Experimenten wurde gezeigt, dass der Wachstumsdefekt von *B. subtilis* NIG1152 bei der nicht permissiven Temperatur durch die Expression des *secA*-Gens von *B. subtilis* DB104 oder von *B. licheniformis* DSM13 (Hintz, 1999) oder von *B. licheniformis* „E“ komplementiert werden kann. Zum Nachweis, dass die Komplementation des

Wachstumsdefekts auf einer Wiederherstellung des Proteinexports beruht, sollte gezeigt werden, dass die Expression des *secA*-Gens von *B. licheniformis* „E“ den Exportblock der *B. subtilis* *secA*-Mutante NIG1152 bei der nicht permissiven Temperatur von 42 °C aufheben kann. Der Proteinexport wurde dazu anhand der Prozessierung (Umwandlung von Proteinvorläufer in reife Form) des Außenmembranproteins OmpA von *E. coli* im „Pulse-Chase“-Experiment verfolgt.

1.4.1. Subklonierung des *secA*-Gens aus *Bacillus licheniformis* „E“ in einen Expressionsvektor für *Bacillus*

Zur Expression in *B. subtilis* NIG1152 wurde das *secA*-Gen von *B. licheniformis* „E“ in den Expressions-Shuttlevektor pWH1520 kloniert. Dieser Vektor repliziert in *E. coli* und *B. subtilis* in hoher Kopienzahl und ermöglicht eine kontrollierte Expression des Gens in *B. subtilis*. Die Expression des *secA*-Gens im resultierenden Plasmid pWMH2 (pWH1520::*secA*_{B.l.„E“}) unterliegt der Kontrolle des Xylose-induzierbaren XylA-Promotors und des zugehörigen Repressors XylR (Ryguis & Hillen, 1991). Während Xylose die Induktion der Expression bewirkt, hat Glukose eine reprimierende Wirkung.

Die Subklonierung des *secA*-Gens von *B. licheniformis* „E“ vom Plasmid pHSG*secAE* wurde mittels PCR-Technik durchgeführt und erfolgte analog zu der bereits beschriebenen Klonierung des *B. licheniformis* DSM13 *secA*-Gens in pWH1520 (Hintz, 1999). Dazu wurden dieselben Primer verwendet, die eine Amplifizierung des *secA*-Gens mit der zugehörigen Ribosomenbindestelle erlauben (Primer Nr. 3: Position -31 bis -2 vor dem *secA* Translationsstart; Primer Nr. 2: Position +9 bis +36 hinter dem Stop-Codon, s. Tab.3.) Um das amplifizierte Gen anschließend gerichtet in den Expressionsvektor pWH1520 ligieren zu können, enthielten die Primer jeweils am 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle (*Sma*I bzw. *Bam*HI). Das amplifizierte Fragment wurde aus dem PCR-Ansatz aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen *Sma*I und *Bam*HI verdaut und in den ebenso gespaltenen Vektor ligiert. Die anschließende Klonierung erfolgte in *E. coli* JM109. Das erhaltene Plasmid pWMH2 wurde nach Überprüfung der *secA*-Gensequenz schließlich zur Transformation von *B. subtilis* NIG1152 eingesetzt.

1.4.2. Das SecA-Protein von *B. licheniformis* kann den Exportdefekt der temperatursensitiven *B. subtilis* Mutante NIG1152 komplementieren

Anhand der Prozessierung des OmpA-Proteins von *E. coli* konnte nun untersucht werden, ob die Expression des *secA*-Gens von *B. licheniformis* oder von *B. subtilis* DB104 den Exportblock der *B. subtilis* *secA*-Mutante NIG1152 bei der nicht permissiven Temperatur von 42 °C wieder aufheben kann. Dazu wurde *B. subtilis* NIG1152 zunächst mit einem der *secA*-Expressionsvektoren pWMH2 (pWH1520::*secA*_{B.l.}„E“) oder pWMKL1 (pWH1520::*secA*_{B.s.}) bzw. als Kontrolle mit dem entsprechenden Leervektor pWH1520 transformiert. In einer zweiten Transformation wurde dann der OmpA-Expressionsvektor pCU3OmpA_{kan} in den jeweiligen Stamm eingebracht. Die Transformationen erfolgten bei der permissiven Temperatur von 30 °C. Mit den erhaltenen Stämmen wurde ein „Pulse-Chase“-Experiment, wie im Kapitel II.5.7. beschrieben, durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst bei der permissiven Temperatur von 30 °C angezogen und 90 min vor der radioaktiven Markierung bei der nicht permissiven Temperatur von 42 °C weiter inkubiert. Die Induktion der *secA*-Gene erfolgte beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,2 mit 0,5 % Xylose. Die Synthese des OmpA-Proteins wurde 10 min vor der Markierung mit 1 mM IPTG induziert. Das Ergebnis des „Pulse-Chase“-Experiments ist in Abb. 11 dargestellt.

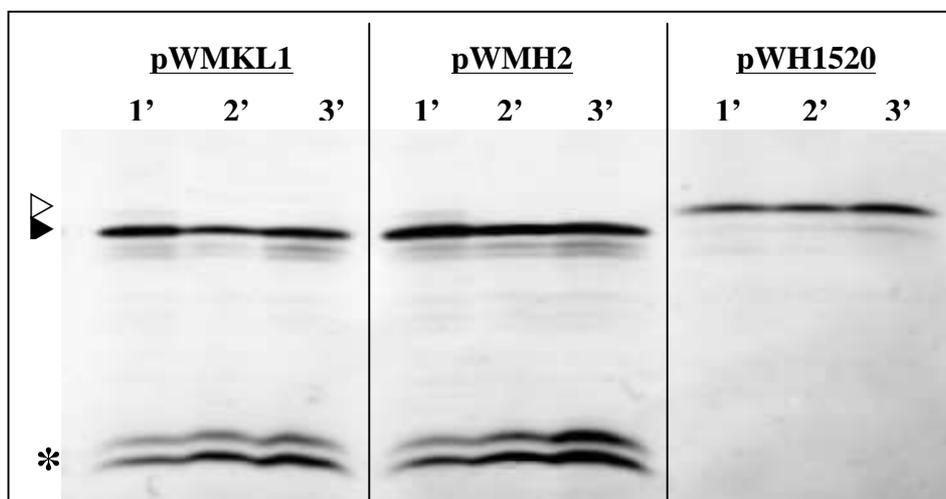


Abb. 11: Prozessierung des OmpA-Vorläuferproteins in *B. subtilis* NIG1152 bei 42 °C („Pulse-Chase“-Experiment) unter Expression der *secA*-Gene von *B. subtilis* DB104 (pWMKL1) oder *B. licheniformis* „E“ (pWMH2) bzw. mit dem entsprechenden Leervektor (pWH1520) ohne plasmidkodiertes SecA. Die Probennahme erfolgte 1 min, 2 min und 3 min nach Zugabe der „Chase“-Lösung. ▷ OmpA-Vorläufer (38 kDa), ▶ reifes OmpA-Protein (36 kDa), * OmpA-Abbauprodukte (16 und 18 kDa)

Das „Pulse-Chase“-Experiment zeigte, dass die *secA*-Mutante NIG1152 bei induzierter Expression der *secA*-Gene von *B. subtilis* DB104 oder *B. licheniformis* „E“ bei 42 °C das

heterologe OmpA-Protein wieder exportieren kann, während beim Kontrollstamm NIG1152 mit dem Leervektor pWH1520 ein Exportblock zu beobachten war. Die Exportkinetik ist bei Expression der *secA*-Gene so schnell, dass man bereits nach einer Minute kaum noch Vorläuferprotein sehen kann. Das in den Kulturüberstand freigesetzte reife OmpA-Protein wird durch Proteasen zu einem 16 kDa und einem 18 kDa großen Spaltprodukt abgebaut (s. auch III.1.5.). Das „Pulse-Chase“-Experiment bestätigt somit direkt, dass das *B. licheniformis* SecA-Protein in *B. subtilis* funktionell ist und den Proteinexport der *B. subtilis* *secA*-Mutante NIG1152 bei der nicht permissiven Temperatur von 42 °C wiederherstellen kann.

1.5. Die Überexpression der *secA*-Gene von *B. subtilis* und *B. licheniformis* hat keinen Einfluss auf den OmpA-Export in *B. subtilis* DB104

Für *B. subtilis* wurde gezeigt, dass eine erhöhte SecA-Menge in den Zellen den Export von bestimmten Proteinen verbessern kann (Leloup *et al.*, 1999). In Anlehnung an diesen Befund wurde nun untersucht, ob die Überexpression der *secA*-Gene von *B. subtilis* bzw. *B. licheniformis* den Export des heterologen OmpA-Proteins in *B. subtilis* DB104 verbessern kann. Das OmpA-Protein ist eines der Hauptproteine der Außenmembran von *E. coli* und wird als 346 AS großes Vorläuferprotein synthetisiert. Es konnte sowohl in früheren Experimenten (Meens *et al.*, 1993) als auch in Abschnitt III.1.4.2. gezeigt werden, dass die 21 AS lange, authentische Signalsequenz des OmpA-Proteins auch in *B. subtilis* einen Export ermöglicht. Da das OmpA-Protein in *E. coli* aber mit einer deutlich schnelleren Kinetik exportiert wird, ist zu vermuten, dass die Wechselwirkungen zwischen dem OmpA-Vorläuferprotein aus *E. coli* und möglicherweise dem *B. subtilis* SecA nicht optimal sind, also der OmpA-Vorläufer eine eher geringe Affinität zum *B. subtilis* SecA-Protein aufweist. Da insbesondere der Export von Proteinen mit geringer Affinität zum SecA-Protein direkt proportional zur SecA-Menge in der Zelle zu sein scheint, wurde das OmpA-Protein als Modellprotein ausgewählt, um vergleichend den Einfluss der Überexpression der *secA*-Gene von *B. licheniformis* bzw. von *B. subtilis* auf den Proteinexport zu untersuchen.

Hierzu wurde *B. subtilis* DB104 zunächst mit dem OmpA-Expressionsvektor pCU3OmpAkan transformiert und in einer anschließenden zweiten Transformation der Vektor pWMH2, der das *B. licheniformis* „E“ *secA*-Gen trägt, in die Zellen eingebracht. Analog dazu wurde mit dem das *B. subtilis* *secA*-Gen-tragende Plasmid pWMKL1 (pWH1520::*secA*_{B,s}) und mit dem Leervektor pWH1520 verfahren. Ausgehend von einer reprimierten ÜNK wurde frisches LB-Medium beimpft, die *ompA*-Expression mit 1 mM IPTG induziert und gleichzeitig die *secA*-Expression mit 0,5 % Xylose induziert bzw. mit 0,5 % Glucose reprimiert (s. II.5.2.1.). Nach vierstündiger Induktion bzw. Repression wurden Zellen und Überstände von 2 ml Kultur

durch Zentrifugation getrennt. Es wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und die Proteine der Kulturüberstände aufgearbeitet. Die Proteine aus Zellextrakten und Kulturüberständen wurden in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und die Proteine mittels Western-Blot-Technik auf einer Membran fixiert. Die SecA-Proteine wurden mit Antikörpern gegen das *B. subtilis* SecA-Protein und die OmpA-Proteine mit OmpA-spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Nachweis der SecA-Proteine

Im Western-Blot-Experiment zum Nachweis der *secA*-Expression war, unabhängig von den Induktionsbedingungen (Xylose oder Glukose), bei Zellen mit dem Leervektor eine Bande gleicher Stärke in dem für das SecA-Protein von *B. subtilis* zu erwartenden Bereich von ca. 95 kDa zu erkennen (Abb. 12). Eine Bande ähnlicher Intensität fand sich auch unter nicht induzierten Bedingungen in Gegenwart der Plasmide pWMH2 und pWMKL1. Diese Banden entsprechen dem chromosomal kodierten *B. subtilis* SecA-Protein. Unter induzierten Bedingungen war in gleicher Höhe bei Zellen, die das Plasmid pWMKL1 bzw. das Plasmid pWMH2 tragen, eine wesentlich intensivere Bande zu sehen, die dem plasmidkodierten SecA-Protein aus *B. subtilis* bzw. *B. licheniformis* entspricht. Unterhalb dieser SecA-Banden war eine große Menge von SecA-Abbauprodukten zu erkennen. Die Induktion mit Xylose führte demnach zu einer starken Überexpression des *B. subtilis secA*-Gens ausgehend vom Vektor pWMKL1 und des *secA*-Gens von *B. licheniformis* „E“ ausgehend vom Vektor pWMH2.

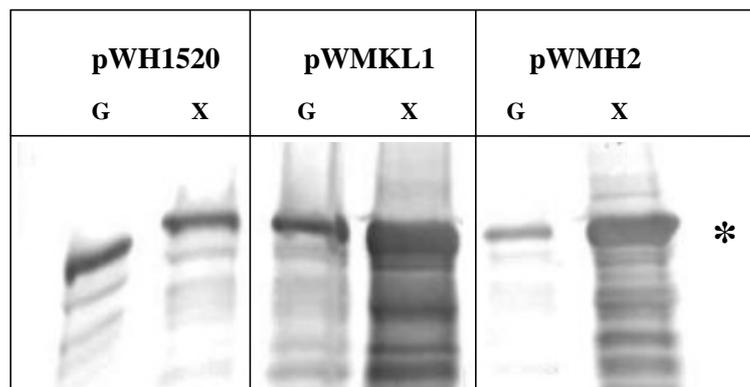


Abb. 12: Expression der *secA*-Gene von *B. licheniformis* „E“ und *B. subtilis* DB104 in *B. subtilis* DB104 (Western-Blot-Experiment). Die Expression der *secA*-Gene, ausgehend von den Vektoren pWMKL1 (*B. subtilis secA*) und pWMH2 (*B. licheniformis* „E“ *secA*), wurde mit 0,5 % Xylose induziert (X) bzw. mit 0,5 % Glukose reprimiert (G). Zellen mit dem Leervektor pWH1520 wurden in gleicher Weise kultiviert. Entsprechend der OD₆₀₀ der Ausgangskulturen wurden Proteinmengen gleicher Zellzahlen aufgetrennt. Die Bandenhöhe der SecA-Proteine (ca. 95 kDa) ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Nachweis der OmpA-Proteine

Im Western-Blot-Experiment mit Antikörpern gegen das OmpA-Protein ist in allen Zellfraktionen deutlich das 38 kDa große OmpA-Vorläuferprotein zu sehen (Abb. 13). Bei der dünnen Bande darunter handelt es sich um transloziertes, reifes OmpA-Protein, das nicht aus der Zellwand freigesetzt wurde (Matzen, 2000). In den Kulturüberständen von *B. subtilis* findet man typischerweise kaum reifes OmpA-Protein, sondern hauptsächlich dessen 16 kDa und 18 kDa große Abbauprodukte. Diese entstehen nicht durch einen einzelnen Schnitt in der Mitte des Proteins, sondern stammen beide aus der C-terminalen Domäne und werden durch Spaltung an zwei alternativen Spaltstellen erhalten (Matzen, 2000). Die C-terminale Domäne ist in *E. coli* periplasmatisch lokalisiert und faltet dort in eine proteaseresistente Konformation. Die N-terminale Domäne dient dagegen zur Verankerung des OmpA-Proteins in der äußeren Membran. Da in *B. subtilis* wegen des Fehlens der äußeren Membran die N-terminale Domäne keine native Konformation einnehmen kann, wird diese wahrscheinlich durch zellwandassoziierte Proteasen so stark abgebaut, dass der immunologische Nachweis von N-terminalen Spaltprodukten nicht mehr möglich ist.

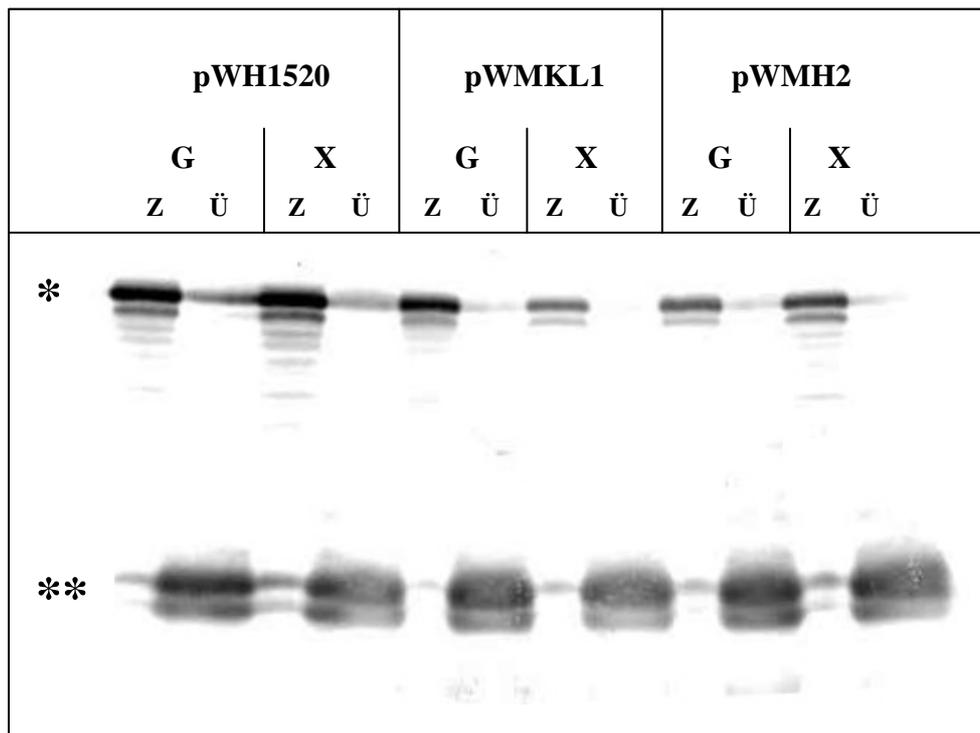


Abb. 13: Vergleich der Mengen an OmpA-Vorläuferprotein und exportiertem OmpA bei gleichzeitiger Überexpression der *secA*-Gene von *B. subtilis* DB104 (pWMKL1) bzw. *B. licheniformis* „E“ (pWMH2) in *B. subtilis* DB104 bzw. ohne zusätzlich plasmidkodiertes SecA-Protein (pWH1520) im Western-Blot-Experiment. Entsprechend der OD₆₀₀ der Ausgangskulturen wurden Proteinmengen gleicher Zellzahlen aufgetrennt. *: OmpA-Vorläuferprotein (38 kDa), **: OmpA-Abbauprodukte (16 und 18 kDa), Z: Zellfraktion, Ü: Kulturüberstand, G: *secA*-Expression durch 0,5 % Glukose reprimiert, X: *secA*-Expression durch 0,5 % Xylose induziert

Vergleicht man die Mengen der OmpA-Vorläuferproteine in den Zellfraktionen, so hat es den Anschein, dass bei Anwesenheit der *secA*-Expressionsvektoren unabhängig von den Induktionsbedingungen etwas weniger Vorläufer vorhanden ist als in Gegenwart des Leervektors pWH1520. In den Überständen finden sich aber unabhängig von der Stärke der *secA*-Expression vergleichbare Mengen der OmpA-Abbauprodukte. Somit scheint die Überexpression der *secA*-Gene aus *B. subtilis* und *B. licheniformis* keinen Einfluss auf den OmpA-Export in *B. subtilis* DB104 zu haben. Anders als beim Export der Levansucrase ist die Menge an SecA-Protein für den Export des OmpA-Proteins in *B. subtilis* DB104 somit nicht limitierend.

1.6. Vergleich der *prfB*-DNA-Sequenzen von *B. licheniformis* DSM13 (Wt) und *B. licheniformis* „E“

Nach der vergleichenden Untersuchung der *secA*-Gene von *B. licheniformis* „E“ und *B. licheniformis* DSM13 (Wt) sollten nun die *prfB*-Gene beider Stämme miteinander verglichen werden. Das *prfB*-Gen von *B. licheniformis* ist 1102 Bp lang und unterliegt wie 70 % aller bekannten bakteriellen *prfB*-Gene einer autoregulierten Translation (Pavel *et al.*, 2002). Der Leserahmen des *B. licheniformis prfB*-Gens wird nach dem 24. Codon durch ein UGA Stop-Codon unterbrochen, über welches das Ribosom bei geringen RF2-Mengen in der Zelle hinweglesen kann. Die sogenannte „frameshift“-Base ist in Abb. 14 eingezeichnet.

Der Sequenzvergleich zeigte, dass sich das *prfB*-Gen aus *B. licheniformis* „E“ (*prfBE*) in insgesamt 40 Basenpaaren vom Wt *prfB*-Gen (*prfBWt*) unterscheidet (s. Abb. 14). Zwei dieser Punktmutationen führen zu je einer veränderten Aminosäure im RF2-Protein von *B. licheniformis* „E“. Sie bewirken den Austausch von Serin nach Asparagin an Position 71 und von Asparagin nach Serin an Position 100 des RF2. Die veränderten Aminosäuren sollten nun anhand der bekannten Strukturdaten des *E. coli* RF2 und zusätzlich durch einen Vergleich des *B. licheniformis* RF2 mit homologen Proteinen anderer Organismen bestimmten funktionellen Bereichen des RF2-Proteins zugeordnet werden.

III. Ergebnisse

RF2Wt M E L A E I R Q E L E N M A T R L A D F
BIE ATGGAATTGGCAGAAATCAGACAGGAACCTTGAAAATATGGCTACTCGGTTAGCGGACTTC 60
BIWt ATGGAATTGGCAGAAATCAGACAGGAACCTTGAAAATATGGCTACTCGGTTAGCGGACTTC

RF2Wt R G S L D L E T K E A R I S E L D E Q M
BIE AGGGGGTCTCTTTGACCTCGAAACAAAGGAAGCAAGAATCAGCGAACTAGACGAGCAGAT 120
BIWt AGGGGGTCTCTTTGACCTCGAAACAAAGGAAGCAAGAATCAGCGAACTAGACGAGCAGAT

RF2Wt A D P D F W G D Q Q K A Q T I I N E A N
BIWt GGCTGACCCCGACTTTTGGGGAGATCAGCAGAAAGCGCAGACGATCATTAAATGAAGCGAA 180
BIE GGCTGACCCCGACTTTTGGGGAGATCAGCAGAAAGCGCAGACGATCATTAAATGAAGCGAA

RF2Wt A L K D Y V N T Y K S L S E S H E E L Q
BIWt TCGGTTAAAAGACTATGTCAACACGTACAAAAGTTTAAAGCGAGTCTCATGAAGAACTGCA 240
BIE CGCGTTAAAAGACTATGTCAACACGTACAAAATTTAAGCGAGTCTCATGAAGAACTGCA
N

RF2Wt M T H D L L K E D P D Q D L Q N E L V N
BIWt AATGACACATGATCTTTTTAAAAGAAGATCCTGACCAGGACCTGCAAAATGAACTGGTCAA 300
BIE AATGACACACGATCTTTTTAAAAGAAGATCCTGACCAAGACCTGCAAAATGAACTGGTCA
S

RF2Wt E L K S L T K Q F N E F E L Q L L L S E
BIWt CGAGCTGAAAAGCTTAACAAAGCAGTTTAAATGAATTTGAGCTCCAGCTATTGTTAAGCGA 360
BIE CGAGCTGAAAAGCTTAACGAAGCAATTTAACGAATTTGAGCTGCAGCTGTTGTTAAGCGA

RF2Wt P Y D K N N A I L E L H P G A G G T E S
BIWt GCCTTATGATAAAAACAATGCGATCCTTGAGCTTCACCCGGGAGCCGGCGGCACCGAATC 420
BIE GCCGTATGATAAAAACAATGCGATCCTTGAGCTTCACCCGGGAGCCGGCGGCACAGAATC

RF2Wt Q D W G S M L L R M Y T R W A E R R G F
BIWt ACAGGATTGGGGTTCAATGCTTCTCAGAATGTACACCAGGTGGGCAGAGCGCCGCGGATT 480
BIE ACAGGATTGGGGTTCAATGCTTCTCAGAATGTACACCAGGTGGGCAGAGCGCCGCGGATT

RF2Wt K V E T L D Y L P G D E A G I K S V T L
BIWt CAAGGTGGAACCCCTTGATTACCTTCCAGGAGATGAGGCGGGAATCAAGTCTGTCACTCT 540
BIE TAAGGTGGAACCCCTTGATTACCTTCCAGGGGATGAAGCGGGAATCAAGTCTGTCACTCT

RF2Wt L I K G H N A Y G Y L K A E K G V H R L
BIWt CCTGATTAAAGGCCACAATGCCTACGGTTATTTAAAAGCCGAAAAGGCGTGACAGGCT 600
BIE CCTGATCAAAGGCCACAATGCATACGGCTATTTAAAAGCCGAAAAGGTTGTGACAGGCT

RF2Wt V R I S P F D S S G R R H T S F V S C D
BIWt CGTCAGAATTTCTCCGTTTGACTCTTCAGGGCGCAGGCACACGTCGTTTGTGCTTGTGA 660
BIE CGTCAGAATTTCTCCGTTTGACTCATCAGGGCGCAGGCACACGTCGTTTGTGCTTGTGA

```

RF2Wt  V M P E F N E E I D I E I R T E D I K V
BIWt   TGTCATGCCTGAATTCAACGAAGAAATCGACATTGAGATCCGTACGGAAGATATTAAGT 720
BIE    TGTCATGCCTGAATTCAACGAGGAAATCGACATTGAGATCCGCACGGAAGATATTAAGT

RF2Wt  D T Y R A S G A G G Q H V N T T D S A V
BIWt   CGATACGTACAGGGCAAGCGGCGCCGGCCAGCACGTCAATACGACAGACTCCGCCGT 780
BIE    CGATACGTACAGGGCAAGCGGCGCCGGCCAGCACGTCAATACGACAGACTCCGCCGT

RF2Wt  R I T H L P T G V I V T C Q T E R S Q I
BIWt   CAGGATCACCCACTTGCCGACAGGCGTCATCGTCACTTGTGACAGAGCGATCACAAAT 840
BIE    CAGGATCACCCACTTGCCGACAGGCGTCATCGTCACTTGCCAGACGGAACGCTCGCAAAT

RF2Wt  K N R E R A M K M L K S K L Y Q R R I E
BIWt   TAAAAACCGCGAACGTGCCATGAAAATGCTGAAATCGAAGCTGTATCAGCGCAGAATCGA 900
BIE    TAAAAACCGCGAACGTGCCATGAAAATGCTGAAGTCGAAGCTGTATCAGCGCAGAATCGA

RF2Wt  E Q Q A Q L D E I R G E Q K E I G W G S
BIWt   GGAGCAGCAGGCACAGCTGGACGAAATTCGCGGCGAACAAAAAGAAATCGGCTGGGGGAAG 960
BIE    AGAGCAGCAGGCACAGCTTGACGAAATTCGCGGCGAACAAAAAGAAATCGGCTGGGGGAAG

RF2Wt  Q I R S Y V F H P Y S L V K D H R T N T
BIWt   CCAGATCCGCTCATACTTTCCACCCGATTCTCTAGTGAAGGATCATCGAACCAACAC 1020
BIE    CCAGATCCGCTCATACTTTCCATCCGATTCCCTAGTGAAGGATCATAGAACGAACAC

RF2Wt  E M G N V Q A V M D G D I D S F I D A Y
BIWt   GGAAATGGGGAACGTGCAGGCGGTTATGGACGGAGACATTGACTCTTTTCATTGACGCATA 1080
BIE    GGAAATGGGGAACGTGCAGGCGGTCATGGACGGAGACATTGACTCTTTTCATTGACGCATA

RF2Wt  L R S K L S *
BIWt   TTTGCGTTCCAAGCTTTTCTAA 1102
BIE    TTTGCGTTCCAAGCTTTTCTAA

```

Abb. 14: Sequenzvergleich der *prfB*-Gene von *B. licheniformis* DSM13 (BIWt) und *B. licheniformis* „E“ (BIE). Alle Sequenzunterschiede sind grau hinterlegt. Oberhalb der DNA-Sequenz ist die entsprechende Aminosäurenabfolge des RF2-Proteins vom Wt-Stamm *B. licheniformis* DSM13 (RF2Wt) gezeigt. Das Stop-Codon ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Unterhalb der DNA-Sequenz sind die beiden Aminosäuren eingezeichnet, die im RF2-Protein von *B. licheniformis* „E“ verändert sind. Die Base Thymin an Bp Position 73, an der das Ribosom bei geringer RF2-Konzentration einen „+1-frameshift“ macht und das Stop-Codon überliest, ist dick gedruckt.

1.6.1. Einteilung des RF2 von *E. coli* in funktionelle Domänen

Der RF2 von *E. coli* wurde anhand seiner Kristallstruktur in 4 Domänen unterteilt (Abb. 15). Die Aminosäuren 1-116 bilden die erste, N-terminale Domäne, die aus 4 α -Helices besteht. Die Helices α_1 , α_3 und α_4 bilden eine klassische dreisträngige und die Helices α_2 und α_3 eine zweisträngige „coiled-coil“ Helix-Struktur aus. Domäne 2, die sich über die Aminosäuren 125-225 erstreckt, besteht aus einer fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblatt-Struktur und aus zwei α -Helices. Die β -Stränge sind dabei um die lange zentrale α -Helix α_5 gewunden. Das SPF-Motiv, welches die spezifische Stop-Codon-Erkennung vermittelt, befindet sich in einer Schleife zwischen den β -Strängen β_4 und β_5 am äußeren Ende des β -Faltblatts, genau entgegengesetzt zur Domäne 1. Domäne 3 besteht aus den Aminosäuren 226-309. Die β -Stränge β_6 , β_7 und β_8 bilden hier ein dreisträngiges antiparalleles β -Faltblatt aus, an das sich eine sehr lange α -Helix α_7 anschließt. Das zwischen Pro- und Eukaryonten hochkonservierte GGQ-Motiv ist in der Schleife zwischen den β -Strängen β_6 und β_7 lokalisiert. Die vierte, C-terminale Domäne erstreckt sich über die Aminosäuren 310-365 und bildet ein dreisträngiges antiparalleles β -Faltblatt (β_9 , β_{10} , β_{11}) und die α -Helix α_8 aus.

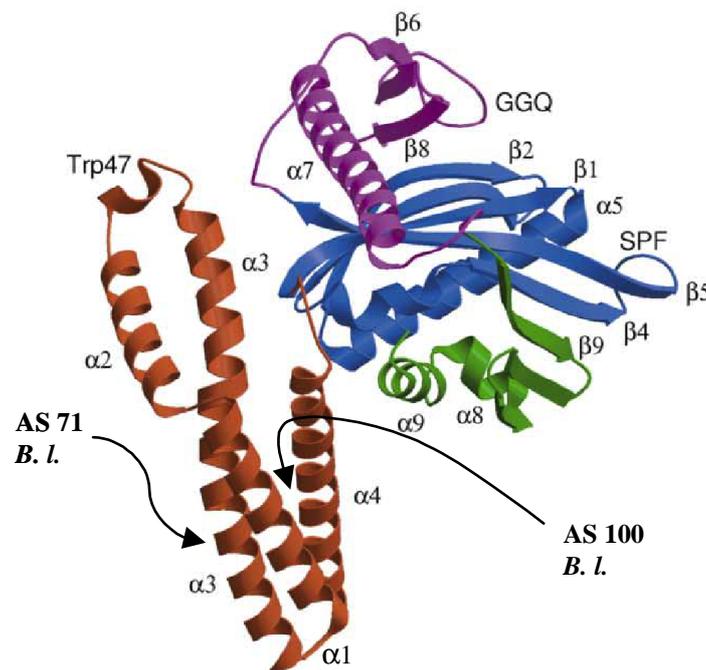


Abb. 15: Kristallstruktur des RF2 von *E. coli* K12 (verändert nach Vestergaard *et al.*, 2001). Die 4 Domänen sind farblich unterschieden (Domäne 1: rot, Domäne 2: blau, Domäne 3: magenta, Domäne 4: grün). Das für die Stop-Codon-Erkennung wichtige SPF-Motiv und das, das Peptidyltransferase-Zentrum des Ribosoms kontaktierende GGQ-Motiv, sind eingezeichnet. Die Positionen, an denen sich die RF2-Proteine von *B. licheniformis* DSM13 (Wt) und *B. licheniformis* „E“ unterscheiden, sind in der Kristallstruktur mit Pfeilen markiert.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der RF2-Proteine von *E. coli* und *B. licheniformis* (s. Abb. 16) ergab, dass die identifizierten Mutationen im RF2 von *B. licheniformis* „E“ in Domäne 1 innerhalb der α -Helices $\alpha 3$ und $\alpha 4$ lokalisiert sind, die zusammen mit der α -Helix $\alpha 1$ eine „coiled-coil“ Struktur ausbilden (s. Abb. 15). Daten aus kryoelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass Domäne 1 gleichzeitig mit beiden ribosomalen Untereinheiten wechselwirkt. Dabei kontaktiert die dreisträngige „coiled-coil“ Struktur die 16S rRNA der 30S Untereinheit (UE), während das entgegengesetzte Ende von Domäne 1 mit der für die G-Faktor-Bindung zuständigen 23S rRNA und dem L11-Protein der 50S UE wechselwirkt. Der Kontakt der Domäne 1 zu bestimmten Basen der 23S rRNA ist essentiell für die Bindung des RF2 an das Ribosom. Wechselwirkungen des RF2 mit der 30S UE führen zu einer relativen Verschiebung beider ribosomalen UE zueinander und zu einer Konformationsänderung des RF2. Diese Konformationsänderung ermöglicht es dem RF2, gleichzeitig die ribosomale A-Stelle mit dem SPF-Motiv und das Peptidyltransferase-Zentrum mit dem GGQ-Motiv zu kontaktieren (Klaholz *et al.*, 2003; Rawat *et al.*, 2003).

1.6.2. Vergleich der Aminosäuresequenzen der RF2-Proteine von *B. licheniformis* „E“ und *B. licheniformis* DSM13 und der RF2-Proteine anderer Organismen

Die Mutationen im RF2 von *B. licheniformis* „E“ konnten einer α -helicalen „coiled-coil“ Struktur zugeordnet werden, die wichtige Wechselwirkungen mit der 30S UE des Ribosoms eingeht. Ein Aminosäurevergleich des RF2-Proteins von *B. licheniformis* mit homologen Proteinen verschiedener Bakterien bzw. einem eukaryontischen RF2 sollte nun zeigen, ob es sich bei den im RF2 von *B. licheniformis* „E“ veränderten Aminosäuren um konservierte und somit sehr wahrscheinlich für die Funktion des RF2 besonders wichtige Aminosäurereste handelt. Die RF2-Proteine von *B. licheniformis* DSM13 (Wt) und *B. licheniformis* „E“ wurden daher mit homologen Proteinen aus den Eubakterien *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Neisseria meningitidis*, *Thermotoga maritima*, *Corynebacterium glutamicum*, *Synechocystis* spec. und dem RF2-Protein aus den Plastiden der Pflanze *Arabidopsis thaliana* verglichen (Abb. 16).

Es lassen sich deutlich konservierte Bereiche in allen vier Domänen erkennen. Hierbei weist Domäne 1 mit nur 3 identischen und 15 sehr ähnlichen Aminosäuren die höchste Varianz auf. Der RF2 von *A. thaliana* besitzt außerdem einen zusätzlichen N-terminalen Bereich, der in den anderen untersuchten RF2-Proteinen fehlt. Das für die Stop-Codon-Erkennung wichtige SPF-Motiv in Domäne 2 ist zwischen allen RF2-Proteinen hoch konserviert. Es befindet sich zwischen den β -Strängen $\beta 4$ und $\beta 5$, die ebenfalls zwischen den RF2-Proteinen einen hohen Anteil an identischen Aminosäuren aufweisen.

Weiterhin finden sich konservierte Reste in der zentralen α -Helix $\alpha 5$ von Domäne 2. In Domäne 3 findet man in allen RF2-Proteinen das hochkonservierte GGQ-Motiv, von dem gezeigt wurde, dass es Wechselwirkungen mit dem Peptidyltransferase-Zentrum am Ribosom eingeht. Auch das GGQ-Motiv ist in einem Bereich hoher Homologie lokalisiert. Die konservierten Reste von Domäne 4 befinden sich vor allem im Bereich der β -Stränge und der α -Helices.

Der Vergleich der *B. licheniformis* RF2-Proteine mit den hier ausgewählten RF2-Proteinen anderer Organismen zeigt, dass die Aminosäuren an den Positionen der identifizierten Aminosäureaustausche nicht konserviert sind und auch keine gemeinsamen Eigenschaften aufweisen. Die eine in *B. licheniformis* „E“ identifizierte Punktmutation bewirkte den Aminosäureaustausch von Serin nach Asparagin an Position 71. Während sich bei keinem der anderen ausgewählten RF2-Proteine ein Serin an der entsprechenden Position befindet, besitzt *N. meningitis* wie *B. licheniformis* „E“ ein Asparagin an dieser Position. Beim zweiten Aminosäureaustausch wurde genau umgekehrt ein Asparagin durch ein Serin an Position 100 im RF2 von *B. licheniformis* „E“ ersetzt. Keine dieser beiden Aminosäuren ist in einem der anderen RF2-Proteine an der entsprechenden Position lokalisiert.

Die Zuordnung der identifizierten Aminosäureaustausche zu der für den RF2 von *E. coli* festgelegten Domänen-Struktur zeigte, dass diese in Domäne 1 in verschiedenen α -Helices lokalisiert sind, die eine „coiled-coil“ Struktur ausbilden und Wechselwirkungen mit der 16S rRNA der ribosomalen 30S UE eingehen. Der Vergleich der RF2-Proteine von *B. licheniformis* mit RF2-Proteinen anderer Organismen ergab, dass die Aminosäuren an den entsprechenden Positionen der Austausch nicht konserviert sind. Für die Funktion des RF2-Proteins ist an diesen Stellen scheinbar keine spezielle Aminosäure erforderlich. Trotzdem könnte der Austausch innerhalb der α -Helices eine Veränderung in der RF2-Struktur und -Funktion bewirken. Es besteht daher dennoch die Möglichkeit, dass die gefundenen Mutationen für die hohen Subtilisin-Ausbeuten, die mit dem Stamm *B. licheniformis* „E“ erzielt werden, mitverantwortlich sind. Dies wurde durch Analyse der Subtilisin-Ausbeuten bei Koexpression des Subtilisin-Gens von *B. lentus* und des *prfBWt*- bzw. des *prfBE*-Gens in den Stämmen *B. subtilis* DB104, *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* „E“ untersucht und ist im folgenden Abschnitt (III.1.7.) beschrieben.

1.7. Einfluss der *prfB*-Expression auf die Subtilisin-Ausbeuten

Ein Vergleich zwischen den *prfB*-Genen vom Wt-Stamm *B. licheniformis* DSM13 und von *B. licheniformis* „E“ zeigte, dass sich beide Gene in 40 Basen unterscheiden und dass zwei dieser Punktmutationen zu je einer veränderten Aminosäure im RF2-Protein führen (s. III.1.6.). Es sollte nun untersucht werden, ob diese Mutationen mitverantwortlich für die hohen Subtilisin-Ausbeuten sind, die mit *B. licheniformis* „E“ erzielt werden. Sowohl die Mutationen im *prfB*-Gen, die zur veränderten Aminosäuresequenz im RF2 führen, als auch die stillen Mutationen im *secA*-Genlocus (38 stille Mutationen im *prfB*- und eine im *secA*-Gen) könnten einen Einfluss auf die Effizienz der Proteinbiosynthese haben. Die mRNA-Information wird zur selben Zeit von vielen hintereinanderliegenden Ribosomen (Polysom) in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt. Beim Erreichen eines Stop-Codons sorgt ein „Release“-Faktor dafür, dass sich das fertig synthetisierte Protein vom Ribosom ablösen kann. Erst danach kann sich auch das Ribosom von der mRNA ablösen. Die nachfolgenden Ribosomen können nun alle weiter auf der mRNA vorrücken. Wenn die Aminosäureaustausche im RF2 ein beschleunigtes Ablösen des Proteins vom Ribosom bewirken würden, dann könnten im Vergleich zum Wt pro Zeiteinheit mehr Ribosomen an der mRNA entlang wandern und die mRNA-Information in Protein übersetzen. Die stillen Mutationen könnten, wie auch schon für die stille Mutation im *secA*-Gen vermutet wurde, eine Stabilisierung des *secA-prfB*-Transkriptes bewirken. Die Tatsache, dass in *B. licheniformis* „E“ im Vergleich zum Wt-Stamm tatsächlich eine etwas höhere SecA-Menge in den Zellen gefunden wurde, bestärkt diese Annahme. Obwohl die Translation des *prfB*-Gens einem Autoregulationsmechanismus unterliegt, könnte eine erhöhte mRNA-Stabilität zu einer Erhöhung der RF2-Menge in der Zelle führen. Der Autoregulationsmechanismus sorgt dafür, dass sich das Verhältnis zwischen der Anzahl an *secA-prfB*-mRNA-Transkripten und der anhand dieser Transkripte erfolgenden vollständigen Translation von *prfB*-Genen auf einen konstanten Wert einpendelt, indem überschüssige RF2-Proteine eine verfrühte Termination der Translation bewirken. Sind mehr *prfB*-Transkripte vorhanden, die zeitgleich in RF2-Protein übersetzt werden, so sind auch mehr RF2-Proteine nötig, um eine verfrühte Termination dieser Translation zu katalysieren. Daher würde bei einer erhöhten *prfB*-mRNA-Konzentration die Synthese weiterer RF2-Proteine durch den Autoregulationsmechanismus erst bei höheren RF2-Konzentrationen in der Zelle unterbunden. Falls bei einer erhöhten RF2-Menge in der Zelle die RF2-Proteine im Durchschnitt öfter mit den translatierenden Ribosomen assoziiert wären, könnte dies zu einer schnelleren Erkennung von Stop-Codons und somit zu einer schnelleren Freisetzung der neu synthetisierten Proteine führen.

Um zu überprüfen, ob die gefundenen Mutationen tatsächlich mitverantwortlich für die hohen Subtilisin-Ausbeuten sind, die mit *B. licheniformis* „E“ erzielt werden, sollte sowohl der Einfluss des jeweiligen RF2-Proteins als auch die Wirkung einer erhöhten Menge an RF2-Protein auf die Subtilisin-Ausbeute untersucht werden. Dazu wurde das jeweilige *prfB*-Gen

(*prfBE* bzw. *prfBWt*) mit dem *sub*-Gen (Subtilisin-Gen von *B. lentus*) in den Stämmen *B. subtilis* DB104, *B. licheniformis* DSM13 (Wt) und *B. licheniformis* „E“ koexprimiert und die jeweilige Subtilisin-Ausbeute ermittelt. Um auch den Effekt einer erhöhten RF2-Menge auf die Subtilisin-Sekretion untersuchen zu können, wurden alternativ auch *prfB*-Gene koexprimiert, bei denen zuvor der Autoregulationsmechanismus ausgeschaltet wurde. Ein Mengenvergleich von sekretiertem Subtilisin bei Koexpression von autoreguliertem oder bei Überexpression von dereguliertem *prfBE* bzw. *prfBWt* sollte zeigen, ob das RF2 von *B. licheniformis* „E“ oder seine erhöhte Konzentration eine Verbesserung der Subtilisin-Ausbeute bewirken kann.

1.7.1. Konstruktion der *prfB*-Expressionsvektoren mit und ohne Autoregulation

Zur Expression der *B. licheniformis prfB*-Gene in den verschiedenen *Bacillus*-Stämmen wurden diese zunächst in den Expressions-Shuttlevektor pCU3, der in *E. coli* und *B. subtilis* replizieren kann, kloniert. Dazu wurden die *prfB*-Gene ausgehend von chromosomaler DNA von *B. licheniformis* DSM13 bzw. von *B. licheniformis* „E“ mittels PCR und Primern, die jeweils stromaufwärts (Primer Nr. 4, s. Tab. 3, S. 26) bzw. stromabwärts (Primer Nr. 6) vom *prfB*-Gen hybridisieren, amplifiziert. Die Primer enthielten zur anschließenden Klonierung der *prfB*-Gene jeweils am 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle (*Bam*HI bzw. *Sal*I). Die amplifizierten Fragmente wurden aus dem PCR-Ansatz aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen *Sma*I und *Bam*HI verdaut und in den ebenso gespaltenen Vektor ligiert. Die Klonierung erfolgte in *E. coli* JM109. Die erhaltenen Plasmide wurden als pCU3*prfBE* bzw. pCU3*prfBWt* bezeichnet. Als Negativkontrolle wurde außerdem ein Vektor gleicher Größe konstruiert, indem ein Fragment des *prfBWt*-Gens ohne korrekten Translationsstart mittels PCR (Primer Nr. 7 und Nr. 5 s. Tab.3) amplifiziert und in umgekehrter Orientierung hinter den Promotor des pCU3-Vektors in die *Sal*I und *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle ligiert wurde. Dieses Konstrukt wurde als pCU3-Kontrolle bezeichnet und wird im Folgenden als Negativkontrolle eingesetzt. Die fehlerfreie Klonierung der *prfB*-Gene wurde durch Sequenzierung überprüft.

1.7.1.1. Ausschalten der Autoregulation der *prfB*-Gene

Wie bereits beschrieben wird der Leserahmen des *B. licheniformis* *prfB*-Gens nach dem 24. Codon durch ein UGA Stop-Codon unterbrochen, über das das Ribosom bei geringen RF2-Mengen in der Zelle hinweglesen kann. Um eine Überexpression der *prfB*-Gene nach Induktion, ausgehend von den pCU3*prfB*-Expressionsvektoren, zu garantieren, wurde mittels PCR und entsprechenden Primern (Primer Nr. 9 und Nr. 10, s. Tab. 3, S. 26 und II.4.7.) die „frameshift“-Base (s. Abb. 14) deletiert und so der Autoregulationsmechanismus ausgeschaltet. Die erhaltenen Konstrukte ohne Autoregulation wurden als pCU3*prfB*Wt* und pCU3*prfB*E* bezeichnet. Die Deletion der „frameshift“-Base wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

1.7.1.2. Austausch des Resistenzgens für Transformation in *B. licheniformis*

Der zur Expression der *prfB*-Gene verwendete Vektor pCU3 besitzt zur Selektion in *Bacillus* eine Chloramphenicol-Resistenzkassette. Wie erwartet war die Selektion von *B. subtilis* Zellen mit einem pCU3-Konstrukt durch Zugabe von Chloramphenicol erfolgreich. Für *B. licheniformis* stellte sich jedoch heraus, dass dieser Stamm eine natürliche Resistenz gegenüber Chloramphenicol besitzt, so dass sich das Chloramphenicol-Resistenzgen des pCU3-Vektors zur Selektion als ungeeignet erwies. Zur Selektion des Expressionsvektors in *B. licheniformis* wurde daher das Chloramphenicol-Resistenzgen im jeweiligen Konstrukt (pCU3*prfB*E mit und ohne bzw. pCU3*prfB*Wt mit Autoregulation) gegen ein Erythromycin-Resistenzgen ausgetauscht. Die Erythromycin-Resistenzkassette (inkl. Promotor) wurde mittels PCR ausgehend vom Vektor pE194 amplifiziert (Primer Nr. 11 und Nr. 12, s. Tab. 3, S. 26). Die Primer enthielten zur anschließenden Klonierung der amplifizierten Kassette am jeweiligen 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle (*MunI* bzw. *BamHI*). Die amplifizierte Erythromycin-Resistenzkassette wurde aus dem PCR-Ansatz aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen *MunI* und *BamHI* verdaut. Die Chloramphenicol-Resistenzkassette wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *MunI* und *BamHI* aus den pCU3*prfB*-Konstrukten herausgeschnitten und durch die Erythromycin-Resistenzkassette ersetzt. Die Konstrukte wurden mit pCU3*prfB*Wt-Ery, pCU3*prfB*E-Ery und pCU3*prfB*E*-Ery bezeichnet. Analog dazu wurde auch ausgehend vom Vektor pCU3-Kontrolle ein Vektor mit Erythromycin-Resistenzgen hergestellt und als pCU3-Ery bezeichnet.

1.7.2. Einfluss der Expression der *prfB*-Gene von *B. licheniformis* Wt und *B. licheniformis* „E“ auf die Subtilisin-Ausbeute

Nach Fertigstellung der *prfB*-Expressionsvektoren zur Expression der autoregulierten *prfB*-Gene *prfBWt* und *prfBE* und der deregulierten *prfB*-Gene *prfBWt** und *prfBE** in *B. subtilis* und *B. licheniformis* wurde nun der Einfluss der *prfB*-Expression auf die Subtilisin-Ausbeute untersucht. Dazu wurde das *sub*-Gen (Subtilisin-Gen von *B. lentus*) ausgehend vom Plasmid pSub mit dem jeweiligen *prfB*-Gen in den Stämmen *B. subtilis* DB104, *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* „E“ koexprimiert. Der Vergleich der Subtilisin-Ausbeuten bei Koexpression des jeweils autoregulierten *prfB*-Gens sollte zeigen, welchen Einfluss die zwischen den RF2-Proteinen von *B. licheniformis* „E“ und *B. licheniformis* DSM13 unterschiedlichen Aminosäuren (Spezifität der RF2-Proteine) auf die Subtilisin-Ausbeute haben. Durch Überexpression der *prfB*-Gene wurde zusätzlich untersucht, ob eine erhöhte Menge von RF2-Protein (Quantität der RF2-Proteine) die Subtilisin-Ausbeute beeinflussen kann.

Um eine sichere Bestimmung der Subtilisin-Ausbeuten zu erreichen, wurden die *B. subtilis* DB104 Stämme mit jeder Plasmidkombination zweifach und die *B. licheniformis* Stämme dreifach kultiviert. Während die Kultivierung von *B. subtilis* DB104 in normalen Schüttelkolben bei 230 upm durchgeführt wurde, erfolgte die Kultivierung der *B. licheniformis* Stämme unter ständiger pH-Kontrolle bei pH 7,2 und 170 upm in der Anlage der Firma DASGIP (s. II.4.1.2.). Ohne pH-Kontrolle stieg der pH-Wert im Laufe der Kultivierung der *B. licheniformis* Stämme auf pH 10 an. Die pH-Kontrolle erwies sich insbesondere bei dem auf hohe Subtilisin-Ausbeuten optimierten Stamm *B. licheniformis* „E“ als nützlich, da bereits kleinere Unterschiede im zeitlichen pH-Anstieg einen großen Einfluss auf die absoluten Subtilisin-Ausbeuten zu haben schienen. So konnten mit *B. licheniformis* „E“ nur bei konstant gehaltenem pH-Wert gleiche absolute Subtilisin-Ausbeuten zwischen verschiedenen Versuchsreihen ermittelt werden. Die Expression der *prfB*-Gene wurde jeweils zwei Stunden nach Animpfen der Kulturen induziert. Nach vierstündiger Induktion und zusätzlich bei jeder Probennahme für die Subtilisin-Bestimmung wurde die Expression der *prfB*-Gene kontrolliert (s. III.1.7.2.1.). Die Probennahme zur Messung der Subtilisin-Aktivitäten in den Kulturüberständen erfolgte jeweils nach einer Kultivierungszeit von 48 h und 72 h.

1.7.2.1. Die RF2-Proteine von *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* „E“ werden in *B. subtilis* und *B. licheniformis* exprimiert

Bevor der Einfluss der *prfB*-Expression auf die Subtilisin-Ausbeute von *B. subtilis* und *B. licheniformis* untersucht werden konnte, musste zunächst sichergestellt werden, dass die *prfB*-Gene, ausgehend von den verschiedenen pCU3*prfB*-Konstrukten, exprimiert werden. Die *prfB*-Expression wurde 2 h nach Animpfen der Kulturen mit 1 mM IPTG induziert. Nach vierstündiger Induktion und zusätzlich bei jeder Probennahme für die Bestimmung der Subtilisin-Ausbeuten wurden zum Nachweis der exprimierten *prfB*-Gene aus je 2 ml Kultur Gesamtzellextrakte hergestellt. Entsprechend der OD₆₀₀ der Ausgangskulturen wurden gleiche Mengen der Zellextrakte im Tricin-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine anschließend mit Coomassie-Lösung angefärbt (s. Abb. 17 a - c). Sowohl in *B. subtilis* als auch in beiden *B. licheniformis* Stämmen ist bei Expression der *prfB*-Gene ohne Autoregulation eine deutliche Bande in dem erwarteten Bereich bei ca. 42 kDa zu erkennen, die in den Gesamtzellextrakten der Stämme mit dem Kontrollvektor (Negativkontrolle) nicht zu sehen ist. Ausgehend von den Konstrukten mit den autoregulierten *prfB*-Genen sind wesentlich geringere Mengen RF2-Protein zu erkennen. Während in *B. subtilis* die RF2-Bande bei autoregulierter Translation noch gut zu sehen ist, ist die entsprechende Bande in den beiden *B. licheniformis* Stämmen nur sehr dünn. Die Autoregulation der *prfB*-Gene aus *B. licheniformis* scheint in *B. subtilis* seltener zu einer verfrühten Beendigung der Translation zu führen als in den *B. licheniformis* Stämmen. Denkbar wäre, dass die Termination durch den RF2 von *B. licheniformis* in *B. subtilis* nicht optimal funktioniert und daher das Ribosom trotz hoher Mengen des *B. licheniformis* RF2-Proteins über das erste verfrühte Stop-Codon hinwegliert.

Mit diesem Experiment konnte die Synthese der RF2-Proteine von *B. licheniformis* DSM13 (Wt) und „E“-Stamm eindeutig sowohl in *B. subtilis* DB104 als auch in *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* „E“, ausgehend vom jeweiligen *prfB*-Expressionsvektor, nachgewiesen werden. Das Ausschalten der Autoregulation der *prfB*-Gene führte dabei jeweils zu einer deutlichen Überproduktion der RF2-Proteine. Im nächsten Schritt konnte jetzt durch Koexpression der autoregulierten oder deregulierten *prfB*-Gene von *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* „E“ der Einfluss der zwischen den RF2-Proteinen veränderten Aminosäuren sowie der Einfluss einer erhöhten RF2-Menge auf die von *B. subtilis* DB104 und von den *B. licheniformis* Stämmen sekretierte Subtilisin-Menge untersucht werden.

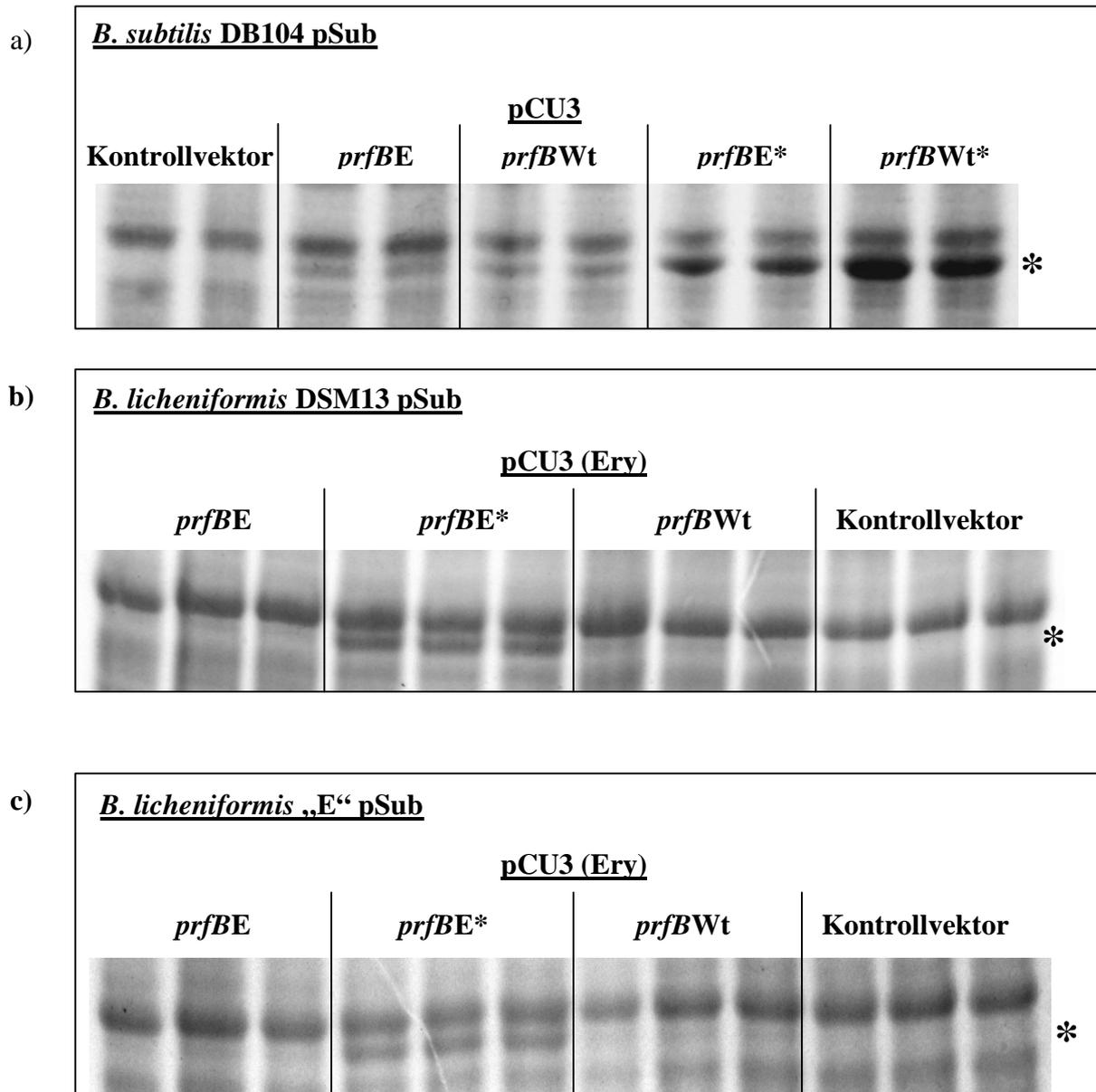


Abb. 17: Nachweis der RF2-Proteine im Tricin-SDS-Polyacrylamidgel (Coomassie-Färbung). Die *prfB*-Gene von *B. licheniformis* DSM13 (*prfBWt*) oder *B. licheniformis* „E“ (*prfBE*) wurden mit oder ohne Autoregulationsmechanismus von den Vektoren pCU3*prfBWt*, pCU3*prfBE*, pCU3*prfBWt** und pCU3*prfBE** in *B. subtilis* DB104 (a) oder ausgehend von den Vektoren pCU3*prfBWt*-Ery, pCU3*prfBE*-Ery, pCU3*prfBE**-Ery in *B. licheniformis* DSM13 (b) bzw. in *B. licheniformis* „E“ (c) exprimiert. Zusätzlich wurde jeweils auch ein Stamm mit dem entsprechenden Kontrollvektor kultiviert (pCU3-Kontrolle bzw. pCU3-Ery). Die Bandenhöhe der RF2-Proteine (ca. 42 kDa) ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet. *prfB*: mit Autoregulation, *prfB**: ohne Autoregulation

1.7.2.2. Vergleich der Subtilisin-Ausbeuten bei Koexpression der *prfB*-Gene von *B. licheniformis* DSM13 oder *B. licheniformis* „E“

Nachdem in den Stämmen *B. licheniformis* DSM13 (Wt), *B. licheniformis* „E“ und *B. subtilis* DB104 die Expression der *prfB*-Gene (autoreguliert: *prfBWt*, *prfBE*, dereguliert: *prfBWt**, *prfBE**), ausgehend von einem der *prfB*-Expressionsvektoren (s. III.1.7.1.), eindeutig nachgewiesen werden konnte (s. III.1.7.2.1.), wurde nun im jeweiligen Stamm der Einfluss der *prfB*-Expression auf die Subtilisin-Ausbeute untersucht. Dazu wurden jeweils nach 48 h und 72 h während desselben Schüttelkolbenexperimentes, bei dem die Synthese der RF2-Proteine nachgewiesen wurde, Proben entnommen. Zellen und Kulturüberstand wurden durch Zentrifugation getrennt und der Kulturüberstand zur Bestimmung der Subtilisin-Aktivität mittels AAPF-Test eingesetzt (s. II.5.1.). Alle Proben wurden dreifach vermessen und die bestimmten Aktivitäten gemittelt. Die aus den Mehrfachkultivierungen erhaltenen Aktivitätswerte (*B. subtilis* DB104 Stämme wurden mit jeder Plasmidkombination zweifach und die *B. licheniformis* Stämme dreifach kultiviert) wurden ebenfalls gemittelt. In den Kulturüberständen der 72 h Proben konnte jeweils eine etwas höhere Subtilisin-Menge nachgewiesen werden als in denen der 48 h Proben. Es werden daher im Folgenden die Aktivitäten der 72 h Proben miteinander verglichen, die in Abb. 18 dargestellt sind.

Subtilisin-Aktivitäten bei *prfB*-Expression in *B. subtilis* DB104

Zunächst wurden die Subtilisin-Aktivitäten pro ml Kulturüberstand von DB104 pSub bei Expression der *prfB*-Gene von *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* „E“ mit und ohne Autoregulation, ausgehend vom Expressionsplasmid pCU3, bzw. ohne *prfB*-Expression (Kontrollvektor) miteinander verglichen. Wie in Abb. 18a dargestellt, wurde die höchste Subtilisin-Aktivität mit 24,8 U/ml Kulturüberstand ohne Expression der *B. licheniformis* *prfB*-Gene erzielt. Bei Koexpression der *prfB*-Gene mit und ohne Autoregulation wurde im Vergleich dazu eine jeweils geringere Subtilisin-Aktivität pro ml Kulturüberstand ermittelt (*prfBWt*: 23 U/ml, *prfBWt**: 23,2 U/ml, *prfBE*: 22,3 U/ml, *prfBE**: 20,3 U/ml). Bezogen auf den Stamm mit dem pCU3-Kontrollvektor ergab sich bei Expression des *prfBWt*-Gens eine um 7,3 % und bei Überexpression des deregulierten *prfBWt**-Gens eine um 6,5 % verringerte Aktivität pro ml Kulturüberstand. Während die Expression des *prfBE*-Gens im Vergleich zum Kontrollstamm zu einer um 10,1 % verringerten Subtilisin-Aktivität führte, bewirkte die Überexpression des *prfBE**-Gens sogar eine Verringerung um 18,1 %.

Da auch bei Expression der autoregulierten *prfB*-Gene größere Mengen der RF2-Proteine synthetisiert werden, könnte die Synthese der RF2-Proteine in direkter Konkurrenz zur Subtilisin-Synthese stehen und so eine Verringerung der Subtilisin-Ausbeute bewirken. Zusätzlich wäre es möglich, dass die RF2-Proteine von *B. licheniformis* DSM13 oder „E“ die Proteinbiosynthese auch direkt behindern. Falls die RF2-Proteine von *B. licheniformis*

DSM13 bzw. „E“ mit dem *B. subtilis*-eigenen RF2 um die Bindung an das Ribosom konkurrieren, aber die Termination nur ineffizient katalysieren können, kommt es zu einer insgesamt verschlechterten Proteinbiosynthese, was schließlich auch zu einer verringerten Subtilisin-Synthese führen würde.

Im Vergleich zur Expression des *prfBWt*-Gens hatte die Expression und insbesondere die Überexpression des *prfBE*-Gens eine stärkere Abnahme der Subtilisin-Ausbeute zur Folge. Möglicherweise sind die Wechselwirkungen der RF2-Proteine von *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* „E“ mit den *B. subtilis* Ribosomen aufgrund der zwei unterschiedlichen Aminosäuren (s. III.1.6.) verschieden. Im Vergleich zum RF2 von *B. licheniformis* DSM13 scheint der RF2 von *B. licheniformis* „E“ stärkere Wechselwirkungen mit dem *B. subtilis* Ribosom einzugehen und daher auch stärker mit dem *B. subtilis*-eigenen RF2 um die Bindung an das Ribosom zu konkurrieren. Eine größere Konkurrenz bei einer nur ineffizient katalysierten Termination würde zu einer größeren Behinderung der Proteinbiosynthese und somit zu einer stärker verringerten Subtilisin-Ausbeute führen. Je mehr RF2 von *B. licheniformis* „E“ in den *B. subtilis* Zellen vorhanden ist, desto stärker wäre dann die Konkurrenz mit dem *B. subtilis*-eigenen RF2 um die Bindung an das Ribosom. So wäre auch zu erklären, dass die Überexpression des *prfBE**-Gens (ohne Autoregulation) im Vergleich zur Expression des autoregulierten *prfBE*-Gens zu einer weiteren Verringerung der Subtilisin-Aktivität im Kulturüberstand führt. Im Gegensatz zur Aktivität bei Überexpression des *prfBE**-Gens liegen die für das autoregulierte und das deregulierte *prfBWt*-Gen ermittelten Aktivitäten mit 92,7 % bzw. 93,5 % der Aktivität des Kontrollstammes in der gleichen Größenordnung. Falls der RF2 von *B. licheniformis* Wt tatsächlich nur eine geringe Affinität zu den Ribosomen von *B. subtilis* aufweist, wird die Proteinbiosynthese wahrscheinlich auch bei höheren Konzentrationen des *B. licheniformis* DSM13 nur geringfügig beeinträchtigt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Koexpression der *prfB*-Gene von *B. licheniformis* in *B. subtilis* zu einer verringerten Subtilisin-Ausbeute führt. Während die Expression des autoregulierten oder des deregulierten *prfBWt*-Gens zu einer leichten Verringerung der Ausbeute führt, hat die Überexpression des *prfBE**-Gens eine deutliche Abnahme der sekretierten Subtilisin-Menge zur Folge. Die zwischen den beiden RF2-Proteinen von *B. licheniformis* Wt und „E“ verschiedenen Aminosäuren haben somit einen unterschiedlichen Einfluss auf die Höhe der mit *B. subtilis* erzielten Subtilisin-Ausbeute. Die Aminosäureaustausche könnten die Effizienz der Wechselwirkungen zwischen den *B. licheniformis* RF2-Proteinen und den Ribosomen von *B. subtilis* beeinflussen. Vorstellbar wäre, dass der RF2 von *B. licheniformis* „E“ im Vergleich zum RF2 von *B. licheniformis* Wt mit den Ribosomen von *B. subtilis* stärkere Wechselwirkungen eingeht und daher die Proteinbiosynthese von *B. subtilis* stärker behindert.

Subtilisin-Aktivitäten bei *prfB*-Expression in *B. licheniformis* DSM13

Analog zu *B. subtilis* DB104 wurden die Subtilisin-Aktivitäten pro ml Kulturüberstand von *B. licheniformis* DSM13 pSub bei Expression der *prfB*-Gene von *B. licheniformis* DSM13 (Wt) und „E“-Stamm mit Autoregulation und zusätzlich ohne Autoregulation bei *prfBE*, ausgehend vom Expressionsplasmid pCU3 mit Erythromycin-Resistenzkassette, miteinander verglichen (Abb. 18b). Da es sich hierbei um die Expression homologer Gene handelt, sollten die Wechselwirkungen der RF2-Proteine mit den *B. licheniformis* DSM13 Ribosomen funktionell sein. Tatsächlich führte die Koexpression der *prfB*-Gene in *B. licheniformis* DSM13 zu einer gesteigerten Subtilisin-Ausbeute. Ohne *prfB*-Expression (Kontrollvektor) wurde die geringste Aktivität mit 34 U/ml Kulturüberstand erzielt. Bei Koexpression der autoregulierten *B. licheniformis* *prfB*-Gene wurde eine erhöhte Subtilisin-Aktivität von 37,7 U/ml (*prfBWt*) bzw. 38 U/ml (*prfBE*) ermittelt. Die Expression des deregulierten *prfBE**-Gens führte hingegen im Vergleich zum autoregulierten Gen zu einer wieder verringerten Subtilisin-Aktivität von 35,3 U/ml Kulturüberstand. Das bedeutet, dass hier nicht die zwischen den RF2-Proteinen von *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* „E“ verschiedenen Aminosäuren, sondern vielmehr die Konzentration der RF2-Proteine für die Höhe der Subtilisin-Ausbeute entscheidend ist. Während die Expression der autoregulierten *prfB*-Gene zu einer Erhöhung der Subtilisin-Aktivität um 10,9 % bzw. 11,8 % führte, hatte die Überexpression des *prfBE**-Gens nur eine geringfügige Erhöhung um 3,8 % zur Folge. Eine moderate Erhöhung der RF2-Konzentration scheint somit für eine effiziente Proteinbiosynthese von *B. licheniformis* DSM13 günstig zu sein.

Subtilisin-Aktivitäten bei *prfB*-Expression in *B. licheniformis* „E“

Im Gegensatz zum Laborstamm *B. subtilis* DB104 und zum Wt-Stamm *B. licheniformis* DSM13 ist *B. licheniformis* „E“ ein durch wiederholte Zyklen von Mutagenese und anschließendem Screening auf hohe Sekretionsleistungen optimierter Stamm. Wie im Kapitel III.1. gezeigt, können bei Expression des plasmidkodierten Subtilisins von *B. lentus* mit *B. licheniformis* „E“ im Vergleich zu *B. licheniformis* DSM13 daher mindestens viermal höhere Subtilisin-Ausbeuten erzielt werden. Bei einem so optimierten Stamm haben weitere Veränderungen, vor allem solche, welche die Proteinbiosynthese oder die Proteinsekretion betreffen, oftmals keine zusätzliche Verbesserung, sondern wieder eine Verringerung der Sekretionsleistung zur Folge. Es wurde daher zunächst angenommen, dass auch die zusätzliche Expression der *prfB*-Gene in *B. licheniformis* „E“ pSub zu einer Verringerung der Subtilisin-Menge im Kulturüberstand führt. Um jedoch zu untersuchen, ob die RF2-Proteine von *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* „E“ einen unterschiedlichen Einfluss auf die mit *B. licheniformis* „E“ pSub erzielten Subtilisin-Ausbeuten haben, wurden die Subtilisin-Aktivitäten pro ml Kulturüberstand mit und ohne Koexpression der *prfB*-Gene von *B. licheniformis* Wt und *B. licheniformis* „E“ (mit Autoregulation bzw. auch ohne

Autoregulation bei *prfBE*), ausgehend vom pCU3-Expressionsvektor mit Erythromycin-Resistenzkassette, miteinander verglichen (Abb. 18c). Erst einmal fällt auf, dass die mit *B. licheniformis* „E“ erzielten Aktivitäten mit 71-93 U/ml Kulturüberstand deutlich über denen liegen, die unter den gleichen Bedingungen (der Koexpression der *prfB*-Gene von *B. licheniformis* und des *sub*-Gens von *B. lentus*) mit *B. subtilis* DB104 oder mit *B. licheniformis* DSM13 (Wt) erhalten wurden. Ohne zusätzliche *prfB*-Expression (Kontrollvektor) betrug die Aktivität 81,5 U/ml. Eine ähnlich hohe Aktivität wurde mit 80,2 U/ml bei Koexpression des *prfBE*-Gens erzielt. Bei Koexpression des autoregulierten *prfBWt*-Gens wurde hingegen mit 70,6 U/ml eine geringere Subtilisin-Aktivität erhalten. Verglichen mit dem Kontrollstamm ohne zusätzliche *prfB*-Expression führte die Expression des Wt *prfB*-Gens somit zu einer deutlichen Verringerung der Aktivität um 13,4 %. Die Überexpression des deregulierten *prfBE**-Gens hatte aber entgegen der ursprünglichen Erwartung eine deutliche Erhöhung der sekretierten Subtilisin-Menge zur Folge. Die Subtilisin-Aktivität war hier mit 93 U/ml Kulturüberstand um 14,1 % größer als ohne zusätzliche *prfB*-Expression (Kontrollvektor).

Der RF2 von *B. licheniformis* Wt scheint die Proteinbiosynthese von *B. licheniformis* „E“ zu behindern, so dass es bei Koexpression des *prfBWt*-Gens zu einer verringerten Subtilisin-Synthese kommt. Während der RF2 von *B. licheniformis* „E“ wahrscheinlich aufgrund der Mutationen optimal auf die Wechselwirkungen mit den zelleigenen Ribosomen abgestimmt ist, kann der RF2 des Wt-Stammes wahrscheinlich an die Ribosomen des „E“-Stammes binden aber die Termination nur mit geringer Effizienz katalysieren. Beide „Release“-Faktoren konkurrieren somit um die Bindung an das Ribosom, doch führt die Bindung des zelleigenen RF2 von *B. licheniformis* „E“ zu einer effizienteren Termination. Große Mengen des eigenen RF2-Proteins haben darüber hinaus sogar einen positiven Einfluss auf die von *B. licheniformis* „E“ synthetisierte und in den Kulturüberstand sekretierte Subtilisin-Menge.

Diese Befunde lassen vermuten, dass die zwei Aminosäureaustausche zwischen den RF2-Proteinen von *B. licheniformis* DSM13 (Wt) und *B. licheniformis* „E“ tatsächlich Auswirkungen auf die Termination der Proteinbiosynthese haben. Während der RF2 von *B. licheniformis* DSM13 die Termination der Translation in *B. licheniformis* „E“ stört, hat eine hohe Konzentration des *B. licheniformis* „E“-eigenen RF2 einen positiven Effekt auf die Proteinbiosynthese.

Der Vergleich der Subtilisin-Ausbeuten bei Koexpression der *prfB*-Gene hat gezeigt, dass durch Expression der *B. licheniformis* *prfB*-Gene durchaus die Subtilisin-Ausbeute gesteigert werden kann. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die Mutationen im *prfBE*-Gen tatsächlich mitverantwortlich für die von *B. licheniformis* „E“ sekretierten hohen Subtilisin-Mengen sind.

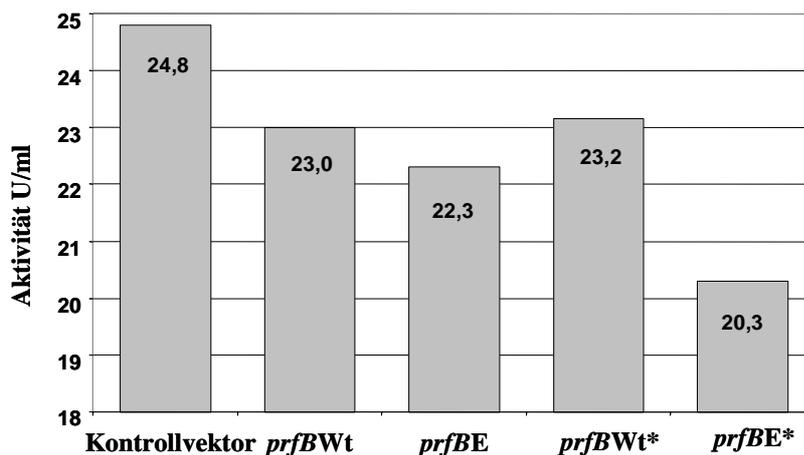
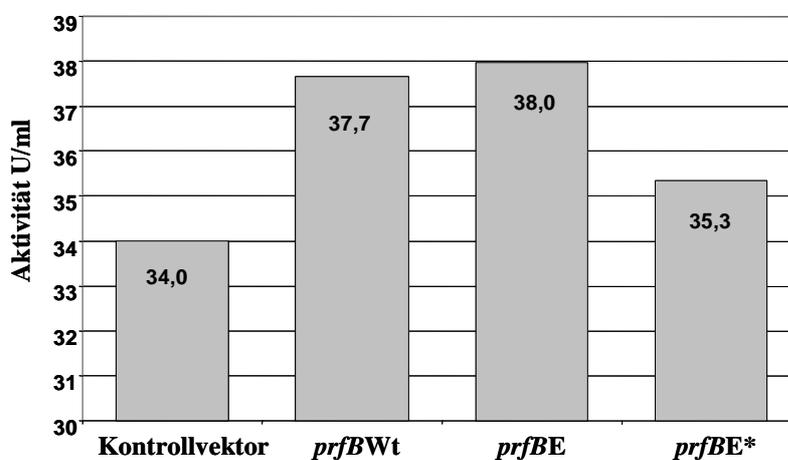
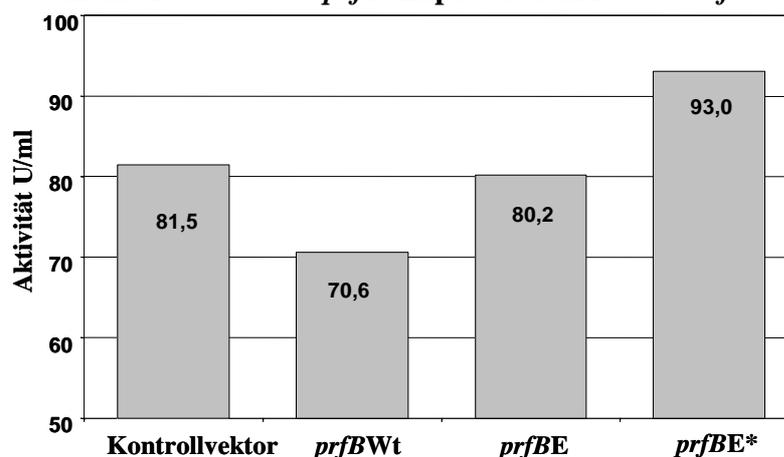
a) Subtilisin-Ausbeute bei *prfB*-Expression in *B. subtilis* DB104b) Subtilisin-Ausbeute bei *prfB*-Expression in *B. licheniformis* DSM13 (Wt)c) Subtilisin-Ausbeute bei *prfB*-Expression in *B. licheniformis* „E“

Abb. 18: Vergleich der Subtilisin-Aktivitäten von a) *B. subtilis* DB104 pSub, b) *B. licheniformis* DSM13 pSub, c) *B. licheniformis* „E“ pSub unter Expression der *prfB*-Gene von *B. licheniformis* DSM13 (*prfBWt*) oder *B. licheniformis* „E“ (*prfBE*) mit und ohne Autoregulation. Dargestellt sind die ermittelten Subtilisin-Aktivitäten der 72 h Proben. *prfB*: mit Autoregulation, *prfB**: ohne Autoregulation

2. Untersuchung des *secA*-Gens auf seine Verwendbarkeit als Selektionsmarker für die Subtilisin-Produktion mit *B. licheniformis*

Bei der industriellen Subtilisin-Produktion erfolgt die Expression des Subtilisin-Gens meist von einem Plasmid, welches zur Selektion eine Antibiotikaresistenzkassette beinhaltet. Die eigentliche Fermentation wird jedoch ohne Antibiotika im Medium durchgeführt, so dass während der Kultivierung ein Teil der Zellen das Plasmid verliert und nicht mehr zur Subtilisin-Produktion beitragen kann. Eine bessere Subtilisin-Ausbeute könnte daher mit einem Selektionssystem erzielt werden, bei dem das Plasmid bis zum Ende der Fermentation stabil bleibt. Es wurde daher untersucht, ob sich das essentielle *secA*-Gen als Selektionsmarker zur Subtilisin-Produktion eignet. Das *secA*-Gen wurde dazu auf das Subtilisin-Gen-tragende Plasmid pSub gebracht, der industrierelevante Stamm *B. licheniformis* „E“ mit dem resultierenden Plasmid pSubSecA transformiert und anschließend das chromosomale *secA*-Gen dieses Stammes über homologe Rekombination deletiert. Das *secA*-Selektionssystem wurde anschließend hinsichtlich der Stabilität des Plasmids pSubSecA und der Subtilisin-Ausbeute charakterisiert. Außerdem wurde untersucht, ob die aufgrund der Anwesenheit des pSubSecA-Plasmids erhöhte *secA*-Gendosis zu einer größeren Menge an SecA-Protein in der Zelle führt. Eine erhöhte SecA-Menge könnte wie bereits erwähnt (s. III.1.2.) eine zusätzliche Verbesserung der Sekretionsleistung bewirken.

2.1. Konstruktion des *secA*-Selektionssystems

Im Folgenden wird die Klonierung des *secA*-Gens in das Subtilisin-Plasmid pSub und die Konstruktion des zur *secA*-Deletion verwendeten Vektors beschrieben. Nach Transformation von *B. licheniformis* „E“ mit beiden Plasmiden erfolgte die Deletion des chromosomalen *secA*-Gens mittels homologer Rekombination.

2.1.1. Klonierung des *secA*-Gens in das Subtilisin-Plasmid

Das *secA*-Gen mit zugehörigem, σ^A -abhängigem Promotor wurde mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI aus dem Plasmid pHSG*secAE* geschnitten und in die entsprechende *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle des zur Expression des Subtilisin-Gens von *B. lentus* (*sub*-Gen) verwendeten Vektors pSub ligiert (s. Abb. 19). Da dieses Plasmid ausschließlich in *Bacillus* repliziert, wurde die Klonierung in *Bacillus subtilis* DB104 durchgeführt.

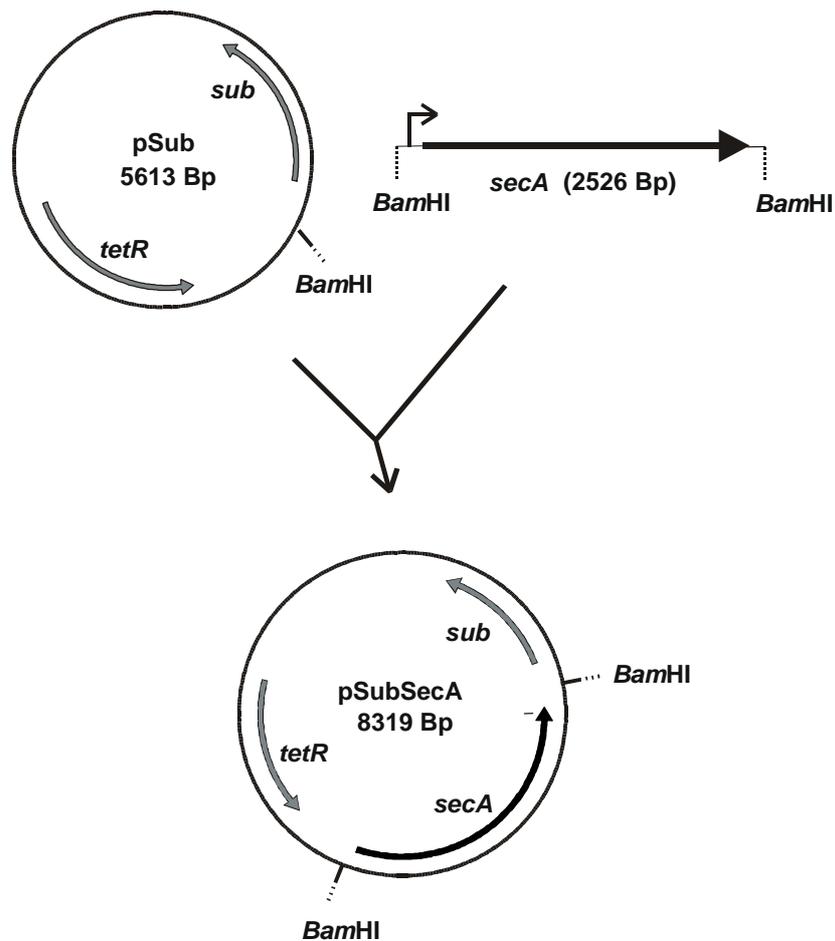


Abb. 19: Konstruktion des Plasmids pSubSecA.

Das *secA*-Gen von *B. licheniformis* „E“ wurde in die *Bam*HI Restriktionsschnittstelle des Plasmids pSub ligiert. *tetR*: Tetracyclin-Resistenzgen, *sub*: Subtilisin-Gen von *B. lentus*



Abb. 20: Test auf proteasepositive Klone mittels „Skim-Milk“-Plattentest.

Klone mit dem Plasmid pSub oder pSubSecA sekretieren das Subtilisin von *Bacillus lentus* und bilden auf LB-Agarplatten mit 1 % Milch durchsichtige Höfe. Links: *B. licheniformis* „E“ Kolonien ohne Plasmid; Rechts: *B. licheniformis* „E“ Kolonien mit dem Plasmid pSub

Der Transformationsansatz wurde auf tetracyclinhaltigem Medium selektioniert und die erhaltenen Transformanten zunächst mittels „Skim-Milk“-Plattentest auf ihre Proteaseaktivität hin überprüft. Dazu wurden LB-Agarplatten verwendet, die 1 % Milch enthielten. Klone, die das plasmidkodierte Subtilisin von *B. lentus* sekretierten, bildeten durchsichtige Höfe auf den milchigen Platten. Die Sekretion von chromosomal kodiertem *B. subtilis*- oder *B. licheniformis*-eigenem Subtilisin bewirkte dagegen keine Hofbildung. So konnten mit dem „Skim-Milk“-Plattentest eindeutig Klone, die das pSub-Plasmid oder eines seiner Derivate enthielten, von solchen ohne plasmidkodierte Protease unterschieden werden (s. Abb. 20). Da *B. subtilis* DB104 und *B. licheniformis* DSM13 nur geringe Mengen Proteasen in den Kulturüberstand sekretieren, war hier ohne zusätzlich plasmidkodierte Subtilisin ein Ausbleiben der Hofbildung zu erwarten. Mit *B. licheniformis* „E“ wurde dagegen im AAPF-Test auch ohne plasmidkodierte Subtilisin eine sehr hohe Subtilisin-Aktivität von 83,8 U/ml Kulturüberstand nachgewiesen (s. III.1.). Da sich der AAPF-Test und der „Skim-Milk“-Plattentest bezüglich des Substrates und des pH-Wertes unterscheiden, wäre es möglich, dass die chromosomal kodierten Proteasen im Vergleich zum plasmidkodierten Subtilisin vielleicht eine andere Substratspezifität oder eine geringere pH-Toleranz besitzen und deshalb unter den Bedingungen des Plattentests nicht aktiv sind.

Die Plasmid-DNA von im „Skim-Milk“-Plattentest identifizierten proteasepositiven *B. subtilis* DB104 Klonen wurde anschließend durch Plasmid-DNA-Präparation und geeigneten Restriktionsverdau überprüft. So wurden zwar Transformanten mit dem als pSubSecA bezeichneten Plasmid erhalten, doch erwies sich dieses als nicht stabil. Erst nach mehrfachem Einzelausstrich und wiederholter Auswahl von Klonen konnten Transformanten mit einem stabilen pSubSecA-Konstrukt erhalten werden, dessen kloniertes *secA*-Fragment durch Sequenzierung nochmals überprüft wurde. Die Sequenzierung ergab eine Punktmutation im *secA*-Gen an Bp Position 1725 von Adenin nach Guanin. Da diese Mutation jedoch keine Veränderung der Aminosäuresequenz des SecA-Proteins bewirkte (TCA -> TCG: Serin), wurde mit dem als pSubSecA-Plasmid bezeichneten Konstrukt weiter gearbeitet. Das Plasmid wurde durch Protoplastentransformation in *B. licheniformis* „E“ Zellen eingebracht und die erhaltenen Transformanten mittels „Skim-Milk“-Plattentest auf ihre Proteaseaktivität hin überprüft. Die Plasmid-DNA von proteasepositiven Klonen wurde präpariert und durch Restriktionsverdau nochmals auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Es zeigte sich, dass auch in *B. licheniformis* „E“ erst nach mehrfachem Einzelausstrich und wiederholter Selektion Klone mit einem stabilen pSubSecA-Plasmid erhalten werden konnten.

Die im pSubSecA-Konstrukt enthaltene stille Mutation an Bp Position 1725 lag vor Umsetzung des *secA*-Gens aus dem Vektor pHSG*secAE* in den Vektor pSub nicht vor und muss daher während der Klonierung in *B. subtilis* DB104 entstanden sein. Diese Punktmutation und die anfänglich beobachtete Instabilität des pSubSecA-Plasmids bei der Klonierung in *B. subtilis* und *B. licheniformis* lassen vermuten, dass durch das jetzt zusätzlich

auf dem Subtilisin-Plasmid lokalisierte *secA*-Gen ein Stress für die Zelle entstanden ist. Da aus früheren Experimenten mit *B. subtilis* DB104 bekannt ist, dass große Mengen SecA-Protein keinen negativen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zellen haben (Frings, 1995), scheint hier die Kombination von überproduziertem Subtilisin und SecA möglicherweise aufgrund der erhöhten metabolischen Belastung ungünstig zu sein (s. IV.2.1.). Im vollständig konstruierten *secA*-Selektionssystem herrscht aufgrund der fehlenden chromosomalen *secA*-Kopie ein Gegendruck auf den Erhalt des pSubSecA-Plasmids in der Zelle. Der Einfluss der aus dem *secA*-Selektionssystem resultierenden erhöhten SecA-Menge auf die Subtilisin-Ausbeuten und die Stabilität des pSubSecA-Plasmids in der *B. licheniformis* „E“ *secA*-Deletionsmutante wurden nach Fertigstellung des Systems untersucht (s. III.2.2.).

2.1.2. Konstruktion des *secA*-Deletionsvektors

Zur Konstruktion des *secA*-Selektionssystems musste nach Einbringung des Plasmids pSubSecA in *B. licheniformis* „E“ Zellen das chromosomale *secA*-Gen deletiert werden. Die Deletion erfolgte mittels homologer Rekombination. Bei dieser Methode werden zunächst die Bereiche, die das *secA*-Gen auf dem Chromosom flankieren (*orf189'* und *prfB'* s.u.), in einen Vektor kloniert und in die Zelle eingebracht. Die Deletion erfolgt dann in zwei Rekombinationsschritten. Über den ersten homologen Bereich wird der gesamte Vektor in das Chromosom integriert, während eine weitere Rekombination über den zweiten homologen Bereich zur Deletion des *secA*-Gens führt. Der für die Durchführung der *secA*-Deletion ausgewählte Vektor pE194 besitzt eine Erythromycin-Resistenzkassette und einen temperaturabhängigen Origin, welcher eine Replikation bei 30 °C, jedoch nicht bei 48 °C, erlaubt. Dies ermöglicht es, zunächst auf eine erfolgreiche Transformation bei 30 °C zu selektionieren, um anschließend durch Temperaturverschiebung nach 48 °C und durch Zugabe von Erythromycin den Selektionsdruck auf die chromosomale Integration des Plasmids über einen der beiden in den Vektor klonierten homologen Bereiche auszuüben. Eine weitere homologe Rekombination über den anderen (zweiten) homologen Bereich führt dann zur *secA*-Deletion und wird durch Inkubation bei der intermediären Temperatur von 37 °C mit Erythromycin im Medium erreicht. Das Plasmid deinsertiert dabei aus dem Chromosom und repliziert bei dieser Temperatur wahrscheinlich mit geringer Kopienzahl. Die so gegenüber nur einer chromosomalen Kopie erhöhte Gendosis des Erythromycin-Resistenzgens ist ein Selektionsvorteil in erythromycinhaltigem Medium. Um die Zellen schließlich vom Plasmid zu kurieren, werden diese in antibiotikafreiem Medium bei 48 °C inkubiert.

Zur Konstruktion des *secA*-Deletionsvektors wurden die stromauf- und stromabwärts des *secA*-Gens von *B. licheniformis* „E“ lokalisierten Bereiche *orf189'* und *prfB'* mittels PCR-Technik amplifiziert. Hierbei war zu beachten, dass das stromabwärts von *secA* lokalisierte

prfB- mit dem *secA*-Gen in einem Operon liegt, also keinen eigenen Promotor besitzt. Um die Transkription des für die Proteinbiosynthese wichtigen *prfB* auch nach *secA*-Deletion zu gewährleisten, wurde das 3'-Ende des vor dem *secA*-Gen befindlichen *orf189* mit eigenem Terminator und dem stromabwärts lokalisierten *secA*-Promotor amplifiziert, so dass das *prfB*-Gen nach *secA*-Deletion direkt von dem *secA*-Promotor aus transkribiert wird (s. Abb. 21).

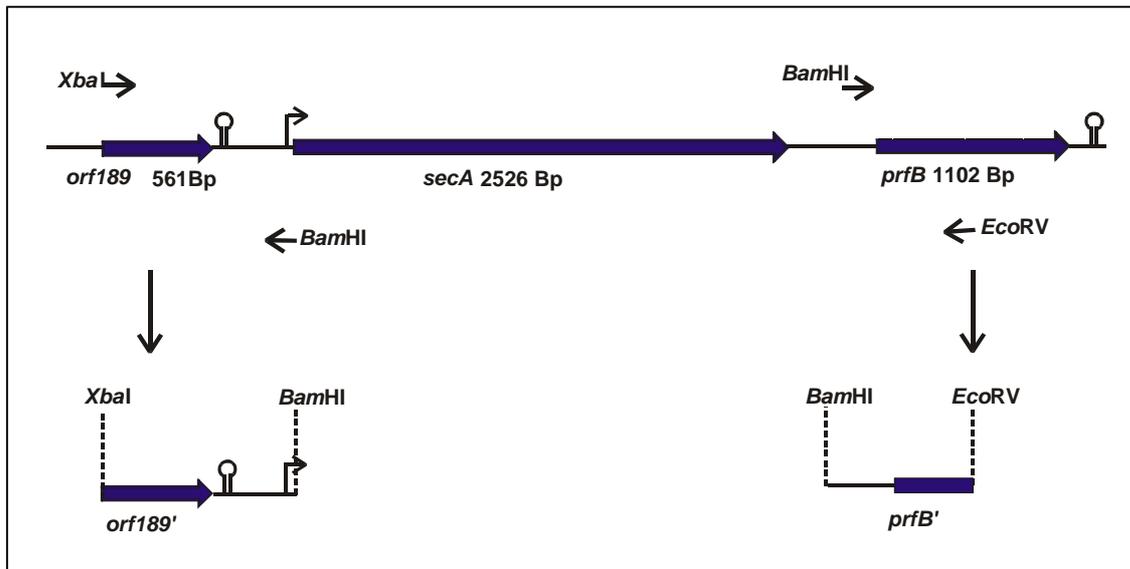


Abb. 21: Amplifizierung der stromauf- und stromabwärts des *secA*-Gens von *B. licheniformis* „E“ lokalisierten Bereiche mit den zur Klonierung ausgewählten Restriktionsschnittstellen. Das 3'-Ende von *orf189* wird mit eigenem Terminator Ω und dem stromabwärts liegenden *secA*-Promotor ► amplifiziert, so dass nach *secA*-Deletion das *prfB*-Gen direkt vom *secA*-Promotor aus transkribiert werden kann.

Die zur Amplifizierung des *orf189'*- (650 Bp) und des *prfB'*-Fragments (581 Bp) verwendeten Primer wurden anhand der *B. licheniformis* „E“ DNA-Sequenz ausgewählt (*orf189'*Primer: Primer Nr. 13 und Nr. 14; *prfB'*Primer: Primer Nr. 4 und Nr. 8, s. Tab. 3, S. 26) und enthielten für die anschließende Klonierung geeignete Restriktionsschnittstellen. Die amplifizierten Fragmente (*orf189'* und *prfB'*) wurden nacheinander in den *E. coli* Vektor pBBRMCS2 in die Restriktionsschnittstellen *Xba*I/*Bam*HI bzw. *Bam*HI/*Eco*RV kloniert und so der Vektor pBB*orf189'**prfB'* konstruiert (s. Abb. 22). Das so zusammengesetzte *orf189'**prfB'*-Fragment wurde durch anschließende Sequenzierung überprüft und im nächsten Schritt in den zur Deletion ausgewählten Vektor pE194 in *B. subtilis* DB104 umkloniert. Der Vektor pE194 wurde dazu mit *Acc*I verdaut, die Restriktionsschnittstelle mittels Klenow-Reaktion aufgefüllt und anschließend der Vektor mit *Xba*I verdaut. So konnte das mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Eco*RV aus dem pBB*orf189'**prfB'*-Vektor geschnittene *orf189'**prfB'*-Fragment schließlich zwischen die *Xba*I und die „blunt“-Schnittstellen des pE194 ligiert werden (s. Abb. 23). Das fertige Konstrukt wurde mit pE*orf189'**prfB'*

bezeichnet. Die Transformation in *B. subtilis* DB104 erfolgte mittels Protoplasten-
transformation bei der für die Replikation des Plasmids permissiven Temperatur von 30 °C.

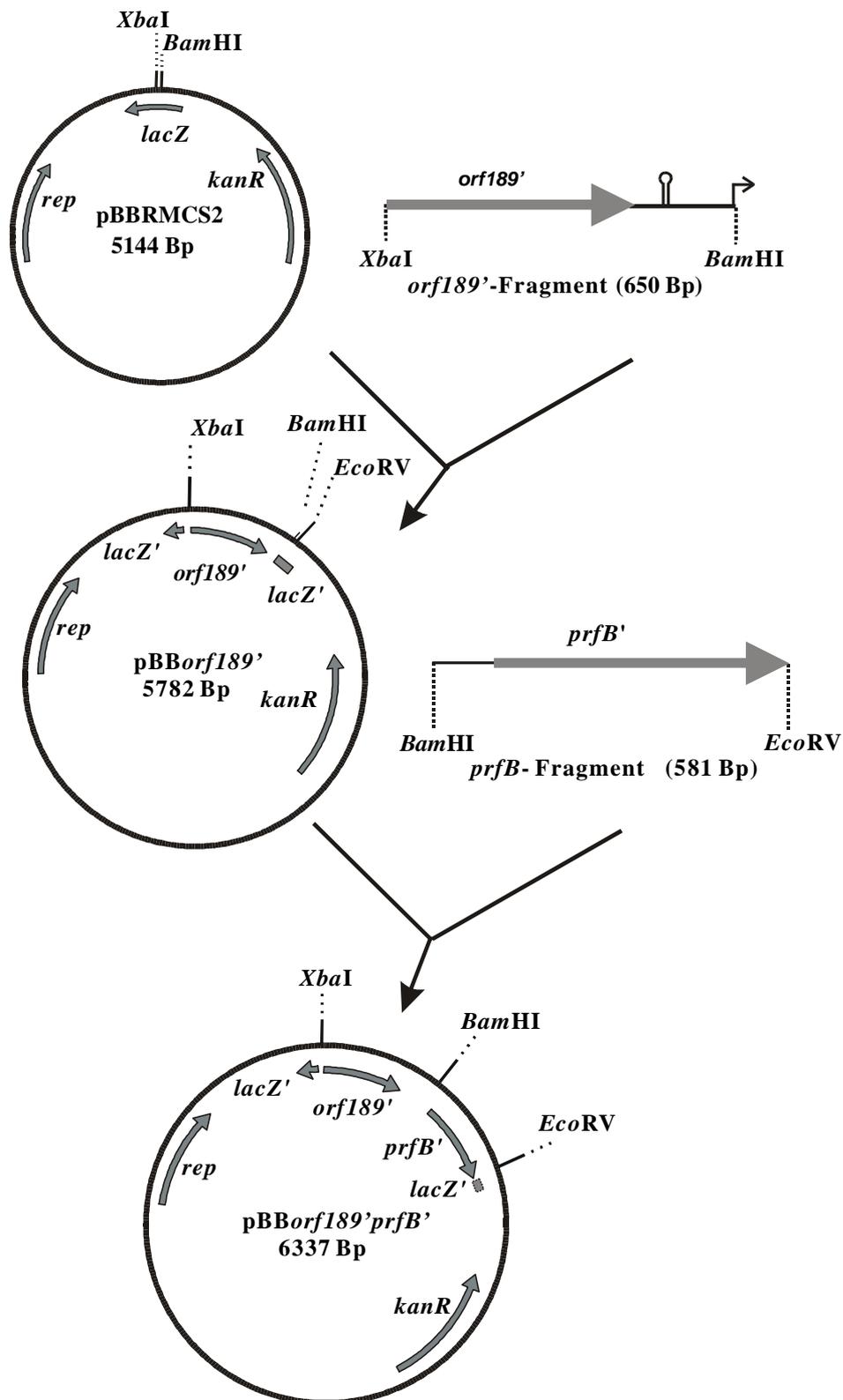


Abb. 22: Klonierung der amplifizierten Fragmente *orf189'* und *prfB'* in den *E. coli* Vektor pBBRMCS2 in die Restriktionsschnittstellen *XbaI/BamHI* bzw. *BamHI/EcoRV*. *rep*: Gen für das Replikationsprotein, *lacZ*: β -Lactamase-Gen, *kan R*: Kanamycin-Resistenzgen

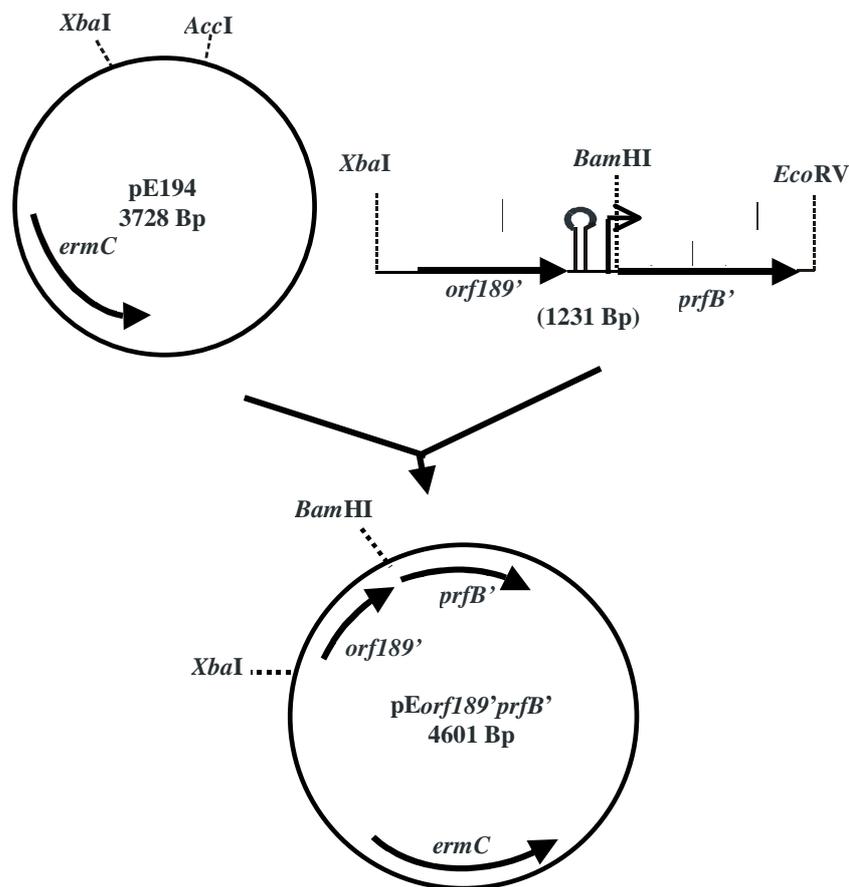


Abb. 23: Klonierung des *orf189'prfB'*-Fragments in den Vektor pE194. pE194 wurde mit *AccI* verdaut, die Schnittstelle mittels Klenow-Reaktion aufgefüllt und der Vektor anschließend *XbaI* verdaut. Das *orf189'prfB'*-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *EcoRV* aus dem Vektor pBB*orf189'prfB'* geschnitten und in die *XbaI* und die „blunt“ Schnittstelle des pE194 ligiert. Der resultierende Vektor pE*orf189'prfB'* wurde zur Deletion des chromosomalen *secA*-Gens von *B. licheniformis* „E“ eingesetzt. *ermC*: Erythromycin-Resistenzgen

2.1.3. Deletion des chromosomalen *secA*-Gens

Da das SecA-Protein essentiell für das Überleben der Zellen ist, musste vor der Deletion des chromosomalen *secA*-Gens von *B. licheniformis* „E“ das Plasmid pSubSecA mit dem plasmidkodierten SecA-Protein in die Zellen eingebracht werden. Anschließend wurden die Zellen mit dem *secA*-Deletionsvektor pE*orf189'prfB'* transformiert. Beide Transformationen wurden nach der Methode der Protoplastentransformation durchgeführt, wobei die Transformation des pE*orf189'prfB'* bei der für die Replikation dieses Plasmids permissiven Temperatur von 30 °C erfolgte. Ausgehend von den Transformanten erfolgte nun die chromosomale Integration des Deletionsvektors und die anschließende Deletion des chromosomalen *secA*-Gens. Die Kultivierung wurde zur Selektion von Zellen mit dem pSubSecA-Plasmid immer mit Tetracyclin und je nach Kultivierungsschritt (s.u.) zusätzlich mit Erythromycin im Medium durchgeführt. Die Zellen wurden ü.N. bei der für

pEorf189'prfB' permissiven Temperatur von 30 °C mit Erythromycin im Medium angezogen. Zur Integration des pEorf189'prfB' wurde die Temperatur anschließend zu nicht permissiven Bedingungen von 48 °C verändert. Die Zellen wurden insgesamt viermal bis zur späten stationären Wachstumsphase bei 48 °C mit Erythromycin im Medium kultiviert und anschließend in frisches Medium überimpft bzw. nach der letzten Kultivierung in verschiedenen Verdünnungen auf erythromycinhaltigen Platten ausplattiert. Die Platten wurden ü.N. bei 37 °C inkubiert. Bei dieser intermediären Temperatur erfolgt die Excision des Plasmids, die, wenn sie nicht über den gleichen homologen Bereich erfolgt wie die erste Rekombination, zur *secA*-Deletion führt. Mit den erhaltenen Klonen wurde frisches Medium beimpft. Die Zellen wurden jetzt bei 48 °C ohne Erythromycin im Medium insgesamt viermal bis zur späten stationären Wachstumsphase kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf erythromycinfreien LB-Agarplatten ausplattiert und die Platten bei 48 °C inkubiert. Um zu untersuchen, ob die Zellen den Deletionsvektor während der 48 °C Passage verloren haben, wurde eine Auswahl der erhaltenen Klone auf Verlust der Erythromycinresistenz getestet. Es konnten 16 erythromycinsensitive Klone identifiziert werden, deren chromosomale DNA anschließend auf die *secA*-Deletion hin mittels PCR-Analyse untersucht wurde. So identifizierte potentielle *secA*-Deletionsmutanten wurden zusätzlich durch eine Southern-Blot-Analyse und letztlich durch Sequenzierung des DNA-Bereichs vom Gen *orf189* bis hin zum 5'-Bereich des *prfB*'-Gens überprüft (s.u.).

PCR-Analyse

Zum Nachweis der *secA*-Deletion im Chromosom von *B. licheniformis* „E“ wurde zunächst eine PCR-Analyse durchgeführt. Dazu wurden Primer verwendet (Primer Nr. 15 und Nr. 16, Tab. 3, S. 26), die sich stromauf- bzw. stromabwärts des zur homologen Rekombination ausgewählten *orf189*'-Bereichs bzw. des *prfB*'-Bereichs anlagern. Anhand der Größe der PCR-Produkte ließ sich unterscheiden, ob das *secA*-Gen noch vorhanden war oder deletiert wurde. Ist das *secA*-Gen im Chromosom noch vorhanden, so wird ein 3,9 kB großes PCR-Produkt, nach *secA*-Deletion dagegen nur ein 1,37 kB großes PCR-Produkt erhalten (s. Abb. 24). Mit der chromosomalen DNA von 14 der 16 untersuchten Klone wurde das nach *secA*-Deletion erwartete 1,37 kB große Fragment amplifiziert. Mit der PCR-Analyse konnte somit die Deletion des chromosomalen *secA*-Gens von *B. licheniformis* „E“ pSubSecA nachgewiesen werden. Da die PCR-Analyse nur ein indirektes Nachweisverfahren darstellt, wurde die Deletion noch zusätzlich über eine Southern-Blot-Analyse durch direkte Hybridisierung der chromosomalen DNA mit einer Gensonde aus dem 3'-Bereich des *orf189*-Gens und aus dem *secA*-Gen nachgewiesen.

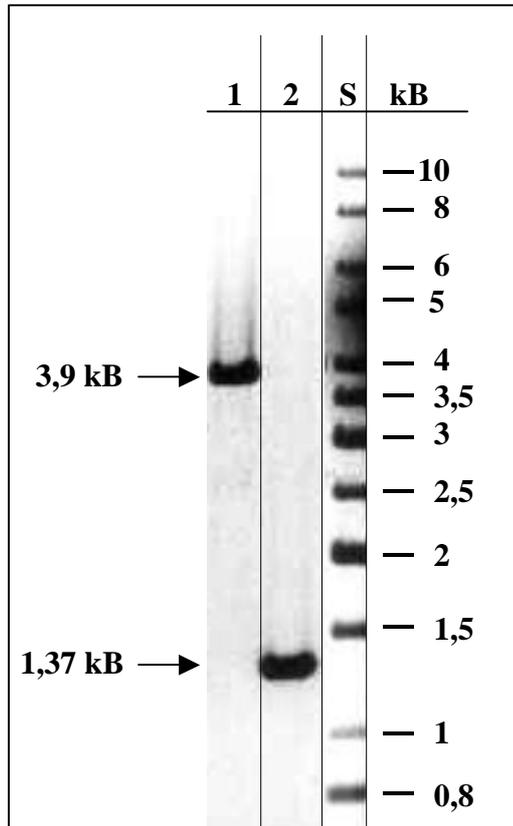


Abb. 24: PCR-Analyse zum Nachweis der *secA*-Deletion im Chromosom von *B. licheniformis* „E“.

Spur 1: 3,9 kB großes PCR-Produkt ausgehend von chromosomaler DNA ohne *secA*-Deletion,

Spur 2: 1,37 kB großes PCR-Produkt ausgehend von chromosomaler DNA nach *secA*-Deletion,

S: Größenstandard 1kB-Leiter (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

Southern-Blot-Analyse

Es wurden zwei der über PCR-Analyse identifizierten potentiellen *B. licheniformis* „E“ *secA*-Deletionsmutanten ausgewählt, um die *secA*-Deletion zusätzlich mit Hilfe der DNA-DNA-Hybridisierungstechnik mit einer Gensonde aus dem 3'-Bereich des *orf189*-Gens und dem vollständigen *secA*-Gen von *B. licheniformis* „E“ nachzuweisen. Aus früheren Experimenten ist bekannt, dass bei Verdau der chromosomalen DNA von *B. licheniformis* mit dem Restriktionsenzym *MunI* ein 5,5 kB großes Fragment entsteht, auf dem die Gene *fliT*, *orf189*, *secA* und *prfB* lokalisiert sind (Hintz, 1999). Nach Deletion des *secA*-Gens würde das *MunI*-Fragment um 2,5 kB kleiner, also nur 3 kB groß sein, während die Insertion des Deletionsvektors zu einem um die 4,6 kB des p*Eorf189*'*prfB*' Plasmids vergrößerten 10,1 kB großen *MunI* Fragment führen würde. Zum Nachweis der *secA*-Deletion wurde aus dem 3'-Ende des *orf189*-Gens und dem stromabwärts liegenden *secA*-Gen von *B. licheniformis* „E“ mittels PCR und den Primern Nr. 15 und Nr. 2 (s. Tab.3) unter Zugabe von Digoxigeninmarkiertem dUTP eine 3,2 kB große DNA-Sonde hergestellt. Die chromosomale DNA der über PCR identifizierten potentiellen *secA*-Deletionsmutanten wurde mit *MunI* verdaut, der Verdau im 0,8 % Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembranen übertragen. Im anschließenden Hybridisierungs-Experiment wurden mit der Gensonde Fragmente nachgewiesen, die entweder den 3'-Bereich vom *orf189*-Gen und das *secA*-Gen oder nach *secA*-Deletion nur noch den 3'-Bereich von *orf189* besitzen. Als Kontrolle wurde mit der

chromosomalen DNA von *B. licheniformis* „E“ und *B. licheniformis* „E“ mit dem integrierten Deletionsvektor pEorf189'prfB' (Integrationsmutante) ebenso verfahren. Bei der Präparation der chromosomalen DNA ist eine Koaufrreinigung von in den Zellen enthaltenen Plasmiden wahrscheinlich. Um im Southern-Blot-Experiment die durch die Plasmide pSubSecA und pEorf189prfB hervorgerufenen Signale leichter identifizieren zu können, wurden beide Plasmide nach *MunI*-Verdau ebenfalls im Agarosegel aufgetrennt und auf die Nylonmembran übertragen.

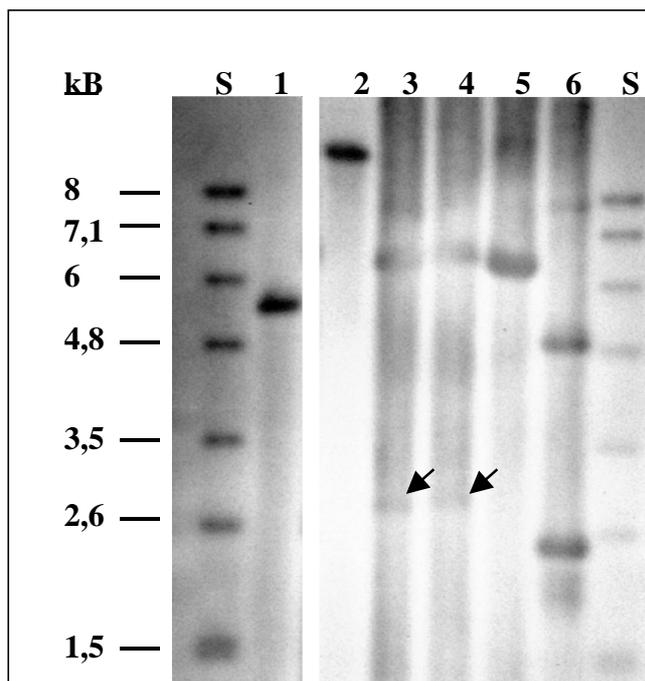


Abb. 25: Southern-Blot-Hybridisierung von *MunI* verdauter chromosomaler DNA und Plasmid DNA.

Spur 1 - 4: chromosomale DNA von

1): *B. licheniformis* „E“,

2): *B. licheniformis* „E“ Integrationsmutante

3) und 4): *B. licheniformis* „E“ *secA*-Deletionsmutanten

Spur 5 und 6: Plasmid-DNA

5): pSubSecA,

6): pEorf189'prfB'.

Die Pfeile markieren das 3,0 kB große *MunI*-Fragment der *B. licheniformis* „E“ *secA*-Deletionsmutanten (Spur 3 und 4),

S: DIG-VII Größenstandard (Roche Diagnostics, Mannheim)

Das Southern-Blot-Experiment (s. Abb. 25) bestätigte, dass es sich bei den über PCR identifizierten Klonen um *secA*-Deletionsmutanten handelt. Während man mit der *MunI* verdauten chromosomalen DNA von *B. licheniformis* „E“ das ohne *secA*-Deletion zu erwartende Hybridisierungssignal von 5,5 kB erhält, ist bei beiden *secA*-Deletionsmutanten das um den deletierten Bereich von 2,5 kB kleinere 3 kB große Signal zu erkennen (Spur 3 und 4). Die Hybridisierung mit *MunI* verdauter chromosomaler DNA der Integrationsmutante ergab wie erwartet das um die 4,6 kB des pEorf189'prfB'-Vektors vergrößerte *MunI*-Fragment von 10,1 kB (Spur 2). Das Hybridisierungssignal des 3 kB großen *MunI*-Fragments der *secA*-Deletionsmutanten ist etwas schwächer als das Signal des 5,5 kB (ohne *secA*-Deletion, Spur 1) oder des 10,1 kB (Integrationsmutante, Spur 2) Fragments, da beim 3 kB Fragment aufgrund der *secA*-Deletion nur noch der *orf189'*-Bereich mit der Sonde hybridisieren kann. Über der 3 kB Bande befindet sich in denselben Spuren zusätzlich jeweils noch eine ca. 6,6 kB große Bande. Diese entspricht dem koaufgereinigten *secA*-tragenden

MunI-Fragment des pSubSecA-Plasmids, das ebenfalls mit der Sonde hybridisiert. Der Deletionsvektor pE*orf189prfB* trägt einen Teil (3'-Bereich) des *orf189*-Gens, lässt sich aber nicht mit *MunI* verdauen. Daher wurden nach Hybridisierung mit der Sonde sowohl die relaxierte als auch eine superspiralisierte Form des unverdauten Vektors (bei ca. 5,2 kB bzw. bei 2,4 kB) nachgewiesen (Spur 6). Neben dem indirekten Nachweis über die PCR-Analyse konnte die Deletion des chromosomalen *secA*-Gens von *B. licheniformis* „E“ pSubSecA somit auch direkt mittels DNA-DNA-Hybridisierungstechnik mit der *orf189*'*secA*-Gensonde bestätigt werden. Die *secA*-Deletionsmutante mit dem pSubSecA-Plasmid wird im Folgenden mit *B. licheniformis* „E“ Δ *secA* pSubSecA bezeichnet. Der DNA-Bereich um die Deletion *orf189*- Δ *secA*-*prfB* wurde zusätzlich noch durch Sequenzierung überprüft.

Sequenzanalyse

Das *prfB*-Gen besitzt keinen eigenen Promotor, sondern wird normalerweise zusammen mit dem *secA*-Gen von dem stromaufwärts des *secA*-Gens lokalisierten σ^A -abhängigen Promotor aus transkribiert (s. I.3.). Um die Transkription des *prfB*-Gens auch in der *secA*-Deletionsmutante zu gewährleisten, sollte nur das *secA*-Strukturgen, aber nicht der *secA*-Promotor, deletiert werden. In der Sequenzanalyse wurde nun untersucht, ob der *secA*-Promotor im Chromosom der *B. licheniformis* „E“ *secA*-Deletionsmutante wie geplant vor der Ribosomenbindestelle des *prfB*-Gens lokalisiert ist. Um den Bereich *orf189*- Δ *secA*-*prfB* zu sequenzieren, wurde dieser zunächst mittels PCR ausgehend von chromosomaler DNA der *secA*-Deletionsmutante mit Primern (Primer wie bei PCR-Analyse: Nr. 15 und Nr. 16 s. Tab. 3, S. 26), die stromaufwärts des homologen *orf189*'-Bereichs bzw. stromabwärts des zu *prfB*' homologen Bereichs hybridisieren, amplifiziert. Die Sequenzierung (Sequenzierprimer: Nr. 17 und Nr. 18, s. Tab.3) des so erhaltenen 1,37 kB großen Fragments bestätigte die Deletion des *secA*-Gens. Der *secA*-Promotor ist erhalten geblieben und liegt 78 Bp vor der Ribosomenbindestelle des *prfB*-Gens (s. Abb. 25). Nach Deletion des chromosomalen *secA*-Gens befindet sich das essentielle *secA*-Gen jetzt nur noch auf dem Subtilisin-Plasmid und kann somit als Selektionsmarker fungieren. Der *secA*-Deletionsstamm *B. licheniformis* „E“ Δ *secA* pSubSecA sollte nun hinsichtlich *secA*-Expression, Plasmidstabilität und Subtilisin-Ausbeute charakterisiert werden.

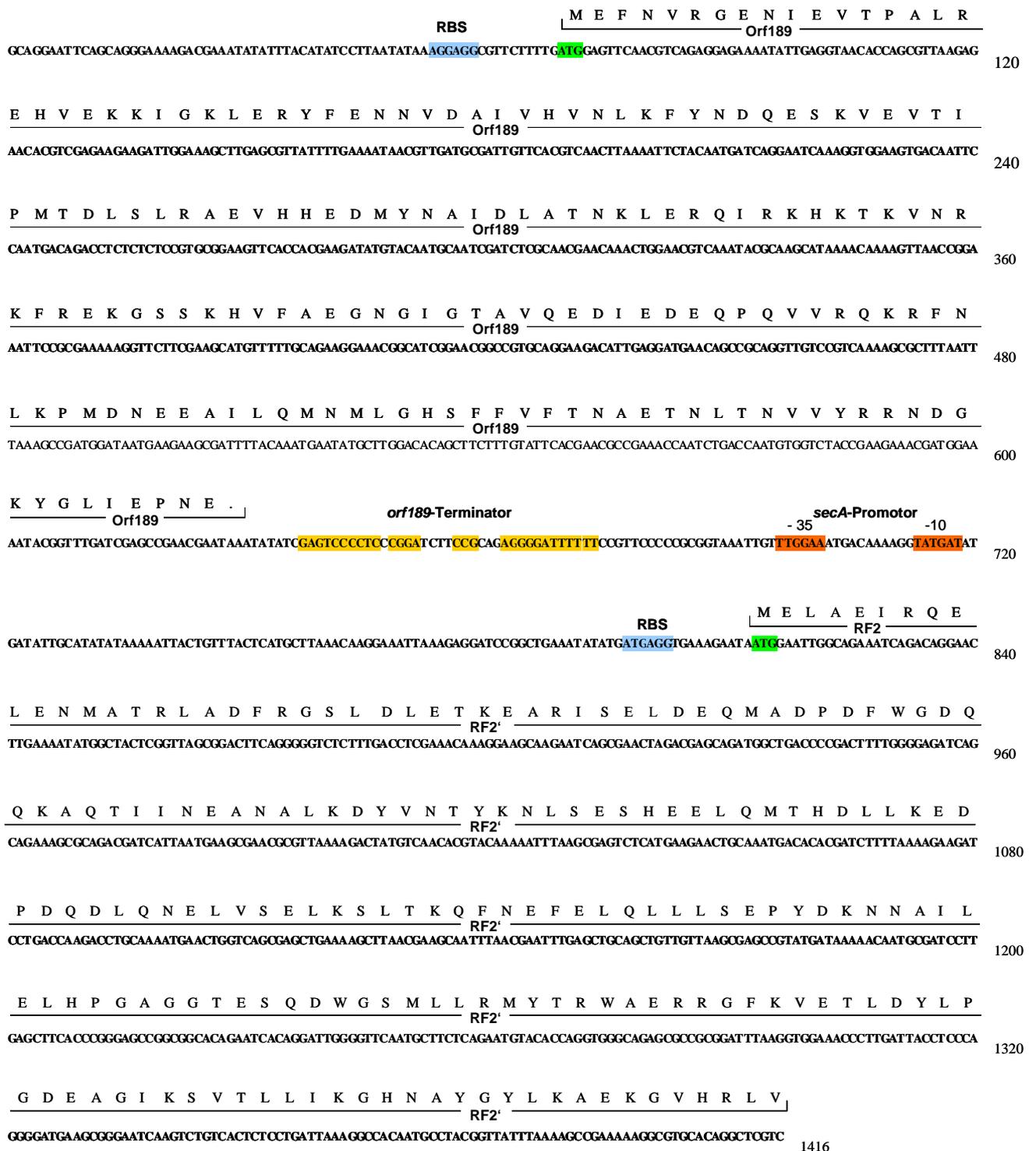


Abb. 25: Nukleotidsequenz *orf189-ΔsecA-prfB'* von *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$. Das *secA*-Strukturgen von *B. licheniformis* „E“ wurde so deletiert, dass sich der *secA*-Promotor 78 Bp vor der Ribosomenbindestelle des *prfB*-Gens befindet. Das *prfB*-Gen wird somit direkt vom *secA*-Promotor aus transkribiert.

2.2. Charakterisierung der *secA*-Deletionsmutante *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA

Nach Fertigstellung des *secA*-Selektionssystems wurde der so veränderte Stamm *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA bezüglich der *secA*-Expression, der Plasmidstabilität und der Subtilisin-Ausbeute untersucht und mit dem Ausgangsstamm *B. licheniformis* „E“ pSub und dem Stamm *B. licheniformis* „E“ pSubSecA ohne chromosomale *secA*-Deletion verglichen.

2.2.1. Das auf dem Plasmid pSubSecA lokalisierte *secA*-Gen führt zu einer Erhöhung der SecA-Proteinkonzentration in *B. licheniformis* „E“

Das *secA*-Selektionssystem hat zur Folge, dass das *secA*-Gen jetzt nicht mehr chromosomal, sondern auf dem in hoher Kopienzahl in der Zelle vorkommenden Plasmid pSubSecA lokalisiert ist. Es wurde daher im Western-Blot-Experiment untersucht, ob diese erhöhte *secA*-Gendosis zu einer erhöhten SecA-Proteinmenge in den Zellen führt.

Dazu wurden jeweils die Stämme *B. licheniformis* „E“ pSub, *B. licheniformis* „E“ pSubSecA und *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA im Schüttelkolben kultiviert und die SecA-Mengen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung miteinander verglichen. Wie bereits erwähnt (s. III.1.3.), wurde für *B. subtilis* gezeigt, dass die *secA*-Expression ihr Maximum zum Zeitpunkt t_0 beim Übergang von exponentieller zu stationärer Wachstumsphase erreicht und mit dem Einsetzen der stationären Wachstumsphase wieder auf ein niedriges Niveau absinkt (Herbort *et al.*, 1999). Die bereits exprimierten SecA-Proteine sind über viele Stunden stabil bis sie in Folge des normalen Proteinumsatzes abgebaut werden (Takamatsu *et al.*, 1994). Aufgrund der nahen Verwandtschaft zu *B. subtilis* ist bei *B. licheniformis* von einer ähnlichen zeitlichen Regulation der *secA*-Expression auszugehen. Die Probenahme erfolgte daher zum Zeitpunkt t_0 und während der stationären Wachstumsphase sechs Stunden später zum Zeitpunkt t_6 . Mit den Zellen wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und diese mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Nachweis der SecA-Proteine erfolgte im Western-Blot-Experiment mit Antikörpern gegen das *B. subtilis* SecA-Protein (Abb. 26).

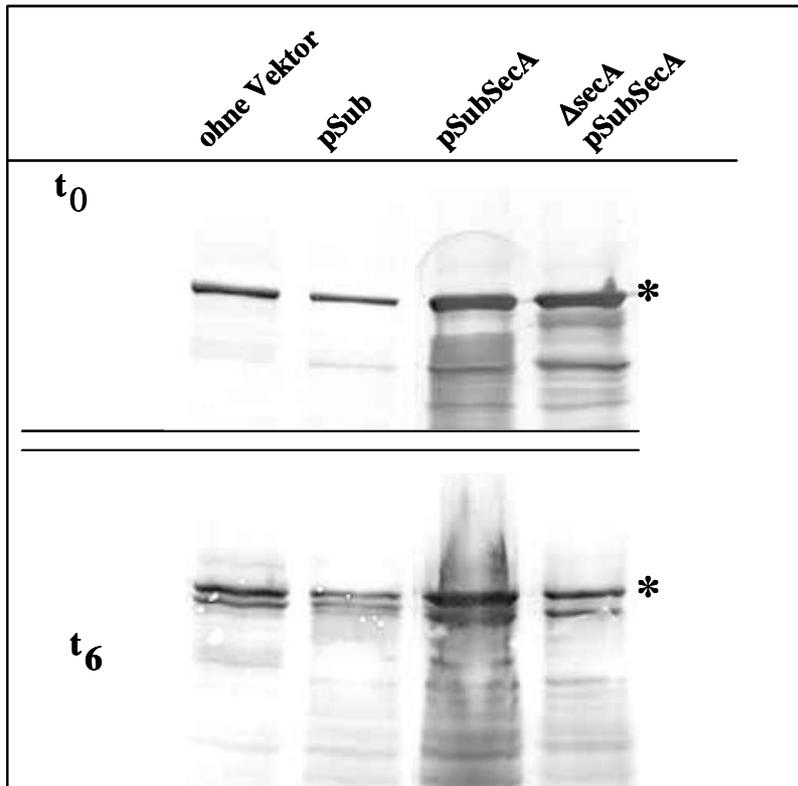


Abb. 26: Vergleich der SecA-Mengen im Western-Blot-Experiment von *B. licheniformis* „E“ ohne Vektor (Spur 1), bzw. mit pSub (Spur 2), oder mit pSubSecA (Spur 3) und von *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ mit pSubSecA (Spur 4) zum Zeitpunkt t_0 und t_6 . Die Bandenhöhe des SecA-Proteins (95 kDa) ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Im Western-Blot-Experiment zeigte sich, dass insbesondere zum Zeitpunkt t_0 die Stämme *B. licheniformis* „E“ pSubSecA und *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA im Vergleich zum Stamm ohne Plasmid und im Vergleich zum Ausgangsstamm *B. licheniformis* „E“ pSub eine deutlich erhöhte SecA-Menge aufweisen. Unterhalb der SecA-Banden waren trotz Aufschlusses der Zellen unter Zusatz des Protease-Hemmers „Complete“ (Boehringer, Mannheim) SecA-Abbauprodukte zu finden. „Complete“ hemmt nach Angaben des Herstellers Serin-, Cystein- und Metalloproteasen. Es wurde gezeigt, dass durch Zusatz von „Complete“ die Proteasen im Kulturüberstand von *B. subtilis* vollständig inhibiert werden (Meens *et al.*, 1997). Da trotz „Complete“ ein Abbau von SecA-Protein zu beobachten war, funktioniert die Hemmung der Proteasen in diesem Fall entweder nicht vollständig, oder die am Abbau von SecA beteiligten Proteasen gehören einer anderen Proteaseklasse an. Vergleicht man im Western-Blot die SecA-Banden der Zellen ohne Plasmid und der Zellen mit dem Plasmid pSub, so scheint es bei Expression des plasmidkodierten Subtilisins zu einem stärkeren Abbau des SecA-Proteins zu kommen. Das könnte bedeuten, dass der Protease-Hemmer „Complete“ tatsächlich keine vollständige Hemmung des plasmidkodierten Subtilisins bewirkt.

Zum Zeitpunkt t_6 wurde in Zellen der *secA*-Deletionsmutante im Vergleich zu Zellen ohne *secA*-Deletion mit dem Plasmid pSubSecA weniger SecA-Protein nachgewiesen. Dies lässt sich entweder durch einen unvollständigen Zellaufschluss oder durch einen schon weiter fortgeschrittenen Abbau des SecA-Proteins begründen, da zum Zeitpunkt t_0 vergleichbare Mengen SecA in Zellen beider Stämme vorhanden waren.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass das auf dem Subtilisin-Plasmid lokalisierte *secA*-Gen tatsächlich zu einer erhöhten SecA-Menge in den Zellen führt. Ein Vergleich der Subtilisin-Ausbeuten von *B. licheniformis* „E“ mit dem pSub- oder dem pSubSecA-Plasmid sollte schließlich zeigen, ob die erhöhte SecA-Menge auch einen positiven Einfluss auf die Subtilisin-Ausbeute hat (s. III.2.2.3.).

2.2.2. Das Plasmid pSubSecA ist in der *secA*-Deletionsmutante *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ stabil

Vor dem Vergleich der Subtilisin-Ausbeuten der verschiedenen *B. licheniformis* „E“ Stämme wurde zunächst die Stabilität des pSubSecA-Plasmids in der Deletionsmutante *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ und die Stabilität der Plasmide pSubSecA und pSub im Ausgangstamm *B. licheniformis* „E“ ohne *secA*-Deletion untersucht. Dazu wurden die Zellen jeweils ohne Antibiotikum im Medium kultiviert und alle 24 h auf LB-Agarplatten vereinzelt. Die nach Vereinzeln erhaltenen Kolonien wurden mittels „Skim-Milk“-Platten (s. III.2.1.1.) auf Proteaseaktivität hin untersucht. Die Anwesenheit bzw. der Verlust des Plasmids wurde zusätzlich durch Plasmidpräparation überprüft. Die Stabilität der Plasmide im jeweiligen Stamm wurde dazu unter zwei verschiedenen Kultivierungsbedingungen im Schüttelkolben untersucht. Im ersten Schüttelkolbenexperiment wurden die Kulturen alle 12 h in frisches LB-Medium überimpft. Dagegen wurden die Kulturen im zweiten Schüttelkolbenexperiment unter den gleichen Bedingungen, die auch zur Bestimmung der Subtilisin-Ausbeuten gewählt wurden (s. II.4.1.2. und III.2.2.3.), bis in die späte stationäre Wachstumsphase unter ständiger pH-Kontrolle bei pH 7,2 kultiviert.

1. Schüttelkolbenexperiment

Die genetische Stabilität des Subtilisin-Plasmids pSub wurde in *B. licheniformis* „E“ und die des *secA*-tragenden Subtilisin-Plasmids pSubSecA in der *secA*-Deletionsmutante *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ ohne Antibiotika im Medium untersucht. Dazu wurde ausgehend von je einer einzelnen Kolonie eine ÜNK angezogen und mit dieser jeweils 14 ml LB-Medium zu einer OD₆₀₀ von 0,05 beimpft. Nach jeweils 12 h wurden die Kulturen in frisches Medium überimpft und hierbei wiederum eine OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt. Die Kultivierung erfolgte über 8 Tage. Jeden Tag wurden Verdünnungsreihen ausplattiert und eine Auswahl der erhaltenen Einzelkolonien mittels „Skim-Milk“-Platten auf ihre Proteaseaktivität hin getestet. Zu jedem Kultivierungszeitpunkt zeigten alle getesteten Klone des Stammes *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA Protease-Aktivität, während beim Stamm *B. licheniformis* „E“ einzelne Klone keine Proteaseaktivität mehr aufwiesen (s. Tabelle 4). Nach Kultivierung über einen

Zeitraum von 8 Tagen hatten 6 von 104 getesteten Klonen des *B. licheniformis* „E“ Stammes das Plasmid pSub verloren.

Tab. 4: Untersuchung der genetischen Stabilität von pSub in *B. licheniformis* „E“ ohne *secA*-Deletion und pSubSecA im *secA*-Deletionsstamm *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ (1. Schüttelkolbenexperiment).

Zeit in Tagen	<i>B. licheniformis</i> „E“ pSub			<i>B. licheniformis</i> „E“ $\Delta secA$ pSubSecA		
	Gesamtzahl untersuchter Klone	Klone mit Proteaseaktivität		Gesamtzahl untersuchter Klone	Klone mit Proteaseaktivität	
		Anzahl	%		Anzahl	%
1	72	72	100	72	72	100
2	72	72	100	70	70	100
3	72	71	98,6	49	49	100
4	52	52	100	52	52	100
5	78	78	100	78	78	100
6	78	77	98,7	78	78	100
7	78	77	98,7	77	77	100
8	104	98	94,2	104	104	100

2. Schüttelkolbenexperiment

Im zweiten Ansatz wurden die genetische Stabilität des pSubSecA-Plasmids in der *secA*-Deletionsmutante *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ und die Stabilität der Plasmide pSubSecA und pSub in *B. licheniformis* „E“ ohne *secA*-Deletion während eines Schüttelkolbenversuchs zur Bestimmung der Subtilisin-Ausbeuten untersucht. Je Stamm wurden zwei Kultivierungen, wie im Kapitel II.4.1.2. beschrieben, durchgeführt. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden je Kultur Zellen entnommen und diese in einer solchen Verdünnung auf LB-Agarplatten ausgestrichen, dass Einzelkolonien erhalten wurden. Von den Einzelkolonien wurden je Ansatz 52 ausgewählt (zwei Ansätze pro Stamm) und diese zum Test auf Proteaseaktivität auf „Skim-Milk“-Platten übertragen. Das Ergebnis des Stabilitätstests ist in Tabelle 5 zusammengefasst. Der Verlust bzw. das Vorhandensein des jeweiligen Plasmids wurde zusätzlich durch Plasmidpräparation anhand von je vier ausgewählten Klonen, die zuvor auf „Skim-Milk“-Platten getestet wurden, bestätigt (Abb. 27). Wenn der Proteasetest wie bei *B. licheniformis* „E“ pSub (s.u.) sowohl Klone mit als auch ohne Hofbildung zeigte, wurden zur Plasmidpräparation je zwei Klone mit Proteaseaktivität und zwei ohne ausgewählt.

Bereits nach 24-stündiger Kultivierung ohne Antibiotikum konnte bei keinem der 52 untersuchten Klone des *B. licheniformis* „E“ pSubSecA ohne *secA*-Deletion noch Proteaseaktivität nachgewiesen werden. Die untersuchten Klone des Ausgangsstammes *B. licheniformis* „E“ pSub und der *secA*-Deletionsmutante *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$

pSubSecA zeigten dagegen alle Proteaseaktivität. Das Ergebnis des „Skim-Milk“-Plattentests wurde durch die Plasmidpräparation bestätigt (s. Abb. 27, 24 h). Bei den Stämmen *B. licheniformis* „E“ pSub und *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA konnte bei allen ausgewählten vier Klonen das jeweilige Plasmid präpariert werden, während alle vier Klone vom Stamm *B. licheniformis* „E“ pSubSecA ihr Plasmid verloren hatten.

Tab. 5: Untersuchung der genetischen Stabilität von pSubSecA im *secA*-Deletionsstamm *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ und von pSubSecA und pSub in *B. licheniformis* „E“ ohne *secA*-Deletion (2. Schüttelkolbenexperiment). Es wurden jeweils 52 Klone getestet.

<i>B. licheniformis</i> „E“	Klone mit Proteaseaktivität					
	24 h		48 h		72 h	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
pSub	52	100	44	84,6	4	7,7
	52	100	46	88,5	5	9,6
pSubSecA	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
$\Delta secA$ pSubSecA	52	100	52	100	52	100
	52	100	52	100	52	100

Im Stamm *B. licheniformis* „E“ gibt es keinen Selektionsdruck zum Erhalt der Plasmide pSub und pSubSecA. Ein Verlust dieser Plasmide hat somit keine negativen Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Da die Zellen im Gegensatz zum pSub-Plasmid vom pSubSecA-Plasmid bereits nach 24 h kuriert sind, scheint letzteres für die Zellen ungünstig zu sein. Der einzige Unterschied zwischen dem pSub- und dem pSubSecA-Plasmid besteht im *secA*-Gen, welches sich zusätzlich auf dem pSub-Plasmid befindet. Die Expression des auf dem Plasmid lokalisierten *secA*-Gens bewirkte eine Zunahme von SecA-Protein in den Zellen (s. III.2.2.1.), die jedoch wie bei *B. subtilis* keinen negativen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zellen haben sollte (Frings, 1995). Möglicherweise haben *B. licheniformis* „E“ Zellen, die sowohl Subtilisin als auch SecA in großen Mengen überproduzieren, aufgrund der mit der hohen Syntheseleistung verbundenen größeren metabolischen Last einen Wachstumsnachteil gegenüber solchen Zellen, die das Plasmid verloren haben.

Nach 48-stündiger Kultivierungszeit hatten auch 11,5 % bzw. 15,4 % der untersuchten Klone des Ausgangsstammes *B. licheniformis* „E“ das pSub-Plasmid verloren. Nach weiteren 24 h trugen sogar nur noch 7,7 % bzw. 9,6 % der *B. licheniformis* „E“ Zellen das Plasmid pSub. In der *secA*-Deletionsmutante erwies sich das pSubSecA-Plasmid dagegen über den gesamten Kultivierungszeitraum als stabil. Auch nach 72-stündiger Kultivierungszeit zeigten noch alle 52 Klone Proteaseaktivität. Die Plasmidpräparation bestätigte zusätzlich, dass sich das pSubSecA-Plasmid auch nach 72-stündiger Kultivierung noch stabil in den Zellen befand (s. Abb. 27, 72 h).

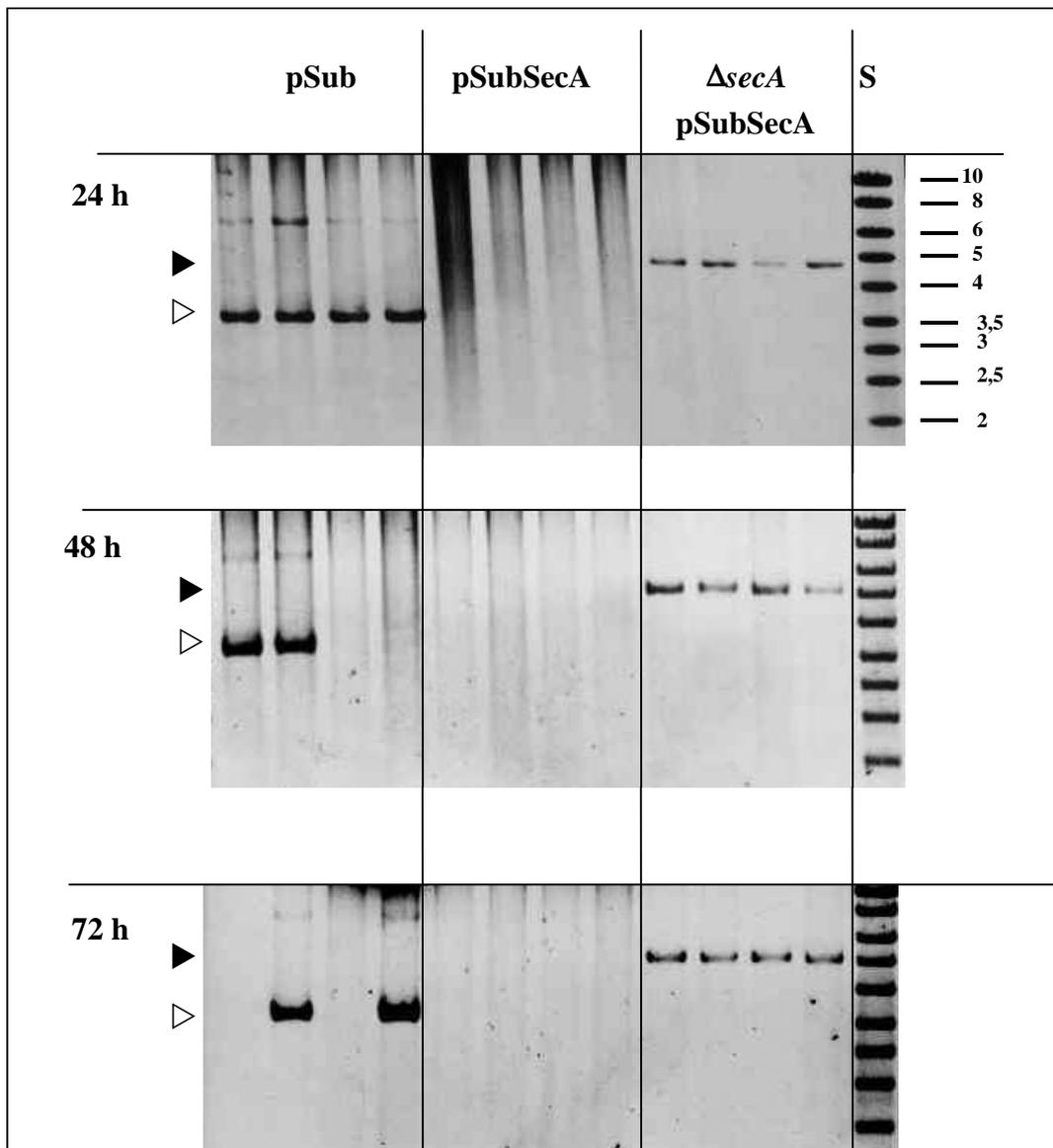


Abb. 27: Kontrolle der nach 24 h, 48 h und 72 h Kultivierung ohne Antibiotikum im Vereinzlungsausstrich erhaltenen Klone auf Plasmid-Verlust. Es wurden je Stamm *B. licheniformis* „E“ pSub, *B. licheniformis* „E“ pSubSecA und *B. licheniformis* „E“ ΔsecA pSubSecA 4 Klone ausgewählt, die vorher auf „Skim-Milk“-Platten auf ihre Protease-Aktivität hin getestet wurden. Wenn der Proteasetest wie bei *B. licheniformis* „E“ pSub sowohl Klone mit als auch ohne Hofbildung zeigte, wurden je zwei Klone mit und zwei ohne Proteaseaktivität ausgewählt. Laufhöhe der unverdauten Plasmide ► pSubSecA, ▷ pSub; S: Größenstandard 1kB-Leiter (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

Beide Experimente zeigen, dass bei Kultivierung in LB-Medium ohne Antibiotikazugabe das *secA*-tragende Subtilisin-Plasmid pSubSecA im *secA*-Deletionsstamm stabil ist, während das Subtilisin-Plasmid pSub im Stamm ohne chromosomale *secA*-Deletion im Laufe der Kultivierung verloren geht. Der Verlustanteil des pSub-Plasmids ist im zweiten Schüttelkolbenexperiment deutlich höher, obwohl die Kultivierung hier nur über 72 h im Vergleich zu 8-tägiger Kultivierung im ersten Experiment erfolgte. Wichtig ist hierbei, dass die Kulturen im ersten Experiment alle 12 h in frisches Medium überimpft wurden, während

die Kulturen im zweiten Experiment nach Animpfen durchgehend bis zur späten stationären Wachstumsphase weiter kultiviert wurden. Die Synthese vieler sekretorischer Proteine und die Proteinsekretion selbst setzen genau beim Übergang von spätexponentieller zu stationärer Wachstumsphase ein. Zellen, die eines der pSub-Derivate besitzen, beginnen daher zu diesem Zeitpunkt in großer Menge Subtilisin zu synthetisieren und zu sekretieren. Der Verlust des pSub-Plasmids bietet daher vielleicht besonders während dieser Sekretionsphase einen Selektionsvorteil, da das von der Zelle in LB-Medium nicht benötigte plasmidkodierte Subtilisin dann nicht hergestellt und sekretiert werden muss.

Zur industriellen Subtilisin-Produktion werden die Kulturen wie im zweiten Experiment auch bis zur späten stationären Wachstumsphase kultiviert. Es ist daher anzunehmen, dass auch im Fermenter ohne Selektionsdruck auf Erhalt des pSub-Plasmids ein großer Anteil der Zellen das Plasmid während der Fermentation verliert und daher nicht mehr zur Subtilisin-Produktion beitragen kann. Das pSubSecA-Konstrukt war in der *secA*-Deletionsmutante über den gesamten Kultivierungszeitraum stabil, was zu einer deutlichen Steigerung der Subtilisin-Ausbeuten in industriellen Fermentationsprozessen führen könnte.

2.2.3. Charakterisierung des *secA*-Selektionssystems bezüglich der Subtilisin-Ausbeuten

Im nächsten Schritt wurde nun untersucht, ob das konstruierte *secA*-Selektionssystem einen positiven Einfluss auf die mit *B. licheniformis* „E“ erzielten Subtilisin-Ausbeuten hat. Im Kapitel III.2.2.1. wurde gezeigt, dass die Erhöhung der *secA*-Gendosis aufgrund des nicht mehr chromosomal, sondern jetzt auf dem Plasmid pSubSecA lokalisierten *secA*-Gens, zu einer erhöhten SecA-Menge in der Zelle führt. Diese könnte einerseits, wie für das sekretorische Protein Levansucrase gezeigt (Leloup *et al.*, 1999), auch die Sekretion des Subtilisins verbessern. Andererseits führt die zusätzliche Klonierung des *secA*-Gens in das Subtilisin-Plasmid aufgrund der daraus resultierenden zusätzlichen *secA*-Expression wahrscheinlich zu einer erhöhten metabolischen Belastung der Zelle. Die Motivation zur Konstruktion des *secA*-Selektionssystems war die Verbesserung der Stabilität des Subtilisin-Plasmids ohne Antibiotikum im Medium, da die industrielle Fermentation ebenfalls ohne Antibiotikazugabe durchgeführt wird. In Abschnitt III.2.2.2. wurde gezeigt, dass das *secA*-Selektionssystem das pSubSecA-Plasmid stabil bis zum Ende der Kultivierung in der *secA*-Deletionsmutante hält, während *B. licheniformis* „E“ das Ausgangsplasmid pSub im Laufe der Kultivierung verliert. Das *secA*-Selektionssystem bewirkt somit, dass die Zellen der gesamten Kultur bis zum Ende der Kultivierung zur Subtilisin-Synthese beitragen, so dass insgesamt eine größere Subtilisin-Ausbeute erzielt werden kann. Ein Vergleich der im Labormaßstab sekretierten Subtilisin-Mengen von der *secA*-Deletionsmutante *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA und von *B. licheniformis* „E“ mit dem Ausgangsplasmid pSub bzw. mit dem

Plasmid pSubSecA sollte zeigen, ob das *secA*-Selektionssystem nun insgesamt zu einer Verbesserung oder zu einer Verringerung der Subtilisin-Ausbeute führt. Dazu wurden Schüttelkolbenexperimente mit und ohne Antibiotikum im Medium unter konstanten pH-Bedingungen (pH 7,2) in der Anlage der Firma DASGIP (s. II.4.1.2.) durchgeführt. Durch die Kultivierung mit Antibiotikum sollte zunächst unabhängig von der Stabilität der Plasmide untersucht werden welchen Einfluss die erhöhte *secA*-Expression, also sowohl die größere metabolische Belastung als auch die erhöhte SecA-Menge, auf die Subtilisin-Ausbeute hat. In der anschließenden Kultivierung ohne Antibiotikum sollte dann untersucht werden, wie sich zusätzlich der Verlust des pSub-Plasmids durch *B. licheniformis* „E“ im Vergleich zur vollständigen Stabilität des pSubSecA-Plasmids in *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ Zellen auf die sekretierte Subtilisin-Menge auswirkt.

Bestimmung der Subtilisin-Ausbeuten unter Antibiotikazugabe

Die Kultivierung der Stämme *B. licheniformis* „E“ pSub, *B. licheniformis* „E“ pSubSecA und *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA zur Bestimmung der Subtilisin-Ausbeuten erfolgte mit 15 µg/ml Tetracyclin im Medium, wie im Kapitel II.4.1.2. beschrieben. Je Stamm wurden vier unabhängige Kulturen angesetzt und die Subtilisin-Aktivitäten in den Kulturüberständen nach 48 h und 72 h mittels AAPF-Test (s. II.5.1.) vierfach bestimmt. Dabei wurde in den Kulturüberständen der 72 h Proben jeweils eine etwas höhere Subtilisin-Menge nachgewiesen. Im Folgenden werden daher die nach 72-stündiger Kultivierung pro ml Kulturüberstand berechneten Subtilisin-Aktivitäten verglichen, die in Abb. 28 dargestellt sind.

Der Stamm *B. licheniformis* „E“ mit dem Subtilisin-Plasmid pSub zeigte eine Aktivität von 94,1 U/ml Kulturüberstand, der gleiche Stamm mit dem Plasmid pSubSecA wies im Mittel dagegen mit 49,1 U/ml Kulturüberstand nur 52,5 % dieser Aktivität auf. Die höchste Aktivität wurde mit 113,5 U/ml Kulturüberstand mit der *secA*-Deletionsmutante *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA erzielt. Das *secA*-Selektionssystem hat somit keinen negativen Einfluss auf die Subtilisin-Ausbeute. Man findet im Gegenteil sogar eine verbesserte Ausbeute, die um 18,8 % größer ist als die, die mit dem Ausgangstamm *B. licheniformis* „E“ pSub erzielt wurde. Bei Kultivierung mit Antibiotikum im Medium sollten alle Plasmide stabil in den Zellen verbleiben. Die im Vergleich zum Ausgangstamm verbesserte Subtilisin-Ausbeute resultiert somit nicht aus einer durch das *secA*-Selektionssystem verbesserten Stabilität des Plasmids. Vielmehr könnte die aufgrund der erhöhten *secA*-Genexpression erhöhte SecA-Proteinmenge in den Zellen für die verbesserte Sekretion des Subtilisins verantwortlich sein. Eine solche verbesserte Subtilisin-Sekretion sollte dann allerdings auch mit dem *B. licheniformis* „E“ Stamm ohne *secA*-Deletion im Chromosom und dem Plasmid pSubSecA erzielt werden. Die für diesen Stamm ermittelte Subtilisin-Aktivität ist entgegen den Erwartungen aber nur etwas mehr als halb so groß (52,5 %) wie die, die mit dem Plasmid pSub erzielt wurde. Parallel zur Probennahme für die Aktivitätsbestimmung wurden

zusätzliche Zellen entnommen und diese in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Von den Verdünnungsausstrichen wurden je Kultur 52 Einzelkolonien ausgewählt und diese zum Test auf Proteaseaktivität auf „Skim-Milk“-Agarplatten übertragen. Alle Klone der Stämme *B. licheniformis* „E“ pSub und *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA bildeten klare Höfe auf den Milch-Platten aus, während *B. licheniformis* „E“ Klone ohne *secA*-Deletion aber mit dem pSubSecA-Plasmid keine oder nur sehr schwache Hofbildung zeigten. Je Stamm wurden vier Klone ausgewählt und ausgehend von je einer ÜNK eine Plasmidpräparation durchgeführt. Das Ergebnis bestätigt den Befund des „Skim-Milk“-Plattentests: Die Klone aus der ursprünglichen *B. licheniformis* „E“ pSubSecA Kultur hatten erstaunlicherweise trotz Tetracyclin im Medium das Plasmid verloren. Das gleiche Plasmid wurde dagegen in allen untersuchten Klonen der *secA*-Deletionsmutante *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ nachgewiesen, und auch das Plasmid pSub ist mit Tetracyclin im Medium in *B. licheniformis* „E“ Zellen mit chromosomalem *secA*-Gen stabil. Die geringe Aktivität, die mit dem Stamm *B. licheniformis* „E“ pSubSecA erzielt wurde, lässt sich somit durch das Fehlen des pSubSecA-Plasmids erklären. Eine Möglichkeit wäre, dass das Plasmid über den 2,7 kB großen homologen Bereich des *secA*-Gens in das Chromosom integriert wurde. Es ist aber auch möglich, dass das pSubSecA-Plasmid tatsächlich ganz verloren gegangen ist und es sich bei den Zellen ohne Plasmid um spontan tetracyclinresistente Mutanten handelt. Wenn den Zellen durch das pSubSecA Plasmid ein Wachstumsnachteil entsteht, würden spontan resistente Zellen während der Kultivierung angereichert.

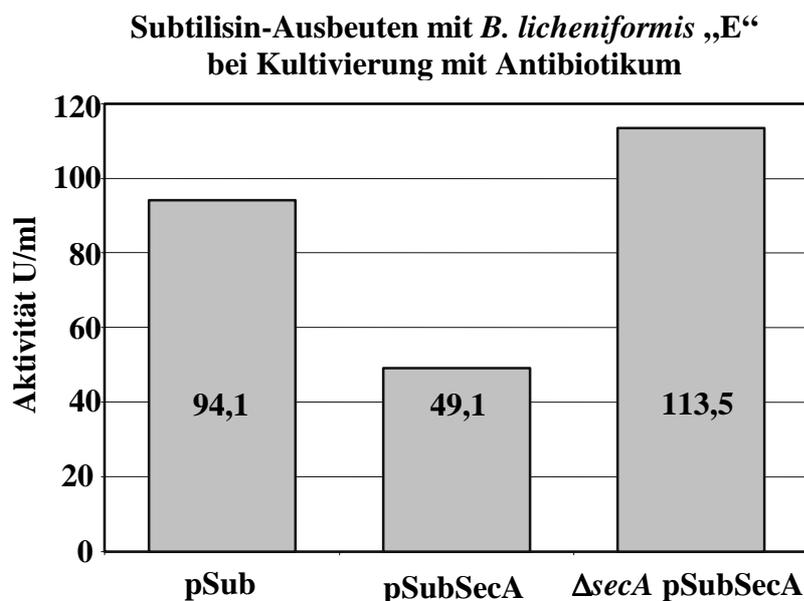


Abb. 28: Vergleich der nach 72 h Kultivierung mit Antibiotikum pro ml Kulturüberstand ermittelten Subtilisin-Aktivitäten der Stämme *B. licheniformis* „E“ pSub, *B. licheniformis* pSubSecA und *B. licheniformis* $\Delta secA$ pSubSecA. Die dargestellten Aktivitäten wurden aus je vier unabhängigen Kulturen und nach je vierfacher Bestimmung mittels AAPF-Test berechnet.

Bestimmung der Subtilisin-Ausbeuten ohne Antibiotikazugabe

Zur Ermittlung der Subtilisin-Aktivitäten pro ml Kulturüberstand bei Kultivierung ohne Antibiotikum im Medium wurden die Stämme *B. licheniformis* „E“, *B. licheniformis* „E“ pSub, *B. licheniformis* „E“ pSubSecA und *B. licheniformis* „E“ Δ secA pSubSecA wieder, wie im Kapitel II.4.1.2. beschrieben, bei konstantem pH-Wert von 7,2 kultiviert. Die ÜNK der plasmidhaltigen Stämme wurden mit 15 µg/ml Tetracyclin angezogen. Je Stamm wurden ausgehend von zwei unabhängigen ÜNK je zwei Hauptkulturen ohne Zusatz von Antibiotikum beimpft. Nach einer Kultivierungszeit von 48 h und 72 h wurden Proben entnommen und die Proteine der Kulturüberstände zum Nachweis des Subtilisins im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 29). Die Kulturüberstände wurden außerdem zur Bestimmung der Subtilisin-Aktivitäten eingesetzt, die jeweils fünffach mittels AAPF-Test erfolgte (s. II.5.1.).

Nach Auftrennung der Kulturüberstände im SDS-Polyacrylamidgel findet man bei Stämmen mit den Plasmiden pSub oder pSubSecA zu beiden Zeiten eine Bande in dem für reifes Subtilisin zu erwartenden Bereich von ca. 27 kDa. Ohne Plasmid ist dagegen keine Bande in diesem Bereich zu sehen, obwohl das chromosomal kodierte Subtilisin (Subtilisin „Carlsberg“) ebenfalls eine molekulare Masse von ca. 27 kDa aufweist. Die Konzentration des chromosomal kodierten Subtilisins scheint für einen Nachweis im Coomassie-gefärbten Gel zu gering zu sein. Im Kulturüberstand von *B. licheniformis* „E“ ohne Plasmid finden sich aber Banden höherer Molekulargewichte, die in den Überständen der anderen Stämme wahrscheinlich durch die großen Mengen Subtilisin abgebaut wurden. Die Stämme *B. licheniformis* „E“ pSub und *B. licheniformis* „E“ Δ secA pSubSecA weisen im Vergleich zu *B. licheniformis* „E“ pSubSecA eine sehr viel größere Menge Subtilisin auf. Dieses Ergebnis korreliert mit dem Ergebnis des Stabilitätstests (s. III.2.2.2.), der zeigte, dass *B. licheniformis* „E“ pSubSecA Zellen im Gegensatz zu den anderen Stämmen das Plasmid bereits nach 24 h verloren haben. In diesem Stamm kann also nur zu frühen Zeiten Subtilisin vom Plasmid pSubSecA aus exprimiert werden, wodurch sich die geringere Menge im Kulturüberstand erklärt.

Im Folgenden werden die nach 72-stündiger Kultivierung mittels AAPF-Test in den Kulturüberständen nachgewiesenen Subtilisin-Aktivitäten miteinander verglichen (s. Abb. 30), da die zu diesem Zeitpunkt ermittelten Aktivitäten höher waren als nach 48-stündiger Kultivierung. Ohne Plasmid und ohne Antibiotikum ergibt sich für *B. licheniformis* „E“ eine Aktivität von 83,8 U/ml Kulturüberstand. Die Expression des Subtilisin-Gens, ausgehend von Plasmid pSub, im gleichen Stamm führte zu einer fast doppelt so hohen Aktivität von 155 U/ml Kulturüberstand. Dagegen zeigten Kulturen, die mit *B. licheniformis* „E“ pSubSecA Zellen beimpft wurden, nur eine zu Kulturen ohne Plasmid vergleichbare Aktivität. Dies war zu erwarten, da *B. licheniformis* „E“ pSubSecA Zellen das Plasmid schon während der ersten 24 h der Kultivierung verlieren (s. III.2.2.2.). Allerdings wurde im SDS-Polyacrylamidgel

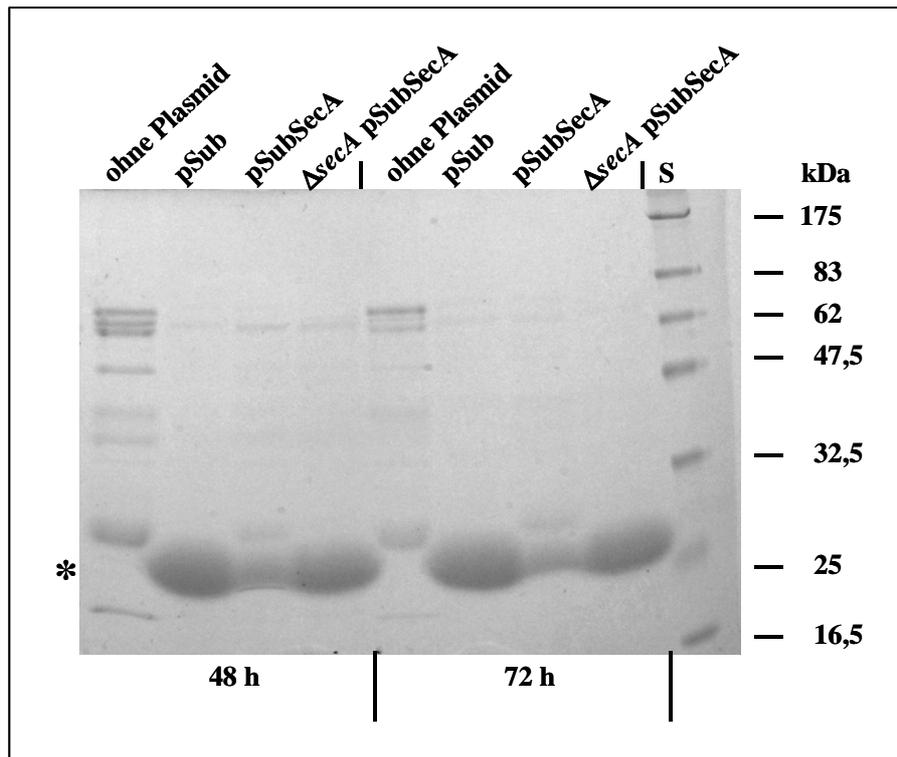


Abb. 29: Auftrennung der Kulturüberstände im SDS-Polyacrylamidgel von *B. licheniformis* „E“ mit pSub bzw. pSubSecA bzw. ohne Plasmid und von *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA nach 48- und 72-stündiger Kultivierung ohne Antibiotikum. Die Bandenhöhe des reifen Subtilisins (ca. 27 kDa) ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet. S: Größenstandard „Broad Range“ (BioLabs)

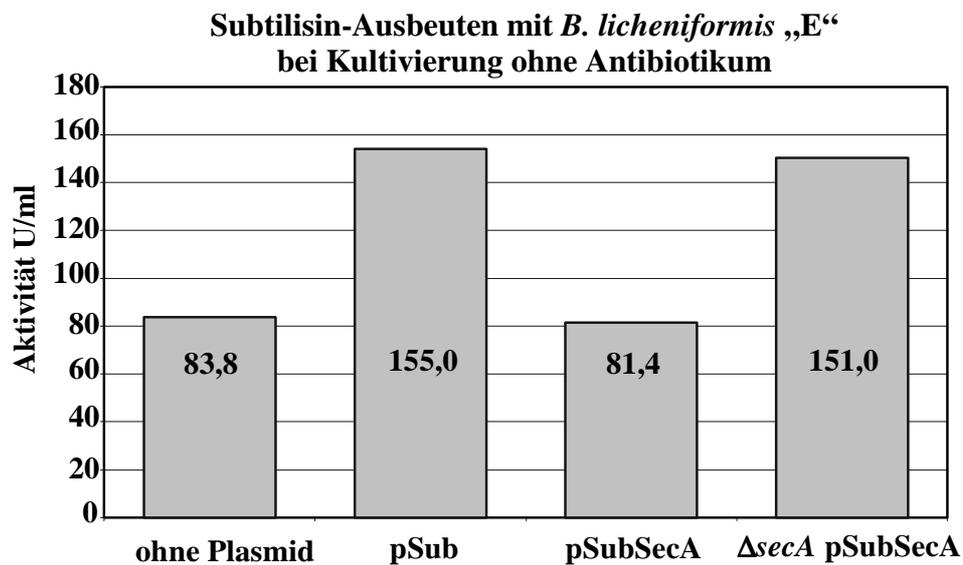


Abb. 30: Vergleich der nach 72 h Kultivierung ohne Antibiotikum pro ml Kulturüberstand ermittelten Subtilisin-Aktivitäten der Stämme *B. licheniformis* „E“ ohne Plasmid, *B. licheniformis* „E“ pSub, *B. licheniformis* pSubSecA und *B. licheniformis* $\Delta secA$ pSubSecA. Die dargestellten Aktivitäten wurden aus je zwei unabhängigen Kulturen und nach je fünffacher Bestimmung mittels AAPF-Test berechnet.

in den Kulturüberständen von *B. licheniformis* „E“ pSubSecA im Gegensatz zu denen des Kontrollstammes ohne Plasmid eine deutliche Menge Subtilisin nachgewiesen, die jedoch nach den gemessenen Aktivitäten zu urteilen nicht aktiv zu sein scheint. Der *secA*-Deletionsstamm mit dem Plasmid pSubSecA wies mit 151 U/ml Kulturüberstand eine ähnlich hohe Aktivität auf wie *B. licheniformis* „E“ pSub. Das *secA*-Selektionssystem führte unter diesen Bedingungen also weder zu einer deutlichen Verringerung noch zu einer Verbesserung der Subtilisin-Ausbeuten. Insgesamt liegen die Aktivitäten deutlich über denen, die bei Kultivierung mit Tetracyclin im Medium erzielt wurden. Tetracyclin greift in die Proteinbiosynthese ein und bewirkt so, wie schon im Kapitel III.1. erwähnt, möglicherweise eine Verringerung der in den Zellen synthetisierten Subtilisin-Menge.

Ein Vergleich der jeweils mit bzw. ohne Antibiotikum durchgeführten Schüttelkolbenexperimente sollte zeigen, wie sich die durch das *secA*-Selektionssystem verbesserte Stabilität des Subtilisin-Plasmids auf die Subtilisin-Ausbeute auswirkt. Da das Tetracyclin im Medium jedoch zu einer verringerten Gesamtausbeute des Subtilisins führte, lassen sich die Aktivitäten zwischen beiden Experimenten nicht vergleichen. Bei der Kultivierung mit Tetracyclin im Medium wurde mit dem *secA*-Deletionsstamm *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA eine höhere Ausbeute erzielt als mit dem Stamm *B. licheniformis* „E“ pSub. Demnach hat die Expression des auf dem Plasmid lokalisierten *secA*-Gens einen positiven Effekt auf die erzielten Subtilisin-Ausbeuten. Ohne Antibiotikum im Medium wurden mit beiden Stämmen ähnlich hohe Ausbeuten erzielt. Im Kapitel 3.2.2.2. wurde gezeigt, dass das *secA*-Selektionssystem das pSubSecA-Plasmid bei Kultivierung im Schüttelkolben ohne Antibiotikazugabe stabil in den Zellen von *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ hält, während der Ausgangstamm *B. licheniformis* „E“ das pSub-Plasmid im Laufe der Kultivierung verliert. Da die industrielle Fermentation zur Subtilisin-Gewinnung auch ohne Antibiotikazugabe durchgeführt wird, verliert wahrscheinlich auch hier ein großer Anteil der Zellen das Plasmid und kann daher nicht mehr zur Subtilisin-Produktion beitragen. Weil im Schüttelkolbenexperiment die aus dem *secA*-Selektionssystem resultierende erhöhte SecA-Menge einen positiven Einfluss auf die Subtilisin-Ausbeute hat und da zusätzlich das pSubSecA-Plasmid bis zum Ende der Kultivierung stabil in den Zellen verbleibt, ist zu erwarten, dass mit dem *secA*-Selektionssystem im industriellen Fermentationsprozess eine deutliche Steigerung der Subtilisin-Ausbeute erzielt werden kann.

IV. Diskussion

1. Untersuchungen zur Ursache der hohen Sekretionsleistung des industrierelevanten Stammes *B. licheniformis* „E“

Gram-positive Bakterien, vor allem einige *Bacillus*-Arten, werden aufgrund ihrer Fähigkeit, große Mengen Protein in den Kulturüberstand zu sekretieren (Palva, 1982), seit langer Zeit zur industriellen Enzymproduktion eingesetzt. *Bacillus licheniformis* wird von der Waschmittelindustrie vor allem zur Gewinnung von Serinproteasen des Subtilisin-Typs genutzt (Rao *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002). Die zur Produktion verwendeten Stämme zeichnen sich durch besonders hohe Sekretionsleistungen aus. Im Ergebnisteil III.1. wurde gezeigt, dass der industrierelevante Stamm *B. licheniformis* „E“ viermal so viel Subtilisin in den Überstand sekretiert wie der Wt-Stamm *B. licheniformis* DSM13, wenn in beiden Stämmen das plasmidkodierte Subtilisin von *B. lentus* synthetisiert wird. Die Ursache für diese erhöhte Sekretionsleistung ist nicht bekannt, da dieser Stamm über mehrere Zyklen ungerichteter Mutagenese und anschließendem Screening auf hohe Sekretionsleistung erhalten wurde. Es ist anzunehmen, dass die guten Sekretionseigenschaften entweder durch Mutationen in Genen der Proteinbiosynthese oder in solchen der Proteinsekretion verursacht werden. Da der *secA*-Genlocus von *B. licheniformis* sowohl ein Gen der Proteinsekretion (*secA*) als auch ein Gen der Proteinbiosynthese (*prfB*) enthält (Hintz, 1999), wurde dieser auf mögliche Sequenzunterschiede zwischen dem industrierelevanten Stamm *B. licheniformis* „E“ und dem *B. licheniformis* Wt-Stamm DSM13 untersucht. Tatsächlich konnte eine veränderte Base im *secA*-Gen und sogar 40 Basenpaaraustausche im *prfB*-Gen identifiziert werden. Von diesen 41 Basenpaaraustauschen führten zwei Austausch, die im *prfB*-Gen lokalisiert waren, zu einer veränderten Aminosäure im RF2-Protein, während die restlichen Austausche stille Mutationen waren. Das *secA*-Gen ist mit dem *prfB*-Gen in einem Operon lokalisiert (Hintz, 1999), so dass ein zusammenhängendes mRNA-Transkript beider Gene synthetisiert wird. Da die stillen Mutationen die Stabilität des *secA-prfB*-mRNA-Transkriptes beeinflussen könnten, wurde die SecA-Menge von *B. licheniformis* „E“ mit der des Wt-Stammes verglichen. Tatsächlich konnte eine zu späten Zeiten der stationären Wachstumsphase erhöhte SecA-Menge in *B. licheniformis* „E“ Zellen nachgewiesen werden. Für *B. subtilis* wurde gezeigt, dass sich bei gleichzeitiger Überproduktion von SecA die Ausbeute an sekretierter Levansucrase um 40 % steigern lässt (Leloup *et al.*, 1999). Daher könnte die in *B. licheniformis* „E“ erhöhte SecA-Menge für die mit diesem Stamm erzielten hohen Subtilisin-Ausbeuten mitverantwortlich sein. Das SecA von *B. licheniformis* „E“ wurde darüber hinaus in *B. subtilis* funktionell charakterisiert. Unter anderem wurde untersucht, ob eine erhöhte Menge vom *B. licheniformis* „E“ SecA den Export des Außenmembranproteins OmpA von *E. coli* in *B. subtilis* DB104 verbessern kann.

Um zu untersuchen, ob die Aminosäurenaustausche in den RF2-Proteinen einen Einfluss auf die Subtilisin-Ausbeute haben, wurden die *prfB*-Gene von *B. licheniformis* Wt und „E“ zusammen mit dem Subtilisin-Gen von *B. lentus* in *B. subtilis* DB104 und *B. licheniformis* Wt und *B. licheniformis* „E“ koexprimiert. Dabei wurde zum einen der Einfluss der verschiedenen RF2-Proteine auf die jeweils sekretierte Subtilisin-Menge und zum anderen der Einfluss einer erhöhten RF2-Menge auf die Subtilisin-Ausbeute untersucht (s. III.1.7.2.2.). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die RF2-Proteine von *B. licheniformis* Wt und „E“ die mit *B. subtilis* DB104 und *B. licheniformis* „E“ erzielten Subtilisin-Ausbeuten unterschiedlich beeinflussen. Bei *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* „E“ war zusätzlich auch die Menge an RF2-Protein für die Höhe der Subtilisin-Ausbeute entscheidend.

1.1. Möglicher Einfluss der im *secA*-Gen von *B. licheniformis* „E“ identifizierten Mutation auf den Proteinexport

Beim Übergang von exponentieller zu stationärer Wachstumsphase zum Zeitpunkt t_0 sorgt in *B. subtilis* ein komplexes regulatorisches Netzwerk für die Expression von Genen, die für die jetzt veränderten Lebensbedingungen der Zelle benötigt werden. Viele hydrolytische Enzyme wie Amylasen, Lipasen und Proteasen werden mit dem Einsetzen der stationären Wachstumsphase verstärkt exprimiert und anschließend sekretiert. Die Enzyme dienen der Zelle dazu, eventuell vorhandene weitere externe Nahrungsquellen zu erschließen (Harwood 1989, Ferrari 1993, Priest 1977). Mit dem Einsetzen der Proteinsekretion zum Zeitpunkt t_0 erreicht in *B. subtilis* die *secA*-Expression ein Maximum. Für *B. subtilis* wurde gezeigt, dass die Transkription des *secA-prfB*-Operons beim Übergang von exponentieller zu stationärer Wachstumsphase maximal ist, danach aber wieder auf ein basales Niveau abfällt (Herbort, 1996 und 1999). Die größte Menge an SecA-Protein liegt also genau zu Beginn der hohen Proteinsekretionsaktivität und nicht während der eigentlichen Sekretionsphase vor. Die Fähigkeit von SecA, in seiner löslichen cytosolischen Form an sekretorische Vorläuferproteine zu binden und das beobachtete SecA-Maximum zu Beginn der Sekretionsaktivität haben zu der Hypothese geführt, dass das SecA möglicherweise zusätzlich zu seiner Funktion als energieliefernde Komponente der Proteintranslokation als exportspezifisches Chaperon fungiert (Herbort *et al.*, 1999). Hierzu passt der Befund, dass in *B. subtilis* die SecA-Menge einen Engpass für die Sekretion bestimmter Enzyme, vor allem für solche mit geringer Affinität zu SecA, darstellen kann. Denkbar wäre daher, dass das SecA in seiner cytosolischen Form die zum Zeitpunkt t_0 in großer Menge synthetisierten sekretorischen Vorläuferproteine bindet und in einer entfalteten und somit exportkompetenten Konformation hält. Die Überproduktion von SecA erhöht vor allem die Menge an cytosolischem SecA und somit den Anteil an SecA-Protein, der als exportspezifisches Chaperon fungieren kann. Der

erhöhte Bedarf an Chaperonen bei Überproduktion von sekretorischen Proteinen könnte so durch gleichzeitige Überproduktion von SecA gedeckt werden.

Bei der Suche nach möglichen Ursachen für die guten Sekretionseigenschaften des *B. licheniformis* „E“ wurde im *secA*-Gen dieses Stammes eine zum *secA*-Gen vom Wt-Stamm *B. licheniformis* DSM13 veränderte Base an Position 1104 gefunden, die jedoch keine Veränderung der Aminosäuresequenz im SecA-Protein zur Folge hat. Außerdem wurden 40 Punktmutationen im nachfolgend lokalisierten *prfB*-Gen gefunden. Da von dem *secA*- und dem *prfB*-Gen ein zusammenhängendes mRNA-Transkript synthetisiert wird, ist es möglich, dass die zwischen beiden *secA*-Genloci gefundenen 41 Punktmutationen einen Einfluss auf die Stabilität dieses *secA-prfB*-mRNA-Transkriptes haben. Eine verbesserte Stabilität könnte zu einer erhöhten SecA-Menge führen und diese wiederum zu einer gesteigerten Subtilisin-Ausbeute. Es wurden daher die SecA-Mengen von *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* „E“ zum Zeitpunkt t_0 und jeweils eine, zwei und drei Stunden später miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die SecA-Menge in Zellen vom Wt-Stamm *B. licheniformis* DSM13 deutlich schneller abnahm als in Zellen von *B. licheniformis* „E“. Drei Stunden nach der maximalen *secA*-Expression konnte im Vergleich zum Wt-Stamm in Zellen von *B. licheniformis* „E“ eine viermal höhere SecA-Proteinkonzentration nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass *B. licheniformis* „E“ im Vergleich zum Wt-Stamm tatsächlich ein stabileres *secA-prfB*-Transkript besitzt. Nach Absinken der maximalen Transkriptionsrate des *secA-prfB*-Operons zum Zeitpunkt t_0 stünde das Transkript in *B. licheniformis* „E“ aufgrund der hier erhöhten *secA-prfB*-mRNA-Stabilität länger für eine Translation zur Verfügung als im Wt-Stamm DSM13. So ließe sich die beobachtete erhöhte SecA-Konzentration während der stationären Wachstumsphase erklären. Um direkt zu beweisen, dass die beobachtete Konzentrationserhöhung des SecA-Proteins aus einer erhöhten Stabilität des *secA-prfB*-Transkriptes resultiert, könnten in einem quantitativen Northern-Blot die Mengen der *secA-prfB*-Transkripte vom Wt-Stamm und von *B. licheniformis* „E“ zu verschiedenen Zeitpunkten der stationären Wachstumsphase miteinander verglichen werden.

1.1.1. Das SecA-Protein von *B. licheniformis* ist in *B. subtilis* funktionell

Der Einfluss einer erhöhten SecA-Menge auf den Proteinexport wurde nicht direkt in *B. licheniformis*, sondern im genetisch besser zugänglichen *B. subtilis* DB104 untersucht. Hierzu musste zunächst sichergestellt werden, dass das SecA-Protein von *B. licheniformis* auch in *B. subtilis* funktionell ist. Da sich zwar die *secA*-Gene aber nicht die SecA-Proteine von *B. licheniformis* DSM13 und „E“ unterscheiden und eine aufgrund der Punktmutation im *secA*-Gen veränderte mRNA-Stabilität unter Überexpressionsbedingungen keinen großen

Einfluss auf die SecA-Menge in der Zelle haben sollte, wurde für diese Untersuchungen nur das *secA*-Gen von *B. licheniformis* „E“ überexprimiert.

Zum Nachweis der Funktionalität des *B. licheniformis* SecA-Proteins in *B. subtilis* wurde gezeigt, dass das *B. licheniformis* SecA-Protein den Exportdefekt der temperatursensitiven *B. subtilis* *secA*-Mutante NIG1152 bei der nicht permissiven Temperatur von 42 °C komplementieren kann (s. III.1.4.2.). In früheren Experimenten wurde bereits gezeigt, dass der Wachstumsdefekt der *secA*-Mutante NIG1152 bei der nicht permissiven Temperatur durch die Expression der *secA*-Gene von *B. subtilis* DB104 oder von *B. licheniformis* DMS13 bzw. „E“ komplementiert werden kann (Hintz, 1999). In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Komplementation des Wachstumsdefekts auf einer Wiederherstellung des Proteinexports der Mutante beruht (s. III.1.4.2.). Der Proteinexport wurde dazu in NIG1152 anhand der Prozessierung des Außenmembranproteins OmpA von *E. coli* in einem „Pulse-Chase“-Experiment verfolgt. Während ohne zusätzliche *secA*-Expression bei 42 °C das OmpA-Protein nicht exportiert wurde, führte die Expression der *secA*-Gene von *B. licheniformis* „E“ und *B. subtilis* DB104 zur Aufhebung des Exportblocks. Die Kinetik des Exports war dabei so schnell, dass bereits nach einer Minute fast das gesamte radioaktiv markierte OmpA-Protein exportiert war. Mit diesem „Pulse-Chase“-Experiment konnte somit direkt gezeigt werden, dass das SecA-Protein von *B. licheniformis* in *B. subtilis* funktionell ist und den Proteinexport der *B. subtilis* *secA*-Mutante NIG1152 bei der nicht permissiven Temperatur von 42 °C wiederherstellen kann. Die Untersuchung zum Einfluss einer erhöhten Menge des *B. licheniformis* SecA-Proteins auf den Proteinexport konnte somit in *B. subtilis* DB104 durchgeführt werden.

1.1.2. Die SecA-Konzentration in *B. subtilis* DB104 ist für den Export des OmpA-Proteins nicht limitierend

Wie bereits erwähnt, wurde für *B. subtilis* gezeigt, dass eine erhöhte SecA-Menge in den Zellen den Export von einigen sekretorischen Proteinen, vor allem von solchen mit geringer Affinität zum SecA-Protein, verbessern kann. Während die Menge an sekretierter Levansucrase direkt proportional zur SecA-Menge in der Zelle ist, wird die α -Amylase auch bei geringen SecA-Konzentrationen noch effektiv exportiert (Leloup *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich durch Überexpression der *secA*-Gene von *B. licheniformis* „E“ oder von *B. subtilis* DB104 der Export des Außenmembranproteins OmpA von *E. coli* in *B. subtilis* DB104 steigern lässt (s. III.1.5.). In früheren Experimenten (Meens *et al.*, 1993) sowie in dieser Arbeit (s. III.1.4.2.) wurde im „Pulse-Chase“-Experiment gezeigt, dass das OmpA-Protein mit seiner 21 AS langen authentischen Signalsequenz auch in *B. subtilis* mit einer relativ schnellen Kinetik exportiert werden kann. Verglichen mit dem OmpA-Export in

E. coli, bei dem bereits nach 30 sek sämtliches Vorläuferprotein in reifes OmpA überführt wird, ist der OmpA-Export in *B. subtilis* dennoch langsamer. Daher ist anzunehmen, dass die Wechselwirkungen des OmpA-Vorläuferproteins von *E. coli* mit den Untereinheiten der *B. subtilis* Translokase einschließlich des SecA-Proteins nicht optimal sind. Da das OmpA-Protein daher wahrscheinlich nur eine geringere Affinität zum *B. subtilis* SecA-Protein aufweist, wurde es als Modellprotein ausgewählt, um den Einfluss der Überexpression der *secA*-Gene von *B. licheniformis* und von *B. subtilis* auf den Proteinexport zu untersuchen.

Es zeigte sich jedoch, dass die Überexpression beider *secA*-Gene keinen Einfluss auf die Menge des exportierten OmpA-Proteins hatte. Im Gegensatz zur Sekretion der Levansucrase ist die SecA-Konzentration somit bei der Translokation von OmpA in *B. subtilis* DB104 nicht limitierend. Der Engpass für den OmpA-Export muss daher an anderer Stelle liegen.

In *E. coli* sind zwei unterschiedliche Wege bekannt, über die Vorläuferproteine zur Translokase geleitet werden: der SRP- und der SecB-abhängige Weg (s. I.1.3.). Für das OmpA-Protein wurde gezeigt, dass dessen Export in *E. coli* strikt SecB-abhängig ist (Kumamoto, 1989; Koch *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu *E. coli* besitzt *B. subtilis* jedoch kein SecB-homologes Protein, so dass hier das „Targeting“ des OmpA-Vorläuferproteins über einen alternativen Weg erfolgen muss. Das SecB-unabhängige „Targeting“ des OmpA-Vorläufers in *B. subtilis* könnte somit einen frühen Engpass in der Translokation darstellen. Die im Vergleich zu Gram-negativen Bakterien längeren Singalpeptide von Vorläuferproteinen Gram-positiver Bakterien (von Heijne & Abrahmsen, 1989) begünstigen vermutlich die Bindung durch das bakterielle SRP (b-SRP), so dass Vorläuferproteine in *B. subtilis* möglicherweise generell über den SRP-Weg zur Translokase geleitet werden (Bunai *et al.*, 1999). Das 21 AS lange Signalpeptid des OmpA-Vorläuferproteins ist im Vergleich zu solchen Gram-positiver Bakterien mit durchschnittlich 30 AS recht kurz. Die Bindung des Signalpeptids des OmpA-Vorläufers durch das b-SRP erfolgt daher vielleicht nur mit einer geringen Effizienz, so dass von dem insgesamt synthetisierten OmpA-Protein vielleicht nur ein Teil zur Translokase geleitet und exportiert wird. Alternativ könnte in *B. subtilis* auch das cytosolische SecA die Chaperonfunktion des SecB-Proteins übernehmen (s. auch IV.1.1.; Herbort *et al.*, 1999). Da die Erhöhung der SecA-Konzentration jedoch keine Verbesserung des OmpA-Exports bewirkte, würde ein Engpass im „Targeting“ bedeuten, dass das cytosolisch vorliegende SecA die Aufgabe als exportspezifisches Chaperon für das OmpA-Protein nicht ausreichend bewerkstelligen kann. Einen weiteren, späteren Engpass für den Export des heterologen OmpA-Proteins könnte die Initiation der Translokation darstellen. Entscheidend hierfür sind funktionelle Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten der Translokase und dem Vorläuferprotein. Da die Qualität der Wechselwirkungen des heterologen OmpA-Proteins mit der Translokase von *B. subtilis* weniger optimal sein könnte, ist der ausgebildete Initiationskomplex im Vergleich zum Export homologer Proteine möglicherweise weniger stabil, so dass die Initiation der Translokation nicht immer erfolgreich verläuft und somit weniger OmpA exportiert würde.

Obwohl die Erhöhung der SecA-Menge keinen Einfluss auf den OmpA-Export in *B. subtilis* DB104 hatte, könnte eine erhöhte SecA-Menge dennoch für andere Proteine zu einer Verbesserung des Exports führen, falls für deren Translokation eine zu niedrige SecA-Konzentration den maßgeblichen Engpass darstellt. Tatsächlich deuten Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin (s. III.2.2.3.), dass die Überproduktion von SecA mit *B. licheniformis* „E“ eine verbesserte Sekretion des überproduzierten Subtilisins von *B. lentus* bewirkt.

1.2. Möglicher Einfluss der im *prfB*-Gen von *B. licheniformis* „E“ identifizierten Mutationen auf die Proteinbiosynthese

Beim Vergleich der *prfB*-Gene von *B. licheniformis* DSM13 und von *B. licheniformis* „E“ wurden 40 Punktmutationen gefunden, von denen zwei zu einer veränderten Aminosäure im RF2-Protein führen. Während das RF2-Protein von *B. licheniformis* DSM13 an Position 71 ein Serin und an Position 100 ein Asparagin besitzt, ist beim RF2-Protein von *B. licheniformis* „E“ genau umgekehrt ein Asparagin an Position 71 und ein Serin an Position 100 vorhanden. Anhand der bekannten Strukturdaten des RF2 von *E. coli* (Vestergaard *et al.*, 2001) wurden die Positionen der Aminosäureunterschiede bestimmten funktionellen Bereichen des RF2-Proteins zugeordnet. Der Sequenzvergleich der RF2-Proteine von *E. coli* und von *B. licheniformis* zeigte, dass die identifizierten Aminosäureaustausche in Domäne 1 innerhalb der α -Helices $\alpha 3$ und $\alpha 4$ lokalisiert sind (s. Abb. 15). Diese bilden im *E. coli* RF2 zusammen mit der α -Helix $\alpha 1$ eine „coiled-coil“ Struktur aus. Daten aus kryoelektronenmikroskopischen Untersuchungen des *E. coli* RF2 zeigen außerdem, dass die Domäne 1 gleichzeitig mit beiden ribosomalen Untereinheiten (UE) wechselwirkt (Klaholz *et al.*, 2003; Rawat *et al.*, 2003). Dabei kontaktiert die dreisträngige „coiled-coil“ Struktur der Domäne 1 die 16S rRNA der ribosomalen 30S UE, während die Schleife zwischen den Helices $\alpha 2$ und $\alpha 3$ am entgegengesetzten Ende der Domäne 1 mit der für die G-Faktor-Bindung zuständigen 23S rRNA und dem L11-Protein der 50S UE wechselwirkt (s. Abb. 7). Nach dem von Rawat *et al.* (2003) vorgeschlagenen Modell lagert sich das RF2-Protein zunächst an das Ribosom an und kontrolliert die in der A-Bindestelle eintreffenden Codons. Während ein Sinn-Codon zum Dissoziieren des RF2-Proteins führt, ermöglicht ein Stop-Codon eine stärkere Wechselwirkung des RF2 mit der 30S UE. Diese Wechselwirkung hat eine Verschiebung der beiden ribosomalen UE zueinander und zusätzlich eine Konformationsänderung des RF2 zur Folge. Beides zusammen ermöglicht es dem RF2, gleichzeitig die ribosomale A-Stelle mit dem SPF-Motiv und das Peptidyltransferase-Zentrum mit dem GGQ-Motiv zu kontaktieren, so dass die Information über das Stop-Codon in der A-Bindestelle an das Peptidyltransferase-Zentrum weitergeleitet und schließlich das fertig synthetisierte Protein freigesetzt werden kann. Die dreisträngige „coiled-coil“ Struktur der Domäne 1, in der die Aminosäureaustausche

lokalisiert sind, spielt somit eine wichtige Rolle bei der Übertragung der Information über das Stop-Codon in der A-Bindestelle zum Peptidyltransferase-Zentrum.

Beim Vergleich der RF2-Proteine von *B. licheniformis* DSM13 und „E“ mit den RF2-Proteinen von *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *N. meningitis*, *T. maritima*, *C. glutamicum*, *Synechocystis* spec. und dem RF2 aus den Plastiden von *A. thaliana* ließen sich zwischen allen RF2-Proteinen deutlich konservierte Bereiche erkennen (s. Abb. 16). Die höchsten Identitäten wurden in den Bereichen um das hochkonservierte SPF- und das GGQ-Motiv gefunden. Im Vergleich zu den anderen Domänen wies Domäne 1 mit nur 3 identischen und 15 sehr ähnlichen Aminosäuren die höchste Varianz auf. Der RF2 aus den Plastiden von *A. thaliana* besitzt außerdem einen zusätzlichen N-terminalen Bereich, der in den anderen untersuchten RF2-Proteinen fehlt. Dieser Bereich stellt wahrscheinlich eine besondere Anpassung des *A. thaliana* RF2-Proteins an die Ribosomen der Plastiden dar. Der Vergleich der verschiedenen RF2-Proteine zeigte außerdem, dass die Aminosäuren an den entsprechenden Positionen, an denen sich die RF2-Proteine von *B. licheniformis* DSM13 und „E“ unterscheiden, nicht konserviert sind. An der zur Aminosäure Serin 71 des RF2 von *B. licheniformis* DSM13 homologen Position ist bei keinem der ausgewählten RF2-Proteine Serin vorhanden. Dagegen besitzt der RF2 von *N. meningitis* wie der von *B. licheniformis* „E“ Asparagin an dieser Position. An Aminosäureposition 100 ist genau umgekehrt beim RF2 von *B. licheniformis* DSM13 ein Asparagin und beim RF2 von *B. licheniformis* „E“ ein Serin lokalisiert, doch keine dieser beiden Aminosäuren ist in einem der anderen RF2-Proteine an entsprechender Position zu finden. Für die Funktion des RF2 ist an diesen Positionen scheinbar keine spezielle Aminosäure erforderlich. Dies schließt jedoch keinesfalls aus, dass die Aminosäureaustausche in den α -Helices $\alpha 3$ und $\alpha 4$ die Konformation des RF2 verändern und so zu einer modifizierten Funktion des RF2 führen könnten.

1.2.1. Die Koexpression der *B. licheniformis* *prfB*-Gene beeinflusst die von *B. subtilis* DB104, *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* „E“ sekretierten Subtilisin-Mengen

Die im *prfB*-Gen von *B. licheniformis* „E“ identifizierten Punktmutationen könnten einen Einfluss auf die Effizienz der Proteinbiosynthese haben und so zu der guten Subtilisin-Ausbeute beitragen, die mit *B. licheniformis* „E“ erzielt wird. Während der Proteinbiosynthese wird die mRNA-Information zeitgleich von vielen hintereinanderliegenden Ribosomen in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt. Gelangt ein Ribosom an ein Stop-Codon, so katalysiert ein „Release“-Faktor der Klasse 1 das Ablösen des fertig synthetisierten Proteins vom Ribosom. Erst danach wird auch das Ribosom unter Beteiligung von anderen Faktoren (s. IV.1.2.1.2.) von der mRNA freigesetzt, so dass die

nachfolgenden Ribosomen nun alle weiter auf der mRNA vorrücken können. Zwei der im *prfB*-Gen von *B. licheniformis* „E“ (*prfBE*) identifizierten Mutationen führten zu je einer veränderten Aminosäure innerhalb der dreisträngigen „coiled-coil“ Struktur von Domäne 1, die wahrscheinlich an der Übertragung der Information über das Stop-Codon in der A-Bindestelle zum Peptidyltransferase-Zentrum beteiligt ist. Wenn diese Aminosäurenaustausche ein beschleunigtes Ablösen des vollständig synthetisierten Proteins vom Ribosom bewirken würden, dann könnte im Vergleich zum Wt eine höhere Translationsrate erreicht werden.

Im *secA*-Genlocus wurden insgesamt 41 Punktmutationen identifiziert, von denen 39 keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz vom SecA- oder RF2-Protein haben. Die stillen Mutationen könnten aber die Stabilität des *secA-prfB*-Transkriptes beeinflussen. Tatsächlich wurde in *B. licheniformis* „E“ Zellen im Vergleich zu Zellen von *B. licheniformis* DSM13 während der stationären Wachstumsphase eine erhöhte Menge an SecA-Protein nachgewiesen, die aus einer erhöhten *secA-prfB*-mRNA-Stabilität resultieren könnte (s. III.1.3.). Obwohl die Translation des *prfB*-Gens einem Autoregulationsmechanismus unterliegt (Farabaugh, 1996; Pavel *et al.*, 2002), könnte eine erhöhte mRNA-Stabilität dennoch zu einer höheren RF2-Menge in der Zelle führen. Der Autoregulationsmechanismus sorgt dafür, dass sich das Verhältnis zwischen der Anzahl der *secA-prfB*-mRNA-Transkripte und der anhand dieser Transkripte erfolgenden vollständigen Translation zu RF2-Proteinen auf einen konstanten Wert einpendelt, indem überschüssiges RF2-Protein eine verfrühte Termination der Translation bewirkt. Ist eine größere Anzahl *secA-prfB*-Transkripte vorhanden, von denen aus zeitgleich die Translation zu RF2-Proteinen erfolgen kann, so sind auch mehr RF2-Proteine erforderlich, um diese Translation verfrüht zu beenden. Bei einer erhöhten *secA-prfB*-mRNA-Konzentration würde daher die Synthese weiterer RF2-Proteine erst bei einer erhöhten RF2-Konzentration in der Zelle verhindert. Wie bereits erwähnt lagert sich das RF2-Protein nach einem von Rawatt *et al.* (2003) vorgeschlagenen Modell an das Ribosom an und kontrolliert so die in der A-Bindestelle eintreffenden Codons der mRNA, wobei ein Stop-Codon zu einer festeren Bindung des RF2 und schließlich zur Freisetzung des fertig synthetisierten Proteins führt. Falls bei einer erhöhten RF2-Konzentration in der Zelle die RF2-Proteine im Durchschnitt öfter mit den translatierenden Ribosomen assoziiert wären, könnte dies zu einer schnelleren Erkennung von Stop-Codons und somit zu einer schnelleren Freisetzung der neu synthetisierten Proteine führen.

Um herauszufinden, ob die im *prfB*-Gen von *B. licheniformis* „E“ identifizierten Punktmutationen tatsächlich mitverantwortlich für die hohen Subtilisin-Ausbeuten sind, die mit diesem Stamm erzielt werden, wurde sowohl der Einfluss der RF2-Proteine von *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* „E“ als auch die Wirkung einer erhöhten RF2-Konzentration auf die Subtilisin-Ausbeute untersucht. Dazu wurden die *prfB*-Gene von *B. licheniformis* DSM13 (*prfBWt*) und *B. licheniformis* „E“ (*prfBE*) zusammen mit dem *sub*-Gen (Subtilisin von *B. lentus*) in den Stämmen *B. subtilis* DB104, *B. licheniformis* DSM13

und *B. licheniformis* „E“ koexprimiert und die jeweilige Subtilisin-Ausbeute ermittelt. Um auch den Effekt einer erhöhten RF2-Menge auf die Subtilisin-Ausbeute untersuchen zu können, wurden alternativ die *prfB*-Gene koexprimiert, bei denen der Autoregulationsmechanismus zuvor ausgeschaltet wurde (s. III.1.7.1.1.). Die Synthese der RF2-Proteine, ausgehend von den verschiedenen *prfB*-Genen, wurde in einem Tricin-SDS-Polyacrylamidgel eindeutig nachgewiesen (s. III.1.7.2.1.).

1.2.1.1. Die Synthese der *B. licheniformis* RF2-Proteine führt bei *B. subtilis* DB104 zu einer Verringerung der Subtilisin-Ausbeute

Die RF2-Proteine von *B. licheniformis* DSM13 und „E“ weisen zum RF2 von *B. subtilis* mit jeweils 92 % eine sehr hohe Aminosäureidentität auf. Trotzdem war anzunehmen, dass die RF2-Proteine der beiden *B. licheniformis* Stämme aufgrund der übrigen Sequenzunterschiede die Termination der Proteinbiosynthese in *B. subtilis* weniger optimal katalysieren können als das *B. subtilis*-eigene RF2. Beim Nachweis der RF2-Proteine zeigte sich zunächst, dass die Expression der autoregulierten *prfB*-Gene in *B. subtilis* zu einer höheren RF2-Konzentration führte als deren Expression in den *B. licheniformis* Stämmen. Der Autoregulationsmechanismus der *prfB*-Gene von *B. licheniformis* scheint in *B. subtilis* weniger oft zu einer verfrühten Beendigung der Translation zu führen als in *B. licheniformis* selbst. Das könnte entweder daran liegen, dass die *B. licheniformis* RF2-Proteine erst gar nicht oder nur schlecht an die Ribosomen von *B. subtilis* binden oder aber nach der Bindung die Termination nur ineffizient katalysieren können. In beiden Fällen wäre zu erwarten, dass die mit *B. subtilis* erzielte Subtilisin-Ausbeute durch Expression der *B. licheniformis* *prfB*-Gene nicht verbessert werden kann. Tatsächlich führte die Koexpression der autoregulierten (*prfB*) und der deregulierten (*prfB**) *B. licheniformis* *prfB*-Gene in *B. subtilis* pSub sogar zu einer verringerten Subtilisin-Ausbeute. Dabei hatte die Koexpression des *prfBE*-Gens einen stärkeren negativen Effekt auf die Subtilisin-Ausbeute als die Koexpression des *prfBWt*-Gens. Der negative Effekt des *prfBE*-Gens wurde durch dessen Überexpression (*prfBE**) noch zusätzlich verstärkt. Das Ausmaß der Verringerung der Subtilisin-Ausbeute war somit von der Art des RF2-Proteins (RF2 von *B. licheniformis* Wt oder „E“ Stamm) und beim RF2 von *B. licheniformis* „E“ auch von der Expressionsstärke abhängig.

Wenn die RF2-Proteine von *B. licheniformis* keine oder nur schwache Wechselwirkungen mit den *B. subtilis* Ribosomen eingehen, wird die Proteinbiosynthese von *B. subtilis* nicht direkt beeinträchtigt. Allerdings muss die Zelle aufgrund der Koexpression der *prfB*-Gene neben der Subtilisin-Synthese noch zusätzlich die Synthese des jeweiligen RF2-Proteins bewerkstelligen. Insbesondere da der Autoregulationsmechanismus der *B. licheniformis* RF2-Proteine in *B. subtilis* scheinbar nicht effektiv funktioniert, werden auch bei Expression der

autoregulierten *prfB*-Gene größere, im Coomassie-gefärbten Gel gut nachzuweisende Mengen an RF2-Protein synthetisiert. Die Subtilisin- und RF2-Synthese stehen somit in direkter Konkurrenz zueinander.

Falls die *B. licheniformis* RF2-Proteine doch an die *B. subtilis* Ribosomen binden können, wäre es vorstellbar, dass das jeweilige *B. licheniformis* RF2-Protein mit dem *B. subtilis*-eigenen RF2 um die Bindung an das Ribosom konkurriert, die Termination aber nur ineffizient katalysieren kann. Eine ineffektive Termination würde zu einer insgesamt verschlechterten Proteinbiosynthese führen, was sich auch auf die sekretierte Subtilisin-Menge auswirken würde. Da die Koexpression von *prfBWt* oder *prfBE* eine unterschiedlich starke Abnahme der Subtilisin-Ausbeute zur Folge hatte, ist anzunehmen, dass die zwischen den RF2-Proteinen von *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* „E“ verschiedenen Aminosäuren einen Einfluss auf die Effizienz der Wechselwirkungen des jeweiligen RF2 mit den *B. subtilis* Ribosomen haben. Möglicherweise hat der RF2 von *B. licheniformis* „E“ eine höhere Affinität zu den *B. subtilis* Ribosomen und stellt somit eine stärkere Konkurrenz zum *B. subtilis*-eigenen RF2-Protein dar. Die Termination der Proteinbiosynthese würde dann durch den RF2 von *B. licheniformis* „E“ stärker behindert als durch den RF2 von *B. licheniformis* DSM13, so dass die Koexpression des *prfBE*-Gens auch zu einer stärkeren Abnahme der Subtilisin-Ausbeute führt als die Koexpression des *prfBWt*-Gens. Je mehr RF2 von *B. licheniformis* „E“ in den Zellen vorhanden ist, desto stärker wäre dann die Konkurrenz mit dem *B. subtilis*-eigenen RF2 um die Bindung an das Ribosom. So ließe sich auch die noch stärkere Verringerung der Subtilisin-Ausbeute bei Überexpression des *prfBE**-Gens erklären.

1.2.1.2. Eine leichte Erhöhung der RF2-Konzentration führt bei *B. licheniformis* DSM13 (Wt) zu einer Steigerung der Subtilisin-Ausbeute

Anders als bei *B. subtilis* handelt es sich bei der Expression der *prfB*-Gene von *B. licheniformis* DSM13 und von *B. licheniformis* „E“ in *B. licheniformis* DSM13 um die Expression homologer Gene. Die Wechselwirkungen der RF2-Proteine von *B. licheniformis* DSM13 und „E“ mit den Ribosomen von *B. licheniformis* DSM13 sollten daher in jedem Fall funktionell sein. Tatsächlich konnte durch Koexpression der *prfB*-Gene in *B. licheniformis* DSM13 pSub auch eine erhöhte Subtilisin-Ausbeute erzielt werden. Die Expression der autoregulierten *prfB*-Gene (*prfBE* und *prfBWt*) führte zu einer deutlichen Steigerung der Subtilisin-Ausbeute, während die Überexpression des *prfBE*-Gens (*prfBE**) nur eine geringfügige Erhöhung zur Folge hatte.

Die zwischen beiden RF2-Proteinen unterschiedlichen Aminosäuren hatten somit keinen Einfluss auf die Höhe der Ausbeute. Vielmehr scheint die RF2-Konzentration für die Menge an synthetisiertem Subtilisin entscheidend zu sein. Die aufgrund der pCU3*prfB*-Konstrukte in

B. licheniformis erhöhte *prfB*-Genexpression führt wahrscheinlich zu einer erhöhten Konzentration an *prfB*-Transkripten. Diese wiederum bewirkt wahrscheinlich trotz Autoregulation der Translation eine moderate Erhöhung der RF2-Konzentration in der Zelle (s.o.). Im SDS-Polyacrylamidgel wurde bei zusätzlicher Expression der autoregulierten Gene eine dünne Proteinbande in dem für die RF2-Proteine zu erwartenden Bereich nachgewiesen. Dagegen konnte ohne Expression eines plasmidkodierten *prfB*-Gens (Negativkontrolle) keine Bande in dem entsprechenden Bereich detektiert werden. Die RF2-Konzentration bei Expression der autoregulierten Gene ist somit höher als die Konzentration, die natürlicherweise in *B. licheniformis* DSM13 vorliegt. Der Befund, dass die Expression der autoregulierten *prfB*-Gene in *B. licheniformis* DSM13 eine Steigerung der Subtilisin-Ausbeute bewirkt, passt zu der Annahme, dass eine erhöhte RF2-Menge in der Zelle zu einer verbesserten Proteinbiosynthese und so zu einer gesteigerten Subtilisin-Ausbeute führen kann. Die stillen Mutationen im *secA*-Genlocus könnten daher, falls sie eine Stabilisierung der mRNA bewirken, tatsächlich zu den hohen Subtilisin-Ausbeuten beitragen, die mit *B. licheniformis* „E“ erzielt werden. Da die Überexpression des *prfBE**-Gens keine weitere Erhöhung, sondern im Vergleich zur Expression der autoregulierten Gene eine wieder verringerte Subtilisin-Ausbeute zur Folge hatte, scheint es auf die richtige RF2-Konzentration in der Zelle anzukommen, die normalerweise durch den Autoregulationsmechanismus kontrolliert wird. Eine moderate Erhöhung der RF2-Menge scheint für die Proteinbiosynthese von Vorteil zu sein, während eine drastisch erhöhte RF2-Konzentration für die Proteinbiosynthese und somit auch für die Subtilisin-Ausbeute wieder weniger günstig ist.

Nach einem Modell von Pavlov *et al.* (1997a) verläuft die Termination in drei Schritten. Zunächst bindet je nach Stop-Codon ein „Release“-Faktor der Klasse 1 (RF1 oder RF2) an das Ribosom und sorgt für die Hydrolyse der Peptidbindung zwischen der t-RNA in der P-Stelle und dem fertig synthetisierten Protein. Anschließend katalysiert der „Release“-Faktor RF3 das Ablösen des gebundenen RF1 bzw. RF2 vom Ribosom. Der Ribosomen-Recycling-Faktor (RRF) und der Faktor EF-G (Elongationsfaktor) ermöglichen unter GTP-Verbrauch schließlich das Ablösen der deacetylierten tRNA von der P-Stelle des Ribosoms und das Ablösen des Ribosoms von der mRNA (Ribosomen-Recycling). Für den gesamten Prozess scheint das Konzentrationsverhältnis von translatierenden Ribosomen, der „Release“-Faktoren RF1, RF2 und RF3 und des Ribosomen-Recycling-Faktors RRF entscheidend zu sein (Pavlov *et al.*, 1997b).

Pavlov *et al.* (1997b) zeigten mit einem *E. coli in-vitro*-System, dass es bei einer hohen RF1-Konzentration zu einer Konkurrenz von RF1 und RRF um die Bindung an das Ribosom kommen kann. Nach erfolgter Freisetzung des fertig synthetisierten Proteins wird zunächst zwar das Ablösen des RF1 durch den RF3 katalysiert, doch kommt es aufgrund der hohen RF1-Konzentrationen häufig zu einer Wiederbindung des RF1 an das Ribosom. Der gebundene RF1 verhindert wegen wahrscheinlich überlappender Bindestellen die Bindung des RRF. Das hat zur Folge, dass das Ribosom am Stop-Codon festsetzt und sich ohne Hilfe des

RRF nicht von der mRNA lösen kann. Zum einen blockiert das nicht abgelöste Ribosom die weitere Translation dieser mRNA und zum anderen stehen die an dieser mRNA feststehenden Ribosomen auch nicht für die Translation anderer mRNA-Transkripte zur Verfügung, so dass es insgesamt zu einer verlangsamten Proteinbiosynthese kommt. In Korrelation mit diesen *in-vitro*-Daten wurde mit *E. coli in vivo* gezeigt, dass die Überexpression des RF1 in einer RRF-Depletionsmutante zu einem verringerten Wachstum führt. Das Konzentrationsverhältnis von RF1 und RRF zueinander ist aber nicht allein entscheidend für die beobachtete Verzögerung des Ribosomen-Recyclings, also für das Ablösen des Ribosoms von der gerade translatierten mRNA und die anschließende erneute Bindung an eine weitere mRNA für eine weitere Translationsrunde. Auch die Konzentration von RF2 und RF3 muss hierbei berücksichtigt werden. *In vitro* wurde beispielsweise gezeigt, dass die aufgrund der Konkurrenz von RF1 und RRF um die Bindung an das Ribosom verringerte Freisetzung des Ribosoms von der mRNA durch eine erhöhte RF3-Menge wieder verbessert werden kann (Pavlov *et al.*, 1997b). *In-vivo*-Daten von Jørgensen *et al.* (1995) deuten darauf hin, dass eine zu hohe RF1-Konzentration die Genauigkeit der Termination herabsetzt. Die Autoren zeigten für *E. coli*, dass bei einer 30- bis 40-fachen Überproduktion von RF1 die vollständige Synthese von β -Galaktosidase von ursprünglich 60 % auf 30 % reduziert wird. Daher lässt sich vermuten, dass eine erhöhte Konzentration von RF1 zu verfrühten Translationsabbrüchen an Sinn-Codons führt. Pavlov *et al.* (1997b) zeigten dagegen mit einem anderen *E. coli* Stamm, dass eine erhöhte RF1-Konzentration bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C keinen Einfluss auf die Wachstumsrate hat. Bei 30°C wurde sogar durch die Erhöhung der RF1-Menge eine Verbesserung des Wachstums erzielt. Die Autoren vermuten, dass bei dieser Temperatur ohne zusätzliche RF1-Synthese die Termination verlangsamt ist und der größte Teil der „Release“-Faktoren nicht frei, sondern an Ribosomen gebunden vorliegt. Durch Überexpression von RF1 oder RF2 steht der Zelle ein größerer Pool an freien RF1- bzw. RF2-Proteinen zur Verfügung, so dass es beim Erreichen eines Stop-Codons zu einer schnelleren Freisetzung des synthetisierten Proteins kommt und die Proteinbiosynthese insgesamt beschleunigt wird.

Im Gegensatz zum RRF ist das RF3-Protein nicht essentiell in *E. coli* (Grentzmann *et al.*, 1994; Mikuni *et al.*, 1994). *B. subtilis* besitzt überdies kein zum RF3 von *E. coli* homologes Protein. Das Ablösen der Klasse 1 „Release“-Faktoren vom Ribosom muss also auch über einen alternativen Weg erfolgen können. *E. coli* RF3-Deletionsmutanten zeigen dennoch ein im Vergleich zum Wt-Stamm verlangsamtes Wachstum. Durch Überexpression von RF1 in RF3-Deletionsmutanten konnte das Wachstum wieder verbessert werden (Pavlov, 1997b). Die Ursache für das verbesserte Wachstum ist möglicherweise wiederum die Konzentrationserhöhung von freiem, also nicht ribosomal gebundenem RF1. Aufgrund des fehlenden RF3-Proteins werden die „Release“-Faktoren der Klasse 1 nach erfolgtem Ablösen des fertigen Proteins weniger effizient vom Ribosom freigesetzt. Wenn zu wenig freie „Release“-Faktoren der Klasse 1 vorhanden sind, müssen die Ribosomen, die an ein Stop-Codon gelangen,

wahrscheinlich auf einen verfügbaren „Release“-Faktor warten, was zu einer verlangsamten Freisetzung des fertig synthetisierten Proteins vom Ribosom und somit auch zu einem verzögerten Ablösen des Ribosoms von der mRNA führt.

Alle diese Daten machen deutlich, dass die Konzentrationen der beteiligten Proteinfaktoren gut aufeinander abgestimmt sein müssen, damit die Termination möglichst schnell und genau erfolgen kann. Dabei spielt natürlich auch die Konzentration der translatierenden Ribosomen eine bedeutende Rolle. Pavlov *et al.* (1997b) zeigten in einem *E. coli in-vitro*-System, dass die höchste Geschwindigkeit für das Recycling der Ribosomen mit einer RF1-Konzentration erhalten wird, die etwas unterhalb der Konzentration der Ribosomen liegt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt (Kapitel III.1.7.2.2.), dass in *B. licheniformis* DSM13 die Koexpression der autoregulierten *prfB*-Gene zu einer erhöhten Subtilisin-Ausbeute, die Überexpression des deregulierten *prfBE**-Gens dagegen nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Ausbeute führt. Diese Daten lassen vermuten, dass eine moderate Erhöhung der RF2-Menge vielleicht zu einer für die Zelle optimalen RF2-Konzentration und dadurch beschleunigten Stop-Codon-Erkennung führt. Eine weitere Erhöhung der RF2-Mengen wirkt diesem positiven Effekt wieder entgegen, da vermutlich das zwischen den an der Termination beteiligten Proteinfaktoren und den Ribosomen bestehende optimale Konzentrationsgleichgewicht aufgrund der jetzt zu hohen RF2-Menge gestört und so die Proteinbiosynthese wieder verlangsamt wird.

1.2.1.3. Die Überproduktion des eigenen RF2-Proteins führt bei *B. licheniformis* „E“ zu einer Steigerung der Subtilisin-Ausbeute

Im Gegensatz zum Laborstamm *B. subtilis* DB104 und zum Wt-Stamm *B. licheniformis* DSM13 ist *B. licheniformis* „E“ ein durch wiederholte Zyklen von ungerichteter Mutagenese und anschließendem Screening auf hohe Sekretionsleistung optimierter Stamm. Bei einem so optimierten Stamm ist es wahrscheinlich, dass alle weiteren Veränderungen, vor allem solche, die in die Proteinbiosynthese eingreifen, die Sekretionsleistung dieses Stammes wieder verringern. Insbesondere mit dem Wissen über das für die Effizienz der Proteinbiosynthese wichtige Konzentrationsgleichgewicht der beteiligten Proteinfaktoren und der Ribosomen war zu erwarten, dass die Koexpression der *prfB*-Gene in *B. licheniformis* „E“ pSub zu einer verringerten Subtilisin-Ausbeute führen würde. Trotzdem wurde die Menge an sekretiertem Subtilisin bei Koexpression der autoregulierten und deregulierten *prfB*-Gene analysiert, um zu überprüfen ob die RF2-Proteine von *B. licheniformis* DSM13 und „E“ einen unterschiedlichen Einfluss auf die mit *B. licheniformis* „E“ erzielten Subtilisin-Ausbeuten haben.

Während die Koexpression des *prfBWt*-Gens in *B. licheniformis* „E“ pSub tatsächlich zu einer Abnahme der Subtilisin-Ausbeute führte, wurde bei Koexpression des autoregulierten *prfBE*-

Gens eine ähnlich hohe Ausbeute erhalten wie ohne *prfB*-Expression. Entgegen der ursprünglichen Erwartung wurde durch Überexpression des deregulierten *prfBE**-Gens sogar eine deutliche Steigerung der Subtilisin-Ausbeute erzielt.

Die Überexpression des deregulierten *prfBE**-Gens hat somit in *B. licheniformis* „E“ ganz im Gegensatz zu dessen Überexpression im Wt-Stamm einen positiven Effekt auf die Proteinbiosynthese. Dieses Ergebnis macht es sehr wahrscheinlich, dass neben den Unterschieden in den RF2-Proteinen noch weitere Veränderungen zwischen beiden *B. licheniformis* Stämmen bestehen, die möglicherweise die Ribosomen oder andere an der Proteinbiosynthese beteiligten Komponenten betreffen (s. IV. 1.2.1.4.). Bei Überexpression des deregulierten *prfBE**-Gens stehen sehr viel mehr RF2-Proteine für die Termination der Translation zur Verfügung, so dass pro Zeiteinheit mehr Proteine synthetisiert werden könnten und die Proteinbiosynthese vielleicht insgesamt beschleunigt wird. Im Vergleich zu *B. licheniformis* DSM13 ist in *B. licheniformis* „E“ möglicherweise aufgrund einer höheren Proteinbiosyntheserate eine höhere RF2-Konzentration für eine optimale Termination der Translation erforderlich. Die Expression des autoregulierten *prfBE*-Gens hatte in *B. licheniformis* „E“ keinen Einfluss auf die Subtilisin-Ausbeute, da diese geringfügige Erhöhung der RF2-Menge für eine Beschleunigung der Termination wahrscheinlich nicht ausreichend ist.

Im Gegensatz zur Expression bzw. Überexpression des *prfBE*-Gens bewirkte die Expression des *prfBWt*-Gens eine deutliche Verringerung der Ausbeute. Der RF2 von *B. licheniformis* „E“ ist durch die zwei veränderten Aminosäuren offenbar besser an die Wechselwirkungen mit den zelleigenen Ribosomen angepasst als der RF2 von *B. licheniformis* DSM13. Letzterer scheint die Proteinbiosynthese von *B. licheniformis* „E“ sogar zu behindern. Bei Expression des *prfBWt*-Gens in *B. licheniformis* „E“ konkurriert das *B. licheniformis* „E“-eigene RF2-Protein wahrscheinlich mit dem RF2-Protein von *B. licheniformis* DSM13 (Wt) um die Bindung an das Ribosom. Der RF2 von *B. licheniformis* DSM13 kann wahrscheinlich mit einer ähnlichen Affinität an die Ribosomen des „E“-Stammes binden, aber vielleicht die Termination nur mit geringerer Effizienz katalysieren. Möglich wäre auch, dass das nachfolgende Ablösen des *B. licheniformis* DSM13 RF2 vom Ribosom des „E“-Stammes weniger schnell erfolgt. Sowohl eine verlangsamte Freisetzung des synthetisierten Proteins als auch ein verlangsamtes Ribosomen-Recycling führen zu einer verringerten Proteinbiosynthese-Rate und letztendlich zu einer verringerten Subtilisin-Ausbeute.

Die unterschiedlichen Auswirkungen der Expression von *prfBWt* und insbesondere der Überexpression von *prfBE** machen es sehr wahrscheinlich, dass die zwei Aminosäureaustausche zwischen den RF2-Proteinen von *B. licheniformis* DSM13 (Wt) und *B. licheniformis* „E“ tatsächlich einen unterschiedlichen Einfluss auf die Termination der Proteinbiosynthese haben.

1.2.1.4. Die Mutationen im *prfBE*-Gen sind wahrscheinlich mitverantwortlich für die mit *B. licheniformis* „E“ erzielte hohe Subtilisin-Ausbeute

Die Koexpression der *prfB*-Gene in *B. subtilis* und *B. licheniformis* „E“ zeigte, dass die zwischen beiden RF2-Proteinen unterschiedlichen Aminosäuren tatsächlich einen unterschiedlichen Einfluss auf die in den Kulturüberstand sekretierte Subtilisin-Menge haben. Zusätzlich wurde die Subtilisin-Ausbeute durch die Expressionsstärke der *prfB*-Gene beeinflusst. In *B. licheniformis* DSM13 führte eine moderate Erhöhung der *prfB*-Expression und in *B. licheniformis* „E“ die Überexpression des *prfBE**-Gens zu einer Steigerung der Subtilisin-Ausbeute. Somit könnten auch die stillen Mutationen, falls sie eine Stabilisierung der *secA-prfB*-mRNA bewirken und diese in einer erhöhten RF2-Menge resultiert, zu den guten Sekretionseigenschaften des *B. licheniformis* „E“ beitragen. Aufgrund dieser Befunde ist es sehr wahrscheinlich, dass die im *secA*-Genlocus von *B. licheniformis* „E“ im Vergleich zum Wt-Stamm identifizierten Sequenzunterschiede mitverantwortlich für die von *B. licheniformis* „E“ sekretierten hohen Subtilisin-Mengen sind.

Auffällig ist, dass in Abhängigkeit vom jeweiligen *B. licheniformis* Stamm die Expression bzw. Überexpression der *prfB*-Gene einen unterschiedlichen Einfluss auf die sekretierten Subtilisin-Mengen hatte. Während bei *B. licheniformis* „E“ gerade die Überexpression des *prfBE**-Gens zu einer verbesserten Ausbeute führte, schien eine zu hohe RF2-Menge (Überexpression von *prfBE**) für die Termination der Proteinbiosynthese in *B. licheniformis* DSM13 (Wt) ungünstig zu sein. Im Wt-Stamm *B. licheniformis* DSM13 konnte die Subtilisin-Ausbeute durch zusätzliche Expression der autoregulierten *prfB*-Gene verbessert werden, wogegen die Expression des autoregulierten *prfBWt*-Gens in *B. licheniformis* „E“ zu einer verringerten Ausbeute führte. Die unterschiedlichen Auswirkungen der *prfB*-Expression auf die Subtilisin-Ausbeute, die mit beiden *B. licheniformis* Stämmen erzielt wird, lässt vermuten, dass *B. licheniformis* „E“ im Vergleich zu *B. licheniformis* DSM13 neben den im *secA*-Genlocus identifizierten Mutationen noch weitere Veränderungen im Genom aufweist, die wahrscheinlich die Ribosomen oder andere Komponenten der Proteinbiosynthese wie z.B. Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren betreffen. Die Mutationen führen möglicherweise zu veränderten Wechselwirkungen der Faktoren und der Ribosomen zueinander. Veränderte Bindungsaffinitäten könnten zu einer Veränderung der für die Proteinbiosynthese optimalen Konzentrationsverhältnisse von Faktoren und translatierenden Ribosomen führen. Denkbar wäre auch, dass *B. licheniformis* „E“ eine insgesamt erhöhte Konzentration der an der Proteinbiosynthese beteiligten Komponenten aufweist und folglich eine erhöhte Proteinbiosynthese-Kapazität besitzt, was eine wesentliche Ursache für die mit diesem Stamm erzielten hohen Subtilisin-Ausbeuten sein könnte.

2. Untersuchungen des *secA*-Gens auf seine Verwendbarkeit als Selektionsmarker für die Subtilisin-Produktion mit *B. licheniformis*

Bacillus licheniformis wird von der Industrie unter anderem zur Gewinnung von Serinproteasen des Subtilisin-Typs eingesetzt (Gupta *et al.*, 2002). Zur industriellen Subtilisin-Produktion erfolgt die Expression des Subtilisin-Gens zumeist von einem Plasmid hoher Kopienzahl, welches zur anfänglichen Selektion eine Antibiotikaresistenzkassette enthält. Die eigentliche Fermentation wird aufgrund von sonst erschwerten gesetzlichen Auflagen und aus Kostengründen jedoch ohne Antibiotika durchgeführt, so dass die Zellen im Laufe der Fermentation das Plasmid verlieren. Somit nimmt der Anteil an Zellen, der zur Subtilisin-Produktion beitragen kann, während der Fermentation ab. Eine höhere Subtilisin-Ausbeute könnte daher mit einem alternativen Selektionssystem erzielt werden, bei dem das Plasmid bis zum Ende der Fermentation stabil in den Zellen gehalten wird. Zur Konstruktion eines alternativen Selektionssystems sollte ein essentielles Gen auf den zur Subtilisin-Produktion verwendeten Vektor gebracht und anschließend die chromosomale Kopie dieses Gens deletiert werden. Es sind bereits mehrere solcher Selektionssysteme in der Literatur beschrieben. Lukacsovich *et al.* (1990) haben beispielsweise ein Selektionssystem für *E. coli* entwickelt, bei dem das Gen des chromosomal kodierten ribosomalen L11-Proteins deletiert, und diese Deletion durch das genannte, aber jetzt auf dem Plasmid lokalisierte Gen, komplementiert wurde. Degryse (1991) konstruierte ebenfalls für *E. coli* ein System, bei dem das chromosomale essentielle *dapD*-Gen mutiert und durch eine funktionelle Kopie auf dem zu selektionierenden Plasmid komplementiert wurde. Das *dapD*-Gen ist für die Synthese von Diaminopimelinsäure wichtig, die eine Vorstufe für Lysin darstellt.

In dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob sich das essentielle *secA*-Gen als alternativer Selektionsmarker zur Subtilisin-Produktion mit *B. licheniformis* eignet. Das SecA-Protein stellt die zentrale, energieliefernde Komponente der Proteinsekretion dar (Economou & Wickner, 1994). Wie bereits erwähnt, wurde gezeigt, dass durch gleichzeitige Überproduktion von SecA die Ausbeute an sekretierter Levansucrase deutlich gesteigert werden kann (Leloup *et al.*, 1999). Aufgrund der essentiellen Bedeutung von SecA für die Lebensfähigkeit der Zelle und seiner bei erhöhter Menge positiven Wirkung auf den Proteinexport wurde das *secA*-Gen daher als vielversprechender Kandidat für die Verwendung als alternativer Selektionsmarker für Subtilisin-Gen-haltige Plasmide in *B. licheniformis* ausgewählt. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass die Expression des *secA*-Gens, ausgehend von dem in hoher Kopienzahl vorkommenden Subtilisin-Plasmid, auch eine zusätzliche Belastung für die Zellen, die bereits große Mengen an Subtilisin produzieren, bedeutet. Die Synthese des SecA-Proteins könnte hinsichtlich der verfügbaren freien Aminosäuren und der zur Proteinbiosynthese benötigten Energie in direkter Konkurrenz zur Synthese des Subtilisins stehen und daher zu einer verringerten Subtilisin-Ausbeute führen. Eine höhere metabolische Belastung durch die Synthese eines plasmidkodierten Proteins könnte, wie in Experimenten

mit *E. coli* gezeigt wurde, auch einen Rückgang der Plasmidkopienzahl zur Folge haben, was in diesem Fall wiederum in einer verringerten Subtilisin-Ausbeute resultieren würde (Cheah *et al.*, 1987; Corchero & Villaverde 1998). Nach Konstruktion des *secA*-Selektionssystems wurde daher der resultierende Stamm *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA bezüglich der SecA-Menge in den Zellen, der Stabilität des pSubSecA-Plasmids und der im Vergleich zum Ausgangsstamm *B. licheniformis* „E“ pSub sekretierten Subtilisin-Menge untersucht.

2.1. Das *secA*-Selektionssystem führt zu einer erhöhten SecA-Konzentration in den Zellen

Um das essentielle *secA*-Gen als Selektionsmarker zur Subtilisin-Produktion einsetzen zu können, wurde das *secA*-Gen in das Subtilisin-Plasmid pSub kloniert, in den industrierelevanten Stamm *B. licheniformis* „E“ eingebracht und anschließend das chromosomale *secA*-Gen über die Methode der homologen Rekombination deletiert (s. III.2.1.3.). Bei der Klonierung des *secA*-Gens in das Subtilisin-Plasmid pSub in *B. subtilis* DB104 wie auch bei der anschließenden Transformation von *B. licheniformis* „E“ mit dem bereits konstruierten pSubSecA-Plasmid erwies sich das Plasmid als nicht stabil (s. III.2.1.1.). Es wurden zwar zunächst *B. subtilis* bzw. *B. licheniformis* Transformanten mit dem pSubSecA-Plasmid erhalten, doch wurden im Vereinzlungsausstrich immer wieder Klone identifiziert, in denen Teile des pSubSecA-Plasmids deletiert waren. Die Deletionen waren entweder im *sub*- oder im *secA*-Gen lokalisiert. Erst nach mehrfachem Einzelausstrich und wiederholter Auswahl von Klonen konnten solche mit einem stabilen pSubSecA-Plasmid isoliert werden. Das so erhaltene pSubSecA-Konstrukt wies allerdings eine Punktmutation im *secA*-Gen an Bp Position 1725 auf, die vor der Umsetzung des *secA*-Gens aus dem Plasmid pHSGsecAE nicht vorlag und daher während der Klonierung in *B. subtilis* DB104 entstanden sein musste. Da die veränderte Base jedoch keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz des SecA-Proteins hatte, wurde mit diesem pSubSecA-Plasmid weitergearbeitet. Es stellte sich die Frage, worauf die beobachtete Instabilität des pSubSecA-Konstrukts beruhte bzw. warum die Punktmutation an Bp Position 1725 entstanden ist. Da in früheren Experimenten gezeigt wurde, dass das *secA*-Gen, ausgehend von einem Expressionsvektor, in *B. subtilis* in großer Menge überproduziert werden kann ohne einen negativen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zellen zu haben (Frings, 1995), kann für die Zelle nur die Kombination aus überproduziertem Subtilisin und SecA ungünstig sein. Ein erster Gedanke war, dass die Kombination von Subtilisin- und SecA-Überproduktion einen Engpass im Proteinexport bewirkt. Möglicherweise wird das in großer Menge synthetisierte Subtilisin durch die erhöhte SecA-Menge in der Zelle häufiger in den Exportapparat eingeschleust und somit der Export anderer wichtiger Proteine verringert. Eine Konkurrenz von in großer Menge synthetisierten

sekretorischen Proteinen um die Exportstellen der Wirtszelle wurde bereits mehrfach beschrieben (Skare, 1989; Zagorec, 1990; Simonen & Palva, 1993). Da mit dem vollständig konstruierten *secA*-Selektionssystem mit *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA trotz großer Mengen SecA in der Zelle (s. III.2.2.1.) Subtilisin-Ausbeuten in mindestens der gleichen Größenordnung wie mit dem Ausgangsstamm *B. licheniformis* „E“ pSub erzielt werden konnten (s. III.2.2.3.), ist ein durch überproduziertes SecA bedingter Engpass im Export jedoch eher unwahrscheinlich.

Die Überproduktion von SecA und Subtilisin stellt für die Zelle eine erhöhte metabolische Belastung dar. Das könnte sogar dazu führen, dass die Synthese von SecA und Subtilisin mit der Synthese von anderen essentiellen Proteinen konkurriert, so dass letztere vielleicht nicht in ausreichender Menge synthetisiert werden können. Um diesen Engpass zu umgehen, ist vielleicht schon eine geringfügige Absenkung der Expressionsstärke des *secA*-Gens ausreichend. Möglicherweise führt die während der Klonierung des pSubSecA-Plasmids in *B. subtilis* DB104 entstandene stille Mutation an Bp Position 1725 zu einer leichten Verringerung der *secA*-Expression. Durch die Mutation wurde das ursprüngliche TCA-Codon durch ein TCG-Codon ersetzt. Beide Codons stehen für die Aminosäure Serin, jedoch liegen sie in unterschiedlicher Häufigkeit im Genom von *B. subtilis* vor. Während das TCA-Codon mit einer Häufigkeit von 1,48 % aller Codons Verwendung findet, ist das TCG-Codon mit einer Häufigkeit von 0,63 % nur weniger als halb so oft im Genom von *B. subtilis* zu finden (Datenbank: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Da für seltenere Codons auch geringere Mengen an passenden tRNA-Molekülen zur Verfügung stehen, bewirkt die Punktmutation vielleicht eine Verzögerung der Translation und somit eine Verringerung der SecA-Proteinmenge in der Zelle (Knippers, 1997). Die Punktmutation könnte außerdem einen Einfluss auf die mRNA-Stabilität des *secA*-Transkriptes haben. Bei einer verringerten Stabilität würde weniger mRNA zur Translation zur Verfügung stehen, so dass letztendlich weniger SecA-Protein synthetisiert würde. Eine verringerte SecA-Synthese senkt die metabolische Last der Zelle und stellt möglicherweise Ressourcen für die Synthese essentieller Proteine frei. Nach Fertigstellung des *secA*-Selektionssystems wurde jedoch im Western-Blot-Experiment gezeigt, dass ausgehend vom Plasmid pSubSecA trotz Punktmutation im *secA*-Gen hohe Mengen SecA synthetisiert werden (s. III.2.2.1.). Somit bewirkt die Punktmutation, wenn überhaupt, nur eine geringfügige Abnahme der SecA-Konzentration.

Neben der Notwendigkeit des *secA*-Gens für die Lebensfähigkeit der Zelle wurde das *secA* gerade deshalb als alternativer Selektionsmarker zur Selektion von Subtilisin-Gen-haltigen Plasmiden ausgewählt, da eine erhöhte *secA*-Gendosis zu einer erhöhten SecA-Menge in der Zelle und diese wiederum zu einer für manche Proteine verbesserten Sekretion führen kann. Die aufgrund des *secA*-Selektionssystems erhöhte SecA-Menge in den Zellen könnte nach der „Chaperon-Hypothese“ dafür sorgen (Herbort *et al.*, 1999), dass mehr Subtilisin durch cytosolisches SecA gebunden und in der exportkompetenten Konformation gehalten wird bis

es schließlich in den Translokator eingeschleust werden kann (s. auch IV.1.1.). Tatsächlich wurde nach vollständiger Konstruktion des *secA*-Selektionssystems beobachtet (s. III.2.2.3.), dass die erhöhte SecA-Konzentration zu einer gesteigerten Subtilisin-Ausbeute führt.

2.2. Das Plasmid pSubSecA ist in der *secA*-Deletionsmutante *B. licheniformis* „E“ Δ *secA* stabil

Die Motivation zur Konstruktion des *secA*-Selektionssystems war, das Subtilisin-Plasmid während der industriellen Fermentation stabil bis zum Ende der Kultivierung in den Zellen zu halten. Nach Fertigstellung des Systems wurde daher in Schüttelkolbenexperimenten die Stabilität des pSubSecA-Plasmids in der *secA*-Deletionsmutante *B. licheniformis* „E“ Δ *secA* und die Stabilität der Plasmide pSubSecA und pSub im Ausgangsstamm *B. licheniformis* „E“ bei Kultivierung ohne Antibiotikazugabe untersucht. Dazu wurden die im Vereinzelausstrich erhaltenen Klone mittels „Skim-Milk“-Plattentest auf ihre Proteaseaktivität hin untersucht (s. III.2.2.2.). Die Überprüfung der Plasmid-Stabilität von pSubSecA in *B. licheniformis* „E“ Δ *secA* und pSubSecA oder pSub in *B. licheniformis* „E“ erfolgte in zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen. Im ersten Ansatz wurden die Zellen alle 12 h in frisches LB-Medium überimpft und insgesamt über einen Zeitraum von 8 Tagen kultiviert. Im zweiten Ansatz erfolgte die Kultivierung unter den gleichen Bedingungen, die auch zur Bestimmung der Subtilisin-Ausbeuten gewählt wurden, über einen Zeitraum von 72 h bis in die späte stationäre Wachstumsphase (s. III.2.2.3.).

Das pSubSecA-Plasmid erwies sich in der *secA*-Deletionsmutante *B. licheniformis* „E“ Δ *secA* in beiden experimentellen Ansätzen jeweils über den gesamten Kultivierungszeitraum als stabil, während die Plasmide pSubSecA und pSub in *B. licheniformis* „E“ verloren gingen. Im ersten Schüttelkolbenexperiment hatten nach Kultivierung über einen Zeitraum von 8 Tagen nur ca. 6 % der getesteten Klone von *B. licheniformis* „E“ das Plasmid pSub verloren. Im zweiten Experiment, bei der Kultivierung über 72 h ohne Überimpfen, war der Verlustanteil des pSub-Plasmids durch *B. licheniformis* „E“ Zellen deutlich höher. Nach 72-stündiger Kultivierung hatten sogar über 90 % der *B. licheniformis* „E“ Zellen das pSub-Plasmid verloren. Beide experimentellen Ansätze unterschieden sich dadurch, dass die Kulturen im ersten Experiment nach Erreichen der stationären Wachstumsphase in frisches Medium überimpft wurden, während im zweiten Experiment nach Animpfen durchgehend bis zur späten stationären Wachstumsphase weiter kultiviert wurde. Beim Übergang von exponentieller zu stationärer Wachstumsphase sorgt das Zwei-Komponentensystem DegS/DegU für die Induktion von vielen hydrolytischen Enzymen, die von der Zelle sekretiert werden, um eventuell vorhandene externe Nahrungsquellen zu erschließen (Mäder *et al.*, 2002). Auch das auf dem pSub-Plasmid lokalisierte und für das Subtilisin von *B. lentus*

kodierende *sub*-Gen besitzt eine Zielsequenz zur Regulation durch DegU (Jacobs *et al.*, 1985). Zellen mit einem pSub-Plasmid beginnen daher, mit dem Übergang von exponentieller zu stationärer Wachstumsphase in großer Menge Subtilisin zu synthetisieren und zu sekretieren. Der Verlust des pSub-Plasmids stellt daher vielleicht besonders während dieser Sekretionsphase (stationäre Wachstumsphase) einen Selektionsvorteil dar, weil das von den Zellen in LB-Medium nicht benötigte plasmidkodierte Subtilisin dann auch nicht hergestellt und sekretiert werden muss. Entsprechend dieser Ergebnisse über den Plasmidverlust durch *B. licheniformis* Zellen zeigten Harington *et al.* (1988), dass auch bei *B. subtilis* Plasmide überwiegend während der postexponentiellen Wachstumsphase verloren gehen.

Noch drastischer als der Verlust des pSub-Plasmids war der Verlust des Plasmids pSubSecA in *B. licheniformis* „E“ Zellen (2. Experiment, Kultivierungszeit von 72 h). Während nach 24-stündiger Kultivierung ohne Antibiotikum noch kein Verlust des pSub-Plasmids auftrat, hatten nach dieser Kultivierungszeit bereits alle getesteten Klone des *B. licheniformis* „E“ das pSubSecA Plasmid verloren. Der einzige Unterschied zwischen dem pSub- und dem pSubSecA-Plasmid besteht im *secA*-Gen, welches zusätzlich in das pSub-Plasmid kloniert wurde. Die Expression des auf dem Plasmid lokalisierten *secA*-Gens bewirkte eine Zunahme von SecA-Proteinen in den Zellen (s. III.2.2.1.). Bereits während der Konstruktion des pSubSecA-Plasmids traten Schwierigkeiten bezüglich der Stabilität des Plasmids auf (s. III.2.1.1.), die wahrscheinlich nicht auf die Expression des *secA*-Gens alleine, sondern auf die kombinierte Expression von *sub*- und *secA*-Gen zurückzuführen sind (s. auch IV.2.1.). Bei Kultivierung ohne Zugabe von Antibiotikum ergibt sich für Zellen, die das Plasmid verlieren, möglicherweise ein Wachstumsvorteil, da sie im Gegensatz zu Zellen mit einem pSubSecA-Plasmid weder das SecA noch das Subtilisin überproduzieren müssen. Solche Zellen würden daher aufgrund des schnelleren Wachstums während der Kultivierung angereichert (Vyas *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu kann der *secA*-Deletionsstamm *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ das Plasmid pSubSecA aufgrund der für diesen Stamm essentiellen *secA*-Kopie auf dem Plasmid nicht verlieren. Das *secA*-Selektionssystem ist somit funktionell.

2.3. Mit *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA werden bei Kultivierung im Schüttelkolben vergleichbar hohe Subtilisin-Ausbeuten erzielt wie mit dem Ausgangsstamm *B. licheniformis* „E“ pSub

Das *secA*-Selektionssystem wurde konstruiert, um die Stabilität des Subtilisin-Gen-tragenden Plasmids bei Kultivierung ohne Antibiotika zu verbessern, da die industrielle Fermentation auch ohne Antibiotika im Medium durchgeführt wird. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass das pSubSecA-Plasmid bei Kultivierung im Schüttelkolben stabil in *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ Zellen verbleibt, während das ursprünglich verwendete Plasmid

pSub den *B. licheniformis* „E“ Zellen im Laufe der Kultivierung verloren geht (s. III.2.1.1.). Das *secA*-Selektionssystem könnte somit zu einer Steigerung der mit *B. licheniformis* „E“ erzielten Subtilisin-Ausbeute führen. Im Western-Blot-Experiment wurde weiterhin gezeigt, dass Zellen mit dem pSubSecA-Plasmid im Vergleich zu solchen mit dem pSub-Plasmid eine erhöhte SecA-Konzentration aufweisen (s. III.2.2.1.). Da eine erhöhte SecA-Menge einen positiven Effekt auf die Proteinsekretion haben kann (Leloup *et al.*, 1999), könnte diese die Subtilisin-Ausbeute noch zusätzlich steigern. Wie bereits erwähnt stellt die Überexpression des *secA*-Gens für die Zellen, die schon in großer Menge Subtilisin produzieren, auch eine zusätzliche Belastung dar (s. IV.2. und IV.2.1.). Ein Vergleich der mit den Stämmen *B. licheniformis* „E“ mit dem Plasmid pSub bzw. pSubSecA und mit *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA im Schüttelkolbenexperiment erzielten Subtilisin-Ausbeuten sollte zeigen, welchen Einfluss das *secA*-Selektionssystem nun insgesamt auf die Subtilisin-Ausbeuten hat (s. III.2.2.3.). Dazu wurde sowohl eine Kultivierung mit als auch ohne Antibiotikum durchgeführt.

2.3.1. Die Überexpression des *secA*-Gens hat einen positiven Einfluss auf die Subtilisin-Ausbeute mit *B. licheniformis* „E“

Die SecA-Menge in Zellen mit dem pSubSecA-Plasmid ist im Vergleich zu solchen mit dem Plasmid pSub deutlich erhöht (s. III.2.2.1.). Um bei gleicher Plasmidstabilität nur den Einfluss der hohen SecA-Konzentration und der aus der Überproduktion von SecA resultierenden größeren metabolischen Belastung auf die Subtilisin-Ausbeute zu untersuchen, wurde eine Kultivierung unter Zugabe von Antibiotika durchgeführt. Unter diesem Selektionsdruck sollten beide Plasmide stabil in den Zellen verbleiben. Mit dem Stamm *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA (113,5 U/ml) wurde im Vergleich zum Ausgangsstamm *B. licheniformis* „E“ pSub (94,1 U/ml) eine um fast 19 % höhere Subtilisin-Ausbeute erzielt (s. III.2.2.3.). Die zur hohen Subtilisin-Synthese zusätzliche Überproduktion von SecA hat somit keinen negativen Einfluss auf die Ausbeute, sondern scheint im Gegenteil eine erhöhte Sekretion von Subtilisin in den Kulturüberstand zu bewirken. Mit dem *B. licheniformis* „E“ Stamm ohne chromosomale *secA*-Deletion wurde dagegen in Gegenwart des Plasmids pSubSecA eine im Vergleich zum Ausgangsstamm nur ca. 50%ige Subtilisin-Ausbeute erzielt (49,1 U/ml). Dies war deshalb erstaunlich, da sich *B. licheniformis* „E“ pSubSecA und *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA nur dadurch unterscheiden, dass im letzteren Stamm das chromosomale *secA*-Gen deletiert ist. Durch die Untersuchung einzelner Klone im „Skim-Milk“-Plattentest und durch Plasmidpräparationen wurde nachgewiesen, dass *B. licheniformis* „E“ Zellen erstaunlicherweise das pSubSecA-Plasmid trotz Selektion mit Antibiotikum verloren hatten. Dagegen blieben die Plasmide in den beiden anderen Stämmen *B. licheniformis* „E“ pSub und

B. licheniformis „E“ $\Delta secA$, wie bei Selektion durch Antibiotikum zu erwarten, bis zum Ende der Kultivierung erhalten. Die nur geringe Subtilisin-Aktivität, die mit dem Stamm *B. licheniformis* „E“ pSubSecA erzielt wurde, lässt sich somit durch das Fehlen des pSubSecA-Plasmids erklären. Das Plasmid könnte über den 2,7 kB großen homologen Bereich des *secA*-Gens in das Chromosom integriert worden sein. Das *sub*-Gen und das für die Tetracyclinresistenz kodierende *tetR*-Gen könnten so vom Chromosom aus exprimiert werden. Die verringerte Gendosis des *sub*-Gens würde die verringerte Subtilisin-Aktivität pro ml Kulturüberstand erklären. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das pSubSecA-Plasmid tatsächlich ganz verloren gegangen ist und es sich bei den Zellen ohne Plasmid um spontan tetracyclinresistente Mutanten handelt. Aufgrund des bereits diskutierten Wachstumsnachteils, der den Zellen wahrscheinlich aufgrund der Expression des *secA*- und des *sub*-Gens entsteht, würden spontanresistente Zellen während der Kultivierung angereichert.

2.3.2. Im Schüttelkolbenexperiment ohne Antibiotika werden mit *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA und *B. licheniformis* „E“ pSub vergleichbare Subtilisin-Ausbeuten erhalten

Nachdem nun gezeigt wurde, dass das *secA*-Selektionssystem trotz wahrscheinlich für die Zelle zusätzlicher metabolischer Belastung einen positiven Effekt auf die Subtilisin-Ausbeute hat, wurde in einer weiteren Kultivierung im Schüttelkolben ohne Antibiotikazugabe untersucht, wie sich die vollständige Stabilität des pSubSecA-Plasmids in *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ im Vergleich zum Verlust der Plasmide pSub bzw. pSubSecA durch *B. licheniformis* „E“ auf die sekretierte Subtilisin-Menge auswirkt. Entgegen der Erwartung wurden mit den Stämmen *B. licheniformis* $\Delta secA$ pSubSecA und dem Ausgangsstamm *B. licheniformis* „E“ pSub nur Subtilisin-Ausbeuten in vergleichbarer Höhe erzielt, obwohl der Ausgangsstamm das Plasmid nachweislich während der Kultivierung ohne Zusatz von Antibiotikum verloren hat. Möglicherweise wird zu frühen Zeitpunkten nach Erreichen der stationären Wachstumsphase bereits der größte Teil des Subtilisins in den Kulturüberstand sekretiert (nur 1,5 % - 5,4 % der Zellen hatten das Plasmid bis zum Kultivierungszeitpunkt von 48 h verloren), so dass ein Verlust zu späteren Zeiten keinen sehr großen Einfluss mehr auf die Gesamtausbeute des Subtilisins hat. Zudem ist die Verlustrate des pSub-Plasmids stark von den Kultivierungsbedingungen abhängig. Während bei der Kultivierung über einen Zeitraum von 8 Tagen und Überimpfen der Zellen in frisches LB-Medium 5,8 % der *B. licheniformis* „E“ Zellen das pSub-Plasmid verloren hatten, war der Verlustanteil mit über 90 % bei Kultivierung über einen Zeitraum von 72 h bis in die späte stationäre Wachstumsphase sehr viel größer. Die industrielle Fermentation erfolgt ebenfalls über einen Zeitraum von 72 h. Es ist davon auszugehen, dass die stationäre Wachstumsphase bei

Kultivierung im Fermenter wegen der verwendeten komplexen Nährmedien (z. B. Soja-Mehl) und der für die Zellen optimierten Wachstumsbedingungen zu früheren Zeiten erreicht wird als bei der Kultivierung im Schüttelkolben. Zusätzlich wird wahrscheinlich die Absterbephase aufgrund der für die Zellen im Fermenter optimierten Lebensbedingungen hinausgezögert. Somit würde die für die Subtilisin-Produktion entscheidende stationäre Wachstumsphase verlängert. Da die Plasmidverluste hauptsächlich während dieser Wachstumsphase auftreten (Harington *et al.*, 1988), könnte die Fermentation im Vergleich zum Schüttelkolbenexperiment einen höheren Verlust des pSub-Plasmids zur Folge haben. Die vollständige Plasmidstabilität des pSubSecA-Plasmids in *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ Zellen sollte daher insbesondere im Fermentationsprozess zu einer Steigerung der Subtilisin-Ausbeute führen.

Im Vergleich zu den hier im Schüttelkolbenexperiment ohne Antibiotikazugabe mit *B. licheniformis* „E“ pSub und *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ pSubSecA erzielten Subtilisin-Ausbeuten war die mit *B. licheniformis* „E“ pSubSecA ohne chromosomale *secA*-Deletion erzielte Ausbeute deutlich geringer. Sie entsprach in etwa der Ausbeute, die mit dem Stamm ohne Plasmid erhalten wurde. Da gezeigt wurde, dass unter diesen Kultivierungsbedingungen *B. licheniformis* „E“ Zellen das pSubSecA-Plasmid bereits nach 24-stündiger Kultivierung verloren haben (s. III.2.2.2.), lässt sich die geringe Subtilisin-Aktivität dieses Stammes durch den frühen Verlust des Plasmids erklären. Allerdings konnten im Kulturüberstand von *B. licheniformis* „E“ pSubSecA mittels Coomassie-gefärbtem SDS-Polyacrylamidgel deutliche Mengen Subtilisin nachgewiesen werden, während im Kulturüberstand des Stammes ohne Plasmid kein Subtilisin detektiert werden konnte. Die Konzentration des chromosomal kodierten Subtilisins, welches wie das plasmidkodierte Subtilisin von *B. lentus* eine molekulare Masse von 27 kDa besitzt, scheint daher für den Nachweis im Coomassie-gefärbten Gel zu gering zu sein. Somit kann es sich bei der im Kulturüberstand von *B. licheniformis* „E“ pSubSecA nachgewiesenen Bande nur um das plasmidkodierte Subtilisin von *B. lentus* handeln, welches vor dem Plasmidverlust noch synthetisiert wurde aber nach den Ergebnissen des AAPF-Testes zu urteilen, nicht vollständig aktiv zu sein scheint. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Stämme mit einem pSub- oder pSubSecA-Plasmid zwar große Mengen Subtilisin synthetisieren, aber nur ein Gemisch aus aktivem und inaktivem Enzym in den Kulturüberstand entlassen. Für *B. subtilis* wurde gezeigt, dass die Konzentration des essentiellen extracytoplasmatischen Faltungshelfers PrsA bei Überproduktion von α -Amylase und Subtilisin „Carlsberg“ (*subC*) limitierend für deren Sekretion in den Kulturüberstand ist (Kontinen & Sarvas, 1993; Vitikainen *et al.*, 2001). „Puls-Chase“-Experimente mit überproduzierten Subtilisin-PhoA-Fusionsproteinen zeigten weiterhin, dass in *B. subtilis* *prsA*-Mutanten nicht die Translokation selbst, sondern die anschließende Freisetzung und die Reifung des Subtilisins verzögert ist (Jacobs *et al.*, 1993). Das an der Außenseite der Plasmamembran verankerte PrsA wird somit als Faltungshelfer für translozierte Proteine an der Grenzfläche von Cytoplasmamembran und Zellwand benötigt. Hier sorgt es wahrscheinlich dafür, dass die sekretierten Proteine keine unproduktiven

Wechselwirkungen mit der Zellwand eingehen und so in ihre native Konformation falten können (Wahlström *et al.*, 2003). Auch in *B. licheniformis* DSM13 wurde ein *prsA*-Gen identifiziert, dessen Genprodukt eine Identität von 69% zum PrsA-Protein von *B. subtilis* aufweist (Frings, 1995). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass auch in *B. licheniformis* die PrsA-Konzentration bei der Gewinnung von sekretorischen Proteinen limitierend ist. Bei Überproduktion des Subtilisins, ausgehend vom Plasmid pSub oder pSubSecA, steht möglicherweise nicht genug PrsA zur Verfügung, um die Faltung des gesamten in großen Mengen sekretierten Subtilisins zu katalysieren, während für die geringeren Mengen des chromosomal kodierten Subtilisins die PrsA-Konzentration für die Faltung nicht limitierend ist. *B. licheniformis* „E“ pSubSecA Zellen verlieren ihr Plasmid während der ersten 24 h der Kultivierung vollständig (s. III.2.2.2.). Diese Zellen sekretieren also nur zu Beginn der stationären Wachstumsphase plasmidkodiertes Subtilisin, welches aufgrund der limitierenden PrsA-Menge wahrscheinlich nur zum Teil in seiner nativen aktiven Konformation ins Kulturmedium entlassen wird. Auch wenn nur ein geringer Teil des während dieser Zeit synthetisierten, plasmidkodierten Subtilisins als aktives Enzym in den Kulturüberstand entlassen wird, sollte mit *B. licheniformis* pSubSecA eine zumindest etwas höhere Ausbeute erzielt werden als mit dem Stamm ohne Plasmid. Der AAPF-Test ergab aber entgegen dieser Erwartung nur ähnlich hohe Subtilisin-Aktivitäten für beide Stämme.

Die Tatsache, dass ein großer Teil des von *B. licheniformis* „E“ in den Kulturüberstand entlassenen Subtilisins nicht aktiv zu sein scheint, bedeutet wahrscheinlich in der industriellen Produktion eine deutliche Verringerung der Gesamtausbeuten. Durch Überproduktion von PrsA in *B. licheniformis* „E“ ließe sich vielleicht der Anteil an aktivem in den Kulturüberstand freigesetztem Subtilisin steigern. Für die Sekretion von Subtilisin „Carlsberg“ mit *B. subtilis* wurde gezeigt, dass die Koexpression des *prsA*-Gens zu einer deutlichen Ausbeutesteigerung führt (Kontinen & Sarvas, 1993). Insbesondere transloziertes ungefaltetes oder gefaltetes aber noch nicht autoprozessiertes Pro-Subtilisin ist anfällig für proteolytischen Abbau (Yabuta *et al.*, 2001). Eine durch hohe Mengen PrsA katalysierte schnellere Reifung und Freisetzung des Subtilisins verringert so zunächst den Zeitraum, in dem der Abbau stattfinden kann und sorgt weiterhin für die richtige Faltung des Subtilisins zu einem aktiven Enzym mit einer proteaseresistenten Konformation. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass eine erhöhte PrsA-Menge auch die Sekretion des Subtilisins von *B. lentus* mit *B. licheniformis* „E“ verbessern kann. Eine erhöhte PrsA-Menge sorgt hier möglicherweise sowohl für einen Anstieg der Gesamtmenge an freigesetztem Subtilisin als auch für einen erhöhten Anteil von in seine native Konformation gefaltetem und somit aktivem Subtilisin im Kulturüberstand. Die Koexpression von *prsA* erscheint somit eine vielversprechende Möglichkeit, um die Subtilisin-Ausbeuten mit *B. licheniformis* „E“ weiter zu steigern.

2.4. Abschließende Betrachtung des *secA*-Selektionssystems für die industrielle Subtilisin-Produktion mit *B. licheniformis*

Mit dem *secA*-Selektionssystem ist es gelungen, ein zur Selektion mit Antibiotika alternatives System zu konstruieren. In dieser Arbeit wurde im Schüttelkolbenexperiment gezeigt, dass der Stamm *B. licheniformis* „E“ $\Delta secA$ das pSubSecA-Plasmid stabil in den Zellen behält und dass die Überexpression des *secA*-Gens, ausgehend vom Plasmid pSubSecA, einen positiven Einfluss auf die Subtilisin-Ausbeute hat. Das bisher zur industriellen Subtilisin-Produktion mit *B. licheniformis* verwendete Plasmid besitzt zur anfänglichen Selektion ein Antibiotikaresistenzgen, doch wird die eigentliche Fermentation ohne Selektionsdruck durchgeführt, so dass die Zellen im Laufe der Kultivierung das Plasmid verlieren. Zur industriellen Subtilisin-Produktion werden die Kultivierungsbedingungen so gewählt, dass in kurzer Zeit hohe Zelldichten erreicht werden und dass die Zellen anschließend möglichst lange in der für die Subtilisin-Produktion entscheidenden stationären Wachstumsphase verbleiben. Da sowohl eine hohe Wachstumsrate (Vyas *et al.*, 1994) als auch eine verlängerte postexponentielle Wachstumsphase (Harington *et al.*, 1988) den Plasmidverlust begünstigen, sollte die im Gegensatz zum pSub-Plasmid vollständige Stabilität des pSubSecA-Plasmids insbesondere unter fermentativen Bedingungen zu einer deutlichen Steigerung der Subtilisin-Ausbeute führen. Das *secA*-Selektionssystem ist somit eine vielversprechende Methode, um die Ausbeuten bei der industriellen Gewinnung von sekretorischen Enzymen weiter zu steigern. Da antibiotikaresistente Krankheitserreger mittlerweile ein großes Problem bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten darstellen, besteht ein zusätzliches allgemeines Interesse, Antibiotikaresistenzgene als Selektionsmarker zu vermeiden. Auch hier bietet das *secA*-Selektionssystem für die industrielle Gewinnung von Enzymen eine gute Alternative.

V. Zusammenfassung

B. licheniformis wird von der Waschmittelindustrie zur Gewinnung von Proteasen des Subtilisin-Typs eingesetzt. Die zur Produktion verwendeten Stämme werden zumeist über wiederholte Zyklen von ungerichteter Mutagenese und anschließendem Screening auf hohe Sekretionsleistung erhalten. Die Ursachen für die guten Sekretionseigenschaften sind in der Regel nicht bekannt. In dieser Arbeit sollten im industrierelevanten Stamm *B. licheniformis* „E“ Sequenzunterschiede zum Wt-Stamm *B. licheniformis* DSM13 identifiziert werden, die zu dessen guten Sekretionseigenschaften beitragen. Anzunehmen ist, dass solche Mutationen Gene der Proteinbiosynthese oder der Proteintranslokation betreffen. Ein möglicher Genort für solche Mutationen ist der *secA*-Genlocus, der sowohl ein Gen der Proteintranslokation als auch eines der Proteinbiosynthese enthält. Der *secA*-Genlocus besteht aus dem für die zentrale und energieliefernde Komponente der Proteintranslokation kodierenden *secA*-Gen und dem stromabwärts lokalisierten *prfB*-Gen, das für den „Release“-Faktor 2 (RF2) kodiert. RF2 sorgt bei der Termination der Proteinbiosynthese für das Ablösen der vollständig synthetisierten Proteine vom Ribosom.

Im *secA*-Genlocus des industrierelevanten Stammes wurden im Vergleich zum Wt-Stamm 41 Punktmutationen gefunden, von denen erstaunlicherweise nur eine im 2526 Bp großen *secA*-Gen liegt, dagegen aber 40 im viel kleineren, 1102 Bp großen *prfB*-Gen lokalisiert sind. Die Mutation im *secA*-Gen ist eine stille Mutation und bewirkt daher keine Veränderung im SecA-Protein. Da gezeigt werden konnte, dass der industrierelevante Stamm in der späten stationären Wachstumsphase jedoch viermal mehr SecA-Protein aufweist als der Wt-Stamm, bewirken die Mutationen im *secA*-Genlocus sehr wahrscheinlich unter anderem eine Stabilisierung der bicistronischen *secA-prfB*-mRNA. Die daraus resultierende Erhöhung der SecA-Konzentration könnte eine der Ursachen für die guten Sekretionseigenschaften des industrierelevanten Stammes sein.

Zwei der im *prfB*-Gen des industrierelevanten Stammes identifizierten Mutationen hatten die Veränderung je einer Aminosäure im RF2-Protein zur Folge. Durch Variation der Expression des unveränderten und des mutierten *prfB*-Gens wurde sowohl der Einfluss der Aminosäureaustausche als auch der Einfluss einer erhöhten RF2-Menge auf die mit dem Wt- und dem industrierelevanten Stamm erzielte Subtilisin-Ausbeute untersucht. Mit dem Wt-Stamm wurde bei einer moderaten Erhöhung der RF2-Konzentration, unabhängig davon welches *prfB*-Gen exprimiert wurde, eine deutlich gesteigerte Subtilisin-Ausbeute erhalten, wogegen höhere RF2-Mengen nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Ausbeute führten. Dies deutet auf ein fein abgestimmtes Verhältnis der Konzentrationen von RF2, den Ribosomen und weiteren an der Proteinbiosynthese beteiligten Faktoren hin. Im industrierelevanten Stamm bewirkte die Überexpression des eigenen, mutierten *prfB*-Gens eine deutliche Ausbeutesteigerung, wogegen bereits eine sehr geringe Expression des Wt *prfB*-Gens im industrierelevanten Stamm eine Verringerung der sekretierten Subtilisin-Menge zur Folge

hatte. Da sowohl die Natur als auch die Konzentration des RF2-Proteins einen Einfluss auf die Höhe der Subtilisin-Ausbeute hat, ist es sehr wahrscheinlich, dass die identifizierten Mutationen zusammen mit weiteren Mutationen in anderen Komponenten des Proteinbiosynthese-Apparates eine erhöhte Proteinbiosynthese-Kapazität bewirken und somit wesentlich für die mit dem industrierelevanten Stamm erzielten hohen Subtilisin-Aubeuten verantwortlich sind.

Bei der industriellen Subtilisin-Gewinnung erfolgt die Expression des Subtilisin-Gens von einem Plasmid, welches zur anfänglichen Selektion eine Antibiotikaresistenzkassette enthält. Die eigentliche Fermentation wird jedoch ohne Antibiotika im Medium durchgeführt, so dass ein Teil der Zellen das Plasmid während der Kultivierung verliert.

In dieser Arbeit wurde ein alternatives Selektionssystem konstruiert, bei dem das essentielle *secA*-Gen als Selektionsmarker fungiert. Dazu wurde das *secA*-Gen des industrierelevanten *B. licheniformis* Stammes in das zur Subtilisin-Synthese verwendete Plasmid kloniert, das so entstandene Plasmid in Zellen des industrierelevanten Stammes eingebracht und anschließend dessen chromosomales *secA*-Gen deletiert. Das Subtilisin-SecA-Plasmid blieb in der *secA*-Deletionsmutante über den gesamten Zeitraum der Kultivierung stabil und im Schüttelkolben-Maßstab wurden Subtilisin-Ausbeuten in mindestens der gleichen Größenordnung erzielt wie mit dem Ausgangsstamm ohne Selektionsdruck durch Antibiotika. Die vollständige Stabilität des Subtilisin-SecA-Plasmids lässt erwarten, dass insbesondere unter den fermentativen Bedingungen der industriellen Subtilisin-Gewinnung eine signifikante Ausbeutesteigerung erzielt werden kann.

VI. Literatur

- Akimaru, J.**, Matsuyama, S., Tokuda, H. & Mizushima, S. (1991): Reconstitution of a protein translocation system containing purified SecY, SecE, and SecA from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (15), 6545-9.
- Baud, C.**, Karamanou, S., Sianidis, G., Vrontou, E., Politou, A. S. & Economou, A. (2002): Allosteric communication between signal peptides and the SecA protein DEAD motor ATPase domain. *J. Biol. Chem.* 277 (16), 13724-31.
- Beck, K.**, Wu, L. F., Brunner, J. & Müller, M. (2000): Discrimination between SRP- and SecA/SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor. *EMBO J.* 19 (1), 134-43.
- Beck, K.**, Eisner, G., Trescher, D., Dalbey, R. E., Brunner, J. & Müller, M. (2001): YidC, an assembly site for polytopic *Escherichia coli* membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. *EMBO Rep.* 2 (8), 709-14.
- Benach, J.**, Chou, Y. T., Fak, J. J., Itkin, A., Nicolae, D. D., Smith, P. C., Wittrock, G., Floyd, D. L., Golsaz, C. M., Gierasch, L. M. & Hunt, J. F. (2003). Phospholipid-induced monomerization and signal-peptide-induced oligomerization of SecA. *J. Biol. Chem.* 278 (6), 3628-38.
- Bernstein, H. D.**, Poritz, M. A., Strub, K., Hoben, P. J., Brenner, S. & Walter, P. (1989): Model for signal sequence recognition from amino-acid sequence of 54K subunit of signal recognition particle. *Nature* 340 (6233), 482-6.
- Bessonneau, P.**, Besson, V., Collinson, I. & Duong, F. (2002): The SecYEG preprotein translocation channel is a conformationally dynamic and dimeric structure. *EMBO J.* 21 (5), 995-1003.
- Bochkareva, E. S.**, Solovieva, M. E. & Girshovich, A. S. (1998): Targeting of GroEL to SecA on the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (2), 478-83.
- Bolhuis, A.**, Broekhuizen, C. P., Sorokin, A., van Roosmalen, M. L., Venema, G., Bron, S., Quax, W. J. & van Dijl, J. M. (1998): SecDF of *Bacillus subtilis*, a molecular Siamese twin required for the efficient secretion of proteins. *J. Biol. Chem.* 273 (33), 21217-24.
- Braun, P.**, Tommassen, J. & Filloux, A. (1996): Role of the propeptide in folding and secretion of elastase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 19 (2), 297-306.
- Breyton, C.**, Haase, W., Rapoport, T. A., Kuhlbrandt, W. & Collinson, I. (2002): Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* 418 (6898), 662-5.
- Briggs, M. S.**, Cornell, D. G., Dluhy, R. A. & Gierasch, L. M. (1986): Conformations of signal peptides induced by lipids suggest initial steps in protein export. *Science* 233 (4760), 206-8.

Brundage, L., Hendrick, J. P., Schiebel, E., Driessen, A. J. & Wickner, W. (1990): The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* 62 (4), 649-57.

Bunai, K., Yamada, K., Hayashi, K., Nakamura, K., Yamane, K. (1999): Enhancing effect of *Bacillus subtilis* Ffh, a homologue of the SRP54 subunit of the mammalian signal recognition particle, on the binding of SecA to precursors of secretory proteins in vitro. *J. Biochem. (Tokyo)* 125 (1), 151-9.

Cheah, U. E., Weigand, W. A. & Stark, B. C. (1987): Effects of Recombinant Plasmid Size on Cellular Processes in *Escherichia coli*. *Plasmid* 18, 127-34.

Chen, M., Samuelson, J. C., Jiang, F., Müller, M., Kuhn, A. & Dalbey, R. E. (2002a): Direct interaction of YidC with the Sec-independent Pf3 coat protein during its membrane protein insertion. *J. Biol. Chem.* 277 (10), 7670-5.

Chen, M., Xie, K., Jiang, F., Yi, L. & Dalbey, R. E. (2002b): YidC, a newly defined evolutionarily conserved protein, mediates membrane protein assembly in bacteria. *Biol. Chem.* 383 (10), 1565-72.

Chou, Y. T., Swain, J. F. & Gierasch, L. M. (2002): Functionally significant mobile regions of *Escherichia coli* SecA ATPase identified by NMR. *J. Biol. Chem.* 277 (52), 50985-90.

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

Collinson, I., Breyton, C., Duong, F., Tziatzios, C., Schubert, D., Or, E., Rapoport, T. & Kuhlbrandt, W. (2001): Projection structure and oligomeric properties of a bacterial core protein translocase. *EMBO J.* 20 (10), 2462-71.

Corchero, J. L. & Villaverde, A. (1998): Plasmid Maintenance in *Escherichia coli* Recombinant Cultures is Dramatically, Steadily and Specifically Influenced by Features of the Encoded Proteins. *Biotech. and Bioeng.* 58 (6), 625-32.

Degryse, E. (1991): Development of stable, genetically well-defined conditionally viable *Escherichia coli* strains. *Mol. Gen. Genet.* 227 (1), 49 -51.

den Blaauwen, T. & Driessen, A. J. (1996): Sec-dependent preprotein translocation in bacteria. *Arch. Microbiol.* 165 (1), 1-8.

den Blaauwen, T., Fekkes, P., de Wit, J. G., Kuiper, W. & Driessen, A. J. (1996): Domain interactions of the peripheral preprotein Translocase subunit SecA. *Biochemistry* 35 (37), 11994-2004.

Donly, B. C. & Tate, W. P. (1991): Frameshifting by eukaryotic ribosomes during expression of *Escherichia coli* release factor 2. *Proc.R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 244 (1311), 207-10.

Driessen, A. J. (1992): Precursor protein translocation by the *Escherichia coli* translocase is directed by the protonmotive force. *EMBO J.* 11 (3), 847-53.

- Driessen, A. J.** (1994): How proteins cross the bacterial cytoplasmic membrane. *J. Membrane Biol.* 142, 145-159.
- Driessen, A. J., Fekkes, P. & van der Wolk, J. P.** (1998): The Sec system. *Curr. Opin. Microbiol.* 1 (2), 216-22.
- Duong, F. & Wickner, W.** (1997a): Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO J.* 16 (10), 2756-68.
- Duong, F. & Wickner, W.** (1997b): The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J.* 16 (16), 4871-9.
- Economou, A. & Wickner, W.** (1994): SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* 78 (5), 835-43.
- Economou, A., Pogliano, J. A., Beckwith, J., Oliver, D. B. & Wickner, W.** (1995): SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell* 83 (7), 1171-81.
- Economou, A.** (1998): Bacterial preprotein translocase: mechanism and conformational dynamics of a processive enzyme. *Mol. Microbiol.* 27 (3), 511-8.
- Economou, A.** (2000): Bacterial protein translocase: a unique molecular machine with an army of substrates. *FEBS Lett.* 476 (1-2), 18-21.
- Eggertsson, G. & Soll, D.** (1988): Transfer ribonucleic acid-mediated suppression of termination codons in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 52, 354-79.
- Elliott, T. & Wang, X.** (1991): *Salmonella typhimurium prfA* mutants defective in release factor 1. *J. Bacteriol.* 173 (13), 4144-54.
- Farabaugh, P. J.** (1996): Programmed translational frameshifting. *Microbiol. Rev.* 60 (1), 103-34.
- Frings, E.** (1995): Untersuchungen zur Limitierung des bakteriellen Proteinexports und Isolierung *prsA*-homologer Gene aus *Bacillus licheniformis*. Dissertation, Forschungszentrum Jülich GmbH.
- Freudl, R.** (1998): Proteinsekretion bei Gram-positiven Bakterien: Molekulare Grundlagen und biotechnologische Aspekte. *Biospektr.* 1/98, 29-33.
- Frolova, L. Y., Tsivkovskii, R. Y., Sivolobova, G. F., Oparina, N. Y., Serpinsky, O. I., Blinov, V. M., Tatkov, S. I. & Kisselev, L. L.** (1999): Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA* 5 (8), 1014-20.
- Grentzmann, G., Brechemier-Baey, D., Heurgue, V., Mora, L. & Buckingham, R.** (1994): Localization and Characterization of the Gene Encoding Release Factor RF3 in *Escherichia coli*. *PNAS* 91 (13), 5848-52.

Gupta, R., Beg, Q. K. & Lorenz, P. (2002): Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59 (1), 15-32.

Haki, G. D. & Rakshit, S. K. (2003): Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour. Technol.* 89 (1), 17-34.

Hanahan, D. (1983): Studies on the transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-80.

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

Harington, A., Watson, T. G., Luow, M. E., Rodel, J. E. & A., T. J. (1988): Stability during fermentation for a recombinant α -amylase plasmid in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 27, 521-7.

Hayashi, S., Chang, S. Y., Chang, S., Giam, C. Z. & Wu, H. C. (1985): Modification and processing of internalized signal sequences of prolipoprotein in *Escherichia coli* and in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 260 (9), 5753-9.

Herbort, M. (1996): Untersuchungen zur Regulation der Expression des Gens für das SecA-Protein, einer zentralen Komponente des Proteinexportapparates von *Bacillus subtilis*. Dissertation, Forschungszentrum Jülich GmbH.

Herbort, M., Klein, M., Manting, E. H., Driessen, A. J. & Freudl, R. (1999): Temporal expression of the *Bacillus subtilis* *secA* gene, encoding a central component of the preprotein translocase. *J. Bacteriol.* 181 (2), 493-500.

Hintz, M. (1999): Klonierung und molekulare Charakterisierung des *secA*-Gens von *Bacillus licheniformis*. Diplomarbeit, Forschungszentrum Jülich GmbH.

Honda, K., Nakamura, K., Nishiguchi, M. & Yamane, K. (1993): Cloning and characterization of a *Bacillus subtilis* gene encoding a homolog of the 54-kilodalton subunit of mammalian signal recognition particle and *Escherichia coli* Ffh. *J. Bacteriol.* 175 (15), 4885-94.

Hunt, J. F., Weinkauff, S., Henry, L., Fak, J. J., McNicholas, P., Oliver, D. B. & Deisenhofer, J. (2002): Nucleotide control of interdomain interactions in the conformational reaction cycle of SecA. *Science* 297 (5589), 2018-26.

Ito, K., Ebihara, K., Uno, M. & Nakamura, Y. (1996): Conserved motifs in prokaryotic and eukaryotic polypeptide release factors: tRNA-protein mimicry hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (11), 5443-8.

Ito, K., Uno, M. & Nakamura, Y. (2000): A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA. *Nature* 403 (6770), 680-4.

Izard, J. W. & Kendall, D. A. (1994): Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol. Microbiol.* 13 (5), 765-73.

Jacobs, M., Eliasson, M., Uhlen, M., Flock, JI. (1985): Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*. *Nucleic. Acids. Res.* 13 (24), 8913-8926.

- Jacobs, M.**, Andersen, J., 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.
- Jäger, K.-E.** & Eggert, T. (2002): Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 13 (4), 390-97.
- Jeong, S. M.**, Yoshikawa, H. & Takahashi, H. (1993): Isolation and characterization of the *secE* homologue gene of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 10 (1), 133-42.
- Jørgensen, F.**, Adamski F. M., Tate, W. P., Kurland, C. G. (1993): Release factor-dependent false stops are infrequent in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 230 (1), 41-50.
- 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.
- Kawamura, F.** and Doi, R.H. (1984): Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral protease. *J. Bacteriol.* 160, 442-444.
- Kessler, E.** & Safrin, M. (1994): The propeptide of *Pseudomonas aeruginosa* elastase acts an elastase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 269 (36), 22726-31.
- Klaholz, B. P.**, Pape, T., Zavialov, A. V., Myasnikov, A. G., Orlova, E. V., Vestergaard, B., Ehrenberg, M. & van Heel, M. (2003): Structure of the *Escherichia coli* ribosomal termination complex with release factor 2. *Nature* 421 (6918), 90-4.
- Klein, M.** (1995): Isolierung und funktionelle Charakterisierung des *secA*-Gens aus *Staphylococcus carnosus* und eines azidresistenten *secA*-Allels von *Bacillus subtilis*. Dissertation, Forschungszentrum Jülich GmbH.
- Knippers, R.** (1997): Molekulare Genetik. Thime Verlag, Stuttgart 7. Auflage.
- Koch, H.-G.**, Hengelage, T., Neumann-Haefelin, C., MacFarlane, J., Hoffschulte, H. K., Schimz, K.-L., Mechler, B. & Müller, M. (1999): In Vitro Studies with Purified Components Reveal Signal Recognition Particle (SRP) and SecA/SecB as Constituents of Two Independent Protein-targeting Pathways of *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Cell* 10 (7), 2163-73.
- Kontinen, V.** & 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.
- Kovach, M.E.** Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R.M. & Peterson, K. M. (1995): Four new derivatives of the broad host range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175-76.
- Kumamoto, C. A.** (1989): *Escherichia coli* SecB protein associates with exported protein precursors in vivo. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 86 (14), 5320-4.
- Kumamoto, C. A.** (1990). SecB protein: a cytosolic export factor that associates with nascent exported proteins. *J. Bioenerg. Biomembr.* 22 (3), 337-51.

Kumamoto, C. A. & Francetic, O. (1993): Highly selective binding of nascent polypeptides by an *Escherichia coli* chaperone protein in vivo. *J. Bacteriol.* 175 (8), 2184-8.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A. & *et al.* (1997): The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390 (6657), 249-56.

Kusters, R., Dowhan, W. & de Kruijff, B. (1991): Negatively charged phospholipids restore prePhoE translocation across phosphatidylglycerol-depleted *Escherichia coli* inner membranes. *J. Biol. Chem.* 266 (14), 8659-62.

Lee, H. C. & Bernstein, H. D. (2001): The targeting pathway of *Escherichia coli* presecretory and integral membrane proteins is specified by the hydrophobicity of the targeting signal. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 98 (6), 3471-6.

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.

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 (23), 9213-7.

Lukacsovich, T., Baliko, G., Orosz, A., Balla, E., Venetianer, P. (1990): New approaches to increase the expression and stability of cloned foreign genes in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 30 (4), 243-50.

Mäder, U., Antelmann, H., Buder, T., Dahl, MK., Hecker, M., Homuth, G. (2002): *Bacillus subtilis* functional genomics: genome-wide analysis of the DegS-DegU regulon by transcriptomics and proteomics. *Mol. Genet. Genomics.* 268 (4), 455-67.

Manting, E. H., van der Does, C. & Driessen, A. J. (1997). In vivo cross-linking of the SecA and SecY subunits of the *Escherichia coli* preprotein translocase. *J. Bacteriol.* 179 (18), 5699-704.

Manting, E. H., Kaufmann, A., van der Does, C. & Driessen, A. J. (1999): A single amino acid substitution in SecY stabilizes the interaction with SecA. *J. Biol. Chem.* 274 (34), 23868-74.

Manting, E. H., van Der Does, C., Remigy, H., Engel, A. & Driessen, A. J. (2000): SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *EMBO J.* 19 (5), 852-61.

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.

- Matzen A.** (2000). Untersuchung von späten Schritten der Proteinsekretion bei den Gram-positiven Bakterien *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus carnosus*. Dissertation, Forschungszentrum Jülich GmbH.
- Meens, J.,** Frings, E., Klose, M. & Freudl, R. (1993): An outer membrane protein (OmpA) of *Escherichia coli* can be translocated across the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 9 (4), 847-55.
- Merrick, M. J. &** Coppard, J. R. (1989): Mutations in genes downstream of the *rpoN* gene (encoding sigma 54) of *Klebsiella pneumoniae* affect expression from sigma 54-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* 3 (12), 1765-75.
- Meyer, T. H.,** Menetret, J. F., Breitling, R., Miller, K. R., Akey, C. W. & Rapoport, T. A. (1999): The bacterial SecY/E translocation complex forms channel-like structures similar to those of the eukaryotic Sec61p complex. *J. Mol. Biol.* 285 (4), 1789-800.
- Mikuni, O.,** Ito, K., Moffat, J., Matsumura, K., McCaughan, K., Nobukuni, T., Tate, W. & Nakamura, Y. (1994): Identification of the *prfC* Gene, Which Encodes Peptide-Chain-Release Factor 3 of *Escherichia coli*. *PNAS* 91 (13), 5798-5802.
- Miller, J.H.** (1972): Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.
- Miller, J. D.,** Bernstein, H. D. & Walter, P. (1994): Interaction of *E. coli* Ffh/4.5S ribonucleoprotein and FtsY mimics that of mammalian signal recognition particle and its receptor. *Nature* 367 (6464), 657-9.
- Mitchell, C. &** Oliver, D. (1993): Two distinct ATP-binding domains are needed to promote protein export by *Escherichia coli* SecA ATPase. *Mol. Microbiol.* 10 (3), 483-97.
- Miyakawa, Y.** and Komano, T. (1981): Study of the cell cycle of *Bacillus subtilis* using temperature-sensitive mutants. I. Isolation and genetic analyses of the mutants defective in septum formation. *Mol. Gen. Genet.* 181, 207-214.
- Moffat, J. G. &** Tate, W. P. (1994): A single proteolytic cleavage in release factor 2 stabilizes ribosome binding and abolishes peptidyl-tRNA hydrolysis activity. *J. Biol. Chem.* 269 (29), 18899-903.
- Müller, J.,** Walter, F., van Dijl, J. M. & Behnke, D. (1992): Suppression of the growth and export defects of an *Escherichia coli* *secA*(Ts) mutant by a gene cloned from *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 235 (1), 89-96.
- Müller, J. P.,** Bron, S., Venema, G. & van Dijl, J. M. (2000a): Chaperone-like activities of the CsaA protein of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 146 (1), 77-88.
- Müller, J. P.,** Ozegowski, J., Vettermann, S., Swaving, J., Van Wely, K. H. & Driessen, A. J. (2000b): Interaction of *Bacillus subtilis* CsaA with SecA and precursor proteins. *Biochem. J.* 348 Pt 2, 367-73.

- Müller, M.**, Koch, H. G., Beck, K. & Schafer, U. (2001): Protein traffic in bacteria: multiple routes from the ribosome to and across the membrane. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 66, 107-57.
- Murakami, T.**, Haga, K., Takeuchi, M. & Sato, T. (2002): Analysis of the *Bacillus subtilis* *spoIIIJ* gene and its Paralogue gene, *yqjG*. *J. Bacteriol.* 184 (7), 1998-2004.
- Nakamura, K.**, Takamatsu, H., Akiyama, Y., Ito, K. & Yamane, K. (1990): Complementation of the protein transport defect of an *Escherichia coli* *secY* mutant (*secY24*) by *Bacillus subtilis* *secY* homologue. *FEBS Lett.* 273 (1-2), 75-8.
- Nakamura, K.**, Imai, Y., Nakamura, A. & Yamane, K. (1992): Small cytoplasmic RNA of *Bacillus subtilis*: functional relationship with human signal recognition particle 7S RNA and *Escherichia coli* 4.5S RNA. *J. Bacteriol.* 174 (7), 2185-92.
- Nakamura, K.**, Yahagi, S., Yamazaki, T. & Yamane, K. (1999): *Bacillus subtilis* histone-like protein, HBSu, is an integral component of a SRP-like particle that can bind the Alu domain of small cytoplasmic RNA. *J. Biol. Chem.* 274 (19), 13569-76.
- Nakamura, Y.**, Ito, K. & Ehrenberg, M. (2000). Mimicry grasps reality in translation termination. *Cell* 101 (12), 349-352.
- Nakamura, Y.** & Ito, K. (2002): A tripeptide discriminator for stop codon recognition. *FEBS Lett.* 514 (1), 30-3.
- Nakatogawa, H.**, Mori, H. & Ito, K. (2000): Two independent mechanisms down-regulate the intrinsic SecA ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 275 (43), 33209-12.
- Nielsen, J. E.** & Borchert, T. V. (2000): Protein engineering of bacterial alpha-amylases. *Biochim. Biophys. Acta* 1543 (2), 253-74.
- Nishiyama, K.**, Mizushima, S. & Tokuda, H. (1993): A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 12 (9), 3409-15.
- Nishiyama, K.**, Hanada, M. & Tokuda, H. (1994): Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J.* 13 (14), 3272-7.
- Nishiyama, K.**, Suzuki, T. & Tokuda, H. (1996): Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell* 85 (1), 71-81.
- Nouwen, N.** & Driessen, A. J. (2002): SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC. *Mol. Microbiol.* 44 (5), 1397-405.
- Nouwen, N.**, Tommassen, J. & de Kruijff, B. (1998): Signal sequences: initiators of protein translocation. Protein Targeting and Translocation D.A. Phoenix (Ed.), Portland Press (Research Monograph XII), 37-47.
- Nunnari, J.** & Walter, P. (1992): Protein targeting to and translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4 (4), 573-80.

- Oguro, A.,** Kakeshita, H., Honda, K., Takamatsu, H., Nakamura, K. & Yamane, K. (1995): *srb*: a *Bacillus subtilis* gene encoding a homologue of the alpha-subunit of the mammalian signal recognition particle receptor. *DNA Res.* 2 (2), 95-100.
- Oguro, A.,** Kakeshita, H., Takamatsu, H., Nakamura, K. & Yamane, K. (1996): The effect of *Srb*, a homologue of the mammalian SRP receptor alpha- subunit, on *Bacillus subtilis* growth and protein translocation. *Gene* 172 (1), 17-24.
- 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.
- Overhoff, B.,** Klein, M., Spies, M. & Freudl, R. (1991): Identification of a gene fragment which codes for the 364 amino-terminal amino acid residues of a SecA homologue from *Bacillus subtilis*: further evidence for the conservation of the protein export apparatus in gram-positive and gram-negative bacteria. *Mol. Gen. Genet.* 228 (3), 417-23.
- Palva, I.** (1982): Molecular cloning of alpha-amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* and its expression in *B. subtilis*. *Gene.* 19 (1), 81-7.
- Park, S.,** Liu, G., Topping, T. B., Cover, W. H. & Randall, L. L. (1988): Modulation of folding pathways of exported proteins by the leader sequence. *Science* 239 (4843), 1033-5.
- Pavel, V.,** B., Raymond F. G. & J. F. Atkins. (2002): Release factor 2 frameshifting sites in different bacteria. *EMBO reports* 3 (4), 373-7.
- Pavlov, Y. M.,** Freistroffer, D. V., MacDougall, J., Buckingham, R. H. & Ehrenberg, M. (1997a): Fast recycling of *Escherichia coli* ribosomes requires both ribosome recycling factor (RRF) and release factor RF3. *EMBO J.* 16 (13), 4134-4141.
- Pavlov, M.,** Freistroffer, DV., Heurgue-Hamard, V., Buckingham, RH., Ehrenberg, M. (1997b): Release factor RF3 abolishes competition between release factor RF1 and ribosome recycling factor (RRF) for a ribosome binding site. *J. Mol. Biol.* 273 (2), 389-401.
- Pogliano, J. A. &** Beckwith, J. (1994): SecD and SecE facilitate protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 13 (3), 554-61.
- Poritz, M. A.,** Bernstein, H. D., Strub, K., Zopf, D., Wilhelm, H. & Walter, P. (1990): An *E. coli* ribonucleoprotein containing 4.5S RNA resembles mammalian signal recognition particle. *Science* 250 (4984), 1111-7.
- Pugsley, A. P.** (1993): The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57 (1), 50-108.
- Ramakrishnan, V.** (2002): Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 108 (4), 557-72.
- Ramamurthy, V. &** Oliver, D. (1997): Topology of the integral membrane form of *Escherichia coli* SecA protein reveals multiple periplasmically exposed regions and modulation by ATP binding. *J. Biol. Chem.* 272 (37), 23239-46.

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. & Deshpande, V. V. (1998): Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (3), 597-635.

Rapoport, T. A. (1992): Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* 258 (5084), 931-6.

Rawat, U. B., Zavialov, A. V., Sengupta, J., Valle, M., Grassucci, R. A., Linde, J., Vestergaard, B., Ehrenberg, M. & Frank, J. (2003): A kryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2. *Nature* 421 (6918), 87-90.

Römisch, K., Webb, J., Herz, J., Prehn, S., Frank, R., Vingron, M. & Dobberstein, B. (1989): Homology of 54K protein of signal-recognition particle, docking protein and two *E. coli* proteins with putative GTP-binding domains. *Nature* 340 (6233), 478-82.

Römisch, K., Ribes, V., High, S., Lutcke, H., Tollervey, D. & Dobberstein, B. (1990): Structure and function of signal recognition particle (SRP). *Mol. Biol. Rep.* 14 (2-3), 71-2.

Ryden, S. M. & Isaksson, L. A. (1984): A temperature-sensitive mutant of *Escherichia coli* that shows enhanced misreading of UAG/A and increased efficiency for some tRNA nonsense suppressors. *Mol. Gen. Genet.* 193 (1), 38-45.

Rygun, T. & Hillen, W. (1991): Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35 (5), 594-9.

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

Sadaie, Y., Takamatsu, H., Nakamura, K. & Yamane, K. (1991): Sequencing reveals similarity of the wild-type *div+* gene of *Bacillus subtilis* to the *Escherichia coli secA* gene. *Gene* 98 (1), 101-5.

Samuelson, J. C., Chen, M., Jiang, F., Moller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G. J. & Dalbey, R. E. (2000): YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* 406 (6796), 637-41.

Scarlett, D. J., McCaughan, K. K., Wilson, D. N. & Tate, W. P. (2003): Mapping Functionally Important Motifs SPF and GGQ of the Decoding Release Factor RF2 to the *Escherichia coli* Ribosome by Hydroxyl Radical Footprinting. Implications for macromolecular mimicry and structural changes in RF2. *J. Biol. Chem.* 278 (17), 15095-104.

Schiebel, E., Driessen, A. J., Hartl, F. U. & Wickner, W. (1991): Delta μ H⁺ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* 64 (5), 927-39.

Schmidt-Dannert, C. (1999): Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. *Bioorg. Med. Chem.* 7 (10), 2123-30.

Seluanov, A. & Bibi, E. (1997): FtsY, the prokaryotic signal recognition particle receptor homologue, is essential for biogenesis of membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 272 (4), 2053-5.

- Sharma, V.**, Arockiasamy, A., Ronning, D. R., Savva, C. G., Holzenburg, A., Braunstein, M., Jacobs, W. R., Jr. & Sacchettini, J. C. (2003): Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* SecA, a preprotein translocating ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (5), 2243-8.
- Shinde, U.**, Li, Y., Chatterjee, S. & Inouye, M. (1993): Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (15), 6924-8.
- Simonen, M.** & Palva, I. (1993): Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol. Rev.* 57 (1), 109-37.
- Skare, J.**, Roof, S.K., Postle, K. (1989): A mutation in the amino terminus of a hybrid TrpC-TonB protein relieves overproduction lethality and results in cytoplasmic accumulation. *Bacteriol.* 171 (8), 4442-7.
- Smith, N.R.**, Gibson, T., Gordon, R.E. and Sneath, P.H.A. (1964): Type cultures and proposed neotype cultures of some species in the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.* 34, 269-272.
- Snyders, S.**, Ramamurthy, V. & Oliver, D. (1997): Identification of a region of interaction between *Escherichia coli* SecA and SecY proteins. *J. Biol. Chem.* 272 (17), 11302-6.
- Song, H.**, Mugnier, P., Das, A. K., Webb, H. M., Evans, D. R., Tuite, M. F., Hemmings, B. A. & Barford, D. (2000): The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1-mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* 100 (3), 311-21.
- Southern, E.M.** (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-518.
- Takamatsu, H.**, Fuma, S., Nakamura, K., Sadaie, Y., Shinkai, A., Matsuyama, S., Mizushima, S. & Yamane, K. (1992): In vivo and in vitro characterization of the *secA* gene product of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174 (13), 4308-16.
- Takamatsu, H.**, Nakane, A., Sadaie, Y., Nakamura, K. & Yamane, K. (1994): The rapid degradation of mutant SecA protein in the *Bacillus subtilis* *secA341* (ts) mutant causes a protein translocation defect in the cell. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58 (10), 1845-50.
- Tippe, D.** (2001): Untersuchung von *in-vivo*-Wechselwirkungen zwischen sekretorischen Vorläuferproteinen und Komponenten des Proteinexportapparates Gram-positiver Bakterien. Dissertation, Forschungszentrum Jülich GmbH.
- Ulbrandt, N. D.**, Newitt, J. A. & Bernstein, H. D. (1997): The *E. coli* signal recognition particle is required for the insertion of a subset of inner membrane proteins. *Cell* 88 (2), 187-96.
- 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.
- van Dijl, J.M.**, de Jong, A., Smith, H., Bron, S. and Venema, G. (1991): Non functional expression of *Escherichia coli* signalpeptidase I in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 214, 55-61.

- van Klompenburg, W.**, Nilsson, I., von Heijne, G. & de Kruijff, B. (1997): Anionic phospholipids are determinants of membrane protein topology. *EMBO J.* 16 (14), 4261-6.
- van Wely, K. H.**, Swaving, J., Broekhuizen, C. P., Rose, M., Quax, W. J. & Driessen, A. J. (1999): Functional identification of the product of the *Bacillus subtilis yvaL* gene as a SecG homologue. *J. Bacteriol.* 181 (6), 1786-92.
- 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.
- Vestergaard, B.**, Van, L. B., Andersen, G. R., Nyborg, J., Buckingham, R. H. & Kjeldgaard, M. (2001): Bacterial polypeptide release factor RF2 is structurally distinct from eukaryotic eRF1. *Mol. Cell.* 8 (6), 1375-82.
- Vieira, J.** and Messing, J. (1982): The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19, 259-268.
- Villafane, R.**, Bechhofer, D. H., Narayanan, C. S. & Dubnau, D. (1987): Replication control genes of pE194. *J. Bacteriol.* 169 (10) 4822-9.
- Vitikainen, M.**, Pummi, T., Airaksinen, U., Wahlström, E., Wu, H., Sarvas, M. & Kontinen, V. (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.** (1985): Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* 184 (1), 99-105.
- von Heijne, G.** & Abrahmsen, L. (1989): Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett.* 244 (2), 439-46.
- von Heijne, G.** (1990): The signal peptide. *J. Membr. Biol.* 115 (3), 195-201.
- Vyas, V.**, Gupta, S. & Sharma, p. (1994): Stability of a recombinant shuttle plasmid in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 240-6.
- Wahlström, E.**, Vitikainen, M., Kontinen, V. & 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 (3), 569-77.
- Walker, J. E.**, Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. (1982): Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1 (8), 945-51.
- Walter, P.** & Blobel, G. (1982): Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* 299 (5885), 691-8.
- Wild, J.**, Altman, E., Yura, T. & Gross, C. A. (1992): DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 6 (7), 1165-72.
- Yabuta, Y.**, Takagi, H., Inouye, M. & Shinde, U. (2001): Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: propeptide release modulates activation precision of pro-subtilisin. *J. Biol. Chem.* 276 (48), 44427-34.

Yabuta, Y., Subbian, E., Takagi, H., Shinde, U. & Inouye, M. (2002): Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: dissecting conformational changes coincident with autoprocessing and the role of Ca(2+) in subtilisin maturation. *J. Biochem. (Tokyo)* 131 (1), 31-7.

Yahr, T. L. & Wickner, W. T. (2000): Evaluating the oligomeric state of SecYEG in preprotein translocase. *EMBO J.* 19 (16), 4393-401.

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

Zagorec, M., Steinmetz, M. (1990): Expression of levansucrase-beta-galactosidase hybrids inhibits secretion and is lethal in *Bacillus subtilis*. *Gen. Microbiol.* 136(6), 1137-43.

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

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

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Roland Freudl für die Überlassung des spannenden Themas, für seine Bereitschaft zur kritischen Diskussion und seine wertvollen Ratschläge, mit denen er diese Arbeit begleitet hat.

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

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

Der Firma Henkel KGaA danke ich für die finanzielle Unterstützung und für die Bereitstellung der *Bacillus licheniformis* Stämme. Insbesondere danke ich Herrn Dr. Jörg Feesche und Herrn Dr. Karl-Heinz Maurer für das Interesse an meiner Arbeit und für die gute Kooperation. Frau Renée Eichstädt und allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Enzymtechnologie danke ich für das sehr freundliche Arbeitsklima.

Bei den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Astrid Bida, Gaby Decker, Oliver Köberling, Angela Vollstedt, Michael Caspers, Peter Kreuzenbeck, Daniel Meißner und Dr. Karlo Schimz möchte ich mich für die stets gute Stimmung und die immer große Hilfsbereitschaft bedanken. Dabei bedanke ich mich ganz besonders bei Astrid Bida, die mir immer mit nützlichen Ratschlägen bei den alltäglichen Arbeiten im Labor zur Seite gestanden hat und mit der ich sehr gerne in einem Labor gearbeitet habe.

Herrn Dr.-Ing. Ralph Takors danke ich für seine Hilfsbereitschaft und für die Bereitstellung der „fedbatch-pro“-Anlage. Auch Michel Brik Ternbach danke ich für die freundliche Einweisung in die Bedienung des Geräts und für die Flexibilität in seiner Versuchsplanung.

Frau Kirsten Bräker danke ich für die Ausführung der fotografischen Arbeiten.

Herrn Dr. Karlo Schimz danke ich für die Bereitstellung der verschiedenen Antikörper.

Allen Mitarbeitern des IBT 1 möchte ich für das immer freundliche Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft danken. Insbesondere Mirja Wessel, Christina Schlüpen und Oliver Köberling danke ich für die gute Zeit in Jülich.

Bei meinen neuen und ehemaligen WG-Mitbewohnern bedanke ich mich für die immer gute Stimmung in „18A“ und dafür, dass ich mich in Jülich zu Hause fühlen konnte.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern und bei Martin, die immer für mich da waren und mich, wenn alles noch so schwierig schien, motiviert haben, mit neuem Schwung durchzustarten.