

**Vergleichende Analyse der Sec- und Tat-abhängigen
sekretorischen Proteingewinnung mit Gram-positiven
Bakterien als Wirtsorganismen**

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

vorgelegt von
Daniel Meißner
aus Duisburg

Dezember 2005

Aus dem Institut für Biotechnologie 1
des Forschungszentrums Jülich

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

Referent: Prof. Roland Freudl
Korreferent: Prof. J.F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2005

Inhaltverzeichnis

I. EINLEITUNG	1
1. Gram-positive Bakterien als Wirtssysteme für die sekretorische Gewinnung von heterologen Proteinen	1
2. Allgemeines zum Proteintransport über Membranen	2
3. Der generelle Sekretionsweg (Sec-Weg)	2
3.1 Das Sec-Signalpeptid	3
3.2 Wechselwirkungen des Signalpeptids mit exportspezifischen Chaperonen	3
3.3 Die Sec-Translokase	4
3.4 Der Mechanismus der Sec-abhängigen Proteintranslokation	6
3.5 Qualitätskontrolle an der Sec-Translokase	6
3.6 Die Anwendbarkeit des Sec-Weges für die Sekretion heterologer Proteine	7
4. Der Tat – Weg	8
4.1 Das Tat-Signalpeptid	8
4.1.1 Die Rolle des Zwillingssarginin-Konsensusmotivs S/TRRxFLK	9
4.1.2 Die Bedeutung der Hydrophobizität der h-Region	10
4.1.3 Das „Sec-Avoidance“-Motiv in der c-Region	10
4.1.4 Spezies-Spezifität in der Erkennung von Tat-Signalpeptiden durch die Tat-Translokase	11
4.2 Die Rolle des reifen Teils von Tat-Substraten	12
4.3 Der Tat-Exportapparat	13
4.3.1 Die <i>tat</i> -Gene und die von ihnen kodierten Komponenten des Tat-Exportapparates	13
4.3.2 Topologie und Funktion der Tat-Proteine	14
4.3.3 Modell zum Mechanismus der Tat-Translokase	16
4.3.4 Energetisierung des Tat-Weges	17
4.4 Die Anwendbarkeit des Tat-Weges für die Sekretion heterologer Proteine	18
5. Einfluß der Zellwand auf die Sekretion von heterologen Proteinen	19
6. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	20
II. MATERIAL UND METHODEN	23
1. Chemikalien und Enzyme	23
2. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	23
3. Mikrobiologische Methoden	28
3.1 Kultivierung von Bakterien	28
3.1.1 Nährmedien	28
3.1.2 Kultivierungsbedingungen	29
3.2 Wachstumskurven	30
3.3 Stammhaltung	30
3.4 Transformation von Bakterien	30
3.4.1 Transformation von <i>E. coli</i> Stämmen (Hanahan, 1985)	30
3.4.2 Transformation von <i>B. subtilis</i> Stämmen (Sadaie und Kada, 1983)	31
3.4.3 Transformation von <i>C. glutamicum</i> Stämmen	31
3.4.4 Transformation von <i>S. carnosus</i> Protoplasten (Götz und Schumacher, 1987)	32
4. Molekularbiologische Methoden	33
4.1 Isolierung von Plasmid-DNA und chromosomaler DNA	33
4.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden	34
4.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	34
4.2.2 Entsalzen von DNA	34
4.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	34

4.2.4 Fällung und Aufkonzentrierung von Plasmid-DNA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	34
4.2.5 Agarose Gelelektrophorese	34
4.2.6 Behandlung mit alkalischer Phosphatase	35
4.2.7 Umwandlung von überhängenden 5'-Enden in glatte Enden	35
4.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten	35
4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
4.4 Nicht-radioaktive DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode	36
4.5 DNA-DNA Hybridisierung nach Southern	37
4.5.1 Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde	37
4.5.2 Hybridisierung von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA	37
5. Proteinchemische Methoden	38
5.1 Induktion der Genexpression	38
5.2 Isolierung von Proteinen aus Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen	39
5.2.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten von <i>E. coli</i>	39
5.2.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten von <i>B. subtilis</i> und <i>S. carnosus</i>	39
5.2.3 Herstellung von Gesamtzellextrakten von <i>C. glutamicum</i>	39
5.2.4 Aufarbeitung von Kulturüberständen von <i>B. subtilis</i> , <i>C. glutamicum</i> und <i>S. carnosus</i>	39
5.3 Fraktionierung von <i>B. subtilis</i> in Protoplasten und Zellwand	40
5.4 Fraktionierung von <i>S. carnosus</i> in Protoplasten und Zellwand	40
5.5 Extraktion von Proteinen aus der Zellwand von <i>C. glutamicum</i> (Peyret <i>et al.</i> , 1993)	40
5.6 Osmotischer Schock mit <i>E. coli</i>	41
5.7 Proteinlokalisierung durch Proteinase K - Verdau von <i>S. carnosus</i> Protoplasten	41
5.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Lämmli, 1970)	42
5.9 Western Blot	42
5.10 MALDI-TOF Massenspektroskopie	44
5.11 Detektion und Quantifizierung von GFP-Fluoreszenz	45
III. ERGEBNISSE	47
1. Untersuchungen zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in <i>S. carnosus</i>	47
1.1 Identifizierung der <i>tat</i> -Gene von <i>S. carnosus</i>	47
1.2 <i>S. carnosus</i> besitzt ein funktionelles Tat-System	50
1.2.1 Konstruktion einer <i>S. carnosus tat</i> -Mutante	50
1.2.2 Effekt der Δ <i>tatC</i> -Mutation auf die Prozessierung des Fusionsproteins TorA-CGTase	53
1.3 Die <i>S. carnosus</i> Δ <i>tatC</i> -Mutante zeigt keinen phänotypischen Unterschied zum Wildtyp	54
1.4 In <i>S. carnosus</i> konnten keine authentischen Tat-Substrate identifiziert werden	55
1.5 Das TorA-CGTase Fusionsprotein wird in <i>S. carnosus</i> nicht sekretiert	56
1.6 Das deutlich kleinere TorA-GFP Fusionsprotein wird von <i>S. carnosus</i> ebenfalls nicht sekretiert	58
1.6.1 Konstruktion des <i>torA-gfp</i> Fusionsgens für die Expression in <i>S. carnosus</i>	58
1.6.2 TorA-GFP wird in <i>S. carnosus</i> Tat-abhängig transloziert, aber nicht in den Überstand sekretiert	60
1.7 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in <i>S. carnosus</i>	62
2. Untersuchungen zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in <i>C. glutamicum</i>	63
2.1 <i>C. glutamicum</i> verfügt über eine TatAC-Minimaltranslokase	63
2.2 Charakterisierung des Tat-Systems von <i>C. glutamicum</i>	65
2.2.1 Konstruktion einer <i>C. glutamicum</i> Δ <i>tatAC</i> -Mutante	66
2.2.2 Die <i>C. glutamicum</i> Δ <i>tatAC</i> -Mutante zeigt erkennbare phänotypische Unterschiede zum Wildtypstamm	69
2.3 <i>C. glutamicum</i> verfügt über ein funktionelles Tat-System mit mindestens einem authentischen Tat-Substrat	71
2.3.1 Identifizierung von potentiellen Tat-Substraten in <i>C. glutamicum</i>	71
2.3.2 Konstruktion der Fusionsgene <i>phoD_{Cg}-gfp</i> und <i>1588_{Cg}-gfp</i>	73
2.3.3 Untersuchungen zur Tat-Abhängigkeit des Exports von PhoD _{Cg} - und 1588 _{Cg} -GFP	74
2.4 GFP und MalE werden mit dem Tat-Signalpeptid von TorA effizient sekretiert	75
2.4.1 Klonierung der <i>torA-malE</i> und <i>torA-gfp</i> Fusionsgene in einen Expressionsvektor für <i>C. glutamicum</i>	76
2.4.2 Untersuchungen zur Sekretion von TorA-MalE und TorA-GFP	76
2.4.3 Fraktionierung von <i>C. glutamicum</i> zur Lokalisierung der Fusionsproteine TorA-GFP und TorA-MalE	77
2.5 MalE wird in <i>C. glutamicum</i> effizienter über den Tat- als über den Sec-Weg sekretiert	80

2.5.1	Konstruktion des <i>malE</i> -Gens mit authentischer Signalsequenz für <i>C. glutamicum</i>	80
2.5.2	Authentisches MalE wird in <i>C. glutamicum</i> Sec-abhängig in den Überstand sekretiert	80
2.5.3	Vergleich der Tat- und Sec-abhängigen Sekretion von MalE	81
2.6	Die Ausbeute an Tat-abhängig sekretiertem GFP und MalE in <i>C. glutamicum</i> ist je nach Medium unterschiedlich hoch	82
2.7	Die Effizienz der Tat-abhängigen Sekretion von GFP in <i>C. glutamicum</i> variiert je nach verwendetem Signalpeptid	83
2.7.1	Konstruktion des <i>phoD_{Bs}-gfp</i> Fusionsgens für <i>C. glutamicum</i>	84
2.7.2	Vergleich der Sekretion von GFP mit TorA-, PhoD _{Bs} - und PhoD _{Cg} -Signalpeptid	84
2.8	Das von <i>C. glutamicum</i> Tat-abhängig sekretierte GFP ist aktiv	85
2.9	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in <i>C. glutamicum</i>	86
3.	Untersuchungen zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in <i>B. subtilis</i>	87
3.1	<i>B. subtilis</i> sekretiert TorA-GFP und TorA-MalE effizient in der Überstand	88
3.1.1	Konstruktion der Fusionsgene <i>torA-malE</i> und <i>torA-gfp</i> für <i>B. subtilis</i>	88
3.1.2	Lokalisierung von TorA-GFP und TorA-MalE in <i>B. subtilis</i>	88
3.2	TorA-, PhoD _{Bs} - und PhoD _{Cg} -GFP werden mit unterschiedlichen Ausbeuten sekretiert	90
3.2.1	Konstruktion der <i>phoD_{Bs}-</i> und <i>phoD_{Cg}-gfp</i> Fusionsgene für <i>B. subtilis</i>	90
3.2.2	Vergleich der Sekretion von TorA-, PhoD _{Bs} - und PhoD _{Cg} -GFP in <i>B. subtilis</i>	91
3.3	Das PhoD _{Bs} -GFP Fusionsprotein wird als einziges Fusionsprotein strikt nur von der TatAC _D -Translokase in <i>B. subtilis</i> exportiert	92
3.4	Das von <i>B. subtilis</i> Tat-abhängig sekretierte GFP ist inaktiv	94
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in <i>B. subtilis</i>	95
4.	Untersuchungen zur Spezies-Spezifität bei der Signalpeptiderkennung im Tat-abhängigen Proteinexport	96
4.1	Konstruktion des <i>torA-gfp</i> Fusionsgens zur Expression in <i>E. coli</i> und der <i>phoD_{Cg}-</i> und <i>phoD_{Bs}-gfp</i> Fusionsgene zur Expression in <i>E. coli</i> und <i>S. carnosus</i>	96
4.1.1	Konstruktion des <i>torA-gfp</i> Fusionsgens für die Expression in <i>E. coli</i>	96
4.1.2	Konstruktion der <i>phoD_{Cg}-</i> und <i>phoD_{Bs}-gfp</i> Fusionsgene für die Expression in <i>E. coli</i>	97
4.1.3	Konstruktion der <i>phoD_{Cg}-</i> und <i>phoD_{Bs}-gfp</i> Fusionsgene für die Expression in <i>S. carnosus</i>	97
4.2	Das <i>E. coli</i> Signalpeptid von TorA wird in allen untersuchten Organismen von der jeweiligen Tat-Translokase erkannt	98
4.3	Das Tat-Signalpeptid von PhoD aus <i>C. glutamicum</i> wird nur von <i>C. glutamicum</i> selbst und <i>B. subtilis</i> erkannt	99
4.4	Das Signalpeptid von PhoD aus <i>B. subtilis</i> wird nur von <i>B. subtilis</i> selbst und <i>C. glutamicum</i> erkannt	99
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Spezies-Spezifität bei der Signalpeptid-erkennung im Tat-abhängigen Proteinexport	100
IV.	DISKUSSION	101
1.	Untersuchungen zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in <i>S. carnosus</i>	101
1.1	<i>S. carnosus</i> verfügt über eine funktionelle Tat-Minimaltranslokase	102
1.2	Das Tat-System von <i>S. carnosus</i> scheint physiologisch eine untergeordnete Rolle zu spielen	103
1.3	Die Zellwand von <i>S. carnosus</i> stellt eine Barriere für die Sekretion von heterologen Tat-Substraten dar	104
2.	Untersuchungen zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in <i>C. glutamicum</i>	107
2.1	<i>C. glutamicum</i> verfügt über eine funktionelle Tat-Minimaltranslokase	107
2.2	Das Tat-System spielt in <i>C. glutamicum</i> eine wichtige physiologische Rolle	108
2.2.1	Das Tat-System ist in <i>C. glutamicum</i> an Zellwachstum und -stoffwechsel beteiligt	108
2.2.2	Der Export des PhoD-Proteins aus <i>C. glutamicum</i> ist Tat-abhängig	109
2.2.3	Der Sec-abhängige Export von MalE und des authentischen 1588-Proteins ist in der Δ <i>tatAC</i> -Mutante von <i>C. glutamicum</i> stark beeinträchtigt	110
2.3	GFP und MalE werden in <i>C. glutamicum</i> mit hoher Ausbeute Tat-abhängig in den Kulturüberstand sekretiert	111
2.3.1	Die Tat-abhängige Sekretion von MalE führt in <i>C. glutamicum</i> zu einer höheren Ausbeute als die Sekretion über den Sec-Weg	113
2.3.2	Das Medium hat einen großen Einfluß auf die Ausbeute an Tat-abhängig sekretiertem GFP und MalE	115
2.3.3	Ein heterologes Signalpeptid führt zur höchsten Sekretionseffizienz von GFP in <i>C. glutamicum</i>	116

2.3.4 Das durch <i>C. glutamicum</i> Tat-abhängig in den Kulturüberstand sekretierte GFP ist aktiv	117
3. Untersuchungen zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in <i>B. subtilis</i>	118
3.1 MalE und GFP werden in <i>B. subtilis</i> mit hoher Ausbeute Tat-abhängig sekretiert	118
3.2 GFP wird in <i>B. subtilis</i> in Abhängigkeit vom Signalpeptid mit unterschiedlichen Ausbeuten sekretiert	121
3.3 Die Signalpeptide TorA und PhoD _{Bs} zeigen eine unterschiedliche Translokase-spezifität in <i>B. subtilis</i>	122
3.4 Das in <i>B. subtilis</i> Tat-abhängig sekretierte GFP ist inaktiv	123
4. Untersuchungen zur Spezies-Spezifität bei der Signalpeptiderkennung im Tat-abhängigen Proteinexport	124
5. Vergleich von <i>S. carnosus</i>, <i>C. glutamicum</i> und <i>B. subtilis</i> in Bezug auf die Anwendbarkeit als Tat-abhängiges Sekretionssystem für die Gewinnung heterologer Proteine	125
V. ZUSAMMENFASSUNG	127
VI. LITERATUR	129

Abkürzungen

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
APS	Amoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chloro-2-Indolyl-Phosphat (X-Phosphat)
BHIS	brainheart-Infusion, Sorbitol
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaar
C-terminal	carboxyterminal
cm	Chloramphenicol
CSPD	3-(4-Metoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'(5'-chloro)Tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4yl) Phenylphosphat, Dinatriumsalz
da	Dalton
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat (N steht für eines der Nukleoside A: Adenin, C: Cytidin, G: Guanosin, T: Thymin)
ddNTP	Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1, 4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)N,N,N',N'-Tetraacetat
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
g/l	Gramm pro Liter
h	Stunden
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Molar
l	Liter
mA	Milliampere
ml	Milliliter
min	Minuten
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µl/ml	Mikroliter pro Milliliter
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal

OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PhoD	Phosphodiesterase
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RBS	Ribosomenbindestelle
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS- PAGE	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
tet	Tetracyclin
TorA	Trimethylamin-N-Oxid (TMAO) Reduktase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ü. N.	über Nacht
ÜNK	Übernachtskultur
UTR	5' untranslatierte Region eines Gens
UV	ultraviolett
V	Volt
W	Watt
Wt	Wildtyp

Drei- und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

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

I. Einleitung

1. Gram-positive Bakterien als Wirtssysteme für die sekretorische Gewinnung von heterologen Proteinen

Die technische Gewinnung von Proteinen durch Bakterien nimmt in der industriellen Biotechnologie neben u. a. der Aminosäureproduktion eine sehr wichtige Rolle ein. Dabei werden sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien als Produktionssysteme für industriell relevante Proteine genutzt. Als wohl bekanntestes Beispiel sei hier die bakterielle Produktion von menschlichem Insulin durch das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* genannt. In Gram-negativen Bakterien werden die Zielproteine meist im Cytoplasma oder im Periplasma akkumuliert, was einen Aufschluß der Zellen zur Gewinnung der Proteine nötig macht. Gram-positive Bakterien besitzen im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien keine äußere Membran. Somit kann prinzipiell bei den Proteinen, die über die Cytoplasmamembran transloziert werden, direkt eine Sekretion in den Überstand erfolgen. Dies hat den Vorteil, daß die Zellen nicht aufgeschlossen werden müssen und somit eine Verunreinigung des Zielproteins mit Zellproteinen ausbleibt.

Aus diesem Grund werden Gram-positive Bakterien schon lange als Sekretionssysteme für die industrielle Gewinnung von Proteinen genutzt. So verwendet man *Bacillus*-Arten zur Gewinnung von Enzymen wie Amylasen, Lipasen und Proteasen, wobei die Ausbeute der Enzyme, die in den Überstand ausgeschieden werden, bei bis zu 20g/l liegt (Ferrari *et al.*, 1993). Hierbei ist aber zu bemerken, daß diese hohen Sekretionsleistungen bislang nur bei homologen Proteinen erzielt wurden. Heterologe sekretierte Proteine werden in *Bacillus*-Arten rasch Opfer der zahlreich vorhandenen zellwandassoziierten und sekretierten Proteasen (Harwood, 1992). *Staphylococcus carnosus*, ein weiterer Vertreter Gram-positiver Bakterien, gewinnt aufgrund seiner ebenfalls relativ hohen Sekretionsleistung von bis zu 2g/l immer mehr als Produktionssystem an Bedeutung. So konnte gezeigt werden, daß er sich als Sekretionssystem sowohl für Enzyme als auch für therapeutische Proteine, wie z.B. Antikörperfragmente, zu eignen scheint (Dilsen *et al.*, 2000; Pschorr *et al.*, 1994; Schnappinger *et al.*, 1995; Sturmfels *et al.*, 2001; Thudt *et al.*, 1985). *S. carnosus* hat *B. subtilis* gegenüber den deutlichen Vorteil, daß er keine Proteasen in den Kulturüberstand sekretiert. Dadurch werden die Ausbeuten an sekretierten Proteinen nicht wie bei *B. subtilis* durch Proteasen beeinträchtigt, was ihn zu einem attraktiven Produktionswirt macht.

Die Proteinsekretion in Gram-positiven Bakterien beinhaltet als zentralen Schritt den Transport der Proteine über die Cytoplasmamembran, bevor diese schließlich die Zellwand passieren und in den Kulturüberstand freigesetzt werden. Daher wird im Folgenden zunächst auf den Proteintransport über Membranen im Allgemeinen und anschließend auf die unterschiedlichen Transportwege im Einzelnen eingegangen.

2. Allgemeines zum Proteintransport über Membranen

Alle Zellen sind von mindestens einer Biomembran umgeben, die aus einer hydrophoben Phospholipid-Doppelschicht besteht. Diese Membran bedeutet für große und geladene Moleküle eine Permeabilitätsbarriere, erlaubt aber die Passage nicht-polarer, hydrophober Substanzen. Der kontrollierte Stoffaustausch über die Membran wird durch Membranproteine reguliert, die als Kanäle, Pumpen oder „Carrier“ fungieren. Eine wichtige Funktion von Biomembranen besteht in der Abgrenzung funktionell unterschiedlicher Reaktionsräume innerhalb der Zelle (Kompartimentierung), welche einen unterschiedlichen Bestand an Proteinen aufweisen. Da die Proteinbiosynthese mit Ausnahme einiger Proteine der Mitochondrien und Chloroplasten bei allen Organismen im Cytoplasma stattfindet, besteht die Notwendigkeit alle Proteine, die nicht für das Cytoplasma bestimmt sind, zu ihrem jeweiligen Wirkungsort zu transportieren (**Proteinsortierung**). Diese Sortierung der Proteine zum korrekten Zielort wird durch spezifische Erkennungssignale, die sog. **Targeting-Signale**, innerhalb der Primärstruktur des jeweiligen Proteins, vermittelt. Der Transport des Proteins über die Membran erfolgt durch membranständige Multienzym-Komplexe, die sog. **Translokasen**, die je nach Zellkompartiment eine unterschiedliche Zusammensetzung aufweisen.

Im Gegensatz zur komplexen Kompartimentierung eukaryotischer Zellen weisen Prokaryoten einen vergleichsweise einfachen Zellaufbau auf. Bei Gram-positiven Bakterien ist das Cytoplasma nur durch die Cytoplasmamembran und eine sehr dicke Zellwand von der Umgebung abgegrenzt. Gram-negative Bakterien haben dagegen eine dünnere Zellwand, besitzen aber aufgrund einer äußeren Membran ein zusätzliches Kompartiment, das Periplasma. In den Prokaryoten müssen daher alle nicht für das Cytoplasma bestimmten Proteine mindestens die Cytoplasmamembran passieren. Hierfür stehen mehrere unterschiedliche Wege zur Verfügung, wobei der generelle Sekretionsweg (Sec-Weg, „secretion“) und der Tat-Weg („twin arginine translocation“) die zwei Hauptwege darstellen. Beide bakteriellen Exportwege besitzen Gemeinsamkeiten, vor allem auf Ebene der Targeting-Signale, weisen aber auch deutliche Unterschiede auf. Auf die Charakteristika des Sec- und des Tat-Weges wird nun im Folgenden detaillierter eingegangen.

3. Der generelle Sekretionsweg (Sec-Weg)

Der Sec-Weg, der für den Organismus essentiell ist, transloziert die Proteine in einer weitgehend ungefalteten Konformation über die Cytoplasmamembran, so daß die Proteine erst nach der Translokation in ihre aktive Konformation falten können. Dieser Weg ist in Bakterien der am längsten bekannte und auch der am intensivsten untersuchte Proteinexportweg. Auch in Bezug auf die Sekretion von Proteinen wurde der Sec-Weg genau studiert und wird daher schon seit langem erfolgreich für die sekretorische Gewinnung homologer Proteine mit Gram-positiven Bakterien als Wirtsorganismen eingesetzt. Im Folgenden wird nun detailliert auf die Charakteristika des Sec-Weges eingegangen.

3.1 Das Sec-Signalpeptid

Bakterielle Proteine, die für den Export aus dem Cytoplasma über den Sec-Weg bestimmt sind, besitzen an ihrem N-Terminus ein Signalpeptid, welches für das Targeting des Vorläufers an die Translokase verantwortlich ist (siehe Abbildung 1). Dieses wird während oder kurz nach der Translokation des Proteins über die Cytoplasmamembran durch eine Signalpeptidase abgespalten (**Prozessierung**). Das Exportprotein wird vor der Prozessierung als **Vorläufer** und im Anschluß daran als **reifes Protein** bezeichnet.

Bakterielle Signalpeptide des Sec-Weges weisen auf Ebene der Primärsequenz praktisch keine Homologien auf, zeichnen sich aber durch einen hochkonservierten Aufbau aus drei Domänen aus: einer am N-Terminus lokalisierten positiv-geladenen **n-Region** (1-5 Aminosäuren), gefolgt von einer zentralen, hydrophoben **h-Region** (7-15 Aminosäuren) und einer eher polaren **c-Region** (3-7 Aminosäuren) (von Heijne, 1985). Letztere enthält das Erkennungsmotiv für die Signalpeptidase, welches den einzigen Teil des Sec-Signalpeptids darstellt, der auf Ebene der Primärstruktur gewisse Homologien zeigt. Das Motiv ist durch kleine, neutrale Reste – vorzugsweise Alanin – an den Positionen -1 und -3 relativ zur Signalpeptidasespaltstelle definiert (von Heijne, 1984). Bei Nicht-Lipoproteinen erfolgt die Abspaltung des Signalpeptids durch die Signalpeptidase I, wohingegen Lipoproteine durch die Signalpeptidase II prozessiert werden. Letztere erkennt ein Sequenzmotiv, bei dem an Position -3 größere hydrophobe Aminosäuren (v. a. Leucin) auftreten und an der Position +1 ein Cystein strikt konserviert ist (Sankaran und Wu, 1994).



Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Sec-Signalpeptids. Es zeigt einen hochkonservierten Aufbau aus drei Domänen und besitzt neben dem konserviertem Erkennungsmotiv Ala – X – Ala (-3, -1) für die Signalpeptidase keine weiteren konservierten Motive. Die Signalpeptidase-Spaltstelle ist durch den Stern gekennzeichnet. Die Aminosäuren des Signalpeptids werden mit -X bis -1 numeriert und die des reifen Teils mit +1 bis +Y. -X ist die erste Aminosäure der Signalsequenz und der Wert entspricht der Anzahl aller Aminosäuren des Signalpeptids, Y ist die letzte Aminosäure des reifen Proteins und der Wert entspricht der Anzahl aller Aminosäuren des reifen Proteins.

3.2 Wechselwirkungen des Signalpeptids mit exportspezifischen Chaperonen

Der Großteil aller Exportproteine wird in einer ungefalteten Konformation über den Sec-Weg transloziert. Dabei findet die Membrantranslokation zumeist post-translational statt, so daß sichergestellt werden muß, daß die Proteine in einer ungefalteten und damit exportkompetenten Konformation gehalten werden. Hierzu trägt ein komplexes Wechselspiel zwischen exportspezifischen Chaperonen und den Signalpeptiden bzw. den reifen Teilen der Vorläuferproteine bei. Das Sec-Signalpeptid spielt neben seiner Funktion als Targeting-Signal und seiner Rolle bei der Regulation der Exporteffizienz und der Initiation der Translokation

eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Exportkompetenz: Es verursacht eine Verlangsamung der Faltung des reifen Teils der Substrate (Hardy und Randall, 1991; Park *et al.*, 1988) und vergrößert somit das Zeitfenster für die Wechselwirkungen des Vorläuferproteins mit exportspezifischen Chaperonen, welche das Vorläuferprotein in einer ungefalteten und damit exportkompetenten Form halten und an den Sec-Apparat in der Membran heranführen.

In *E. coli*, in dem der Sec-abhängige Proteinexport bislang am besten untersucht ist, kann das Targeting der Vorläuferproteine an die membranständige Sec-Translokase über zwei verschiedene Wege erfolgen. Dabei handelt es sich um das SecB- und das SRP-abhängige Targeting. Sowohl SecB als auch SRP („signal recognition particle“) sind exportspezifische Chaperone, die jeweils unterschiedliche Klassen von Proteinen zur Translokase leiten. Das Targeting sekretorischer Proteine wird vorzugsweise von SecB vermittelt, Proteine mit sehr hydrophoben Signalpeptiden und die meisten integralen Proteine der Cytoplasmamembran werden jedoch über SRP zur Translokase dirigiert.

Das bakterielle SRP ist ein Ribonukleoprotein-Komplex, welcher aus dem Ffh-Protein („fifty four homologue“) und einer 4.5S-RNA besteht, die zum SRP54-Protein und der 7S-RNA des eukaryotischen SRP homolog sind (Poritz *et al.*, 1988; Römisch *et al.*, 1989). Der Ribonukleoprotein-Komplex bindet co-translational an lange, hydrophobe Signalpeptide und/oder Transmembransegmente von naszierenden Membranproteinen. Diese werden dann in Assoziation mit den Ribosomen als sog. „Ribosome nascent chain complex“ (RNC) vom SRP an die Membran geleitet, wo das SRP an den membranständigen SRP-Rezeptor FtsY bindet. Anschließend erfolgen durch GTP-Bindung an FtsY und SRP die Freisetzung des RNC vom SRP und die Übergabe des Vorläuferproteins an die Sec-Translokase. Nach GTP-Hydrolyse dissoziiert SRP von FtsY und kehrt zurück ins Cytosol, wo es für SRP-abhängiges Targeting wieder zur Verfügung steht. (Driessen *et al.*, 2001; Manting und Driessen, 2000; van Wely *et al.*, 2001).

Das Chaperon SecB, das nur bei Gram-negativen Bakterien vorkommt, bindet innerhalb des reifen Teils der Vorläuferproteine, wodurch diese in einer exportkompetenten Konformation gehalten werden. Das Signalpeptid selbst wird nicht von SecB gebunden, trägt jedoch indirekt an der Bindung von SecB bei da es, wie bereits erwähnt, die Faltung des Vorläuferproteins verlangsamt. Der Komplex aus Vorläuferprotein und SecB wird über die hohe Affinität von SecB zu SecA, der zentralen Komponente des Sec-Apparats, an den Translokationsapparat geleitet (Hartl *et al.*, 1990) und SecB wird bei der Initiation der Translokation wieder ins Cytoplasma freigesetzt (Fekkes *et al.*, 1997).

3.3 Die Sec-Translokase

Die Komponenten der bakteriellen Sec-Translokase (Abbildung 2) wurden zuerst im Gram-negativen Modellorganismus *E. coli* identifiziert und eingehend genetisch und biochemisch charakterisiert. Die zentralen Komponenten der Sec-Translokase bilden die ubiquitär vorkommenden integralen Membranproteine SecY, SecE und SecG, sowie die Untereinheit SecA. SecY, SecE und SecG stehen im direkten Kontakt miteinander (Breyton *et al.*, 2002;

Nishiyama *et al.*, 2000; van der Sluis *et al.*, 2002; Veenendaal *et al.*, 2001) und bilden zusammen als dynamisches Heterotrimer die hydrophile Translokationspore, durch welche die sekretorischen Proteine geschleust werden. Eine Strukturaufklärung dieses Kanals bei *Methanococcus jannaschii* deutet auf ein einzelnes SecY/E/G-Heterotrimer als aktive Spezies (van den Berg *et al.*, 2004). SecY und SecE sind essentielle Komponenten des Sec-abhängigen Proteinexports, SecG hat einen starken stimulierenden Effekt. Das SecA-Protein ist die zentrale Komponente der Sec-Translokase. Seine Aufgabe ist es, das Vorläuferprotein in die Sec-Translokase einzuschleusen (Initiation) und den Vorgang der Translokation voranzutreiben. Durch ATP-Bindung und -hydrolyse gemeinsam mit dem Membranpotential liefert es die für die Translokation nötige Energie. SecA liegt während des Translokationsprozesses sowohl membranassoziiert als auch -integriert vor. Bislang wurde angenommen, daß SecA als stabiles Homodimer vorkommt, neuere Untersuchungen deuten aber darauf hin, daß sich das SecA-Homodimer in einem Gleichgewicht mit einem SecA-Monomer befindet. Beide Formen sind für die Sec-Translokation wichtig, jedoch ist das Homodimer essentiell für die Translokation (Benach *et al.*, 2003; Jilaveanu *et al.*, 2005; Or *et al.*, 2002).

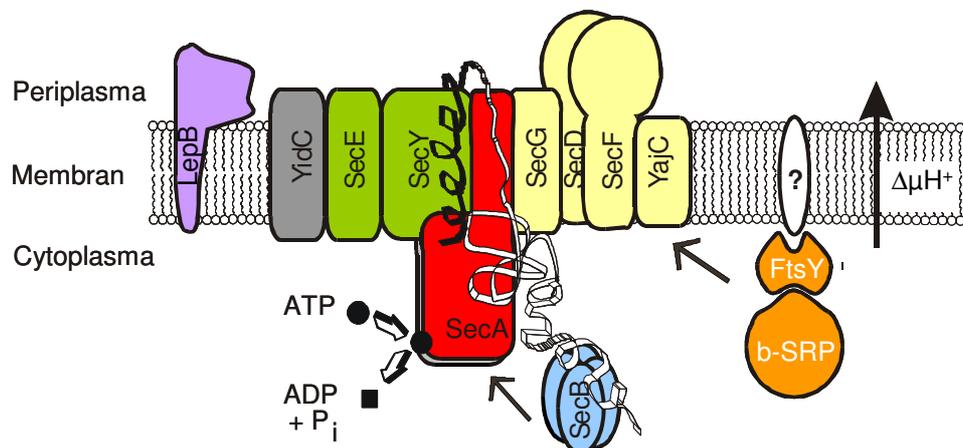


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Sec-Translokase. Sie besteht aus den Komponenten der Translokationspore (SecY, E und G), aus der zentralen ATPase SecA und weiteren akzessorischen Proteinen (SecD, SecF und YajC) und dem mit der Sec-Translokase assoziierten YidC. Das Targeting der sekretorischen Proteine erfolgt entweder SecB- oder SRP-abhängig. Die für die Translokation benötigte Energie wird sowohl durch ATP-Bindung und -Hydrolyse als auch durch das Membranpotential ($\Delta\mu H^+$) bereitgestellt. Das Signalpeptid (schwarz dargestellt) wird nach oder während der Translokation durch die Signalpeptidase (LepB) vom reifen Teil des Proteins (weiß dargestellt) abgetrennt. Weitere Erklärungen im Text (siehe I.3.3 und I.3.4).

Neben der zentralen Komponente SecA und den Untereinheiten des Translokationskanals gibt es noch weitere akzessorische Proteine, welche die Effizienz der Translokation beeinflussen. Hierzu zählen SecD, SecF und YajC, welche einen membranintegralen Komplex bilden, der in *E. coli* die Effizienz des Sec-Weges positiv beeinflusst (Pogliano und Beckwith, 1994; Tseng *et al.*, 1999). Dieser Komplex scheint in *E. coli* an der Regulierung des katalytischen Zyklus von SecA beteiligt zu sein und stabilisiert möglicherweise dessen membranintegrale Form, um ein „Zurückrutschen“ von bereits translozierten Abschnitten des Vorläuferproteins zu verhindern (Duong und Wickner, 1997; Economou *et al.*, 1995). Das YidC-Protein, welches mit der Sec-Translokase assoziiert, ist in manchen Fällen an der Membraninsertion von integralen Membranproteinen beteiligt (Houben *et al.*, 2002; Luirink *et al.*, 2001; Nouwen und Driessen, 2002; Urbanus *et al.*, 2001).

3.4 Der Mechanismus der Sec-abhängigen Proteintranslokation

Die eingehende biochemische Charakterisierung der Komponenten der Sec-Translokase führte zur Aufstellung eines Modells, wie die Energie aus ATP-Bindung und -Hydrolyse am SecA-Protein an die Translokation eines Polypeptids über die Cytoplasmamembran gekoppelt ist. Das Vorläuferprotein wird nach dem Targeting an die Sec-Translokase an das SecA-Protein übergeben. Das SecA-Protein tritt mit SecB, dem Signalpeptid und dem reifen Teil des Vorläuferproteins und auch mit Membranlipiden und der SecY/E/G-Translokationspore in Wechselwirkungen. Die Übergabe des Vorläuferproteins auf das SecA-Protein führt zu einer Aktivierung desselbigen, so daß ADP gegen ATP ausgetauscht wird (Brundage *et al.*, 1990). Durch die ATP-Bindung ändert SecA seine Konformation (den Blaauwen *et al.*, 1996), was zu einer Freisetzung des SecB-Proteins (den Blaauwen *et al.*, 1996) und zu einer zumindest partiellen Integration von SecA in die Cytoplasmamembran führt (Economou und Wickner, 1994). Die gleichzeitige Co-Insertion des Vorläuferproteins mit dem SecA-Protein bewirkt die Translokations-Initiation des Signalpeptids und eines Teils des reifen Proteins und somit die Bildung des Translokations-Initiationskomplexes. Hierbei wird die Spaltstelle zwischen Signalpeptid und reifem Teil des Vorläuferproteins auf der *trans*-Seite der Cytoplasmamembran für die Signalpeptidase zugänglich (Schiebel *et al.*, 1991). Anschließend erfolgt die Hydrolyse von ATP, was in einer Membraneinsertion von SecA, sowie zum Ablösen von SecA vom Vorläuferprotein, welches in der Pore bleibt, resultiert. Durch nachfolgende zyklische erneute Bindung von SecA an das Vorläuferprotein und ATP-Bindung und -hydrolyse wechselt SecA zwischen inserierten und deinserten Zustand und befördert das Vorläuferprotein so in einem sogenannten „Nähnadelmechanismus“ in Schritten von 20-30 Aminosäuren durch die Translokationspore (Schiebel *et al.*, 1991; van der Wolk *et al.*, 1997).

3.5 Qualitätskontrolle an der Sec-Translokase

Es ist wichtig, daß Bakterien nur diejenigen Proteine exportieren, die auch tatsächlich für den Export bestimmt sind. Um dies gewährleisten zu können, benutzt die Sec-Translokase einen strikten Mechanismus der Qualitätskontrolle. Über genetische Selektion konnten Suppressoren isoliert werden, die in der Lage waren Sec-Substrate mit Veränderungen im Signalpeptid, die einen Block des Sec-abhängigen Export dieses Substrates verursachen, wieder zu exportieren. Solche Suppressor-Mutationen, die als *prl*-Mutationen („protein localization“) bezeichnet wurden, sind in den Genen, die für die Sec-Translokasekomponenten SecA (PrID), SecY (PrIA), SecE (PrIG) und SecG (PrIH) kodieren, gefunden worden (Bost und Belin, 1997; Emr *et al.*, 1981; Fikes und Bassford, 1989; Stader *et al.*, 1989). Diese *prl*-Mutanten suppressieren nicht nur den Exportdefekt von Sec-Substraten, der durch verschiedenste Signalpeptid-Mutationen hervorgerufen wurde, sondern können sogar auch den Export von Proteinen mit deletierter Signalsequenz vermitteln (Derman *et al.*, 1993; Flower *et al.*, 1994; Prinz *et al.*, 1996) In diesen Suppressoren ist damit scheinbar die Qualitätskontrolle an der Translokase herabgesetzt bzw. komplett ausgeschaltet. Die Effekte der Suppressor-Mutationen sind meistens das Resultat veränderter Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Untereinheiten der Sec-Translokase. So führen *prlA*-Mutationen zu

einer erhöhten Affinität zwischen SecA und SecY/E/G, was einen erhöhten Export selbst unveränderter Substrate bewirkt (van der Wolk *et al.*, 1998). Weiterhin bewirken *prlA*- und *prlG*-Mutationen eine gelockerte Assoziation von SecY, SecE und SecG, was durch eine vereinfachte Insertion von SecA mit dem zu exportierenden Protein in die Membran zu einer erhöhten Translokationsrate führt, so daß im Extremfall sogar Proteine ohne Signalpeptid exportiert werden können (Duong und Wickner, 1999).

3.6 Die Anwendbarkeit des Sec-Weges für die Sekretion heterologer Proteine

Der Sec-Weg ist der am längsten bekannte und am besten untersuchte Proteintransportweg in Bakterien. Daher ist es nicht verwunderlich, daß die industrielle Gewinnung von Proteinen mittels Sekretion in Gram-positiven Bakterien bislang ausschließlich über den Sec-Weg erfolgte.

Der Gram-positive Modellorganismus *B. subtilis* zeigt eine sehr hohe Sekretionsleistung Sec-abhängiger Substrate, dies ist aber nur bei homologen Proteinen zu beobachten. Heterologe Proteine werden vielfach nur sehr ineffizient und mit einer sehr geringen Ausbeute sekretiert. Die Engpässe, die dafür verantwortlich sind - sogenannte „bottlenecks“ - treten meist erst in den späten Schritten der Sekretion auf, d.h. nach der Translokation der Vorläuferproteine über die Cytoplasmamembran (Bolhuis *et al.*, 1999). Vor der Translokation kann es zur cytosolischen Aggregation der heterologen Proteine kommen, da aufgrund einer hohen Syntheserate der Vorläuferproteine die Kapazität der Chaperone, die die Vorläuferproteine in einer exportkompetenten Form halten, überschritten wird (Wu *et al.*, 1998). Das erste „bottleneck“ nach der Translokation bilden die Signalpeptidasen an der *trans*-Seite der Cytoplasmamembran: Durch eine Überbelastung der Signalpeptidasen stockt die Prozessierung der Proteine und führt zu einer Akkumulation von Exportproteinen in der Cytoplasmamembran. Anschließend können extrazelluläre Faltungsfaktoren, wie z.B. PrsA in der heterologen Proteinsekretion limitierend wirken (Bolhuis *et al.*, 1996; Kontinen und Sarvas, 1993), was zu einer Akkumulation von nicht- oder falschgefalteten Proteinen in der Zellwand führen kann. Membran- oder zellwandassoziierte Proteasen, sowie lösliche Proteasen im Überstand stellen schließlich das letzte „bottleneck“ dar. Langsame Faltungen der heterologen Proteine nach der Translokation aufgrund von fehlenden Faltungsfaktoren oder unproduktive Wechselwirkungen mit der Zellwand vergrößern das Zeitfenster, in dem die Proteine von diesen extracytosolischen Proteasen abgebaut werden können, was dann häufig auch der Grund für die niedrigen Proteinausbeuten ist.

Die Verwendung von *B. subtilis* Stämmen, die nur noch eine geringe proteolytische Aktivität im Kulturüberstand aufweisen, erbrachte zwar eine deutliche Verbesserung der Proteinausbeuten von bis zu 500mg/l, zeigen aber deutlich, daß nach wie vor einige Ausbeute-limitierende Engpässe in der heterologen Proteinsekretion mittels des Sec-Weges bestehen.

4. Der Tat – Weg

Der Tat-Weg, der die herausragende Fähigkeit besitzt, vollständig gefaltete Proteine zu exportieren, ist erst seit einigen Jahren bekannt und weist noch viele ungeklärte Fragen auf. Die heterologe Proteinsekretion in Gram-positiven Bakterien mittels des Tat-Weges wurde bislang kaum untersucht, obwohl aber gerade hierfür der Tat-Weg aufgrund seiner Fähigkeit vollständig gefaltete Proteine zu exportieren möglicherweise ein großes Potential besitzt. Im Folgenden wird nun detailliert auf die Eigenschaften des Tat-Weges eingegangen.

4.1 Das Tat-Signalpeptid

Tat-Signalpeptide besitzen wie Sec-Signalpeptide den gleichen dreiteiligen Aufbau aus einer basischen n-, einer hydrophoben h- und einer c-Region, welche die Erkennungssequenz für die Signalpeptidase aufweist. Eine genauere Betrachtung von Tat-Signalpeptiden zeigt jedoch, daß sie neben der Länge - aufgrund einer Durchschnittslänge von 35 Aminosäuren sind Tat- größer als Sec-Signalpeptide - einige besondere Merkmale aufweisen, welche sie deutlich von Sec-Signalpeptiden unterscheidet (siehe Abbildung 3). So befindet sich in der n-Region am Übergang zur h-Region ein hoch konserviertes Motiv, S/T-R-R-x-F-L-K, bei dem zwei dicht benachbarte Argininreste extrem konserviert sind und deshalb für den Tat-Weg namensgebend waren (Twin arginine translocation, Sargent *et al.*, 1998). Weiterhin auffällig ist auch, daß die h-Region in Tat-Signalpeptiden meist signifikant weniger hydrophob ist als in Sec-Signalpeptiden (Cristobal *et al.*, 1999) und daß sich in der c-Region kurz vor der Signalpeptidase-Spaltstelle ein oder mehrere positiv geladenen Aminosäurereste befinden können, die in Sec-Signalpeptiden fehlen und ein sogenanntes „Sec-Avoidance“-Motiv darstellen (Blaudeck *et al.*, 2003; Bogsch *et al.*, 1997; Cristobal *et al.*, 1999; Stanley *et al.*, 2000).

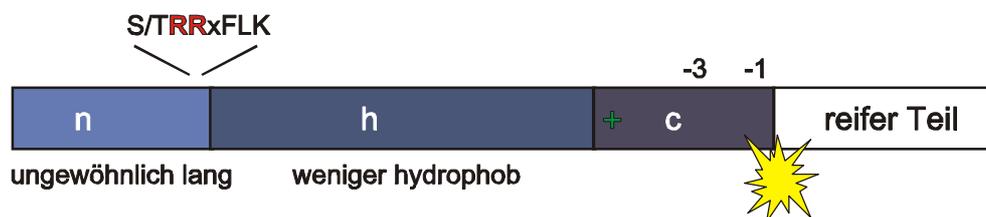


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Tat-Signalpeptids. Es zeigt, wie das Sec-Signalpeptid, einen hochkonservierten Aufbau aus drei Domänen. Die n-Region ist ungewöhnlich lang und beinhaltet am Übergang zur h-Region das Zwillingargininmotiv. Die h-Region ist meist weniger hydrophob als bei Sec-Signalpeptiden und die c-Region kann positive Aminosäuren enthalten, die in der c-Region von Sec-Signalpeptiden nicht vorkommen (durch das grüne Plus gekennzeichnet). Der Stern kennzeichnet die Signalpeptidase-Spaltstelle.

In unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, daß Tat-Signalpeptide in der Lage sind auch Sec-Substrate zur Tat-Translokase zu dirigieren (Blaudeck *et al.*, 2003; Cristobal *et al.*, 1999; Niviere *et al.*, 1992). Umgekehrt ist es aber auch möglich mit Hilfe von Sec-Signalpeptiden Tat-Substrate zur Sec-Translokase zu dirigieren (Wiegert *et al.*, 1997). Dies legt die Vermutung nahe, daß das Signalpeptid über die gesamte Information, die für ein korrektes Targeting zu der jeweiligen Translokase nötig ist, verfügt. Im Folgenden wird daher noch einmal genauer auf die einzelnen Regionen des Tat-Signalpeptids eingegangen.

4.1.1 Die Rolle des Zwillingsarginin-Konsensusmotivs S/TRRxFLK

Das Zwillingsarginin im Tat-Signalpeptid ist extrem konserviert und die Bedeutung dieser zwei Argininreste für das Targeting der Vorläuferproteine an die Tat-Translokase wurde in mehreren Arbeiten untersucht. So wurde gezeigt, daß ein konservativer Austausch beider Argininreste zu zwei Lysinresten in den meisten Tat-Substraten einen vollständigen Exportblock zur Folge hat, während konservative Austausche der Zwillingsarginreste zu KR und RK die Effizienz des Tat-abhängigen Export zwar deutlich reduzieren, jedoch keinen vollständigen Block zur Folge haben (Buchanan *et al.*, 2001; DeLisa *et al.*, 2002; Halbig *et al.*, 1999; Ize *et al.*, 2002a; Kreutzenbeck und Freudl, unveröffentlichte Ergebnisse; Stanley *et al.*, 2000). Erst ein Ladungsverlust durch einen Austausch der beiden Argininreste zu KQ oder QQ, oder eine Ladungsumkehr durch Austausch der beiden Argininreste zu DD führte zu einem vollständigen Block (Kreutzenbeck und Freudl, unveröffentlichte Ergebnisse). Das TatC-Protein, welches als Rezeptor für Tat-Signalpeptide fungiert, bindet in der Nähe der Zwillingsarginreste an das Signalpeptid (siehe auch I.4.3.2). Diese Interaktion ist aber abhängig von einem intakten Zwillingsarginin und so scheint die eigentliche Funktion der Zwillingsarginreste im Konsensusmotiv darin zu liegen, ein Erkennungssignal für TatC zu sein (Alami *et al.*, 2003).

Es gibt jedoch auch einige natürlich vorkommende Tat-Substrate, die ein weniger perfektes Konsensusmotiv aufweisen. So besitzt die Tat-abhängige Penicillin-Amidase aus *E. coli* anstelle der Zwillingsarginreste (RR) die Aminosäuren Arginin-Asparaginsäure-Arginin (RNR) im Konsensus-Motiv (Ignatova *et al.*, 2002) und das Tat-Substrat TtrB aus *Salmonella enterica* weist ein Lysin-Arginin anstelle der zwei Argininreste auf (Hinsley *et al.*, 2001).

In Tat-Signalpeptiden sind nicht nur die Zwillingsarginine, sondern das gesamte Konsensusmotiv stark konserviert. So beeinflussen die Aminosäuren Phenylalanin, Leucin und Lysin im Konsensusmotiv ebenfalls die Effizienz der Substrat-Erkennung durch die Tat-Translokase, wobei beim Phenylalanin vermutlich dessen hydrophober Charakter die relevante Eigenschaft ist (Stanley *et al.*, 2000).

Das Tat-Konsensusmotiv ist zwar notwendig für den Tat-abhängigen Export, aber für ein Targeting zur Tat-Translokase ist es nicht ausreichend. Wird das Tat-Konsensusmotiv in ein Sec-Signalpeptid an entsprechender Stelle eingefügt, erfolgt keine Umleitung des modifizierten Sec-Vorläufers in den Tat-Weg und, obendrein, wird der Sec-abhängige Export nicht beeinträchtigt (Brink *et al.*, 1998; Brüser *et al.*, 1998). Dies bedeutet, daß zusätzliche Eigenschaften des Tat-Signalpeptids für das Tat-spezifische Targeting verantwortlich sein müssen.

4.1.2 Die Bedeutung der Hydrophobizität der h-Region

Die h-Region von Tat-Signalpeptiden weist meist eine signifikant niedrigere Hydrophobizität als die von Sec-Signalpeptiden auf. Die Bedeutung dieser niedrigeren Hydrophobizität scheint darin zu liegen, eine produktive Einschleusung des Tat-Vorläuferproteins in den Sec-Weg zu verhindern, so daß das Tat-Substrat auch tatsächlich über die Tat-Translokase und nicht über die Sec-Translokase exportiert wird. So konnte Cristobal *et al.* (1999) zeigen, daß das eigentlich Tat-abhängige Fusionsprotein TorA-Lep, bestehend aus dem Tat-Signalpeptid der TMAO-Reduktase (TorA) und der löslichen Domäne der Sec-abhängigen Leaderpeptidase (Lep), durch eine Erhöhung der Hydrophobizität in der h-Region im TorA-Signalpeptid in den Sec-Weg umgeleitet wird. Die Gesamthydrophobizität des TorA-Signalpeptids und auch die Hydrophobizität der h-Region ist allerdings nicht viel niedriger als die von Sec-Signalpeptiden, so daß es sogar unverändert – im Gegensatz zu anderen weniger hydrophoben Tat-Signalpeptiden – in der Lage ist, die ATPase-Aktivität von SecA *in vitro* zu stimulieren (Kebir und Kendall, 2002). Da es aber *in vivo* dennoch zu keinen funktionellen Wechselwirkungen mit dem Sec-Apparat kommt, müssen zusätzliche Faktoren vorhanden sein, die eine Einschleusung des TorA-Signalpeptids in den Sec-Weg verhindern. Somit brauchen Tat-Signale, wie z. B. das von TorA, deren Hydrophobizität ausreichend hoch für produktive Interaktion mit Sec-Translokasen sind, eine zusätzliche Absicherung, nicht Sec-abhängig exportiert zu werden. Diese zusätzliche Absicherung erfolgt durch das sogenannte „Sec-Avoidance“-Motiv, welches im folgenden Abschnitt erläutert wird.

4.1.3 Das „Sec-Avoidance“-Motiv in der c-Region

In der c-Region von Tat-Signalpeptiden können positiv geladene Aminosäurereste auftreten, die in den c-Regionen von Sec-Signalpeptiden nur äußerst selten vorkommen (von Heijne, 1986). Solche positiv geladenen Aminosäurereste in der c-Region von Tat-Signalpeptiden stellen das sogenannte „Sec-Avoidance“-Motiv dar, welches produktive Wechselwirkungen mit der Sec-Translokase verhindert. Eine Entfernung dieses Motivs aus dem Tat-Signalpeptid hat zur Folge, daß das Tat-Substrat in den Sec-Weg umgeleitet wird (Blaudeck *et al.*, 2003; Bogsch *et al.*, 1997; Cristobal *et al.*, 1999; Stanley *et al.*, 2000). Im TorA-Signalpeptid ist solch ein „Sec-Avoidance“-Motiv vorhanden. Nun hat aber das TorA-Signalpeptid eine für Tat-Signalpeptide untypische hohe Hydrophobizität, ähnlich der von Sec-Signalpeptiden, was prinzipiell Wechselwirkungen des TorA-Signalpeptids mit der Sec-Translokase erlauben würde (siehe auch I.4.1.2). Daher ist es wahrscheinlich, daß das „Sec-Avoidance“-Motiv in solchen Signalpeptiden, in denen die Gesamthydrophobizität hoch genug ist um potentiell produktive Wechselwirkungen mit der Sec-Translokase einzugehen (siehe I.4.1.2), als entscheidender Faktor fungiert, um ein Targeting zur Sec-Translokase zu verhindern. So konnte bei dem Tat-abhängigen Fusionsprotein TorA-MalE, bestehend aus dem TorA-Signalpeptid und dem reifen Teil des Sec-abhängigen Maltosebindeprotein (MalE), gezeigt werden, daß der Austausch des „Sec-Avoidance“-Motivs im TorA-Signalpeptid, bestehend aus zwei Argininresten, gegen ein Leucin ausreichte, es in den Sec-Weg umzuleiten (Blaudeck *et al.*, 2003).

Die Kinetik des Tat-abhängigen Exports von TorA-MalE ist abhängig von der Anwesenheit von SecB (Blaudeck *et al.*, 2003). Da der Export schneller in Abwesenheit von SecB erfolgt, bindet SecB das Tat-Vorläuferprotein trotz vorhandenem „Sec-Avoidance“-Motiv. Daher verhindert dieses Motiv sehr wahrscheinlich in einem späteren Schritt die produktiven Wechselwirkungen des Tat-Vorläuferproteins mit dem SecY/E/G-Komplex, nachdem durch die ausreichend hohe Hydrophobizität des Signalpeptids bereits Wechselwirkungen mit dem SecA-Protein aufgetreten sind.

Inzwischen wurden bereits natürliche Tat-Signalpeptide entdeckt, die bei einer Blockierung des Tat-Weges eine Sec-abhängige Translokation vermitteln können, somit also einen bifunktionellen Charakter aufweisen (DeLisa *et al.*, 2003). Dies gilt auch für das oben genannte TorA-MalE Fusionsprotein, bei dem das „Sec-Avoidance“-Motiv mutiert ist. Es ist in der Lage beide Wege zu benutzen, wobei aber der Sec-Weg kinetisch stark favorisiert ist. Ein Gegenbeispiel für den Sec-Weg ist auch bekannt: Hier ist das Sec-abhängige Ribosebindeprotein in der Lage auf den Tat-Weg auszuweichen, sofern der Sec-Weg blockiert ist (Pradel *et al.*, 2003).

Zusammengefaßt kann gesagt werden, daß in allen drei Bereichen des Tat-Signalpeptids Faktoren vorkommen, die sowohl ein spezifisches Targeting zur Tat-Translokase bewirken, als auch das Einschleusen in den Sec-Weg verhindern. Dies sind soweit bislang bekannt das Tat-Konsensusmotiv, die im Vergleich zu Sec-Signalpeptiden niedrige Hydrophobizität der h-Region und das „Sec-Avoidance“-Motiv der c-Region. Weiterhin scheint aber auch die Gesamthydrophobizität der n-Region einen für die Aufrechterhaltung der Exportweg-Spezifität wichtigen Faktor darzustellen (Ize *et al.*, 2002a).

4.1.4 Spezies-Spezifität in der Erkennung von Tat-Signalpeptiden durch die Tat-Translokase

Die Signalpeptide von Sec-Substraten lassen sich fast uneingeschränkt zwischen den Bakterien austauschen und gewährleisten weiterhin einen Export des jeweiligen Substrats. Im Gegensatz dazu sind im Tat-Weg schon einige Fälle bekannt, bei denen ein fremdes Tat-Signalpeptid von der jeweiligen Tat-Translokase nicht erkannt wird und daher das Substrat nicht exportiert wird. So wird z. B. das Tat-Signalpeptid der Glucose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) aus *Zymomonas mobilis* nicht von der Tat-Translokase in *E. coli* erkannt (Blaudeck *et al.*, 2003). Diese sogenannte Spezies-Spezifität in der Signalerkennung von Tat-Substraten wird höchstwahrscheinlich dadurch entstanden sein, daß sich im Laufe der Evolution die Wechselwirkungen zwischen Tat-Translokase und Tat-Substrat spezifisch aufeinander abgestimmt haben. Es gibt aber auch Tat-Signalpeptide, wie z. B. das von TorA aus *E. coli*, die bislang von allen untersuchten Tat-Translokasen erkannt werden. Scheinbar weisen die Signalpeptide, bei denen Spezies-Spezifität in der Erkennung durch eine fremde Translokase auftritt, eine „Avoidance“-Eigenschaft auf, die die Erkennung durch eine fremde Tat-Translokase verhindert und die augenscheinlich im TorA-Signalpeptid nicht vorkommt.

4.2 Die Rolle des reifen Teils von Tat-Substraten

Die herausragende Eigenschaft des Tat-Weges ist seine Fähigkeit, vollständig gefaltete Proteine zu exportieren. Die meisten Substrate des Tat-Weges sind cofaktorhaltige monomere Redoxproteine, die ihre Cofaktoren bereits im Cytoplasma binden und somit ihre native vollständig gefaltete Konformation einnehmen. Neben Cofaktorhaltigen Tat-Substraten gibt darüber hinaus auch solche, die aus mehreren Untereinheiten bestehen. Jedoch ist das Vorhandensein eines Cofaktors und/oder das Bestehen aus mehreren Untereinheiten keine Voraussetzung für ein Tat-Substrat und auch umgekehrt sind Cofaktorhaltige Proteine und/oder solche, die aus mehreren Untereinheiten bestehen nicht zwangsläufig Tat-Substrate. So wird z.B. das monomere SufI-Protein, daß keinen Cofaktor trägt, Tat-abhängig exportiert (Sargent *et al.*, 1999). Solche Proteine falteten sehr wahrscheinlich zu schnell in eine stabile Konformation und sind mit dem Sec-Weg nicht mehr kompatibel.

Für die Tat-abhängige Translokation ist ein korrekter Faltungszustand der Tat-Substrate sogar eine notwendige Voraussetzung, da in mehreren Arbeiten gezeigt werden konnte, daß falsch gefaltete Substrate nicht mehr vom Tat-Weg akzeptiert werden. So wird die NADP-abhängige homotetramere Glucose-Fructose-Oxidoreduktase (GFOR) aus *Zymomonas mobilis* nur dann über den Tat-Weg exportiert, wenn der Cofaktor NADP gebunden ist und das Enzym korrekt gefaltet vorliegt (Halbig *et al.*, 1999).

Neben homooligomeren Substraten, existieren auch heterooligomere Substrate, die Tat-abhängig exportiert werden. Dazu zählen die [NiFe]-Hydrogenasen, die aus einer kleinen und einer großen Untereinheit bestehen, wobei nur die kleine Untereinheit mit einem Tat-Signalpeptid synthetisiert wird. Die große Untereinheit wird jedoch trotz fehlendem Signalpeptid exportiert, so daß eine Assemblierung beider Untereinheiten noch im Cytoplasma stattfinden muß (Rodrigue *et al.*, 1999). Hier erfolgt ein Export mittels „Huckepack“-Prinzip: Die große Untereinheit bindet an die kleine Untereinheit und wird vermittelt über deren Signalpeptid exportiert. Weiterhin wird die kleine Untereinheit auch nur dann exportiert, wenn die große Untereinheit vorhanden ist.

Für die alkalische Phosphatase (PhoA), bei der die Ausbildung von Disulfidbrücken für die korrekte Faltung zwingend erforderlich ist, konnte gezeigt werden, daß ein Tat-abhängiger Export nach Austausch der authentischen Sec-PhoA-Signalsequenz gegen eine Tat-Signalsequenz nur in *E. coli*-Mutanten möglich ist, die eine Disulfidbrückenbildung auch im Cytoplasma erlauben (DeLisa *et al.*, 2003). In *E. coli* Wildtyp wird dagegen der Tat-abhängige PhoA-Reporter nicht durch die Tat-Translokase exportiert. Dieser Versuch zeigte deutlich, daß an der Tat-Translokase eine Qualitätskontrolle existieren muß, welche erkennen kann, ob ein Protein korrekt gefaltet ist, ggf. seine Cofaktoren eingebaut und alle seine Untereinheiten assembliert hat. Wie genau aber diese Qualitätskontrolle aber nun tatsächlich funktioniert, ist bislang noch ungeklärt.

Das sogenannte „Proofreading“, welches sich von der genannten Qualitätskontrolle unterscheidet und die Faltung und gegebenenfalls den Cofaktoreinbau zumindest bei einigen Tat-Substraten in einer früheren Phase kontrolliert, erfolgt u. a. über Substrat-spezifische Chaperone, wie z.B. das DmsD- oder TorD-Protein. Diese beschleunigen den Cofaktoreinbau und verhindern durch ein Binden des Tat-Signalpeptids der DMSO- bzw. der TMAO-

Reduktase solange ein Targeting zur Tat-Translokase, bis der Cofaktor eingebaut und eine korrekte Faltung eingenommen wurde (Hatzixanthis *et al.*, 2005; Sargent *et al.*, 2002).

4.3 Der Tat-Exportapparat

4.3.1 Die *tat*-Gene und die von ihnen kodierten Komponenten des Tat-Exportapparates

Der Tat/ Δ pH-Weg ist erst seit einigen Jahren bekannt und wurde ursprünglich als Proteinimportweg (Δ pH-Weg) in der Thylakoidmembran von Chloroplasten entdeckt. Im Gegensatz zum Sec-Weg wird dieser ausschließlich durch den Protonengradienten über der Membran energetisiert. Das erste für eine Komponente des Δ pH-Weges kodierende Gen, *hcf106*, wurde in *Zea mays* entdeckt und kodiert für ein Membranprotein, dessen Inaktivierung zur cytoplasmatischen Akkumulation einiger Enzymkomplexe führt (Settles *et al.*, 1997). Bei den Substraten des Δ pH-Weges fiel auf, daß diese mit einem charakteristischen Signalpeptid synthetisiert wurden, das ein Zwillingsargininmotiv aufweist (Chaddock *et al.*, 1995; Henry *et al.*, 1997). Neben Thylakoidproteinen wurden später auch bakterielle Redoxenzyme mit solch einem Motiv gefunden. Tatsächlich konnte auch in *E. coli* ein zum *hcf106* homologes Gen identifiziert werden, dessen Inaktivierung zum Translokationsblock dreier Molybdoenzyme führte, die alle ein Signalpeptid mit Zwillingsargininmotiv besitzen (Weiner *et al.*, 1998). Dieses Gen (*mttA*) ist Teil eines zunächst als *mtt* bezeichneten Operons („*m*embrane *t*argeting and *t*ranslocation“), das später aber in *tat*-Operon umbenannt wurde (Sargent *et al.*, 1998). Weitere Untersuchungen konnten zeigen, daß das *mttA*-Gen für zwei zum *hcf106*-Gen homologe Proteine, TatA und TatB, kodiert.

Das *tat*-Operon in *E. coli* enthält die Gene *tatABCD* und wird konstitutiv exprimiert, wobei es sich für das TatD-Protein herausstellte, daß es nicht an der Tat-abhängigen Translokation beteiligt ist (Wexler *et al.*, 2000). Zu *tatA* sind sowohl *tatB* und *tatE* homolog, wobei letzteres monocistronisch in einem anderen Abschnitt des Chromosoms vorliegt.

Tat-Gene sind zwar weit verbreitet, kommen aber nicht ubiquitär vor. So sind sie, zusätzlich zu ihrem Vorkommen in Pflanzen, in allen sequenzierten Genomen Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien mit einem Genom größer als 2 Megabasen und auch in Archaeen vorhanden (Wu *et al.*, 2000; Yen *et al.*, 2002). Die Organisation der *tat*-Gene ist variabel, so können sie innerhalb eines Operons oder aber auch getrennt voneinander vorliegen.

Neben einem *tatC*-Gen ist immer mindestens ein dem *hcf106* homologes Gen (*tatA/B/E*) vorhanden, so daß ein funktioneller Tat-Apparat anscheinend mindestens aus einem *tatC*- und mindestens einem der drei *hcf106*-Homologen bestehen muß. Solch eine Minimaltranslokase findet sich in vielen Bakterien, wie z.B. *Staphylococcus aureus*. Insgesamt gibt es bislang unter den bekannten Tat-Translokasen drei unterschiedliche Klassen, die sich in der Zusammensetzung der *tat*-Gene unterscheiden: (I) Minimaltranslokasen, d.h. Systeme die nur aus den zwei Untereinheiten TatA und TatC bestehen, (II) Systeme, die die drei Komponenten TatA, TatB und TatC aufweisen, wie z.B. *Heliobacter pylori* und der Δ pH-Weg in Chloroplasten, und (III) Systeme, die neben TatA, TatB und TatC noch TatE besitzen.

Solche Tat-Translokasen kommen u. a. bei *E. coli* und einigen weiteren Vertretern der γ -Proteobakterien vor (Dilks *et al.*, 2003).

4.3.2 Topologie und Funktion der Tat-Proteine

Laut Strukturvorhersagen (Settles *et al.*, 1997) bestehen TatA/B/E-Proteine aus einer N-terminalen Transmembranhelix, gefolgt von einer cytoplasmatischen amphipatischen Helix und einer cytoplasmatischen C-Region mit variabler Sequenz und Länge (siehe Abbildung 4). Es wird vermutet, daß die amphipatische Helix aufgrund ihrer positiven Nettoladung mittels elektrostatischer Wechselwirkungen an der cytoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran anliegt (Berks *et al.*, 2000a). Weiterhin haben Arbeiten zum Hcf106-Protein aus Chloroplasten und zum TatA-Protein aus *E. coli* gezeigt, daß sich diese Proteine integral in der Thylakoid- bzw. Cytoplasmamembran befinden (De Leeuw *et al.*, 2001; Settles *et al.*, 1997) und daß der Großteil des Proteins von der stromalen bzw. cytoplasmatischen Seite aus für Proteasen zugänglich ist (Porcelli *et al.*, 2002; Settles *et al.*, 1997). Neuere Untersuchungen am TatA-Protein von *E. coli* deuten jedoch darauf hin, daß möglicherweise eine duale Topologie vorliegt (Gouffi *et al.*, 2004). So wurden mit Proteaseverdau des TatA-Proteins zwei Formen ermittelt, wobei in der einen Form der C-Terminus von TatA periplasmatisch und in der anderen Form cytoplasmatisch lokalisiert zu sein scheint. Diese duale Topologie gilt aber nur für TatA und nicht für TatB und TatE. TatA und TatE, die auf Aminosäureebene zu 60% identisch sind, haben überlappende Funktionen und nur eine *tatA/E*-Doppelmutante verursacht eine vollständige Blockierung des Tat-Weges (Jack *et al.*, 2001; Sargent *et al.*, 1998). Die Expression von *tatA* ist in der Zelle 50 - 100fach höher als die von *tatE* und so wird angenommen, daß *tatE* nur das Resultat einer kryptischen Genduplikation von *tatA* ist. TatA und TatB, welche auf Aminosäureebene mit 25% eine geringere Ähnlichkeit aufweisen, haben trotz ihres ähnlichen Aufbaus grundsätzlich verschiedene Funktionen, da TatB in *E. coli* für den Export aller authentischen Substrate essentiell ist (Sargent *et al.*, 1999). Das TatC-Protein besitzt laut Strukturvorhersage sechs Transmembransegmente, sowie einen cytoplasmatisch lokalisierten N- und C-Terminus (Sargent *et al.*, 1998). Jüngste Arbeiten zur Topologie von TatC unterstützten auch dieses Modell mit sechs Transmembransegmenten (Ki *et al.*, 2004). Jedoch wird auch eine alternative Topologie für TatC vorgeschlagen, in der TatC nur vier Transmembransegmente aufweist und daher auch nur zwei anstelle von drei periplasmatischen Loops ausbildet (Behrendt *et al.*, 2004; Gouffi *et al.*, 2002). TatC ist ebenfalls - wie auch TatA und TatB - eine essentielle Komponente des Tat-Systems.

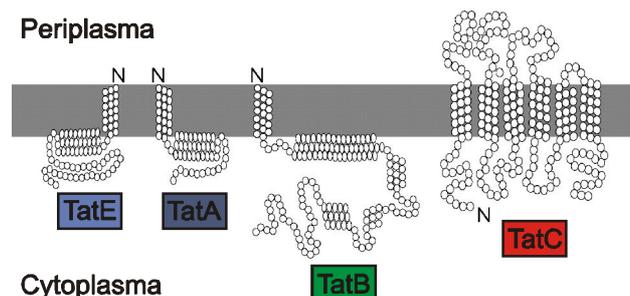


Abbildung 4: Strukturvorhersage der Tat-Proteine von *E. coli*. Abb. verändert nach Berks *et al.* (2000a).

Die Stöchiometrie der Tat-Proteine in der Zelle wurde in mehreren Arbeiten anhand aufgereinigter hochmolekularer Komplexe untersucht und das Mengenverhältnis von TatA:TatB:TatC auf ca. 20:1:0.4 geschätzt (Bolhuis *et al.*, 2001; Jack *et al.*, 2001; Sargent *et al.*, 2001). TatA, welche demnach die dominante Komponente des Tat-Apparats ist, kommt in Komplexen unterschiedlicher Zusammensetzung und Größe in der Zelle vor. So findet sich TatA sowohl in einem 600kDa großen heterooligomeren Komplex zusammen mit TatB und TatC, wobei die Menge an TatA variiert (Bolhuis *et al.*, 2001; Jack *et al.*, 2001; Sargent *et al.*, 2001), als auch in einem heterooligomeren Komplex mit TatB, wobei es in 20-fachem Überschuß gegenüber TatB vorliegt (Sargent *et al.*, 2001). TatA findet sich aber auch in homooligomeren Komplexen mit einer Größe von 460kDa (Porcelli *et al.*, 2002), sowie in homooligomeren Komplexen, deren Größe zwischen weniger als 100 und mehr als 500kDa liegt (Oates *et al.*, 2005). Bei letzteren wird angenommen wird, daß die Komplexe aus Molekülen von drei bis vier Untereinheiten aufgebaut sind.

TatB und TatC liegen - wie bereits oben erwähnt - zusammen in einem 600kDa großen Komplex vor, mit einem Verhältnis zueinander von 1:1 (Bolhuis *et al.*, 2001). Hierbei zeigte sich, daß TatB einen stabilisierenden Effekt auf TatC ausübt (Sargent *et al.*, 1999). Das TatC-Protein geht als erste Untereinheit der Tat-Translokase Wechselwirkungen mit dem Vorläuferprotein ein und erkennt sehr wahrscheinlich das Konsensusmotiv im Tat-Signalpeptid. Daher übernimmt es offensichtlich die Rolle des Substratrezeptors (Alami *et al.*, 2003). Erst nach der Bindung des Tat-Substrates an den Rezeptor im TatBC-Komplex kommt TatA ins Spiel: Durch die Bildung eines Komplexes aus TatBC und Substrat erfolgt eine Rekrutierung von TatA-Molekülen, welche die eigentliche Translokationspore bilden (siehe auch I.0). Dies konnte sowohl für den Δ pH-Weg in Thylakoiden als auch für den bakteriellen Tat-Weg gezeigt werden (Alami *et al.*, 2003; Cline und Mori, 2001). Dabei wird spekuliert, daß das TatA-Protein, induziert durch die Wechselwirkung des Substrates mit dem TatB/C-Rezeptorkomplex über seine Transmembransegmente oligomerisiert und die Translokationspore bildet (Porcelli *et al.*, 2002). Da die Größe der Tat-Substrate variiert, ist es denkbar, daß der Durchmesser der Translokationspore der Größe des zu translozierenden Substrats angepaßt wird und, je nach Substrat, eine unterschiedliche Anzahl an Tat-Molekülen enthält.

Die Rolle von TatB in der Tat-Translokase ist scheinbar die Vermittlung zwischen Rezeptor und Translokationspore – sozusagen als physikalisches Bindeglied. Für Interaktionen zwischen TatC und dem Tat-Substrat wird TatB nicht benötigt, so daß sich möglicherweise folgender Ablauf an der Translokase ergibt: TatC erkennt als Rezeptor das Vorläuferprotein am Konsensusmotiv. Anschließend gibt es das Vorläuferprotein an TatB weiter, was in der Lage ist, sowohl mit dem Konsensusmotiv, als auch mit der hydrophoben h-Region und dem frühen Bereich des reifen Proteins zu interagieren. TatB reicht den Vorläufer schließlich an die Translokationspore weiter. Möglicherweise ist TatB nur eine physikalische Verbindung zwischen TatC und TatA, da es zum einen in Abwesenheit von TatC mit TatA wechselwirken kann und zum anderen in Abwesenheit von TatA mit TatC stabile Komplexe eingeht (de Leeuw *et al.*, 2002). Darüber hinaus erlaubt eine Minimaltranslokase in *E. coli*, bestehend nur aus TatA und TatC, einen geringen, aber dennoch detektierbaren Export (Blaudeck *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurden darüber hinaus TatA-Suppressormutanten isoliert, die den Tat-abhängigen Export dieser *E. coli* Minimaltranslokase sogar wieder deutlich steigern konnten.

Interessanterweise befanden sich alle Mutationen in der N-terminalen Domäne von TatA. Dies deutet darauf hin, daß in diesen Mutanten das TatA-Protein die Rolle von TatB übernehmen kann und möglicherweise nun effizienter an TatC bindet, ohne TatB als physikalische Verbindung zu benötigen. Dies deutet darauf hin, daß TatB eine spezialisierte Form von TatA zu sein scheint. Diese Ergebnisse erklären vielleicht auch das Vorkommen von TatAC-Minimaltranslokasen bei den Bakterien: Hier erfüllt das TatA-Protein eine bifunktionelle Rolle sowohl als TatA als auch als TatB, eine Differenzierung von TatA zu TatA und TatB hat hier nicht stattgefunden.

Die Aufgaben der einzelnen Tat-Proteine innerhalb der Translokase sind in einem Modell zur Struktur der Tat-Translokase noch einmal bildlich zusammengefaßt (siehe Abbildung 5, Berks *et al.*, 2000b).

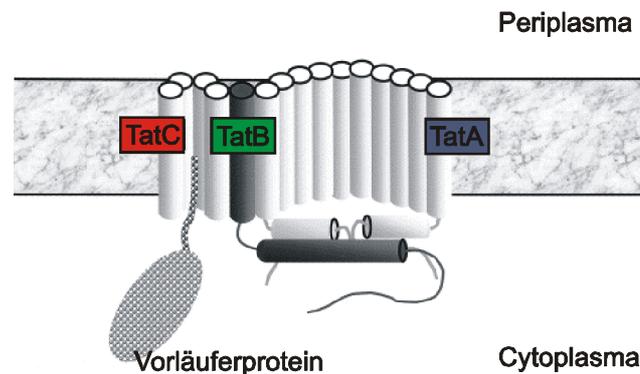


Abbildung 5: Modell zur Struktur der Tat-Translokase von *E. coli*. TatC bildet den Rezeptor für die Tat-Signalpeptide, mehrere Kopien von TatA bilden die Translokationspore und TatB fungiert als Bindeglied zwischen dem Rezeptor und der Pore. Abbildung verändert nach Berks *et al.* (2000b).

4.3.3 Modell zum Mechanismus der Tat-Translokase

In vitro Studien zur Tat-Translokation in *E. coli* und Erbsen-Thylakoiden führten zu einem Modell, das die teilweise ΔpH -abhängige zyklische Assemblierung und Disassemblierung der Tat-Translokase während des Transportvorganges beschreibt (Alami *et al.*, 2003; Cline und Mori, 2001; de Leeuw *et al.*, 2002; Mori und Cline, 2002). Laut diesem Modell liegen die Untereinheiten der Translokase in der Ruhephase in getrennten TatA- und TatBC-Komplexen vor. Im ersten Schritt werden Tat-Vorläuferproteine in einem Energie-unabhängigen Schritt vom TatBC-Komplex gebunden (Abbildung 6-1), wobei das TatC-Protein als Rezeptor für das Tat-Signalpeptid dient. Möglicherweise erfolgen durch diese Bindung Konformationsänderungen am TatBC-Komplex, da die Bindung des Substrates Voraussetzung für den folgenden Schritt ist. Abhängig vom Protonengradienten (ΔpH) werden nun TatA-Moleküle rekrutiert, die die eigentliche Translokationspore bilden, und assoziieren mit dem TatBC-Komplex zur kompletten und aktiven Translokase (Abbildung 6-2). Es kann vermutet werden, daß die Anzahl der TatA-Proteine, die rekrutiert werden, von der Größe des Tat-Substrates abhängen, um so eine von der Größe her passende Translokationspore zu bilden. Diese Assoziation zwischen TatA und TatBC bleibt solange bestehen, bis das Tat-Substrat vollständig über die Membran transloziert wurde (Abbildung 6-3). Nach der Prozessierung

des Tat-Vorläuferproteins durch die Signalpeptidase und der vollständigen Freisetzung des reifen Teils aus der Translokationspore dissoziieren TatA und der TatBC-Komplex und das System kehrt wieder in den Ausgangszustand zurück (Abbildung 6-4).

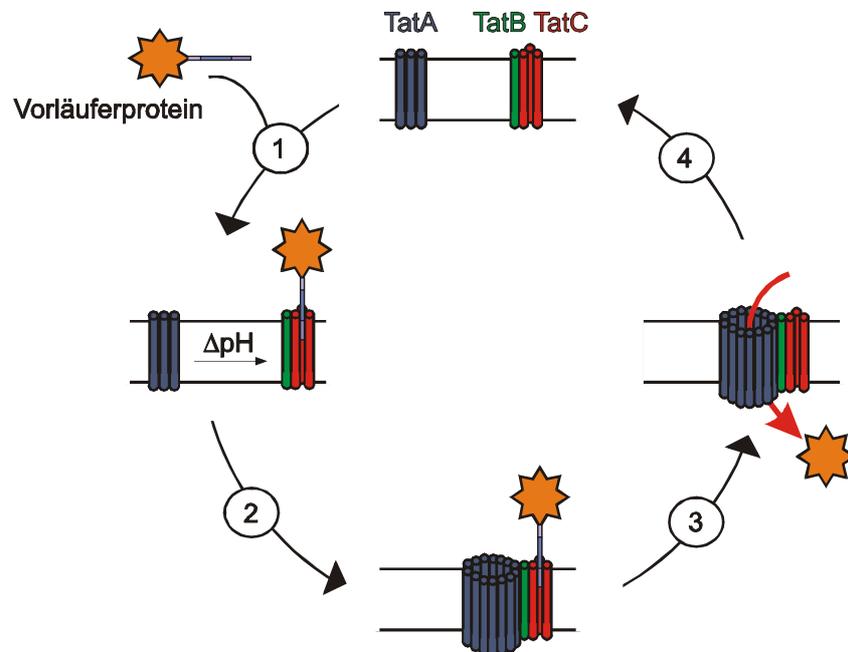


Abbildung 6: Modell zum Zyklus der Tat-Translokation. 1: Bindung des Vorläuferproteins an den TatBC-Komplex. 2: ΔpH -abhängige Assoziation des TatBC-Substrat-Komplexes mit TatA. 3: Translokation des Substrates (Prozessierung des Vorläuferproteins durch die Signalpeptidase ist nicht gezeigt). 4: Dissoziation von TatA und TatBC.

4.3.4 Energetisierung des Tat-Weges

Der Tat-Weg wird über den elektrochemischen Protonengradienten der Membran (ΔpH) energetisiert und benötigt im Gegensatz zum Sec-Weg keine Energie in Form von NTPs. In *E. coli* konnte gezeigt werden, daß Protonophoren, die das Membranpotential zerstören, auch den Tat-Weg blockieren (Cristobal *et al.*, 1999; Santini *et al.*, 1998; Wiegert *et al.*, 1996). Der klassische Inhibitor des Sec-Weges, Natriumazid, der die ATP-Hydrolyse durch SecA verhindert, blockiert in *E. coli* auch den Tat-Weg zumindest partiell (Cristobal *et al.*, 1999; Santini *et al.*, 1998; Wiegert *et al.*, 1996). Da Natriumazid aber ein relativ unspezifischer Inhibitor ist, kann es sein, daß das Tat-System indirekt beeinträchtigt wird. Denkbar ist, daß z.B. die terminale Reduktasen der Elektronentransportkette inhibiert werden, die den Protonengradienten der Membran aufrecht erhalten (Berks *et al.*, 2000a). Für den ΔpH Weg in Thylakoiden wurde gezeigt, daß ein substratspezifischer ΔpH -Mindestwert für den Export notwendig ist. Offenbar gibt es eine substratspezifische Energiebarriere, die möglicherweise von Parametern wie Substratgröße, Faltungstabilität oder Unterschieden in der Affinität zur Translokase bestimmt wird (Alder und Theg, 2003a; Alder und Theg, 2003b). Bei den Untersuchungen in Thylakoiden zur Abhängigkeit der einzelnen Translokationsschritte vom

Protonengradienten hatte sich gezeigt, daß der Protonengradient vermutlich während des ganzen Transportverlaufs genutzt wird. Die Tat-Translokase könnte somit eventuell als ein Protonen/Protein Antiporter fungieren.

4.4 Die Anwendbarkeit des Tat-Weges für die Sekretion heterologer Proteine

In Gram-negativen Bakterien konnte schon anhand mehrerer Arbeiten gezeigt werden, daß das Tat-System in der Lage ist effizient heterologe Proteine über die Cytoplasmamembran in das Periplasma zu translozieren (Blaudeck *et al.*, 2003; Gerard *et al.*, 2002; Ize *et al.*, 2002a; Ize *et al.*, 2002b; Thomas *et al.*, 2001). In Bezug auf seine Fähigkeit zur heterologen Proteinsekretion in Gram-positiven Bakterien wurde das Tat-System bislang aber - im Gegensatz zum Sec-Weg - kaum untersucht. Erste Untersuchungen in *B. subtilis* (Gerlach *et al.*, 2004) und *Streptomyces lividans* (Schaerlaekens *et al.*, 2004b) deuten aber an, daß der Tat-Weg in Gram-positiven Bakterien durchaus das Potential zur Sekretion von heterologen Proteinen besitzt und somit eine mögliche Alternative zum Sec-Weg darstellen könnte. Dabei spielt seine herausragende Eigenschaft vollständig gefaltete Proteine zu exportieren eine bedeutende Rolle: Die Proteine nehmen noch im Cytoplasma vor der Translokation ihre gefaltete, aktive Form ein und werden in diesem Zustand transloziert. Aus diesem Grund tauchen nach der Tat-abhängigen Translokation nicht die Probleme, bzw. „bottlenecks“ auf, die in der Sec-abhängigen Sekretion in Gram-positiven Bakterien die Sekretionseffizienz drastisch reduzieren, nämlich der massive proteolytische Abbau von Exportproteinen, die nach der Translokation zu langsam oder fehlerhaft falten (siehe auch I.3.6). Durch die besondere Eigenschaft des Tat-Weges, Substrate in vollständig gefalteter Konformation über die Cytoplasmamembran zu translozieren, können speziell auch solche Proteine in den Kulturüberstand sekretiert werden, die - z.B. aufgrund der notwendigen Unterstützung durch cytosolische Faltungsfaktoren - nur im Cytoplasma und nicht nach der Translokation über die Cytoplasmamembran ihre aktive Konformation einnehmen können. Eine Sec-abhängige Sekretion wäre in solch einem Fall nicht möglich, da der Sec-Weg nur Proteine in weitestgehend entfalteter Konformation translozieren kann, was zur Folge hat, daß die Proteine natürlich auch in entfalteter Konformation in den Kulturüberstand gelangen, wo sie dann aufgrund von fehlenden Faktoren nicht mehr in ihre aktive Form falten können. Dies konnte besonders gut am Beispiel des Grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) demonstriert werden, das für die Faltung in seine aktive Konformation anscheinend auf cytosolische Faltungsfaktoren angewiesen ist: Wird das GFP mit einem Sec-Signalpeptid synthetisiert, liegt es nach dem Export inaktiv vor (Feilmeier *et al.*, 2000), da es offensichtlich wegen fehlender Faktoren außerhalb des Cytoplasmas nicht mehr falten kann. Wird es dagegen mit einem Tat-Signalpeptid synthetisiert, liegt es nach dem Export in aktiver Form vor, da die Faltung bereits im Cytoplasma stattfinden konnte (Thomas *et al.*, 2001).

Die Tatsache, daß Tat-abhängig exportierte Proteine bereits im Cytoplasma ihre vollständig gefaltete Konformation einnehmen und in diesem Faltungszustand über die Cytoplasmamembran transloziert werden, hat aber möglicherweise nicht nur Vorteile in der Sekretion

heterologer Proteine. Es ist bislang ungeklärt, ob die Konformation der vollständig gefalteten Tat-abhängig exportierten Proteine für die Zellwandpassage von Nachteil sein könnte und daher möglicherweise die Größe der vollständig gefalteten Tat-Substrate eine Limitation in Proteinsekretion darstellt. Dies wird im Folgenden Kapitel näher beleuchtet.

5. Einfluß der Zellwand auf die Sekretion von heterologen Proteinen

Die Sekretion heterologer Protein mit Gram-positiven Bakterien setzt voraus, daß die Proteine die Zellwand passieren können. Denn im Vergleich zu Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* ist die Zellwand Gram-positiver Bakterien ca. 10 mal so dick und weitaus stärker vernetzt, was aber von Organismus zu Organismus und auch je nach Wachstumsphase variieren kann. Die Zellwand besteht aus einem dicken Mureinsacculus, der im Gegensatz zur Situation bei Gram-negativen Bakterien aus mehreren, untereinander verlinkten Peptidoglykanschichten aufgebaut ist. An das Peptidoglykan sind kovalent Teichon-, Lipoteichon und/oder Teichuronsäuren gebunden, die der Zellwand eine stark negative Ladung geben. Untersuchungen zur Zellwandstruktur in *B. subtilis* haben ergeben, daß diese einen porösen Charakter aufweist, wobei die Porengröße zwischen 2 und 4nm im Durchmesser beträgt. Daher sollten theoretisch Proteine bis zu einer Größe von 50kDa die Zellwand durch die Poren passieren können (Demchick und Koch, 1996). Größere Proteinen könnten dagegen in der Zellwand stecken bleiben, was natürlich die Sekretionsleistung stark beeinträchtigt (Tjalsma *et al.*, 2000).

Neben der Größe eines Proteins kann auch seine Nettoladung limitierend für die Zellwandpassage sein. Aufgrund der Ladungseigenschaft der Zellwand können Proteine, die eine insgesamt positive Nettoladung aufweisen, Wechselwirkungen mit der Zellwand eingehen und somit die Sekretionsleistung mindern.

Die Zellwandstruktur der Gram-positiven Bakterien ist wie bereits erwähnt von Organismus zu Organismus verschieden. Besonders deutlich ist das bei den *Corynebacterianae*, wozu u. a. *Corynebacterium glutamicum* und *Mycobacterium tuberculosis* gehören. Diese Bakterien besitzen einzigartige Zellwandkomponenten, die in anderen Gram-positiven Bakterien nicht vorkommen. Typisch ist vor allem, daß die Zellwand Mykolsäuren aufweist, welche die komplette Zelle vermutlich als Doppelschicht umgibt (Minnikin *et al.*, 1978). Diese Mykolsäureschicht, die eine höchst geordnete Struktur aufweist, ist der Grund für eine außerordentlich niedrige Permeabilität der Zellhülle (Nikaido, 1994) und stellt daher auch für sekretorische Proteine potentiell eine Barriere dar. Da aber auch in *Corynebacterianae* die Sekretion von Proteinen in den Überstand beobachtet wird, wird angenommen, daß möglicherweise ein spezifischer Translokationsapparat in der Mykolsäureschicht die Sekretion von Proteinen erlaubt (Houssin *et al.*, 2002).

Da die Zellwandstruktur somit höchstwahrscheinlich die Sekretionsleistung beeinflusst, ist es denkbar, daß aufgrund der Variabilität der Zellwandstruktur auch die Sekretionsleistung innerhalb der Gruppe der Gram-positiven Bakterien variiert. D. h. es gibt möglicherweise

unter den Gram-positiven Bakterien solche, die aufgrund einer guten „Proteindurchlässigkeit“ ihrer Zellwand auch gute Sekretierer sind.

Möglicherweise spielt hier auch die Zellform der Gram-positiven Bakterien eine wichtige Rolle, die maßgeblich für den Zellwandturnover während des Zellwachstums und der Zellteilung verantwortlich ist. Die Zellteilung und das Zellwachstum unterscheiden sich bei stäbchen- und kokkenförmigen Bakterien deutlich, was sich auch auf das Maß an Zellwandturnover auswirkt. So erfolgt während des Zellwandturnovers bei stäbchenförmigen Bakterien ein deutlich größerer Austausch an Zellwandmaterial als es bei kokkenförmigen Bakterien der Fall ist. Wenn tatsächlich heterologe Proteine in der Zellwand steckenbleiben, würde es theoretisch durch den Zellwandturnover zu einer Freisetzung zumindest eines Teils dieser steckengebliebenen Proteine kommen. In solch einem Falle wären höchstwahrscheinlich aufgrund des größeren Zellwandturnovers die stäbchenförmigen Bakterien gegenüber den kokkenförmigen Bakterien im Vorteil, da eine größere Menge an Protein freigesetzt wird und in den Kulturüberstand gelangt.

6. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die sekretorische Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien hat den deutlichen Vorteil gegenüber der intrazellulären Proteingewinnung mit Gram-negativen Bakterien, daß die Zielproteine direkt in den Überstand sekretiert werden können. Dadurch entfallen ein Aufschluß der Zellen und eine dadurch verursachte Verunreinigung der Zielproteine. Zudem weisen Gram-positive Bakterien eine sehr hohe Sekretionsleistung auf und werden daher schon lange in der industriellen Proteingewinnung genutzt. Bislang erfolgte die Sekretion jedoch allein über den Sec-Weg, was einige Limitierungen mit sich bringt. So werden die hohen Sekretionsraten zumeist nur bei homologen Proteinen erreicht, wohingegen die Sekretionseffizienz heterologer Proteine aufgrund der zahlreichen „bottlenecks“ der Sec-abhängigen Sekretion sehr niedrig ist.

Bakterien besitzen neben dem Sec-Weg noch einen zweiten, den erst vor einigen Jahren entdeckten Tat-Weg, welcher die herausragende Eigenschaft hat, vollständig gefaltete Proteine zu exportieren. Die für den Tat-abhängigen Export nötige vollständige Faltung der Proteine im Cytosol umgeht die meisten unter I.3.6 aufgeführten Probleme, die in der Sec-abhängigen Gewinnung heterologer Proteine zu niedrigen Ausbeuten führt. Der Tat-Weg eröffnet somit die Möglichkeit, solche Proteine effizient zu sekretieren, die aufgrund von Faltungsproblemen nach der Membranpassage für die Sec-abhängige Sekretion nicht geeignet sind. Der Tat-Weg wurde aber bislang kaum auf seine biotechnologische Anwendbarkeit hin untersucht, obwohl er ein großes Potential im Hinblick auf die Sekretion heterologer Protein hat.

Ziel dieser Arbeit war es, den Tat-Weg im Hinblick auf sein Potential zur sekretorischen Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien als Wirtsorganismen zu bewerten. Da möglicherweise die Zellwandstruktur und auch die Zellform eine Rolle bei der Proteinsekretion spielt, wurden drei Gram-positiven Organismen zur Untersuchung der Tat-abhängigen Sekretion heterologer Substrate ausgewählt, die über eine unterschiedliche

Zellwandstruktur verfügen und außerdem eine unterschiedliche Zellform aufweisen: *B. subtilis* (Stäbchenförmig), *S. carnosus* (Kokkenförmig) und *C. glutamicum* (Coryneform). Um nun den Tat-Weg für die sekretorische Proteingewinnung in diesen drei Organismen zu erschließen und zu bewerten, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Tat-abhängige Sekretion von unterschiedlichen heterologen Substraten in diesen Organismen untersucht, qualitativ miteinander und auch gegebenenfalls mit der Sec-abhängigen Sekretion verglichen werden. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollten helfen, eine Aussage über die Verwendbarkeit des Tat-Weges für sekretorische Proteingewinnung in verschiedenen Gram-positiven Bakterien treffen zu können.

Für *B. subtilis* war bekannt, daß er über ein funktionelles Tat-System verfügt, im Gegensatz zur Situation bei *S. carnosus* und *C. glutamicum*. Daher sollte zunächst untersucht werden, ob *S. carnosus* und *C. glutamicum* über einen funktionellen Tat-Weg verfügen, wobei zumindest für *C. glutamicum* die Genomsequenz einen ersten Hinweis darauf gab. Eine anschließende Charakterisierung des jeweiligen Tat-Weges sollte deutlich machen, welche Rolle er für den Organismus spielt. Hierdurch könnten für den jeweiligen Organismus erste Rückschlüsse auf die Verwendbarkeit des Organismus als Tat-abhängiges Sekretionssystem gezogen werden, da wahrscheinlich ist, daß ein Organismus, in dem der Tat-Weg eine wichtige Rolle spielt, sich eher als Sekretionssystem für Tat-Substrate eignet, als ein Organismus, in dem der Tat-Weg einen sehr geringen Stellenwert hat.

Ein weiterer zusätzlicher Aspekt dieser Arbeit ist die Untersuchung zur Spezies-Spezifität in der Erkennung von Tat-Substraten durch die Tat-Translokase (siehe auch I.4.1.4). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, in wie weit die Spezies-Spezifität in der Erkennung von Tat-Substraten zwischen *S. carnosus*, *C. glutamicum*, *B. subtilis* und *E. coli* ausgeprägt ist und in welchem Maße sie dadurch die Sekretionseffizienz heterologer Proteine beeinflusst. Dazu soll die Sekretionseffizienz von Fusionsproteinen mit einem, sofern vorhanden, eigenen Tat-Signalpeptid des jeweiligen Organismus mit der Sekretionseffizienz von Fusionsproteinen mit fremdem Tat-Signalpeptid verglichen werden.

II. Material und Methoden

1. Chemikalien und Enzyme

In der vorliegenden Arbeit wurden analysenreine Chemikalien der Firmen Merck AG (Darmstadt), Sigma Chemie (Taufkirchen) und Serva (Heidelberg) verwendet. Biochemikalien und Enzyme, einschließlich der dazugehörigen Puffer stammten von den Firmen MBI Fermentas GmbH (St.Leon-Rot), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) und New England Biolabs (Frankfurt/Main). Zusätze für Nährmedien wurden von der Firma Difco Laboratories (Detroit, USA) bezogen. Produkte anderer Hersteller sind an entsprechender Stelle aufgelistet.

2. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Stämme und ihre wesentlichen genetischen Marker.

Art	Stamm	Genotyp	Referenz
<i>B. subtilis</i>	DB104	<i>His nprR2 nprR2 nprE18 ΔaprA3</i>	Kawamura und Doi, 1984
	168	<i>trpC2</i>	Kunst <i>et al.</i> , 1997
	<i>tatAdCd</i>	<i>trpC2, tatAd-Cd::Kan</i>	Jongbloed <i>et al.</i> , 2004
	<i>tatAyCy</i>	<i>trpC2, tatAy-tatCy::Sp</i>	Jongbloed <i>et al.</i> , 2004
	total- <i>tat</i> ₂	<i>trpC2, tatAc::Em, tatAy-tatCy::Sp, tatAd-tatCd::Kan</i>	Jongbloed <i>et al.</i> , 2004
<i>C. glutamicum</i>	ATCC13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
	DCTC	ATCC13032 <i>ΔtatAC</i>	diese Arbeit
<i>E. coli</i>	DH5α	<i>supE44 ΔlacU169(φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
	JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi-1 Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacI^Q Z ΔM15</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
	MC4100	<i>araD39 (argF-lac, U169 relA51 rps150 f1B5301 deoC1 ptsF25</i>	Casadaban, 1976
	GSJ100	MC4100 x P1.MM129>Tet ^R	Blaudeck <i>et al.</i> , 2003
	DADE	<i>ΔmalE444 zjb729::Tn10</i> MC4100 <i>ΔtatABCD/E</i>	Wexler <i>et al.</i> , 2000

<i>E. coli</i>	GSJ101	DADE x P1.MM129>Tet ^R <i>malE444 zjb729::Tn10</i>	Blaudeck <i>et al.</i> , 2003
<i>S. carnosus</i>	TM300	Wildtyp	Schleifer und Fischer, 1982
	S1	Industrieller Geschmacksproduzent, <i>nuc⁻</i>	Wisby
	DMC	S1 Δ <i>tatC</i>	diese Arbeit

Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pWH1520	amp ^R _{E.c.} , tet ^R _{B.s.} , P _{xyl} , <i>xylR</i>	Ryguis <i>et al.</i> , 1991
pBBR1MCS-2	kan ^R _{E.c.} , P _{lacZ} <i>mob rep lacZ</i> α^+	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pEKEEx2	kan ^R _{E.c.,C.g.} , P _{tac} , <i>lacI^q</i>	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991
pXR100	amp ^R _{E.c.} , cm ^R _{S.c.} , P _{xyl}	Jochen Meens (pers. Mitteilung)
pUC18	amp ^R _{E.c.} , P _{lacZ}	Vieira und Messing, 1982
pGFP _{uv}	pUC18 <i>gfp-uv</i>	Clontech
pK19 <i>mobsacB</i>	Integrationsvektor für <i>C. glutamicum</i> , kan ^R , <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriT</i> , <i>mob</i> , <i>sacB</i>	Schafer <i>et al.</i> , 1994
pK19 <i>mobsacBtat</i> *	pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit den flankierenden Bereichen des <i>tatAC</i> -Operons aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pPSM1058	Integrationsvektor für <i>S. carnosus</i> , cm ^R , <i>rep^{ts}</i> , <i>usb45-nucB</i>	Madsen <i>et al.</i> , 2002
pPSM1058 <i>tatC</i>	pPSM1058-Derivat mit den flankierenden Bereichen des <i>tatC</i> -Gens aus <i>S. carnosus</i>	diese Arbeit
pXRTorACGTase	pXR100, <i>torA_{signalsequenz}cggtase</i> , 'untranslated region' (UTR) und Ribosomenbindestelle von <i>S. hyicus</i>	Angela Vollstedt (pers. Mitteilung)
pXRTorAGFP	pXR100, <i>torA_{signalsequenz}gfp</i> , UTR und RBS _{S. hyicus}	diese Arbeit
pEKEEx2PhoD _{Cg} GFP	pEKEEx2, <i>phoDC.g_{signalsequenz}gfp</i>	diese Arbeit
pEKEEx21588 _{Cg} GFP	pEKEEx2, <i>1588_{signalsequenz}gfp</i>	diese Arbeit
pBBRTorAMaIE	pBBR1MCS-2, <i>torA_{signalsequenz}male</i>	Natascha Blaudeck (pers. Mitteilung)
pEKEEx2TorAMaIE	pEKEEx2, <i>torA_{signalsequenz}male</i>	diese Arbeit

pEKEx2TorAGFP	pEKEx2, <i>torA</i> _{signalsequenz} <i>gfp</i>	diese Arbeit
pEKEx2MalE	pEKEx2, <i>malE</i> _{signalsequenz} <i>malE</i>	diese Arbeit
pEKEx2PhoD _{Bs} GFP	pEKEx2, <i>phoDB</i> . <i>s</i> . _{signalsequenz} <i>gfp</i>	diese Arbeit
pWHTorAMalE	pWH1520, <i>torA</i> _{signalsequenz} <i>malE</i>	diese Arbeit
pWHTorAGFP	pWH1520, <i>torA</i> _{signalsequenz} <i>gfp</i>	diese Arbeit
pWHPhoD _{Bs} GFP	pWH1520, <i>phoDB</i> . <i>s</i> . _{signalsequenz} <i>gfp</i>	diese Arbeit
pWHPhoD _{Cg} GFP	pWH1520, <i>phoDC</i> . <i>g</i> . _{signalsequenz} <i>gfp</i>	diese Arbeit
pWHOmpA	pWH1520, <i>ompA</i>	Dietmar Tippe (pers. Mitteilung)
pBBRTorAGFP	pBBR1MCS-2, <i>torA</i> - <i>gfp</i>	diese Arbeit
pBBRPhoD _{Bs} GFP	pBBR1MCS-2, <i>phoDB</i> . <i>s</i> . _{signalsequenz} <i>gfp</i>	diese Arbeit
pBBRPhoD _{Cg} GFP	pEKEx2, <i>phoDC</i> . <i>g</i> . _{signalsequenz} <i>gfp</i>	diese Arbeit
pXRPhoD _{Cg} GFP	pXR100, <i>phoDB</i> . <i>s</i> . _{signalsequenz} <i>gfp</i>	diese Arbeit
pXRPhoD _{Bs} GFP	pXr100, <i>phoDC</i> . <i>g</i> . _{signalsequenz} <i>gfp</i>	diese Arbeit

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Die jeweiligen Schnittstellen sind unterstrichen

Oligonukleotid	Sequenz (5' – 3')	Verwendung
tatASa-for	ACAGGCCCAACAAGTCTTGTCGTC	Amplifizierung eines internen <i>tatAC</i> Fragmentes von <i>S. aureus</i>
tatCSa-rev	ATGCTTTAAAGCCAATGACAGGCG	
tatA400Sc-for	GTAG <u>GTACCAT</u> GTTTACAAATATGTTTG	Konstruktion der <i>S. carnosus</i> Δ <i>tatC</i> -Mutante
tatA400Sc-rev	TTCTTGGCATCACAGG ACGGGTGTATCCACCAATGAGATG	
tatC400Sc-for	GGTGGATACACCCGTGTCAGAACTATTA CGTTGGCTG	
tatC400Sc-rev	CGGGGATC <u>CTCC</u> GACATGGGAAACAAT AGTACCA	
TorA(UTR)-for	CTCTAGAGTCGACCTAGAGTCGAT	Konstruktion des <i>torA</i> - <i>gfp</i> Fusionsgens für <i>S. carnosus</i>
TorA(UTR)-rev	CGCCGCTTGCGCCGCACT	

Tor/GFP-for	ACTGCGGCGCAAGCGGCGCGTAAAGGA GAAGA <u>ACTTTT</u> CACTGGA	Konstruktion des <i>torA-gfp</i> Fusionsgens für <i>S. carnosus</i>
GFP(UTR)-rev	CGCGCATGCTGGAATTCATTATTTGTAG AGCTC	
tatACg-for	GAGGTCGACA <u>AAATCTT</u> CCGATATTGCCA CGTTATTGCTGC	Konstruktion der <i>C. glutamicum ΔtatAC</i> -Mutante
tatACg-rev	CCCATCCACTAAACTTAAACACCATGGT CCGAGGGACATGTGGTCTAC	
tatCCg-for	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGAAACCCG GGCGCGCCGACTTCG	
tatCCg-rev	GTGGGATCCATCCATGACCACGTGGCTT AAGCGCT	
CgDel-for	AGGCTTGATCGCATCCGAAG	Überprüfung der <i>C. glutamicum ΔtatAC</i> -Mutante
CgDel-rev	CAGGCTCAAACAGTGGCATC	
Cg2185ss-for	GGCGGTACCAAGGAGATATAGATATGC CACAGTTAAGCAGACGCCAGTTC	Konstruktion der <i>phoD_{Cg}-gfp</i> und <i>1588_{Cg}-gfp</i> Fusionsgene
Cg2185ss(+4)-rev	AGTTCTTCTCCTTTACGTTGGCGTTCTTC AGCGCGTG CAG	
Cg1588ss-for	GGCCCTGCAGGAAGGAGATATAGATAT GAAGCTTTTCTCCCGCACCTCACTG	
Cg1588ss(+4)-rev	AGTTCTTCTCCTTTACGGGAGTCCTCATC AGCGAATGCAGG	
GFP(malE)-for	GTAAAGGAGAAGA <u>ACTTTT</u> CACTGGAG	Konstruktion der <i>phoD_{Cg}-gfp</i> und <i>1588_{Cg}-gfp</i> Fusionsgene
CgGFP-rev	CAGGAATTCATTATTTGTAGAGCTCATC CATGCCATG	
CgRBSTorA-for	GGCGTCGACAAGGAGATATAGATATGA ACAATAACGATCTCTTTCAGGCATCAC	Konstruktion des <i>torA-malE</i> Fusionsgens für <i>C. glutamicum</i>
CgRBSTorA-rev	GATGGATCCCCGCATCCGGCATTTCACA GCA	
CgTorAGFP-for	GGCCTGCAGAAGGAGATATAGATATGA ACAATAACGATCTCTTTCAGGCATC	Konstruktion des <i>torA-gfp</i> Fusionsgens für <i>C. glutamicum</i>
CgTorAGFP-rev	CAGGAATTCATTATTTGTAGAGCTCATC CATGCCATG	
MalECg-for	TTCGTCGACAAGGAGATATAGATATGAA AATAAAAACAGGTGCACGC	Konstruktion des authentischen <i>malE</i> -Gens für <i>C. glutamicum</i>
MalECg-rev	TTCGGATCCTTACTTGGTGATACGAGTC TGCG	

PhoDss(Cg)-for: CgTorAGFP-rev	GAGCTGCAGAAGGAGATATAGATATGG CATACGACAGTCGTTTTGATG s. o.	Konstruktion des <i>phoD_{Bs}-gfp</i> Fusionsgen für <i>C. glutamicum</i>
TorAGFPBs-for TorAGFPBs-rev	GATGGTACCGATCTAGAACTAGTGGATC CGCGCATGCTGGAATTCATTATTTGTAG AGCTC	Konstruktion des <i>torA-</i> <i>gfp</i> Fusionsgens für <i>B. subtilis</i>
PhoDss(Bs)-for PhoDss(GFP)- rev GFP(males)-for GFP(UTR)-rev	GAGGTACCATGAGGAGAGAGGGGATCT TGAATG AGTTCTTCTCCTTTACGGAAGTTAGGCG CAGCATTTACTTC s. o.	Konstruktion des <i>phoD_{Bs}-gfp</i> Fusionsgens für <i>B. subtilis</i>
PhoDCg-Bs-for TorAGFPBs-rev	TGGGGTACCATAAGAAGGAAGAAAAT AATGCCACAGTTAAGCAGACGCCAGTTC CGCGCATGCTGGAATTCATTATTTGTAG AGCTC	Konstruktion des <i>phoD_{Cg}-gfp</i> Fusionsgens für <i>B. subtilis</i>
TorA(GFP)Ec- for TorA(UTR)-rev Tor/GFP-for GFP(UTR)-rev	GATAAGCTTGATCTAGAACTAGTGGATC s. o.	Konstruktion des <i>torA-</i> <i>gfp</i> Fusionsgens für <i>E. coli</i>
PhoDCgRBS-for CgTorAGFP-rev	GAGGGTACCAAGGAGATATAGATATGG CATACGACAGTCGTTTTGATG s. o.	Konstruktion des <i>phoD_{Bs}-gfp</i> Fusionsgens für <i>E. coli</i>
ScPhoDBs-for ScPhoDCg-for CgTorAGFP-rev	GGAGCATGCGAAGGGACTGGTTTAATG GCATACGACAGTCGTTTTGATGAATGG GGAGCATGCGAAGGGACTGGTTTAATGC CACAGTTAAGCAGACGCCAGTTC s. o.	Konstruktion der <i>phoD_{Bs}-gfp</i> und <i>phoD_{Cg}-gfp</i> Fusionsgene für <i>S. carnosus</i>

3. Mikrobiologische Methoden

3.1 Kultivierung von Bakterien

3.1.1 Nährmedien

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

10g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl mit Aqua dest. auf 1l auffüllen. Zur Herstellung von festen Nährböden wurden dem Medium zusätzlich 20g Agar pro l zugesetzt. Dieses Medium diente standardmäßig zur Anzucht aller untersuchten Bakterienstämme.

BHIS-Medium

37g Brain Heart Infusion und 91g Sorbitol mit Aqua dest. auf 1l auffüllen. Die Sterilisierung erfolgte durch 15min autoklavieren. Dieses Medium diente standardmäßig zur Anzucht der *C. glutamicum* Stämme und zur Regeneration von *C. glutamicum* nach Elektroporation.

LBHIS-Medium

LBHIS-Medium wurde standardmäßig für die Anzucht und zur Regeneration von *C. glutamicum* nach Elektroporation auf festen Nährböden verwendet.

auf 500ml 45g Sorbitol
2,5g Trypton
2,5g NaCl
1,25g Hefeextrakt
0,25g MgSO₄ x 7H₂O
9,25g BHI
8g Agar
15min autoklavieren

CgXII Minimal-Medium (Keilhauer *et al.*, 1993)

Dieses Medium wird standardmäßig für die Anzucht von *C. glutamicum* in Minimal-Flüssigmedien verwendet.

20g (NH ₄) ₂ SO ₄	<u>Spurensalze:</u> 1gFeSO ₄ x 7H ₂ O
5g Harnstoff	(pro 100ml) 1g MnSO ₄ x H ₂ O
1g KH ₂ PO ₄	0,1g ZnSO ₄ x 7H ₂ O
1g K ₂ HPO ₄	20mg CuSO ₄
0,25g MgSO ₄ x 7H ₂ O	2mg NiCl ₂ x 6H ₂ O
42g MOPS	zum Lösen mit HCl (konz.) ansäuern
1ml CaCl ₂ (1g/100ml)	
1ml Spurensalze	
1ml Biotin (20mg/100ml)	

Auf etwa 800ml mit Aqua dest. auffüllen und mit NaOH auf pH 7.0 einstellen. Anschließend mit Aqua dest. auf 920ml auffüllen und 15min autoklavieren. Zuletzt 80ml 50%ige Glucose und 1ml Protocatechusäure (30mg/ml) steril zuführen.

Phosphatmedium (HPDM und LPDM)

50ml Hulett's Salz	<u>Hulett's Salz</u> : 6,06 g Tris
1250µl 20% Glycerin	(pro l) pH7.1 mit Eisessigsäure einstellen
1250µl 2% Casamino Acids	0,4g Ammoniumsulfat
500µl 1M L-Arginin	2g Natriumcitrat
500µl 100x Tryptophan (2mg/ml)	82mg Eisen(III)-chlorid
	0,22g Mangansulfat
	8,63g Magnesiumsulfat
	1,4mg Zinkchlorid

Für Phosphatmedium mit einer hohen Phosphatkonzentration (HPDM, *high phosphate defined medium*) wurden 420µl 50mM KH_2PO_4 (pH7.0) und für Phosphatmedium mit einer niedrigen Phosphatkonzentration (LPDM, *low phosphate defined medium*) wurden 65µl 50mM KH_2PO_4 (pH7.0) zugesetzt.

Zur Selektion auf Antibiotikaresistenz wurden die entsprechenden Antibiotika in folgender Endkonzentration dem jeweiligen Medium zugefügt:

<u>für <i>B. subtilis</i></u>	
Tetracyclin	(in abs. Ethanol): 15mg/l
<u>für <i>C. glutamicum</i></u>	
Kanamycin	(in Aqua bidest.): 25mg/l
<u>für <i>E. coli</i></u>	
Chloramphenicol	(in abs. Ethanol): 25mg/l
Kanamycin	(in Aqua bidest.): 50mg/l
Ampicillin	(in Aqua bidest.): 100mg/l
<u>für <i>S. carnosus</i></u>	
Chloramphenicol	(in abs. Ethanol): 15mg/l

3.1.2 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung sämtlicher Bakterienstämme erfolgte, soweit nicht anders aufgeführt, in LB-Vollmedium, bzw. für *C. glutamicum* in BHIS-Medium. Die Inkubation der Stämme in Flüssigmedium erfolgte, soweit nicht anders aufgeführt, in einem Volumen von 5ml in Reagenzgläsern bei 170rpm. Die Kultivierung in Flüssigmedium ab einem Volumen von

10ml erfolgte, soweit nicht anders aufgeführt, in Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler bei 130rpm. *C. glutamicum* wurde bei 30°C inkubiert, alle anderen Stämme bei 37°C.

3.2 Wachstumskurven

Die Aufnahme von Wachstumskurven erfolgte in 500ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit einem Kulturvolumen von 100ml. Das Flüssigmedium wurde mit Übernachtskulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und je nach Stamm bei 30°C oder 37°C und 130rpm inkubiert.

3.3 Stammhaltung

Die langfristige Stammhaltung erfolgte in Form von Glycerin-Dauerkulturen. Hierzu wurden 760µl der Übernachtskultur mit 300µl 87% Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Die kurzfristige Aufbewahrung von Stämmen erfolgte zumeist auf LB-Agarplatten bei 4°C.

3.4 Transformation von Bakterien

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

Die Transformation von Plasmid-DNA erfolgte mittels kompetenter Zellen, die nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt wurden. Hierzu wurden 100ml LB-Medium im 500ml Schüttelkolben mit Schikane mit 1ml einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C und 130rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,5 angezogen. Die Zellen wurden nach Erreichen der OD auf Eis gestellt und durch Zentrifugation geerntet (4°C, 4000rpm, 15min). Das Pellet wurde in 30ml eiskalter RF₁-Lösung resuspendiert und mindestens 15min im Eisbad inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 4000rpm, 15min) wurde das Pellet in 4ml RF₂-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 200µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen bei RT aufgetaut und danach für 5min auf Eis gestellt. Es wurden 0,1µg Plasmid-DNA dazugegeben (das Volumen der DNA darf höchstens ¼ des Volumens der kompetenten Zellen betragen) und für 20min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Hitzeschockbehandlung für 1,5min bei 42°C. Anschließend wurden die Zellen 2min auf Eis inkubiert. Zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz wurde der Ansatz nach Zugabe von 800µl LB-Medium bei 37°C und leichtem Schütteln 1h inkubiert. Die Zellen wurden dann auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

RF ₁ : pro l	12g RbCl	RF ₂ : pro l	2,1g MOPS
	9,9g MnCl ₂		1,2g RbCl
	1,5g CaCl ₂ x 2H ₂ O		11g CaCl ₂ x 2H ₂ O
	2,9g Kaliumacetat		121ml Glycerin (87%)
	121ml Glycerin (87%)		pH 5.8 mit 0,2M
	pH 6.8 mit 1M Natronlauge		Essigsäure eingestellt
	eingestellt		

3.4.2 Transformation von *B. subtilis* Stämmen (Sadaie und Kada, 1983)

Die Transformation von *B. subtilis* erfolgte über natürliche Kompetenz. Sämtliche verwendeten Gefäße wurden vor Gebrauch mit Aqua bidest autoklaviert. In einem 100ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurden 10ml SPI-Medium mit Zellen aus einer *B. subtilis* Übernachtskultur, welche in LB-Medium angezogen wurden, zu einer OD₆₀₀ von 0,1 beimpft. Die Zellen wurden bei 37°C und 160rpm im Schüttler inkubiert. Beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase wurden 1ml der Zellsuspension in einen 100ml Erlenmeyerkolben übertragen, mit 10µl EGTA (0,1 M) versetzt und 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurde den Zellen 1µg bis 10µg Plasmid-DNA zugesetzt und die Kultur 1h bei 37°C mit 110rpm geschüttelt. Zur Ausprägung der plasmidkodierten Antibiotikaresistenz wurden 1ml LB-Medium (+ 0.5% Glucose) zum Transformationsansatz zugegeben und die Stämme ein bis zwei Stunden bei 37°C mit 160rpm geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend in 15ml Falcon-Röhrchen 10min mit 5000rpm bei 4°C abzentrifugiert, in 100µl LB-Medium resuspendiert, auf Selektionsagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4x SP: pro l	8g (NH ₄) ₂ SO ₄	1xSP: pro l	250ml 4xSP
	24g KH ₂ PO ₄		0,5mM CaCl ₂
	56g K ₂ HPO ₄		2,5mM MgCl ₂
	4g Na ₃ Citrat x 7H ₂ O		50µg/ml Tryptophan
	0,8g MgSO ₄ x 7H ₂ O		50µg/ml Histidin
	4g Hefeextrakt		0,5% Glucose
	0,8 g Casamino Acids		ad 1l Aqua bidest
	pH 7.2 mit NaOH eingestellt		sterilfiltrieren

3.4.3 Transformation von *C. glutamicum* Stämmen

Zur Transformation von *C. glutamicum* wurde die Methode der Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock angewandt (Tauch *et al.*, 2002). Dazu wurden 50ml BHIS-Medium mit einer Einzelkolonie von *C. glutamicum* angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 5ml dieser Vorkultur in 250ml BHIS-Medium überimpft (1l Kolben mit Schikanen) und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen in zwei JA-10 Zentrifugenbecher überführt und durch Zentrifugation geerntet (20min, 6000rpm, 4°C). Die Zellen wurden nachfolgend

dreimal mit 20ml eiskaltem TG-Puffer (1mM Tris pH 7.5, 10% Glycerin) und weitere zweimal mit 50ml eiskaltem 10 %igem (v/v) Glycerin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1ml eiskaltem 10 %igem (v/v) Glycerin resuspendiert, in Aliquots von 100µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -70 °C gelagert. Zur Elektroporation wurden 50µl Zellen mit der zu transformierenden DNA gemischt und luftblasenfrei in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (Typ 16 S 2086, Biorad, München) überführt. Der Ansatz wurde mit 0,8ml 10 %igem (v/v) Glycerin überschichtet. Die Elektroporation wurde dann bei einer Spannung von 2,5kV, einem Parallelwiderstand von 200Ω und einer Kondensatorkapazität von 25µF in einem BIORAD GENE PULSER™ (Biorad, München) durchgeführt. Sofort nach Beendigung des elektrischen Pulses wurde die Zellsuspension in 4ml BHIS-Medium aufgenommen, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 6min bei 46°C inkubiert. Dieser Hitzeschock inaktiviert vermutlich das Restriktionssystem von *C. glutamicum*, so daß bei Verwendung heterologer DNA eine höhere Transformationseffizienz erreicht werden kann (Schafer *et al.*, 1994). Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen für 90min bei 30°C unter Schütteln regeneriert, bevor die Zellsuspension auf LBHIS-Selektionsagarplatten ausplattiert wurde.

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

Die Transformation von Plasmid-DNA in *S. carnosus* erfolgte über Protoplasten. Hierzu wurde der jeweilige Stamm in 500ml PH-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (6700rpm, 15min, 4°C) geerntet. Das Pellet wurde anschließend in 30ml SMMP-Lösung resuspendiert, in einen sterilen 100ml Erlenmeyerkolben überführt und mit 30µl 1mg/ml Lysostaphin versetzt und 16-18h bei 30°C stehend inkubiert. Die so hergestellten Protoplasten wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet (25min, 7600rpm, RT) und in 5ml SMMP gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Protoplasten in 2,1ml SMMP aufgenommen, in 300µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -75°C gelagert. Für die Transformation wurden die Protoplasten auf Eis aufgetaut und je Aliquot mit 1-2µg DNA versetzt. Nach Zugabe von 2ml 40 %iger PEG/SMM-Lösung und einer Inkubation von 2min bei RT wurden 7ml SMMP-Lösung zugesetzt, die Protoplastensuspension sanft vermischt und anschließend 15min bei 7600rpm, RT zentrifugiert. Die geernteten Protoplasten wurden in 250µl SMMP resuspendiert, auf DM3 Platten ausplattiert und für 4,5h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die DM3-Platten mit 3ml CY-Softagar (50°C), der das gewünschte Antibiotikum in 10-facher Konzentration enthielt, überschichtet und für 2-4 Tage bei 37°C inkubiert.

PH-Medium: 10g Bacto-Pepton
(pro l) 5g Hefeextrakt
5g NaCl
1g Glucose
1g K₂HPO₄

4x PAB:

7% (w/v) Difco
Antibiotic Medium No. 4

40% PEG/SMM Lsg.: 40g PEG 6000 in 50ml
2x SMM
ad 100ml Aqua dest.

<u>2x SMM:</u> (pro l)	1M Saccharose 40mM Maleinsäure 40mM MgCl ₂ pH6.5 mit NaOH eingestellt	<u>CY-Medium:</u> (pro l)	25g Hefeextrakt 25g Casamino Acids 14,75g NaCl 8g Agar
---------------------------	---	------------------------------	---

alle Lösungen 15min autoklavieren

SMMP-Lsg. (50ml): 25ml 2x SMM, 9,5ml 4x PAB und 2,5ml 5% BSA (sterilfiltriert)

CY-Softagar: 25ml CY-Medium (frisch aufgekocht und auf 50°C abgekühlt), 25ml 1M Na-Succinat (50°C), 2ml 1,5M Na-Glycerophosphat, 1ml 1M MgCl, 0,5ml Glucose (50%) und 0,5ml BSA (5%)

DM3-Medium: Die folgenden Lösungen wurden einzeln angesetzt und autoklaviert: 500ml 1M Na-Succinat pH7.3 (mit Bernsteinsäure eingestellt), 200ml 5% Agar, je 150ml 3,3% Casamino Acids und Hefeextrakt und je 100ml 3,5% K₂HPO₄ und 1,5% KH₂PO₄. Nach dem Autoklavieren wurden die Lösungen steril zusammengeführt und mit 20ml MgCl₂, 10ml 50% (w/v) Glucose und 10ml 5% (w/v) BSA versetzt.

4. Molekularbiologische Methoden

4.1 Isolierung von Plasmid-DNA und chromosomaler DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden), welches auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen beruht (Birnboim und Doly, 1979). Um Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* zu isolieren, wurde eine modifizierte Form der alkalischen Lyse verwendet (Schwarzer und Pühler, 1991). Auch hier erfolgte die Isolierung von Plasmid-DNA nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Allerdings ist bei *C. glutamicum* aufgrund der besonders stabilen Zellwand zur effektiven Lyse der Bakterienzellen eine vorhergehende Behandlung der Zellen mit Lysozym (15 mg/ml) von 1 bis 2h erforderlich. Das gleiche gilt für die Plasmidpräparation aus *B. subtilis*, bei der 10mg/ml Lysozym eingesetzt werden und 30min bei 37°C inkubiert werden. Zur Lyse von *S. carnosus* Zellen wurde dem Lysepuffer P1 10µl Lysostaphin (1mg/ml) anstelle von Lysozym zugegeben.

Für die Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA (Maxiprep) wurde das ‚Nucleobond AX500‘ Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Protokoll verwendet.

Die Isolierung chromosomaler DNA erfolgte mit dem *DNeasy Tissue Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

4.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

4.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Der Verdau von DNA erfolgte in den vom Enzymhersteller (Firmen MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot und Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) mitgelieferten Puffern und nach Vorschrift des Herstellers.

4.2.2 Entsalzen von DNA

Zur Entsalzung von DNA, z.B. nach Restriktionsverdau oder PCR, wurde das ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘ nach der Vorschrift ‚QIAquick PCR Purification Kit Protocol‘ verwendet (Qiagen, Hilden).

4.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Agarosegelen erfolgte bei DNA-Fragmenten mit einer Größe von 400bp bis über 5kb über das ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘ nach Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden). Fragmente mit einer geringeren Größe wurden mit dem ‚MiniElute Gel Extraction Kit‘ nach Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden) aus Agarosegelen isoliert.

4.2.4 Fällung und Aufkonzentrierung von Plasmid-DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Fällung von DNA mit 2fachem Volumen absolutem Ethanol und 1/10 Volumen 4M Natriumacetat pH 4.8 bei -20°C über Nacht. Anschließend wurde die Lösung 15min bei 13.000rpm (Eppendorf Zentrifuge, 4°C) zentrifugiert, das Pellet mit 1ml Ethanol (70%) gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 20 - 50 μl Aqua dest. aufgenommen.

4.2.5 Agarose Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese. Die Agarosekonzentration lag zwischen 0,8 und 1%, je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente (je größer das Fragment, desto niedriger die Konzentration). Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen 5x Probenpuffer versetzt und die Elektrophorese in 1x TAE Puffer bei 100V durchgeführt. Das Gel wurde zur Visualisierung der DNA-Banden 10min in wässriger Ethidiumbromidlösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gefärbt und 5 bis 10min in Wasser entfärbt.

50x TAE-Puffer: pro l 242g Trizima Base (Sigma)
7,44g EDTA/Na₂ (Titriplex III, Merck)
pH 8,0 mit Essigsäure (96%)

5x Probenpuffer: 0,1% Bromphenolblau
30% Glycerin

4.2.6 Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Zur Verhinderung von Religationen der linearisierten Vektoren wurden vor der Ligation die 5'-Phosphatreste mit alkalischer Phosphatase entfernt. Hierzu wurde der linearisierte Vektor nach Isolierung aus dem Agarosegel (DNA in 30µl EB-Puffer aus dem ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘) mit 1,5 Einheiten ‚Shrimp alkaline phosphatase‘ und 3,3µl 10x SAP-Puffer (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) versetzt und für 30min (überhängende Enden) oder für 1h (glatte Enden) bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wurde anschließend durch eine 15-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert.

4.2.7 Umwandlung von überhängenden 5'-Enden in glatte Enden

Zum Auffüllen von überhängenden 5'-Enden wurde die ‚Klenow‘ - DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) benutzt. Bis zu 300ng DNA wurden mit 1/10 Volumen Nick Translationspuffer, 1/10 Volumen dNTP-Mix (2mM) und 1µl ‚Klenow‘ - Enzym (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) versetzt und 30min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Hitze inaktiviert (10min bei 70°C) und die DNA mit Hilfe des ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘ nach Vorschrift ‚QIAquick PCR Purification Kit Protocol‘ gereinigt.

Nick Translationspuffer: 500mM Tris/HCl, pH7,5
1mM DTT
0,1M MgSO₄
500µl/ml BSA

4.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden mit dem ‚Rapid DNA ligation Kit‘ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Ligationsansatz wurde ein molares Verhältnis von Fragment zu Vektor von 3:1 eingestellt, wobei ca. 30 ng Vektor-DNA eingesetzt wurde. Die geschnittene Vektor-DNA wurde vor Einsatz in die Ligation immer über ein Agarosegel von unvollständig verdauter Vektor-DNA getrennt und dephosphoryliert.

4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988). Hierzu wurden zwei komplementäre, konvergierende Oligonukleotide (Primer) verwendet, die das zu amplifizierende Fragment flankieren. Die PCR-Reaktion wurde mit Hilfe der ‚PWO‘ - DNA-Polymerase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50µl durchgeführt, wobei als ‚template‘-DNA zwischen 1 und 20ng Plasmid-DNA eingesetzt wurde. Die Reaktion wurde im T3 Thermocycler von Biometra® durchgeführt. Hierbei wurde der erste Programm-Zyklus 10 mal, der zweite 15 mal mit einer Verlängerung der Elongationszeit von 5s/Zyklus wiederholt. Der PCR Produkt wurde über ein Agarosegel von Nebenprodukten getrennt und aufgereinigt (siehe II. 4.2.3. und II. 4.2.4).

Die Temperatur für das ‚Primer Annealing‘ errechnet sich nach folgender Formel:

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

4.4 Nicht-radioaktive DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode

Wie bei der klassischen radioaktiven Sequenziertechnik (Sanger *et al.*, 1977) wird auch bei dieser Methode der Abbruch der DNA-Polymerasereaktion beim Einbau von Didesoxynukleotiden genutzt. Hierzu wurden Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide als Primer (MWG Biotech) und zirkuläre Plasmid-DNA als Matrize verwendet. Die Sequenzierung wurde mit der LI-COR Apparatur der Firma MWG-Biotech nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Sequenzreaktion wurde das ‚Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit‘ (Amersham Pharmacia Biotech, England) verwendet. Die PCR-Reaktion wurde im T3 Thermocycler von Biometra® nach folgendem Protokoll durchgeführt:

30x: 1. 95°C 3min; 2. 95°C 15s; 3. 55°C 30s; 4. 70°C 40s, gehe zu 2

15x: 5. 95°C 20s; 6. 70°C 30s; gehe zu 5.

Die Reaktion wurde durch Zusatz von 3µl ‚stop solution‘ und 3-minütiges Erhitzen bei 95°C gestoppt. Die DNA-Fragmente wurden in einem 4,6%igem, 66cm langen und 0,25mm dicken ‚Long-Ranger‘ Polyacrylamidgel in 1x TBE Laufpuffer aufgetrennt. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Gel im Vorlauf für ca. 10min auf 45°C vortemperierte. Es wurden jeweils 1,5µl Probe auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte über Nacht bei 47mA, 50W, 2200V und einer Temperatur von 45°C. Die Fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente wurden mit der Software ‚Base ImageIR™‘ (Begleitsoftware zur Apparatur LI-COR) erfaßt und ausgewertet.

<u>Sequenzgel (12,5%):</u>	pro 38ml
	4,6ml Acrylamid (Long Ranger)
	21g Harnstoff
	5ml 10x TBE-Puffer (Long Run)
	32ml Aqua dest.
	60µl TEMED
	350µl 10% APS
<u>10x TBE-Puffer:</u>	162g Tris
(pro l)	27,5g Borsäure
	9,3g EDTA

4.5 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.

4.5.1 Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde

Die Digoxigenin-markierte DNA-Sonde wurde mittels PCR-Reaktion (s. 4.3) hergestellt. Dazu wurde der zur DNA-DNA-Hybridisierung ausgewählte DNA-Bereich mit geeigneten Primern unter Zusatz von 20µM 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.

4.5.2 Hybridisierung von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA

Transfer der DNA auf Nylonmembranen

Die mit Restriktionsenzymen verdaute DNA (4-15µg 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 60min nacheinander mit Depurinierungslösung (0,25M HCl), Denaturierungslösung (1,5M NaCl, 0,5M 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: 1200mJ) 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 4h bei 68°C in Prähybridisierungslösung (5x SSC, 0,1% N-Laurylsarkosinat, 0,02% SDS, 0,5% Blocking Reagenz [Roche]). Zur Hybridisierung wurde die Membran in Hybridisierungslösung (wie Prähybridisierungslösung mit 5 -10ng DNA-Sonde pro ml) über Nacht bei 42°C inkubiert. Die Sonde wurde vor der Zugabe in die Hybridisierungslösung für 10min bei 95°C denaturiert und in Eiswasser abgekühlt.

Nachweis der Sonde

Um ungebundene Sonden zu entfernen, wurden die Membranen zweimal für 10min bei RT in 2x SSC, 0,1% SDS und zweimal für 25min bei 68°C mit 0,1x SSC, 0,1% SDS gewaschen. Zur Vermeidung der unspezifischen Bindung des Antikörperkonjugates (s. u.) wurden die Membranen kurz in Puffer 1 (100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, pH 7.5) äquilibriert und für 60min in Blocking-Puffer (Puffer 1 mit 1% Blocking Reagenz) im Hybridisierungssofen 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 weitere 30min 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 (100mM Tris/HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂) wurden die Membranen mit 10µl CSPD[®] in 1,5ml 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 12min und für 1h.

20x SSC: 175,5g NaCl, 88,23g Na₃-Citrat x 2H₂O pro l

5. Proteinchemische Methoden

5.1 Induktion der Genexpression

2ml Zellen einer 5ml Übernachtskultur wurden 10min bei 13.000rpm (Eppendorf Zentrifuge, RT) abzentrifugiert und zweimal mit dem Medium gewaschen, indem die anschließende Induktion stattfinden soll. Mit der gewaschenen Kultur wurden 5ml Induktionsmedium (mit den experimentell erforderlichen Antibiotika bzw. weiteren Supplementen versetzt) angeimpft. Zur gerichteten Induktion der Expression von Genen, welche unter der Kontrolle regulierbarer Promotoren stand, wurde den Kulturen der geeignete Induktor in der experimentell erforderlichen Konzentration zugesetzt. Da in *S. carnosus* und *B. subtilis* die Expression der Gene auf dem *S. carnosus* pXR100-Vektor, bzw. auf dem *B. subtilis* pWH1520-Vektor durch einen Xylose-regulierbaren Promotor gesteuert werden, wurde zur Induktion 0,5% Xylose zugesetzt. In *C. glutamicum* erfolgt die Induktion der Genexpression auf dem pEKEx2-Vektor durch Zugabe von 1mM IPTG, da die Expression durch einen *tac*-

Promotor gesteuert wird. Die Kulturen wurden 4h bei der experimentell erforderlichen Temperatur inkubiert.

5.2 Isolierung von Proteinen aus Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen

5.2.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten von *E. coli*

Für den Zellaufschluß wurden 2ml Kultur für 10min bei 13000rpm zentrifugiert und das Pellet in 1ml 30mM Tris/HCl pH8 aufgenommen. Anschließend wurden Glaskugeln (0.1-0.25mm, Fa. Clauss, Nidderau) dazugegeben und die Zellen 10min bei maximaler Schüttelfrequenz in der Retschmühle aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden 10min bei 13000rpm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit einer geeigneten Menge 2x Probenpuffer nach Lämmli versetzt und 10min bei 95 °C erhitzt.

5.2.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten von *B. subtilis* und *S. carnosus*

2ml der Kultur wurden 10min bei 13000rpm abzentrifugiert und das Pellet in 100µl Lysepuffer (10mM Tris/HCl pH 8.0; 25mM MgCl₂; 200mM NaCl) resuspendiert. Für den Aufschluß von *B. subtilis* wurde dem Lysepuffer 5mg/ml Lysozym zugefügt, für den Aufschluß von *S. carnosus* 20µl Lysostaphin (1mg/ml). Der Ansatz wurde 30min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 100µl 2x Probenpuffer nach Lämmli versetzt und 10min bei 95°C erhitzt.

5.2.3 Herstellung von Gesamtzellextrakten von *C. glutamicum*

2ml der Kultur wurden 10min bei 13000rpm abzentrifugiert und das Pellet in 100µl Lysepuffer (10mM Tris/HCl pH 8,0; 25mM MgCl₂; 200mM NaCl) plus 15mg/ml Lysozym resuspendiert. Der Ansatz wurde 2h bei 37°C bei 250rpm inkubiert und anschließend im Branson Sonifier 250 bei 20% Amplitude und Stufe 2 mittels Ultraschall komplett aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden 30min bei 15300rpm abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 100µl 2x Probenpuffer nach Lämmli versetzt und 10min bei 95 °C erhitzt.

5.2.4 Aufarbeitung von Kulturüberständen von *B. subtilis*, *C. glutamicum* und *S. carnosus*

Die Zellen wurden durch Zentrifugation vom Kulturüberstand getrennt und die im Überstand befindlichen Proteine mit 10% TCA über Nacht bei 4°C gefällt. Das Präzipitat wurde nach Zentrifugation jeweils ein Mal mit 500µl 100% Aceton und 500µl 80% Aceton gewaschen und bei RT oder in der Speed-Vac getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 60µl 2x Probenpuffer nach Lämmli resuspendiert und für 10min bei 95°C erhitzt.

5.3 Fraktionierung von *B. subtilis* in Protoplasten und Zellwand

Für die Fraktionierung von *B. subtilis* wurden 10ml Kultur in 100ml Kolben 4h bei 37°C inkubiert. Es wurde soviel an Volumen der 10ml-Kultur in ein 50ml Falcon-Röhrchen überführt, daß die Gesamt-OD der überführten Kultur im 50ml Falcon-Röhrchen 4 betrug. Die Zellen wurden anschließend 10min bei 5000rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1,9ml SMMP-Lösung (siehe 3.4.4) aufgenommen, mit 100µl Lysozymbilösung (20mg/ml frisch in SMMP gelöst) versetzt und 2h im Wasserbad leicht schwenkend inkubiert. Die Protoplastierung der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Zellsuspension wurde dann 10min bei 15300rpm zentrifugiert, um das Zellwandkompartiment (Überstand) von den protoplastierten Zellen (Pellet) zu trennen. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 10% TCA bei 4°C über Nacht gefällt. Das Pellet wurde mit 500µl SMMP gewaschen und schließlich in 500µl 50mM Tris/HCl pH 7.5 resuspendiert und ebenfalls mit 10% TCA bei 4°C über Nacht gefällt. Anschließend wurden die Proben 10min bei 15300rpm zentrifugiert und jeweils ein Mal mit 500µl 100% Aceton und 80% Aceton gewaschen. Das Präzipitat wurde bei RT getrocknet und in 85µl 2x Probenpuffer nach Lämmli aufgenommen und 10min bei 95°C erhitzt.

5.4 Fraktionierung von *S. carnosus* in Protoplasten und Zellwand

Für die Fraktionierung von *S. carnosus* wurden 2ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 4 für 2min bei 13000rpm zentrifugiert und der Kulturüberstand entfernt. Das Pellet wurde in 96µl SMM-Lösung (500mM Sucrose, 20mM Maleinsäure, MgCl₂ (Navarre *et al.*, 1996) resuspendiert, mit 4µl Lysostaphin (5mg/ml in SMM gelöst) versetzt und 45min bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann 10min bei 15300rpm zentrifugiert, um das Zellwandkompartiment (Überstand) von den protoplastierten Zellen (Pellet) zu trennen. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 10% TCA bei 4°C über Nacht gefällt. Das Pellet wurde mit 500µl SMM gewaschen und schließlich in 500µl 50mM Tris/HCl pH 7.5 resuspendiert und ebenfalls mit 10% TCA bei 4°C über Nacht gefällt. Anschließend wurden die Proben 10min bei 15300rpm zentrifugiert und jeweils 1x mit 500µl 100% Aceton und 80% Aceton gewaschen. Das Präzipitat wurde bei RT getrocknet und in 85µl 2x Probenpuffer nach Lämmli aufgenommen und 10min bei 95°C erhitzt.

5.5 Extraktion von Proteinen aus der Zellwand von *C. glutamicum* (Peyret *et al.*, 1993)

Eine 5ml Kultur wurde 4h bei 30°C unter induzierenden Bedingungen (1mM IPTG) inkubiert und anschließend 2ml entnommen und 10min bei 13.500rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in [OD₆₀₀ x 100]µl 50mM Tris/HCl (pH 6.8) und 2% SDS aufgenommen. Zur Extraktion der Proteine aus der Zellwand wurde die Suspension 5min bei 100°C inkubiert, anschließend 10min bei 13.500rpm abzentrifugiert. Aufgrund der relativ geringen SDS-Konzentration und der kurzen Inkubationszeit bleiben die Spheroplasten intakt. Der Überstand, der die extrahierten Proteine aus der Zellwand enthält, wurde abgenommen und die Proteine wurden über Nacht mit 10% TCA gefällt. Anschließend wurden die Proben

10min bei 15300rpm zentrifugiert und jeweils 1x mit 500µl 100% Aceton und 80% Aceton gewaschen. Das Präzipitat wurde bei RT getrocknet und in 50µl 2x Probenpuffer nach Lämli aufgenommen.

5.6 Osmotischer Schock mit *E. coli*

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

Die Zellen wurden in 5ml LB-Medium über Nacht bei 37°C angezogen. 700µl der Kultur wurden in 50ml LB-Medium im Schüttelkolben pipettiert und bei 37°C für 2 bis 3 Stunden geschüttelt. Sobald die Kultur eine OD₆₀₀ von 1,1 – 2 erreicht hatte, wurde soviel der Kultur in ein 50ml Falcon-Röhrchen überführt, daß die Gesamt-OD 55 betrug. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10min, 5000rpm) und in 2,5ml 30mM Tris/HCl pH 8.0 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (siehe oben) wurde der Überstand sorgfältig abpipettiert, das Pellet in 40µl Sucroslösung resuspendiert (Vortex) und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden 20µl Lysozymlösung dazugegeben, kurz ‚gevortext‘ und sofort für 4min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (15min, 13000, 4°C) wurde der Überstand (Periplasmafraktion) in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Das Pellet (Spheroplasten) wird vorsichtig mit 80µl Sucroslösung abgespült und in 1ml 30mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert. Nach Zugabe von Glaskugeln (Ø 0,1 - 0,25mm, Fa. Clauss, Nidderau) wurden die Spheroplasten 10min bei maximaler Schüttelfrequenz in der Retschmühle aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert (10min, 13000rpm). Der Überstand (Cytoplasma-/Membranfraktion) wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von (Bradford, 1976) bestimmt. Die Cytoplasma-/Membran-, sowie die Periplasmafraktion wurden in 2x Probenpuffer nach Lämli aufgenommen.

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

Die zelluläre Lokalisierung von Proteinen, die in *S. carnosus* exprimiert wurden, wurde durch die Behandlung von protoplastierten Zellen mit Proteinase K untersucht. Hierzu wurden jeweils 2ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 4 in einem Volumen von 100µl wie unter II.5.4 beschrieben protoplastiert, eine Entfernung des Zellwandkompartimentes fand jedoch nicht statt. Anschließend wurde ein Aliquot der Suspension mit 10µl Proteinase K (500µg/ml Proteinase K in SMM gelöst (500mM Sucrose, 20mM Maleinsäure, MgCl₂ (Navarre *et al.*, 1996)) versetzt und 20min auf Eis inkubiert, ein zweites Aliquot wurde mit 5% Triton X-100 (20%ige Stammlösung) aufgeschlossen und dann mit 12,5µl Proteinase K (500µg/ml Proteinase K in SMM gelöst versetzt und 20min auf Eis inkubiert. Ein drittes Aliquot wurde für die Zeit des Verdau ebenfalls auf Eis gestellt. Alle Proben wurden mit 10% TCA über Nacht gefällt. Anschließend wurden die gefällten Proteine jeweils einmal mit 100% und mit

80% Aceton gewaschen, bei RT getrocknet und in 2x Probenpuffer nach Lämmli aufgenommen.

5.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Lämmli, 1970)

Proteine wurden nach ihrer molekularen Masse in 12,5%igen Polyacrylamidgelen nach der Standardmethode von Lämmli (1970) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Auftragen wurden die Proteine mit Probenpuffer versetzt und zur Denaturierung 5min bei 95°C inkubiert. Als Eichstandards wurde der ‚Prestained Protein Marker Broad Range‘ (New England Biolabs, Frankfurt/Main) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 10mA pro Gel (200V) in 1x Laufpuffer über Nacht durchgeführt. Bei Verwendung von Minigelen von Biometra® wurde die Elektrophorese bei 20mA für 1 bis 2 Stunden durchgeführt.

10x Laufpuffer: 144g Glycin
(pro l) 30g Tris
15g SDS

5x SDS-Probenpuffer: 300mM Tris/HCl pH 6,8
20% 2-Mercaptoethanol
10% SDS
0,1% Bromphenolblau
10% Glycerin

Trenngel (12,5%): pro 55ml
22,9ml Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8; Roth)
13,8ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
0,37ml 15% SDS
5,95ml 87% Glycerin
37µl TEMED
0,55ml 10% APS

Sammelgel (6,5%): pro 12,5ml:
2,7ml Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)
1,5ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
125µl 15% SDS
8µl TEMED
25µl 10%APS

5.9 Western Blot

Der immunologische Nachweis einzelner Proteine erfolgte nach der Methode von Towbin *et al.* (1979). Die über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden im Elektrolotverfahren unter Verwendung einer Mini Trans-Blot™ Kammer (Biorad, München) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Millipore, Schwalbach) übertragen. Der Blot erfolgte dabei in Tris/Glycin Puffer (25mM Tris/HCl pH 8, 192mM Glycin) bei 100V für

1h. Nach Transfer der Proteine wurde die PVDF-Membran zur Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen 1h bei 37°C in Lösung I geschüttelt. Anschließend wurde die Membran mit spezifischen Antikörpern 1h bei 37°C inkubiert. Die Antikörper wurden dazu 1:1000 (Verdünnung für GFP-Antiserum 1:2000) in Lösung II verdünnt. Nach einmaligem Waschen mit Lösung II (30min) wurde die Membran 1h bei 37°C mit an alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörpern inkubiert. Hierzu wurde entweder Anti-Rabbit IgG 1:15000, Anti-Mouse IgG 1:15000 oder Anti-Guinea Pig 1:30000 in Lösung II verdünnt. Überschüssige Antikörper wurden durch einmaliges Waschen mit Lösung II (30min) entfernt. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte durch eine etwa 5-minütige Inkubation der Membran in AP-Puffer. Die Detektions-Reaktion wurde mit 3 %iger TCA-Lösung gestoppt.

Lösung I: pro 100ml
 5g Milchpulver
 1ml 1M Tris/HCl pH 7,5
 7ml 10% NaCl
 92ml Aqua dest.

Lösung II: pro 200ml:
 1g Milchpulver
 2ml 1M Tris/HCl pH 7,5
 20µl Tween 20
 18ml 10% NaCl
 179,98ml Aqua dest

AP-Puffer: 100mM Tris/HCl pH 9,5
 100mM NaCl
 25mM MgCl₂

Als alternative Methode wurde das ‚ECL Western Blotting‘-System von Amersham Biosciences (Freiburg) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der sekundäre Antikörper ist hierbei an ‚horseradish peroxidase‘ (HRP) konjugiert, die Detektion erfolgt über Chemolumineszenz. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe einer CCD-Kamera dokumentiert, die Bilder mit Hilfe des Programms AIDA 2.41 (raytest) analysiert, das eine Quantifizierung der Chemolumineszenz-Signale ermöglicht.

Verwendete polyklonale Antikörper:

- Anti-CGTase *S. carnosus* (Eurogentec)
- Anti-GFP *Aquorea victoria* (JL-8, BD Biosciences Clontech)
- Anti-MalE *E. coli* (Dr. K. L. Schimz)
- Anti-MtrA *C. glutamicum* (BioGenes)
- Anti-SecA *B. subtilis* (Dr. K. L. Schimz)
- Anti-SecA *S. carnosus* (Dr. K. L. Schimz)
- Anti-SufI *E. coli* (Dr. K. L. Schimz)
- Anti-TalB *E. coli* (gereinigtes TalB Protein: Ulrich Schörken; Antikörper: Eurogentec)

5.10 MALDI-TOF Massenspektroskopie

Für Peptidmassen-, „Fingerprint“-Analysen wurden die Proteinbanden in Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen herausgeschnitten und mit Trypsin verdaut (Fountoulakis und Langen, 1997). Die Proteinbanden wurden nach 2x 10min Waschen mit 350µl 0,1M Ammoniumbicarbonat in 30% (v/v) Acetonitril (ACN) für 20min in einer Vakuumentrifuge getrocknet und anschließend mit 1µl 3mM Tris/HCl-Puffer (pH8,8) mit 10ng/µl Trypsin (Promega) rehydratisiert. Nach 20min wurden weitere 2µl 3mM Tris/HCl (pH8.8) ohne Trypsin zugegeben und die Proben bei 37°C über Nacht verdaut. Die Peptide wurden durch Zugabe von 6µl Wasser, 15min Inkubation, Zugabe von 5µl 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in 30% (v/v) ACN und nochmals 10min Inkubation aus den SDS-Polyacrylamidgel-Resten eluiert. Zum tryptischen Verdau von Proteinen in Lösung wurde die Proteinprobe durch Ultrafiltration (je nach Größe Microcon-30 oder -100) eingengt, in 10µl 3mM Tris/HCl (pH8.8) mit 10 ng/µl Trypsin aufgenommen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5µl 0,1% (v/v) TFA in 30% (v/v) ACN zugegeben. 0,5µl der erhaltenen Peptidlösung wurden auf einer Probenplatte mit 0,5µl einer gesättigten Lösung von α -Cyano-4-hydroxy-trans-Zimtsäure in 50 % (v/v) ACN, 0,25 % (v/v) TFA gemischt. Eine externe Kalibrierung erfolgte für jede Probe mit Hilfe der Calibration Mixtures 1 und 2 des „Sequazyme Peptide Mass Standard Kits“ (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Proben wurden in einer Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems) im positiven Reflektor-Modus mit 20kV Beschleunigungsspannung, 63% Gitterspannung und einer Verzögerungszeit von 125ns analysiert. Zur Steuerung des Geräts und zur Datenanalyse wurden die Voyager Control Panel Software 5.0 und die Voyager Data Explorer Software 3.5 (Applied Biosystems) verwendet. Die erhaltenen Peptidmassen wurden zur Suche in einer lokalen Datenbank mit 3312 *C. glutamicum*-Proteinen (Degussa) mit Hilfe der GPMW-Software 4.0 (Lighthouse Data) oder dem MS-Fit-Programm (Clauser *et al.*, 1999) genutzt. Eine sichere Identifizierung wurde angenommen, wenn mindestens vier Peptidmassen mit den vorhergesagten Massen übereinstimmten, wobei die Unterschiede zwischen gemessener und theoretischer Masse maximal 100ppm betragen durften, und die Fehler der einzelnen Peptide einem Muster folgten, das auf eine ungenaue Kalibrierung zurückgeführt werden konnte. Wenn die Anzahl der zugeordneten Peptide für eine sichere Identifizierung des Proteins nicht ausreichend war, wurde versucht, einzelne dominante Peptide einer PSD-Analyse („Post Source Decay“) zu unterziehen. Peptide im Bereich zwischen 1 und 4kDa wurden über einen „precursor ion selector“ (Fensterbreite ± 10 Da) isoliert und die Fragmentierung durch hohe Laserenergie induziert. Die Fragmentmassenspektren wurden in 12 Segmenten mit unterschiedlichen Verhältnissen von Beschleunigungs- zu Reflektorspannung aufgenommen („decrement ratio“ 0,75). Die Geräteparameter waren wie oben beschrieben, außer daß die Gitterspannung auf 75% und die Verzögerungszeit auf 150ns eingestellt wurden. Eine Kalibrierung erfolgte über die Aufnahme eines Fragmentmassenspektrums von Angiotensin. Die erwartete Aminosäuresequenz des analysierten Peptids wurde mit den erhaltenen Fragmentmassen mit dem „Ion Fragmentation Calculator“ der Voyager Data Explorer Software verglichen.

5.11 Detektion und Quantifizierung von GFP-Fluoreszenz

Die in dieser Arbeit verwendete Variante des Grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) von *Aequorea victoria* trägt die Bezeichnung GFP_{uv} und kann zusätzlich zum wildtypischen GFP auch durch UV-Licht angeregt werden. Die maximale Absorption von GFP liegt bei einer Wellenlänge von 395nm, der typische Emissionspeak von GFP liegt bei 509nm, gefolgt von einer sogenannten „Peak-Schulter“ bei 540nm.

Zur Detektion der GFP-Fluoreszenz wurden 1ml Kulturüberstand bzw. Gesamtzellfraktion in 1ml Plastikkuvetten gegeben und mit Licht der Wellenlänge 366nm aus einer normalen UV-Lampe bestrahlt. Die Fluoreszenz wurde dabei mit einer Digitalkamera aufgenommen. Die Kulturüberstände wurden nach Abzentrifugation der Zellen unbehandelt zur Fluoreszenzmessung verwendet. Gegebenenfalls wurden jedoch die Proteine des Kulturüberstands aufkonzentriert. Dazu wurden Amicon „Ultra Centrifugalfilter Devices“ Ultra-15 Säulen von Millipore nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Herstellung der Gesamtzellfraktionen erfolgte je nach verwendetem Organismus nach II.5.2.2 oder 5.2.3, jedoch erfolgte weder eine Zugabe von Probenpuffer noch ein Aufkochen der Proben.

Die Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz im Kulturüberstand wurde mit dem Fluoreszenzspektrometer QM/4 der Firma Photon Technology International (PTI) durchgeführt. Hierbei wurde die Fluoreszenz aus 1ml (gegebenenfalls aufkonzentriertem) Kulturüberstand in 1ml Glasküvetten gemessen. Die Anregung von GFP erfolgte mit Licht der Wellenlänge 385nm, das Emissionsspektrum wurde im Wellenlängenbereich von 400 bis 650nm aufgezeichnet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Felix32 Analysis von PTI.

III. Ergebnisse

1. Untersuchungen zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in *S. carnosus*

1.1 Identifizierung der *tat*-Gene von *S. carnosus*

Da das Genom von *S. carnosus* noch nicht vollständig sequenziert ist, war nicht bekannt, ob dieser Organismus überhaupt über *tat*-Gene verfügt. Das Genom seines pathogenen Verwandten *S. aureus* dagegen ist bereits vollständig sequenziert und annotiert. Danach verfügt *S. aureus* über ein *tatA*- und ein *tatC*-Gen, besitzt daher also eine Tat-Minimaltranslokase. Aufgrund der hohen Verwandtschaft und der damit vorliegenden hohe Sequenzähnlichkeit zwischen den beiden Organismen, wurden die *tat*-Gene aus *S. aureus* als Sonde für die Suche nach *tat*-Genen im Chromosom von *S. carnosus* verwendet. Die Sonde wurde durch Amplifizierung eines internen 700bp-Fragments des *S. aureus* *tatAC*-Operons mit den Primern *tatASa-for* und *tatASa-rev* hergestellt. Im Southern Blot mit HindIII-verdauter chromosomaler *S. carnosus* DNA hybridisierte die *tat*-Sonde an ein 3.7kb großes DNA-Fragment (Abbildung 7A). Dies weist darauf hin, daß auf diesem Fragment der chromosomalen DNA ein Sequenzbereich vorliegt, der große Ähnlichkeiten zu der Sequenz der *S. aureus* *tat*-Gene hat. Daher wurden HindIII-geschnittene DNA-Fragmente von ca. 3.7kb Größe aus dem *S. carnosus* Chromosom isoliert, in pUC18 Vektoren ligiert und diese in *E. coli* transformiert. Über zwei Selektionsschritte wurden die Vektoren isoliert, in denen tatsächlich die mit der *tat*-Sonde detektierten 3.7kb-Fragmente kloniert wurden. Dazu wurden zuerst Pool-Minipreps von jeweils sechs Transformanden durchgeführt und diese Plasmidpools mittels Southern Blot und der *tat*-Sonde untersucht. Nur wenn das richtige 3.7kb-Fragment in mindestens einen der Vektoren kloniert wurde, kann die Sonde mit den 7.2kb großen Plasmiden hybridisieren. Anschließend wurden die Plasmide der Pools, die ein Signal im Southern Blot gegeben haben, einzeln untersucht. Wie in Abbildung 7B ersichtlich, hybridisiert die *tat*-Sonde mit den Plasmiden 2, 3, 4 und 6, was zeigt, daß diese Vektoren das gesuchte 3.7kb-Fragment aufweisen. In die Plasmide 1 und 5 wurde ein anderes HindIII-geschnittenes Fragment kloniert, da keine Hybridisierung mit der *tat*-Sonde stattfand.

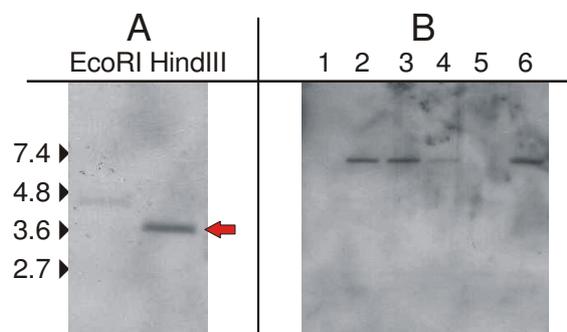


Abbildung 7: Southern Blot mit EcoRI- bzw. HindIII geschnittener chromosomaler DNA aus *S. carnosus* TM300 (A), bzw. mit den ca. 7.2kb großen unverdauten Plasmiden, die das 3.7kb-Fragment aufweisen sollten (B). Als Sonde wurde ein 700bp-großes internes Fragment des *tatAC*-Operons aus *S. aureus* benutzt. Der rote Pfeil kennzeichnet das 3.7kb-Fragment, daß durch die *tat*-Sonde detektiert wird.

Die anschließende Sequenzierung des 3.7kb-DNA-Fragments zeigte dann eindeutig, daß sich auf diesem Genomabschnitt von *S. carnosus* sowohl ein *tatA*- als auch ein *tatC*-Gen befinden. Somit weist *S. carnosus*, wie sein pathogener Verwandter *S. aureus*, ebenfalls mindestens eine Tat-Minimaltranslokase auf. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß sich auf einem anderen Bereich des Chromosoms von *S. carnosus* noch weitere *tat*-Gene, wie z. B. ein *tatB*- oder gar ein *tatE*-Gen befinden. Die hier identifizierten *tat*-Gene von *S. carnosus* sind wie bei *S. aureus* in einem *tatAC*-Operon angeordnet, weisen jedoch die Besonderheit auf, daß sich die Gene überlappen, da sich das Start-Codon von *tatC* 52bp upstream des Stop-Codon von *tatA* befindet (siehe Abbildung 8).

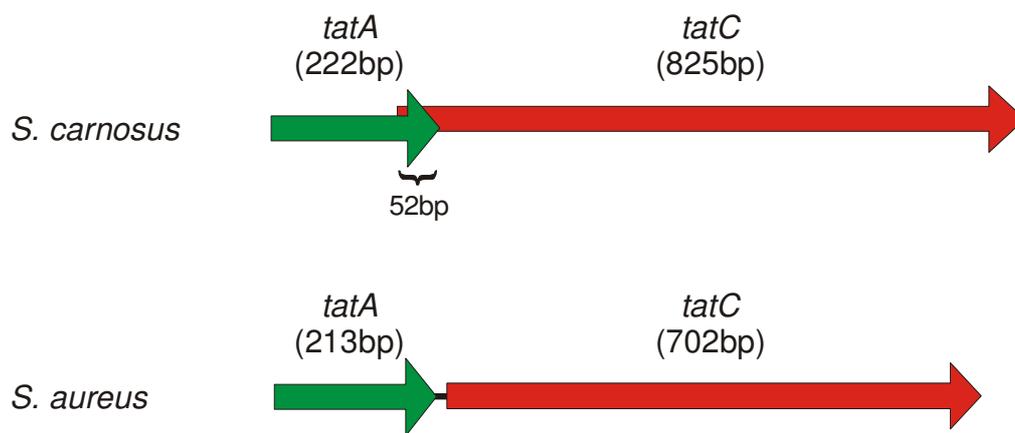


Abbildung 8: Schematische Zeichnung des *tat*-Operons von *S. carnosus* und *S. aureus*. Die *tat*-Gene von *S. carnosus* überlappen sich in einem 52bp großen Bereich.

Zur weiteren Charakterisierung wurden TatA und TatC aus *S. carnosus* auf Aminosäureebene mit den entsprechenden Proteinen von *E. coli*, *S. aureus* und *B. subtilis* verglichen (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10). Hierbei zeigte sich, daß TatA und TatC von *S. carnosus* die größte Ähnlichkeit erwartungsgemäß mit TatA und TatC von *S. aureus* aufwiesen (77%, bzw. 64% Identität) und generell die geringste zu den Tat-Proteinen von *E. coli* zeigten (32%, bzw. 34% Identität, siehe Tabelle 4).

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i> (D)	<i>B. subtilis</i> (Y)
TatA	32%	77%	42%	60%
TatC	34%	64%	35%	36%

Tabelle 4: Vergleich der Aminosäureidentitäten der *S. carnosus* Tat-Proteine zu den Tat-Proteinen von *E. coli*, *S. aureus* und den zwei Tat-Systemen von *B. subtilis* (TatAC_D und TatAC_Y).

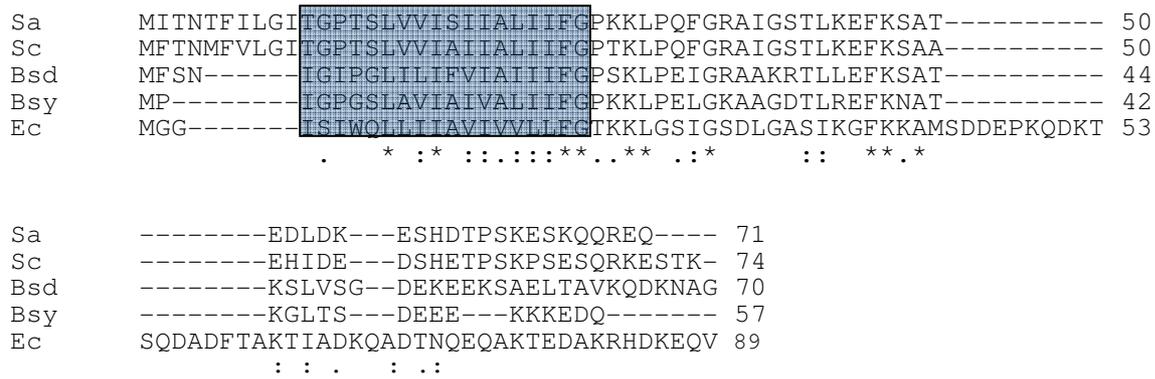


Abbildung 9: Alignment der Aminosäuresequenzen der TatA-Proteine von *S. aureus* (Sa), *S. carnosus* (Sc), *B. subtilis* TatA_D (Bsd) TatA_Y (Bsy) und *E. coli* (Ec). Die Position der Transmembrandomäne ist durch den blauen Kasten markiert. Identische Aminosäuren sind durch einen Stern, semi-konservierte Aminosäuren durch einen Punkt und Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften durch einen Doppelpunkt markiert. Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW 1.82 aufgestellt.

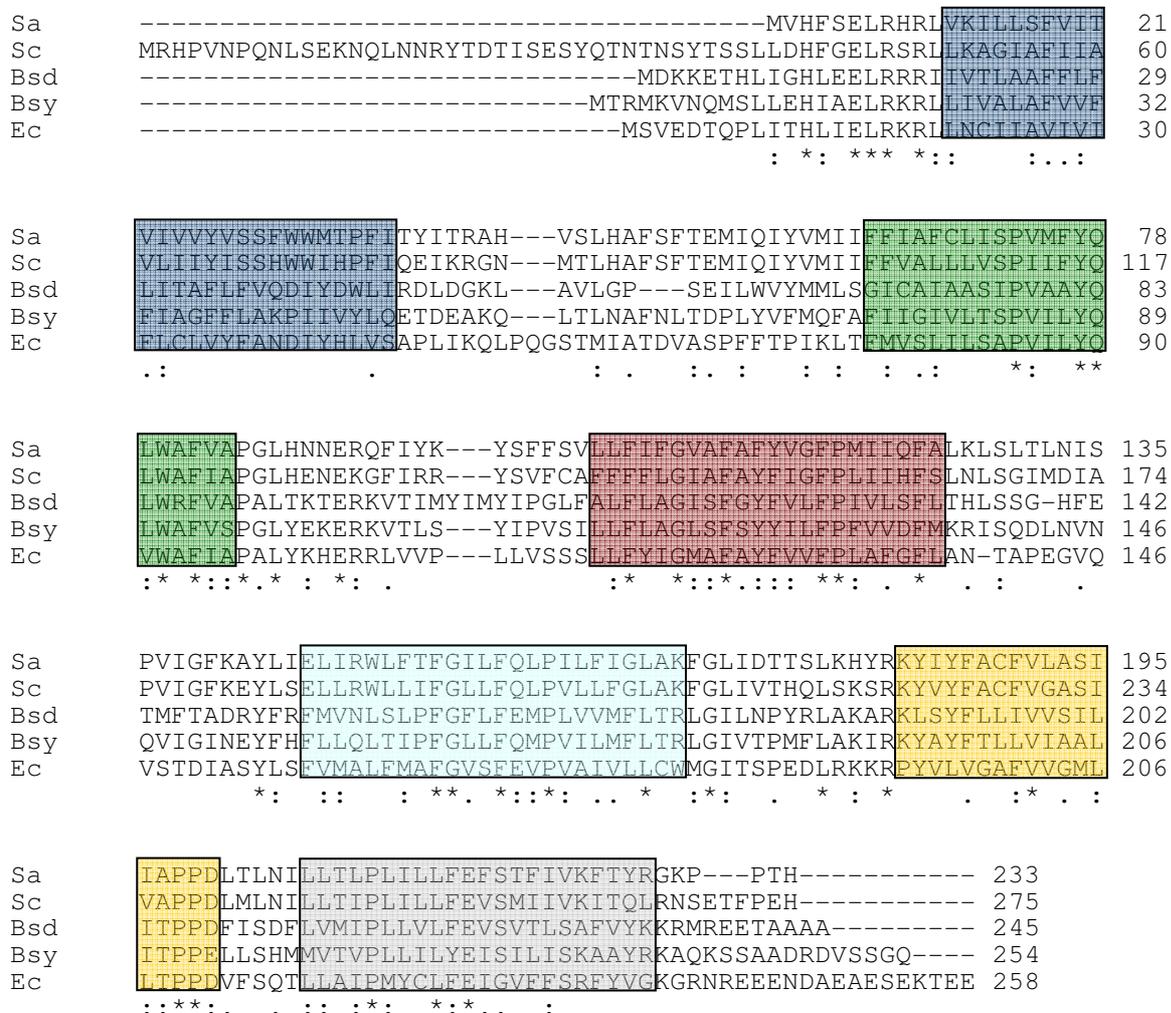


Abbildung 10: Alignment der Aminosäuresequenzen der TatC-Proteine von *S. aureus* (Sa), *S. carnosus* (Sc), *B. subtilis* TatA_D (Bsd) TatA_Y (Bsy) und *E. coli* (Ec). Die Position der sechs Transmembrandomänen ist durch die farbigen Kästen markiert. Zeichenerklärung siehe Legende zu Abbildung 9.

Aus dem Alignment der Aminosäuresequenzen der TatA und TatC-Proteine ist ersichtlich, daß die Lage der Transmembransegmente hochkonserviert ist und dort auch die meisten Übereinstimmungen vorkommen. Das TatC-Protein von *S. carnosus* besitzt einen deutlich längeren cytoplasmatischen N-terminalen Bereich, ansonsten weisen die Tat-Proteine von *S. carnosus* jedoch keine weiteren signifikanten Abweichungen zu den anderen Tat-Proteinen auf (siehe Abbildung 9 und 10).

1.2 *S. carnosus* besitzt ein funktionelles Tat-System

Nachdem die *tat*-Gene im Genom von *S. carnosus* identifiziert werden konnten, war der nächste Schritt zu untersuchen, ob tatsächlich auch ein funktionelles Tat-System vorliegt. Dazu soll der Export eines Tat-abhängigen Reporterproteins in *S. carnosus* untersucht werden. Um dabei die Tat-Abhängigkeit dieses Exportes zeigen zu können, war es zwingend erforderlich das Exportverhalten des Reporterproteins auch in einer *S. carnosus* *tat*-Mutante zu untersuchen. Verfügt *S. carnosus* über ein funktionelles Tat-System, sollte das Tat-abhängige Reporterprotein im Wildtyp exportiert und in der *tat*-Mutante nicht exportiert werden.

1.2.1 Konstruktion einer *S. carnosus* *tat*-Mutante

Das TatC-Protein stellt in allen bisher untersuchten funktionellen Tat-Systemen eine essentielle Komponente des Tat-abhängigen Exports dar und seine Deletion führt zu einem Exportblock aller bislang untersuchten Tat-Substrate. Um nun einen möglichen Tat-abhängigen Export in *S. carnosus* auszuschalten, sollte daher das *tatC*-Gen deletiert werden. Dazu wurde das Wildtyp *tatAC*-Operon auf dem Chromosom mit einem *tatAC**-Operon, bei dem ein 400bp großer interner Bereich des *tatC*-Gens fehlt, ausgetauscht. Dies erfolgte mit einem Integrationsvektor, welcher das inaktivierte *tatAC**-Operon trägt (pPSM1058tat*). Dieser Integrationsvektor trägt das Gen für Chloramphenicolresistenz und kann aufgrund eines temperatursensitiven Replikons nur bei der permissiven Temperatur von 30°C replizieren, bei der nichtpermissiven Temperatur von 42°C erfolgt keine Replikation mehr.

Zur Konstruktion des *tatAC**-Operons wurden mittels PCR die ersten 400bp (Fragment 1) und die letzten 400bp des *tatAC*-Operons (Fragment 2) mit der chromosomalen DNA von *S. carnosus* als ‚template‘-DNA und den Primern *tatA400Sc*-for und *tatA400Sc*-rev bzw. *tatC400Sc*-for und *tatC400Sc*-rev amplifiziert. Die Primer *tatA400Sc*-rev und *tatC400Sc*-for wurden so konstruiert, daß sie komplementäre DNA-Bereiche aufwiesen. So konnten die beiden teilweise überlappenden PCR-Fragmente als ‚template‘ für eine Crossing-over PCR eingesetzt werden, bei der mit den Primern *tatA400Sc*-for und *tatC400Sc*-rev ein Fragment amplifiziert wurde, das aus den ersten 400bp, gefolgt von den letzten 400bp des *tatAC*-Operons besteht. Das PCR-Produkt wurde mit KpnI und BamHI geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen pPSM1058-Vektor ligiert.

Der *S. carnosus* Wildtyp wurde mit dem Vektor pPSM1058tat* transformiert und bei der permissiven Temperatur über mehrere Generationen mit Chloramphenicol im Medium

inkubiert. Durch einen anschließenden „Shift“ der Zellen auf die nichtpermissive Temperatur von 42°C mit Chloramphenicol im Medium muß *S. carnosus* das Plasmid ins Chromosom integrieren, um weiterhin Chloramphenicolresistenz ausprägen zu können. Dies erfolgte durch homologe Rekombination zwischen dem Wildtyp *tatAC*-Operon auf dem Chromosom und dem inaktiviertem *tatAC**-Operon auf dem Plasmid via eines doppelten Crossing-overs (Abbildung 11A und B). Durch Zurückshiften des Stammes zur permissiven Temperatur mit Chloramphenicol im Medium wurde anschließend wieder die Plasmidexzision ermöglicht. Diese erfolgte durch eine homologe Rekombination zwischen dem aktiven und dem inaktiven *tat*-Operon auf dem Chromosom, wobei entweder das Wildtyp *tatAC*-Operon auf dem Chromosom verbleibt oder, wie gewollt, das inaktivierte *tatAC**-Operon (Abbildung 11, C).

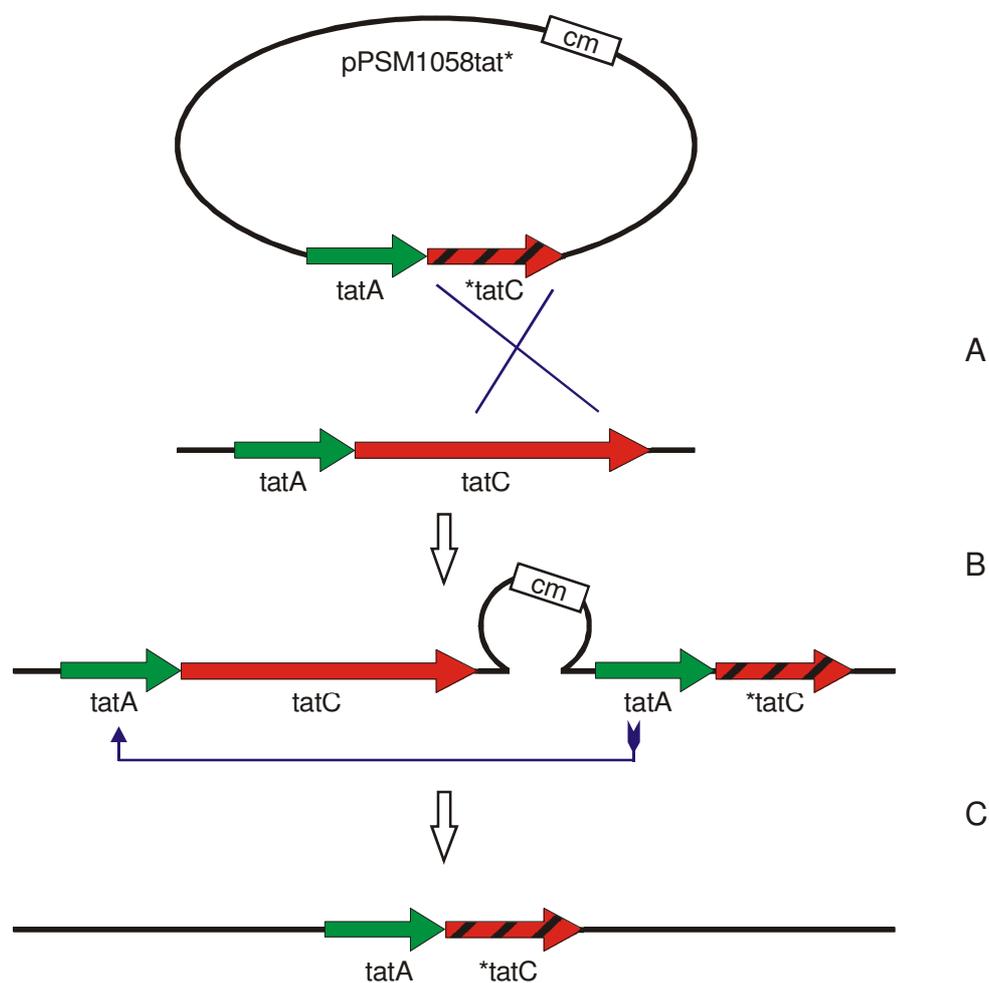


Abbildung 11: Schema zur Inaktivierung des *tat*-Operons. Durch homologe Rekombination zwischen dem inaktivierten *tat*-Operon auf dem Plasmid und dem *tat*-Operon auf dem Chromosom (A) integriert der Vektor pPSM1058tat* in das Chromosom (B). Homologe Rekombination zwischen dem inaktivierten und dem Wildtyp *tat*-Operon auf dem Chromosom führt zur Exzision des Plasmids (C). Es verbleibt entweder das Wildtyp oder das inaktivierte *tat*-Operon auf dem Chromosom (letzteres ist dargestellt). Weitere Erklärung im Text.

In einem letzten Schritt wurde die Temperatur wieder auf die nichtpermissive Temperatur erhöht und die Zellen mehrere Generationen, jedoch diesmal ohne Chloramphenicol im Medium, inkubiert. Dies soll dem Stamm ermöglichen das Plasmid, welches nun nicht mehr benötigt wird, zu verlieren. Der Verlust des Plasmids wurde mittels Replikaplattierung überprüft. Dazu wurden die Zellen nach der Inkubation bei 42°C ohne Chloramphenicol auf Agarplatten ebenfalls ohne Chloramphenicol ausplattiert und dann auf Agarplatten mit Chloramphenicol replikaplattiert. Nur die Klone, die das Plasmid noch besitzen, sind in der Lage nach der Replikaplattierung auf der Agarplatte mit Chloramphenicol zu wachsen.

Unter den Klonen, die das Plasmid nicht mehr besitzen, wurden nun abschließend diejenigen isoliert, bei denen mit der Plasmidexzision das Wildtyp *tatAC*-Operon aus dem Chromosom geschnitten wurde und das inaktivierte *tatAC**-Operon auf dem Chromosom verblieb. Dazu wurde die chromosomale DNA der Klone isoliert und mittels PCR und Southern Blot überprüft. In der PCR-Überprüfung wurde das *tatAC*-Operon mittels PCR mit der chromosomalen DNA dieser Klone als „template“ und den Primern *tatA400Sc-for* und *tatC400Sc-rev* amplifiziert. Da das inaktivierte *tatAC**-Operon um 400bp kleiner ist als das *tatAC*-Operon des Wildtyp-Stammes, muß bei den Klonen, bei denen ein Austausch des Operons stattgefunden hat, ein um 400bp kleineres Fragment bei der PCR amplifiziert werden. In Abbildung 12A ist das Ergebnis der PCR-Untersuchung zu sehen. Bei allen vier ausgewählten Klonen ergab die PCR ein Fragment von 800bp Größe, was um 400bp geringer ist als das 1,2kb-Fragment, welches die Wildtypkontrolle ergibt. Zur Überprüfung mittels Southern Blot wurde die chromosomale DNA der Klone und die des Wildtyps als Kontrolle mit dem Restriktionsenzym *Hind*III verdaut. Als Sonde wurde das *tatA*-Gen aus *S. carnosus* verwendet, welches in der *tat*-Mutante auch noch vorhanden ist. Durch den *Hind*III-Verdau liegt im Wildtyp das *tatAC*-Operon auf einem 3,7kb großem Fragment. Durch den Austausch des Operons verringert sich das Fragment um 400bp auf 3,3kb (siehe Abbildung 12B). Bei den Klonen 1, 3, 5 und 6 konnte diese Größenveränderung um 400bp im Vergleich zum Wildtyp, die auf den Austausch der Operons zurückzuführen ist, beobachtet werden, was sich auch mit den Ergebnissen aus der PCR-Untersuchung deckt. Bei den Klonen 2 und 4 wurde durch die Plasmidexzision die Wildtypsituation wiederhergestellt.

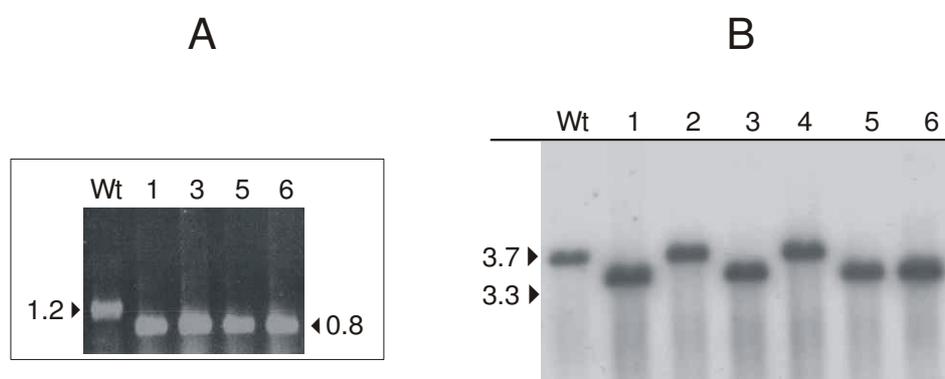


Abbildung 12: PCR- (A) und Southern Blot-Analyse (B) zur Überprüfung der auf Plasmidexzision selektierten Klone. Wt: Wildtyp-Kontrolle, 1 – 6: ausgewählte Chloramphenicol-sensitive Klone

Der Austausch des Wildtyp *tat*-Operons durch das inaktivierte *tat*-Operon wurde abschließend noch durch Sequenzierung eindeutig verifiziert. Klon 1 wurde für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Zur Vereinfachung wird der Stamm im Folgenden nur noch als Δ *tatC*-Mutante bezeichnet.

1.2.2 Effekt der Δ *tatC*-Mutation auf die Prozessierung des Fusionsproteins TorA-CGTase

Um zu zeigen, daß das Tat-System von *S. carnosus* funktionell ist, sollte der Export eines Tat-Substrates in Wildtyp und Δ *tatC*-Mutante untersucht werden. Da bislang keine authentischen *S. carnosus* Tat-Substrate bekannt sind, mußte diese Überprüfung mit heterologen Substraten erfolgen. Angela Vollstedt untersuchte in ihrer Dissertation die Sec- und Tat-abhängige Sekretion von Enzymen aus extremophilen Bakterien in *S. carnosus* und hatte dazu bereits ein heterologes Fusionsprotein, bestehend aus dem Signalpeptid der Tat-abhängigen TMAO-Reduktase (TorA) aus *E. coli* und der Cyclodextrin-Glycosyltransferase (CGTase) aus *Anaerobranca gottschalkii* konstruiert. Daher wurde in Kooperation mit Angela Vollstedt die Prozessierung dieses TorA-CGTase Fusionsproteins mittels Pulse Chase-Experiment im *S. carnosus* Wildtyp und der Δ *tatC*-Mutante miteinander verglichen. Die Prozessierungskinetik des TorA-CGTase Fusionsproteins in der Δ *tatC*-Mutante zeigt im Vergleich der Kinetik im Wildtyp, daß die Deletion des *tatC*-Gens eine starke Hemmung der Prozessierung bewirkt (siehe Abbildung 13). Während im Wildtyp nach 60min bereits über 75% des Vorläuferproteins in die reife Form prozessiert wurden, findet in der Δ *tatC*-Mutante über den gleichen Zeitraum eine deutlich geringere Abnahme des Vorläufers statt. Es erscheint zwar ein Protein mit dem gleichen Laufverhalten der reifen CGTase, doch weiterführende Untersuchungen zur Lokalisation des Fusionsproteins mittels Zellfraktionierung haben gezeigt, daß es sich dabei um ein cytosolisches Abbauprodukt handelt.

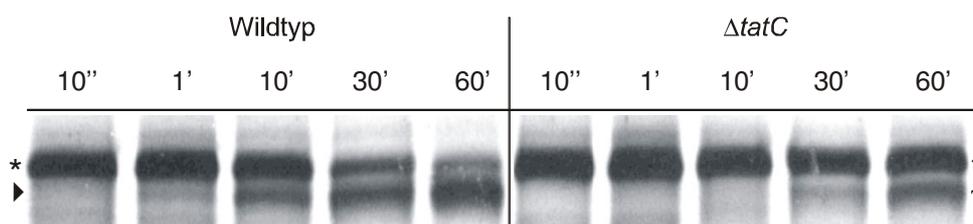


Abbildung 13: Prozessierungskinetik der TorA-CGTase in *S. carnosus* Wildtyp und Δ *tatC*-Mutante. Die Stämme wurden im Pulse Chase-Experiment für 10min mit 35 S-Methionin markiert und nach Zugabe der Chase-Lösung wurden Proben nach 10'', 1', 30' und 60' genommen. Die Immunfällung erfolgte mit α -CGTase Antikörpern. *: TorA-CGTase Vorläuferprotein, ▶ : reife CGTase, ~: cytosolisches Abbauprodukt

Das Pulse Chase-Experiment zeigt, daß die Deletion von *tatC* in *S. carnosus* die Prozessierung des TorA-CGTase Fusionsproteins hemmt, wohingegen im Wildtyp eine deutliche Prozessierung stattfindet. Dies beweist, daß die TorA-CGTase Tat-abhängig exportiert wird und somit *S. carnosus* über ein funktionelles Tat-System verfügt.

1.3 Die *S. carnosus* Δ *tatC*-Mutante zeigt keinen phänotypischen Unterschied zum Wildtyp

Da gezeigt werden konnte, daß *S. carnosus* über ein funktionelles Tat-System verfügt, wurde im Folgenden untersucht, welche Bedeutung das Tat-System für diesen Organismus besitzt. Bei *E. coli* ist bekannt, daß das Tat-System u. a. eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität der äußeren Membran spielt (Stanley *et al.*, 2001). So äußert sich eine Inaktivierung des Tat-Systems von *E. coli* u. a. in einer erhöhten Sensitivität gegenüber der Detergenz SDS, was eine Folge der Verschlechterung der Membranintegrität ist. Weiterhin läßt sich bei den Zellen von *E. coli* *tat*-Mutanten eine Kettenbildung beobachten, die aus einem Defekt in der Zellteilung resultiert.

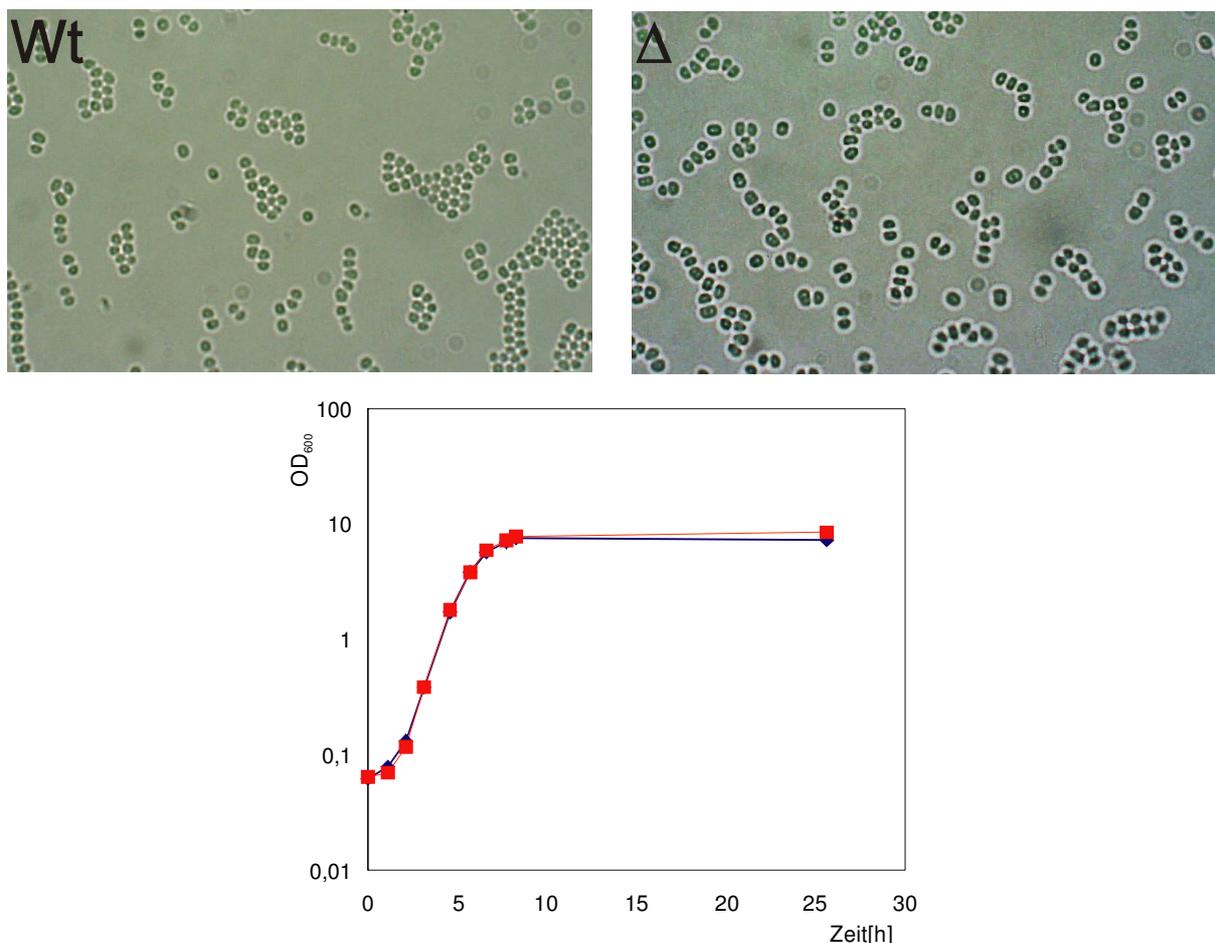


Abbildung 14: Vergleich der Phänotypen von *S. carnosus* Wildtyp und Δ *tatC* Mutante. Oben: Mikroskopische Aufnahme der Zellen von Wildtyp (Wt) und Δ *tatC*-Mutante (Δ). Unten: Wachstumsvergleich von *S. carnosus* Wildtyp (■) und Δ *tatC*-Mutante (◆) in LB-Medium bei 37°C.

Die *S. carnosus* *tat*-Mutante wies jedoch keine phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp auf. So wird weder die Zellform noch das Wachstumsverhalten durch Inaktivierung des Tat-Systems verändert. (siehe Abbildung 14). Diese Ergebnisse deuten an, daß das Tat-System von *S. carnosus* anscheinend keine große Rolle für dessen Überleben unter den gewählten Laborbedingungen spielt. Daher stellte sich im Zuge der weiteren Charakterisierung dieses Tat-Systems die Frage, ob und über welche authentischen Tat-Substrate *S. carnosus* verfügt.

1.4 In *S. carnosus* konnten keine authentischen Tat-Substrate identifiziert werden

Da das Genom von *S. carnosus* bis dato nicht vollständig sequenziert und auch nicht annotiert war, konnte das Genom mittels Sequenzanalyse nicht nach potentiellen Tat-Substraten durchsucht werden (siehe auch III.2.3.1). Daher wurde eine Identifizierung von authentischen Tat-Substraten von *S. carnosus* über einen anderen Weg versucht. Die Proteine der Kulturüberstände von *S. carnosus* Wildtyp und $\Delta tatC$ -Mutante wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt, mittels Comassie Blau gefärbt und das Proteinbandenmuster miteinander verglichen. Proteine, die im Überstand des Wildtyps vorhanden sind, aber im Überstand der Mutante fehlen, wären nun potentielle Tat-Substrate. Diese Methode hat den Nachteil, daß die Synthese und Translokation von Tat-Substraten, die nur bei bestimmten Wachstumsbedingungen stattfindet, nicht zwangsläufig bei den hier gewählten Bedingungen erfolgt und somit die Substrate identifiziert werden könnten.

Die Proteine aus den Kulturüberständen von Wildtyp und $\Delta tatC$ -Mutante unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (Komplex- und Minimalmedium, bei 37°C und 30°C) wurden isoliert, auf einem SDS-Gel nach Größe getrennt und das Bandenmuster miteinander verglichen. Es konnte jedoch bei keiner der untersuchten Wachstumsbedingungen ein Unterschied im Proteinbandenmuster des Kulturüberstandes zwischen dem Wildtyp und der $\Delta tatC$ -Mutante von *S. carnosus* gefunden werden (exemplarisch gezeigt für Wachstum auf Komplexmedium bei 37°C, siehe Abbildung 15).

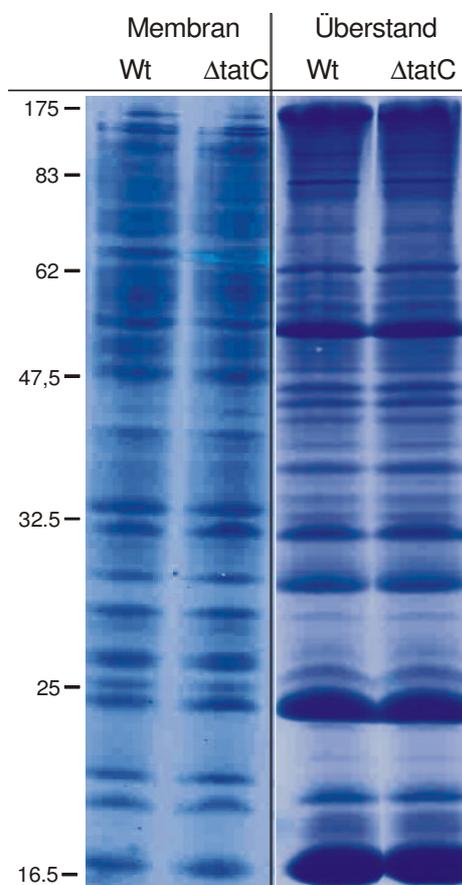


Abbildung 15: Proteinbandenvergleich. Vergleich der Proteine des Kulturüberstandes und der Membran zwischen *S. carnosus* Wildtyp und $\Delta tatC$ -Mutante in Komplexmedium bei 37°C. Links ist das Molekulargewicht angegeben.

Eine Auswertung der annotierten Sequenz von *S. aureus*, dem nahen Verwandten von *S. carnosus*, im Hinblick auf potentielle Tat-Substrate brachte auch dort nur ein potentielles Tat-Substrat zum Vorschein, welches aller Wahrscheinlichkeit nach ein Membranprotein ist. Daher wurden auch die Membranproteine von *S. carnosus* Wildtyp und $\Delta tatC$ -Mutante isoliert und wie die Proteine des Kulturüberstandes miteinander verglichen. Auch hier konnte kein Protein gefunden werden, das im Proteinbandenmuster des Wildtyps vorhanden ist und in der $\Delta tatC$ -Mutante fehlt (Abbildung 15, links) und so auf ein potentielles Tat-Substrat hindeuten würde.

1.5 Das TorA-CGTase Fusionsprotein wird in *S. carnosus* nicht sekretiert

Da keine authentischen Tat-Substrate von *S. carnosus* für weitere Exportuntersuchungen zur Verfügung standen, wurden für die weiteren Untersuchungen zur Sekretion heterologe Substrate verwendet. Im Pulse Chase-Experiment konnte bereits gezeigt werden, daß das TorA-CGTase Fusionsprotein in *S. carnosus* Tat-abhängig prozessiert und damit über die Membran transloziert wird (siehe III. 1.2.2). Da die Translokationseffizienz jedoch nicht zwangsläufig die Sekretionsleistung widerspiegelt, da die Zellwandpassage noch bevorsteht, sollte im Folgenden untersucht werden, welcher Anteil an reifer CGTase sich tatsächlich im Überstand befindet. Dazu erfolgte mittels Zellfraktionierung von *S. carnosus* Wildtyp und $\Delta tatC$ -Mutante in Protoplasten-, Zellwand- und Überstandsfraction eine Lokalisierung der TorA-CGTase Genprodukte. Die Fraktionen wurden anschließend im Western Blot untersucht (siehe Abbildung 16).

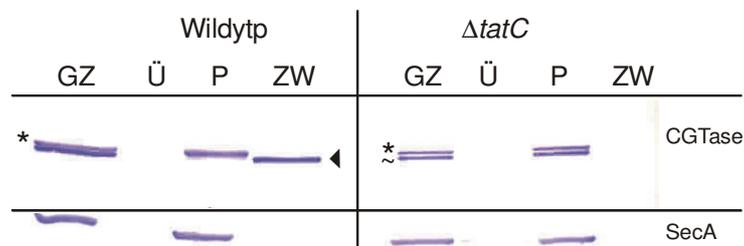


Abbildung 16: Zellfraktionierung zur Lokalisierung des TorA-CGTase Fusionsproteins. Die Fraktionierung von *S. carnosus* Wildtyp und $\Delta tatC$ -Mutante in Protoplasten (P), Zellwand (ZW) und Überstand (Ü) erfolgte wie in II.5.2.2, 5.2.4 und 5.4 beschrieben. Die in der Gesamtzell- (GZ), Protoplasten- und Zellwandfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD600 von 0,5, die Proteinmenge im Überstand 1ml Kultur mit einer OD600 von 1,5. *: TorA-CGTase Vorläuferprotein, ▶: reife CGTase, ~: cytosolisches Abbauprodukt.

In der Gesamtzellfraktion des *S. carnosus* Wildtyps werden der TorA-CGTase Vorläufer und die reife Form detektiert, in der Protoplastenfraction findet sich - wie erwartet - nur die Vorläuferform. Überraschenderweise findet sich aber im Überstand keine nachweisbare reife CGTase. Das Vorhandensein großer Mengen von reifer CGTase in der Zellwandfraktion zeigt aber, daß in der Tat eine Translokation des TorA-CGTase Fusionsproteins über die Cytoplasmamembran stattgefunden hat. Eine anschließende Sekretion der reifen CGTase in

den Überstand erfolgte jedoch nicht, sondern die reife CGTase blieb in der Zellwand stecken. In der $\Delta tatC$ -Mutante erfolgte - wie bereits im Pulse Chase-Experiment gezeigt (siehe Abbildung 13) - keine Prozessierung des TorA-CGTase Fusionsproteins und damit im Einklang findet sich auch keine reife CGTase in der Zellwandfraktion. Da auch keine verstärkte Akkumulation von Vorläuferprotein in der Zelle auftritt, wird von einem schnellen Abbau eines Teils des Vorläuferproteins ausgegangen. Die Proteinform, die intrazellulär das gleiche Laufverhalten wie die reife Form aufweist, ist ein Abbauprodukt des Vorläuferproteins. Um auszuschließen, daß Zell-Lyse für das Auftreten von reifem Protein in der Zellwand des Wildtyps die Ursache ist, wurde zusätzlich die Verteilung von SecA, einem cytoplasmatischen und membranständigen Protein, untersucht. In der Abbildung ist zu sehen, daß SecA nur in der Gesamtzell- und der Protoplastenfraktion, nicht aber in der Zellwandfraktion oder im Überstand, detektiert wurde, so daß Zell-Lyse ausgeschlossen werden kann.

Ein anschließend durchgeführter Proteinase K-Verdau der protoplastierten Zellen bestätigte das Resultat der Zellfraktionierung. Bei solch einem Proteinase K-Verdau erfolgt wie bei der herkömmlichen Fraktionierung ebenfalls eine Protoplastierung der Zellen. Jedoch wird anschließend die Zellwandfraktion nicht von den Protoplasten getrennt, sondern der Mix aus Protoplasten und Zellwandfraktion wird mit Proteinase K behandelt (siehe auch II. 5.7). Alle Proteine außerhalb und auf der *trans*-Seite der Cytoplasmamembran exponierten Proteine (also außerhalb der Protoplasten), sind der Proteinase K zugänglich und werden abgebaut, wohingegen cytoplasmatisch lokalisierte Proteine, wie z.B. Vorläuferproteine geschützt sind und daher nicht durch die Proteinase K abgebaut werden können.

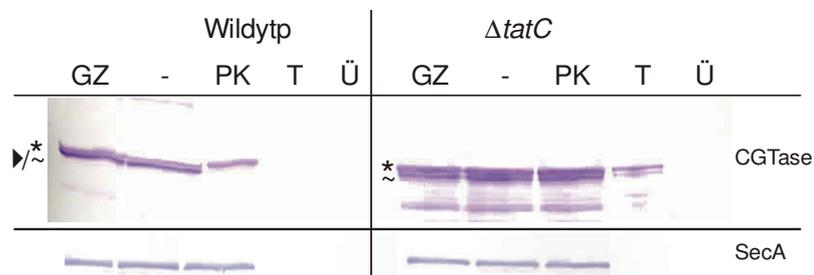


Abbildung 17: Lokalisierung der TorA-CGTase Proteinformen in *S. carnosus* Wildtyp und $\Delta tatC$ -Mutante durch Proteinase K-Behandlung. Die Protoplastierung und der Proteinase K-Verdau erfolgte wie in II.5.4 und 5.7 beschrieben. Der Aufschluß der Protoplasten zum Verdau von intrazellulären Proteinen erfolgte durch Zugabe von Triton X-100 in einer Endkonzentration von 5% bevor Proteinase K zugesetzt wurde. Die Proteinmenge für die unbehandelte Gesamtzellfraktion (GZ), die ohne Proteinase K behandelten Protoplasten (-), die mit Proteinase K behandelten Protoplasten (PK) und die mit Triton X-100 aufgeschlossenen und Proteinase K behandelten Protoplasten (T) entspricht 1ml Kultur mit einer OD_{600} von 0,5, die Proteinmenge im Überstand (Ü) entspricht 1ml Kultur mit einer OD_{600} von 1,5. Die Qualität der Protoplastierung sowie die Wirkung der Proteinase K wurde anhand des cytoplasmatischen und membranständigen SecA-Proteins überprüft. *: TorA-CGTase Vorläuferprotein, \blacktriangleright : reife CGTase, \sim : cytosolisches Abbauprodukt.

In Abbildung 17 ist zu erkennen, daß im Wildtyp das TorA-CGTase Vorläuferprotein vor dem Proteinase K-Verdau geschützt ist, wohingegen der Großteil der reifen CGTase abgebaut wird. In der $\Delta tatC$ -Mutante sind beide Formen, das Vorläuferprotein und die Proteinbande auf Höhe der reifen CGTase, vor der Proteinase K geschützt, was beweist, daß beide cytoplasmatisch lokalisiert sind. Diese Ergebnisse zeigen, zusammen mit der vorherigen

Fraktionierung, daß das TorA-CGTase Fusionsprotein im *S. carnosus* Wildtyp Tat-abhängig über die Cytoplasmamembran transloziert wird, jedoch nicht in den Kulturüberstand sekretiert wird, sondern im Zellwandkompartiment verbleibt. In der *S. carnosus* Δ *tatC*-Mutante erfolgt hingegen ein partieller cytoplasmatischer Abbau des TorA-CGTase Vorläuferproteins. Anhand des cytoplasmatischen Kontrollproteins SecA zeigte sich, daß die hergestellten Protoplasten intakt waren, da die SecA-Menge sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Proteinase K gleich ist und SecA erst nach Aufschluß der Protoplasten durch Triton X verdaut wird. Die Triton X-Kontrolle zeigt weiterhin, daß die Proteinase K tatsächlich wirkt.

1.6 Das deutlich kleinere TorA-GFP Fusionsprotein wird von *S. carnosus* ebenfalls nicht sekretiert

In den vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß das TorA-CGTase Fusionsprotein in *S. carnosus* zwar Tat-abhängig über die Cytoplasmamembran transloziert, aber nicht in den Kulturüberstand sekretiert wird, da es in der Zellwand verbleibt. Die reife CGTase hat ein Molekulargewicht von ca. 70kDa und gelangt, da sie als Fusionsprotein mit der Tat-Signalsequenz von TorA Tat-abhängig exportiert wird, in einer vollständig gefalteten Konformation in das Zellwandkompartiment. Es ist denkbar, daß sie aufgrund ihrer Größe und/oder ihrer gefalteten Konformation das Zellwandkompartiment nicht passieren kann, sondern in der porösen Struktur der Zellwand stecken bleibt (siehe auch I.5).

Daher wurde im Folgenden anhand eines weiteren Fusionsproteins mit einem geringeren Molekulargewicht untersucht, ob tatsächlich die Größe eines Proteins einen limitierenden Faktor bei der Tat-abhängigen Proteinsekretion mit *S. carnosus* darstellt. Als Fusionsprotein wurde das TorA-GFP gewählt, welches aus dem TorA-Signalpeptid aus *E. coli* und dem Grün-fluoreszierenden Protein (GFP) aus *Aquorea victoria* zusammengesetzt ist. Das GFP hat eine Größe von ca. 25kDa und sollte daher theoretisch die Poren der Zellwand passieren können (siehe auch I.5). Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, daß sich das TorA-GFP Fusionsprotein als Tat-abhängiger Reporter, zumindest in *E. coli*, eignet (Santini *et al.*, 2001).

1.6.1 Konstruktion des *torA-gfp* Fusionsgens für die Expression in *S. carnosus*

Die Fusion der *torA*-Signalsequenz mit dem *gfp*-Gen wurde mittels Crossing-over PCR durchgeführt (siehe Abbildung 18A und B). Dazu wurden zunächst die *torA*-Signalsequenz und die Basen, die für die ersten vier Aminosäuren des reifen TorA kodieren, inklusive der ‚untranslated region‘ (UTR) und der Ribosomenbindestelle (RBS) der *S. hyicus* Lipase mittels PCR mit dem Vektor pXRTorACGTase als ‚template‘ und den Primern TorA(UTR)-for und TorA(UTR)-rev amplifiziert (Fragment 1). Es hatte sich in vorherigen Arbeiten gezeigt, daß es für die Expression von heterologen Substraten in *S. carnosus* von Vorteil ist, anstelle der authentischen RBS vor dem *torA*-Gen aus *E. coli* die UTR und RBS aus *S. hyicus* zu verwenden. Weiterhin wurde das *gfp*-Gen ohne Startcodon mittels PCR mit dem Vektor pGFP_{uv} als ‚template‘ und den Primern Tor/GFP-for und GFP(UTR)-rev amplifiziert (Fragment 2). Die Primer TorA-rev und GFP-for wurden so konstruiert, daß sie einen

überlappenden Bereich aufweisen. So konnten die beiden PCR-Fragmente als ‚template‘ für eine Crossing-over PCR eingesetzt werden, bei der mit den Primern TorA(UTR)-for und GFP(UTR)-rev ein Fragment amplifiziert wurde, welches aus der *torA*-Signalsequenz, inklusive der Basenpaare, die für die ersten vier Aminosäuren des reifen TorA kodieren, und dem *gfp*-Gen besteht (siehe Abbildung 18C). Das PCR-Produkt wurde mit SphI und XbaI geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen pXR100 Vektor ligiert (pXRTorAGFP). Auf dem *E. coli*/*S. carnosus* Shuttle-Vektor pXR100 wird die Expression der Genfusionen in *S. carnosus* durch die Xylose-regulierbare Promotor/Operator-Region des *xylA*-Gens von *Staphylococcus xylosus* gesteuert (Wieland *et al.*, 1995). Nach Sequenzierung der Genfusion wurden Wildtyp und Δ *tatC*-Mutante von *S. carnosus* mit dem Vektor pXRTorAGFP transformiert und zunächst Expression und Sekretion untersucht.

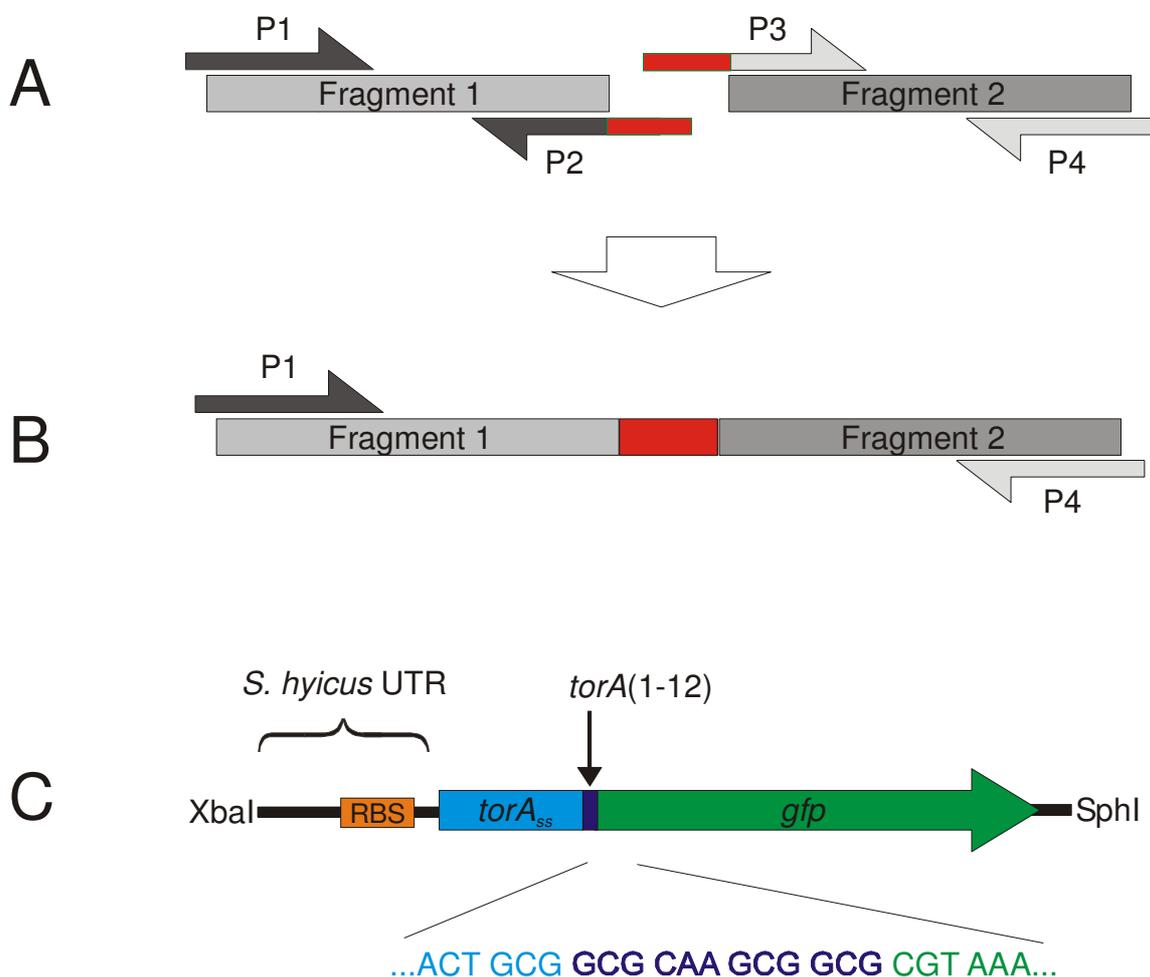


Abbildung 18: Schema einer Crossing-over PCR (A+B): Fragment 1 und 2 werden mit den Primern P1 und P2, bzw. P3 und P4 amplifiziert (A). Die Primer P2 und P3 weisen einen überlappenden Bereich auf (rot), so daß sich in der 2. PCR die Fragmenten 1 und 2, die als ‚template‘ eingesetzt werden, am überlappenden Ende aneinanderlagern. So entsteht mit den Primern 1 und 4 das Produkt, das aus Fragment 1 und Fragment 2 besteht. **Schema des *torA-gfp* Fusionsgens (C):** Das *torA-gfp* Fusionsgen setzt sich aus der *S. hyicus* UTR, der Signalsequenz (hellblau) und den ersten 12 Basenpaaren des *torA*-Gens (dunkelblau) und dem *gfp*-Gen (grün) zusammen. Zur Klonierung wurden upstream der UTR eine XbaI- und downstream des *gfp*-Gens eine SphI-Schnittstelle eingefügt. Die Sequenz des Übergangsbereichs Signalsequenz - *gfp*-Gen ist angegeben, wobei die dunkelblau markierte Sequenz für die ersten vier Aminosäuren des reifen TorA-Proteins kodiert.

1.6.2 TorA-GFP wird in *S. carnosus* Tat-abhängig transloziert, aber nicht in den Überstand sekretiert

Um die Exporteigenschaften des TorA-GFP Fusionsproteins in *S. carnosus* genauer zu untersuchen, wurde wie im Falle des TorA-CGTase Fusionsproteins eine Zellfraktionierung durchgeführt. Diese Fraktionierung erfolgte sowohl im Wildtyp als auch in der $\Delta tatC$ -Mutante, um gleichzeitig die Tat-Abhängigkeit des Exports des Substrats zu überprüfen. *S. carnosus* Wildtyp und $\Delta tatC$ -Mutante wurden mit dem pXRTorAGFP Vektor transformiert, wie unter II.5.1 und 5.4 beschrieben mit Xylose induziert und in Protoplasten, Zellwand und Überstand fraktioniert und mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft. Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, wird das TorA-GFP Fusionsprotein in *S. carnosus* synthetisiert, es wird aber kein Protein im Überstand detektiert. In der Gesamtzellfraktion sind zwei Proteinformen unterschiedlichen Molekulargewichts im etwa gleichen Mengenverhältnis zueinander zu sehen. Durch Fraktionierung der Gesamtzellfraktion in Protoplasten und Zellwand verschiebt sich in der Protoplastenfraction das Verhältnis der beiden Proteinformen zugunsten der Proteinform mit dem größerem Molekulargewicht und in der Zellwandfraktion zugunsten der Proteinform mit dem niedrigerem Molekulargewicht. Dies deutet darauf hin, daß es sich bei der Proteinform mit dem höheren Molekulargewicht um das cytoplasmatisch lokalisierte TorA-GFP Vorläuferprotein handelt und bei der Proteinform mit dem niedrigeren Molekulargewicht um das extracytosolisch lokalisierte reife GFP. In der $\Delta tatC$ -Mutante erscheinen ebenfalls zwei Proteinformen in der Gesamtzellfraktion, die augenscheinlich das gleiche Molekulargewicht wie die beiden Proteinformen im Wildtyp aufweisen. Die Fraktionierung zeigt aber, daß beide Proteinformen cytoplasmatisch lokalisiert sind, da in der Zellwandfraktion der $\Delta tatC$ -Mutante keine der beiden Formen nachgewiesen werden konnte. Somit kann es sich bei der Proteinform mit dem niedrigeren Molekulargewicht in der $\Delta tatC$ -Mutante nur um ein cytosolisches Abbauprodukt des Vorläuferproteins handeln. Um Zell-Lyse auszuschließen, die für das Auftreten des reifen GFP in der Zellwand des *S. carnosus* Wildtyps ebenfalls verantwortlich sein könnte, wurde zur Kontrolle die Lokalisierung des cytoplasmatischen SecA Proteins untersucht. SecA wurde nur in der Gesamtzell- und der Protoplastenfraction detektiert, was eine Zell-Lyse ausschließt.

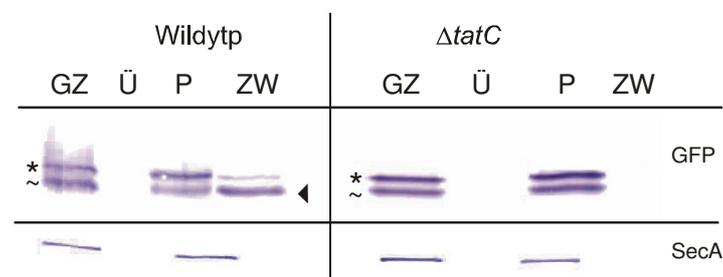


Abbildung 19: Lokalisierung des TorA-GFP Fusionsprotein mittels Zellfraktionierung. Die Fraktionierung von *S. carnosus* Wildtyp und $\Delta tatC$ -Mutante in Protoplasten (P), Zellwand (ZW) und Überstand (Ü) erfolgte wie in II.5.2.2, 5.2.4 und 5.4 beschrieben. Die in der Gesamtzell- (GZ), Protoplasten- und Zellwandfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD600 von 0,5, die Proteinmenge im Überstand 1ml Kultur mit einer OD600 von 1,5. *: TorA-GFP Vorläuferprotein, \blacktriangleright : reifes GFP, \sim : cytosolisches Abbauprodukt.

Das Fraktionierungsexperiment zeigt, daß das TorA-GFP Fusionsprotein im *S. carnosus* Wildtyp über die Cytoplasmamembran transloziert wird, wohingegen in der $\Delta tatC$ -Mutante ein cytoplasmatischer Abbau des Vorläufers stattfindet. Dies beweist den Tat-abhängigen Export von TorA-GFP in *S. carnosus*. Jedoch erfolgt wie im Falle des TorA-CGTase Fusionsproteins keine Sekretion des reifen Proteins in den Überstand, sondern eine Akkumulation des reifen Proteins im Zellwandkompartiment.

Mittels Proteinase K-Verdau wurden im Folgenden die Ergebnisse der Fraktionierung bestätigt. Durch die Proteinase K-Behandlung der Protoplasten werden alle Proteine außerhalb der Cytoplasmamembran abgebaut, wohingegen cytoplasmatisch lokalisierte Proteine durch die Cytoplasmamembran geschützt sind und daher nicht durch die Proteinase K abgebaut werden können. In Abbildung 20 ist zu erkennen, daß im Wildtyp das reife GFP durch die Proteinase K zu einem Proteinfragment mit niedrigerem Molekulargewicht abgebaut wird. Es fällt auf, daß nicht die komplette Bande, die auf Höhe der reifen Form läuft, durch die Proteinase K-Behandlung verschwindet, sondern etwa nur 2/3 des Proteins. Scheinbar findet auch im Wildtyp bereits vor der Translokation ein geringer cytoplasmatischer Abbau von TorA-GFP Vorläuferprotein statt, was in einem cytoplasmatischen und daher vor Proteinase K geschützten Abbauprodukt mit dem gleichen Molekulargewicht des reifen GFP resultiert. Das TorA-GFP Vorläuferprotein ist wie zu erwarten ebenfalls vor der Proteinase K geschützt. In der $\Delta tatC$ -Mutante sind beide Formen, das Vorläuferprotein und die Abbaubande auf Höhe des reifen GFP, vor der Proteinase K geschützt, was beweist, daß beide cytoplasmatisch lokalisiert sind. Die Verteilung des cytoplasmatischen SecA-Proteins zeigt, daß die Protoplasten intakt waren und die Triton X-Kontrolle, bei der die Protoplasten vor Proteinase K-Behandlung aufgeschlossen werden, beweist, daß ein Verdau durch Proteinase K stattfindet.

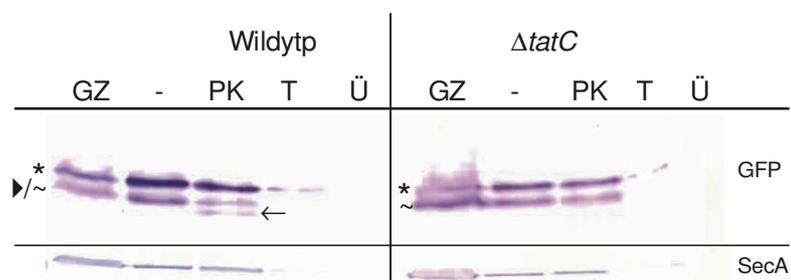


Abbildung 20: Lokalisierung der TorA-GFP Genprodukte in *S. carnosus* Wildtyp und $\Delta tatC$ -Mutante durch Proteinase K-Behandlung. Die Protoplastierung und der Proteinase K-Verdau erfolgte wie in II 5.4 und 5.7 beschrieben. Der Aufschluß der Protoplasten zum Verdau von intrazellulären Proteinen erfolgte durch Zugabe von Triton X-100 in einer Endkonzentration von 5% bevor Proteinase K zugesetzt wurde. Die Proteinmenge für die unbehandelte Gesamtzellfraktion (GZ), die ohne Proteinase K behandelten Protoplasten (-), die mit Proteinase K behandelten Protoplasten (PK) und die mit Triton X-100 aufgeschlossenen und Proteinase K behandelten Protoplasten (T) entspricht 1ml Kultur mit einer OD_{600} von 0,5, die Proteinmenge im Überstand (Ü) entspricht 1ml Kultur mit einer OD_{600} von 1,5. Die Qualität der Protoplastierung sowie die Wirkung der Proteinase K wurde anhand des cytoplasmatisch und membranständigen SecA-Proteins überprüft. *: TorA-GFP Vorläuferprotein, ▶: reifes GFP, ~: cytosolisches Abbauprodukt, →: Abbaufragment des reifen GFP durch Proteinase K-Verdau.

Diese Ergebnisse der Fraktionierung und des Proteinase K-Verdaus beweisen, daß das TorA-GFP Fusionsprotein im *S. carnosus* Wildtyp Tat-abhängig über die Cytoplasmamembran transloziert, jedoch nicht in den Kulturüberstand sekretiert wird, sondern im Zellwandkompartiment verbleibt.

1.7 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in *S. carnosus*

Die vorangegangenen Untersuchungen haben gezeigt, daß *S. carnosus* ein funktionelles Tat-System besitzt. Dieses Tat-System besitzt mindestens die Komponenten TatA und TatC, gehört also möglicherweise zur Klasse der Minimaltranslokasen, wie sie auch *S. aureus* und *B. subtilis* aufweisen. Eine Deletion des *tatC*-Gens, welches für eine essentielle Komponente aller bisher untersuchten Tat-Systeme kodiert, zeigte keine besonderen phänotypischen Auswirkungen auf *S. carnosus*. Weiterhin konnten auch keine authentischen Tat-Substrate in *S. carnosus*, weder durch Analyse der noch unvollständigen Genomsequenz noch durch Vergleich der Kulturüberstände von Wildtyp und Δ *tatC*-Mutante, gefunden werden. Möglicherweise spielt das Tat-System nur unter bislang unbekanntem Bedingungen für *S. carnosus* eine wichtige Rolle.

Zur Untersuchung der Tat-abhängigen Sekretion in *S. carnosus* wurden die Fusionsproteine TorA-CGTase und TorA-GFP, die beide das Tat-Signalpeptid TorA aus *E. coli* besitzen, verwendet. Beide Fusionsproteine wurden in *S. carnosus* Tat-abhängig über die Cytoplasmamembran transloziert, jedoch nicht in den Kulturüberstand sekretiert, sondern akkumulierten in der Zellwand. Die reife CGTase hat ein relativ hohes Molekulargewicht von ca. 70kDa, was möglicherweise ein Grund für das „Steckenbleiben“ des Proteins in der Zellwand ist. Das reife GFP dagegen hat ein nur geringes Molekulargewicht von ca. 25kDa und sollte daher theoretisch die Zellwand passieren können. Da GFP aber ebenfalls in der Zellwand steckenbleibt, müssen weitere Faktoren, wie z.B. elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem reifen Protein und der Zellwand, die Zellwandpassage verhindern. Das heißt, daß nicht nur die Größe des zu sekretierenden Proteins einen limitierenden Faktor in der Tat-abhängigen Sekretion in *S. carnosus* darstellt, sondern scheinbar auch die elektrostatischen Eigenschaften der Zellwand die Tat-abhängige Proteinsekretion beeinflussen.

2. Untersuchungen zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in *C. glutamicum*

C. glutamicum wird bereits seit vielen Jahren für die Gewinnung von Aminosäuren benutzt, ist aber im Bezug auf die sekretorische Gewinnung heterologer Proteine noch kaum untersucht worden. *C. glutamicum* gehört, wie *S. carnosus*, zu den Gram-positiven Bakterien, weist jedoch eine Besonderheit auf, die die Proteinsekretion beeinflussen könnte: *C. glutamicum* besitzt Mykolsäuren im Zellwandkompartiment, welche die Zelle wie eine äußere Membran bei Gram-negativen Bakterien anscheinend komplett umgeben. Diese zusätzliche Permeabilitätsbarriere stellt potentiell auch für die Proteinsekretion ein Hindernis dar, jedoch wurde bereits gezeigt, daß *C. glutamicum* Proteine zumindest Sec-abhängig sekretieren kann (Houssin *et al.*, 2002).

Wie auch bei *S. carnosus* war bei *C. glutamicum* nicht bekannt, ob ein funktionelles Tat-System vorhanden ist. Im Gegensatz zu *S. carnosus* ist aber das Genom von *C. glutamicum* bereits vollständig sequenziert und annotiert, was eine Suche nach den *tat*-Genen und potentiellen Tat-Substraten deutlich vereinfacht.

2.1 *C. glutamicum* verfügt über eine TatAC-Minimaltranslokase

Um die *tat*-Gene im Genom von *C. glutamicum* zu identifizieren erfolgte zunächst ein „Blast“ der *C. glutamicum* Genomsequenz gegen die Sequenzen von *tat*-Genen unterschiedlicher Bakterien, wie z.B. *E. coli* und *B. subtilis*. Dazu wurde das „Genomic Blast“-Programm von NCBI verwendet. Hiermit konnte jeweils ein *tatA*- und ein *tatC*-Gen identifiziert werden, die hintereinander, ähnlich der Anordnung der *tat*-Gene bei *S. aureus* und *S. carnosus*, auf dem Chromosom lokalisiert sind (siehe Abbildung 21). Somit besitzt auch *C. glutamicum* ein Tat-System aus der Klasse der Minimaltranslokasen.

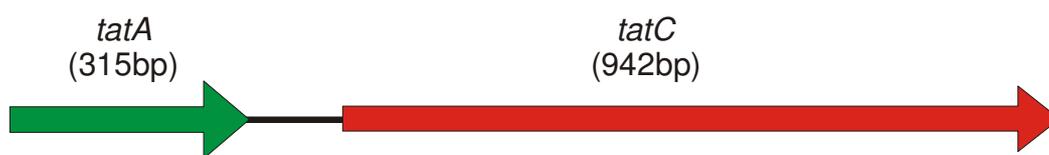


Abbildung 21: Schematische Zeichnung des *tat*-Operons von *C. glutamicum*

Zur weiteren Charakterisierung erfolgte ein Vergleich von TatA und TatC aus *C. glutamicum* mit den entsprechenden Proteinen von *M. tuberculosis*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* und *S. carnosus* auf Aminosäureebene (siehe Abbildung 22 und 23). Hierbei zeigte sich, daß die Tat-Proteine von *C. glutamicum* die größte Ähnlichkeit mit den Tat-Proteinen von *M. tuberculosis* aufwiesen (49% für TatA, bzw. 54% Identität für TatC, siehe Tabelle 5). Dies war zu erwarten, da sowohl *M. tuberculosis* wie auch *C. glutamicum* zur Gruppe der *Corynebacterianae* gehört.

	<i>M. tuberculosis</i>	<i>B. subtilis</i> (D)	<i>B. subtilis</i> (Y)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. carnosus</i>
TatA	49%	34%	29%	26%	33%	30%
TatC	54%	26%	28%	29%	25%	25%

Tabelle 5: Vergleich der Aminosäureidentitäten der *C. glutamicum* Tat-Proteine zu den Tat-Proteinen von *M. tuberculosis*, den beiden Tat-Systemen von *B. subtilis* (TatAC_D und TatAC_Y), *E. coli*, *S. aureus* und *S. carnosus*.

```

Sa  MITNTFILGITGPTSLVVISIITAIITIFGPKKLPQFGRAIGSTLKEFKSATIEDLDK----- 55
Sc  MFTNMFLVLTGPTSLVVVIAITAIITIFGPTKLPQFGRAIGSTLKEFKSAAEHIDE----- 55
Bsd MFSN-----IGIPGLILIFVIAITAIITIFGPKSLPEIGRAAKRTLLEFKSATKSLVSG---- 50
Bsy MP-----IGPGSLAVIATVALIITIFGPKKLPPELGKAAGDTLREFKNATKGLTS----- 47
Cg  -----M-SLGPWEIGIIVLLIIVLIFGAKKLPDAARSIGRSMRIFKSEVKEMNKDGDTP 52
Mt  -----MGSLSPPWHWAILAVVVIVLIFGAKKLPDAARSLGKSLRIFKSEVRELQN----- 48
Ec  -----MGGISTWQLITIAVIVVLIIFGATKLLGSIGSDLGASIKGFKKAMSDDEPK----- 49
      .           :: :: :: ::**..** . .           :: **.
```

```

Sa  ESHDTPSKESKQREQ----- 71
Sc  DSHETPSKPSSESQRKESTK----- 74
Bsd DEKEEKSAELTAVKQDKNAG----- 70
Bsy DEEE---KKKEDQ----- 57
Cg  EQQQQPQQQIAPNQIEAPQPNFEQHYQGGQQVQQPQNPQTPDYRQNYEDPNRTS 105
Mt  ENK-----AEASIEPTTP-----VQSQRVD-----PSAASGQDSTEAA--RPA 83
Ec  QDKTSQDADFTAktiADKQAD-----TNQEQAKTEDAKRHDKEQV----- 89
      :..
```

Abbildung 22: Alignment der Aminosäuresequenzen der TatA-Proteine von *S. aureus* (Sa), *S. carnosus* (Sc), *B. subtilis* TatA_D (Bsd), TatA_Y (Bsy), *C. glutamicum* (Cg), *M. tuberculosis* (Mt) und *E. coli* (Ec). Die Position der Transmembrandomäne ist durch den blauen Kasten markiert. Identische Aminosäuren sind durch einen Stern, semi-konservierte Aminosäuren durch einen Punkt und Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften durch einen Doppelpunkt markiert. Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW 1.82 aufgestellt.

```

Sa  -----MVHFSELRHRILVKILLSFVIT 21
Sc  MRHPVNPQNLSEKNQLNNRYTDTISESYQNTNINSYTSLLDHFGELELSRLIKAGIAFIIA 60
Bsd -----MDKKETHLIGHLEELRRRIIVTLAAFFLF 29
Bsy -----MTRMKVNQMSLLEHIAELRKRLLIVALAFVVF 32
Cg  -----MSIVEHIKEFRRRLLIALAGILVG 24
Mt  -----MRAAGLLKRLNPNRRSRVNPDATMSLVDHLTELRLRLISLAAIIVT 48
Ec  -----MSVEDTQPLITHLIELRKRLLNGLIIVIVT 30
      : * : * : * * : : . . . .
```

```

Sa  VIVVYVSSFVWMTPEIITYITRAH-----VSLHAFSFTEMIQIYVMI 62
Sc  VLIITYISSHWIHPFIQEIKRGN-----MTLHAFSFTEMIQIYVMI 101
Bsd LITAFLFVQDIYDWLIRDLDGKL-----AVLGP---SEILWVYVML 67
Bsy FIAGFFLAKPIIVYLQETDEAKQ-----LTLNAFNLTDPPLYVFMQF 73
Cg  TIIGFIWYDFSFWQIPTLGELLRDPYCSLPAESRWAMSDSEECRLLATGPFDPFMLRLKV 84
Mt  TIFGFVWYSHSIFGLDSLGEWLRHPYCALPQSARADISADGECRLLATAPFDQFMLRLKV 108
Ec  FLCIVYFANDIYHLVSAPLIKQLP-----QGSTMIAATDVASPFPTPIKL 74
      : . . . .
```


2.2.1 Konstruktion einer *C. glutamicum* Δ tatAC-Mutante

Zur Konstruktion einer *C. glutamicum* *tat*-Mutante wurde das komplette *tatAC*-Operon deletiert. Dazu wurde das Wildtyp *tatAC*-Operon auf dem Chromosom gegen ein inaktiviertes *tatAC**-Operon, welches nur noch aus den ersten 17 Basenpaaren des *tatA*-Gens und den letzten 35 Basenpaaren des *tatC*-Gens besteht, ausgetauscht. Dies erfolgte mit einem Integrationsvektor, welcher das inaktivierte *tatAC**-Operon trägt (pK19*mobsacBtat**). Dieser Integrationsvektor ist ein pUC19 Derivat aus *E. coli* und trägt ein Gen für Kanamycinresistenz. Aufgrund seines *E. coli* Replikons kann pK19*mobsacB* nicht in *C. glutamicum* replizieren und kann daher nur Kanamycinresistenz vermitteln, wenn er ins Chromosom integriert. Ferner liegt auf diesem Vektor das Gen für die Levansucrase (*sacB*). Die Levansucrase bildet aus Sucrose Heteropolymere, die aufgrund ihrer Akkumulation toxisch auf die Zellen wirken, so daß Zellen, die das *sacB*-Gen enthalten, nicht in Medien mit Sucrose wachsen können.

Zur Konstruktion des *tatAC**-Operons wurden mittels PCR ein 400bp großer upstream Bereich des *tatAC*-Operons inklusive der ersten 17 Basenpaare des *tatA*-Gens (Fragment 1) und die letzten 35 Basenpaaren des *tatC*-Gens gefolgt von ca. 400bp des downstream Bereichs des *tatAC*-Operons (Fragment 2) mit der chromosomalen DNA von *C. glutamicum* als ‚template‘-DNA und den Primern *tatACg*-for und *tatACg*-rev bzw. *tatCCg*-for und *tatCCg*-rev amplifiziert. Die Primer *tatACg*-rev und *tatCCg*-for wurden so konstruiert, daß sie komplementäre DNA-Bereiche aufweisen. So konnten die beiden überlappenden PCR-Fragmente 1 und 2 als ‚template‘ für eine Crossing-over PCR eingesetzt werden, bei der mit den Primern *tatACg*-for und *tatCCg*-rev ein Fragment amplifiziert wurde, das aus dem upstream und downstream Bereich inklusive der ersten 17 und 35 letzten Basenpaare des *tatAC*-Operons besteht. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen SalI und BamHI geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen pK19*mobsacB*-Vektor ligiert.

C. glutamicum Wildtyp wurde mit dem Vektor pK19*mobsacBtat** transformiert und auf LBHIS-Agarplatten mit Kanamycin als Antibiotikum ausplattiert. Nur die *C. glutamicum* Zellen, bei denen mittels homologer Rekombination via eines doppelten Crossing-overs über den upstream Bereich und den ersten 17bp des *tatA*-Gens oder dem downstream Bereich und den letzten 35bp des *tatC*-Gens eine Integration des Vektors ins Chromosom erfolgt ist, können auf diesen Selektionsplatten wachsen (siehe Abbildung 24A und B). Die Integration des Vektors in das Chromosom konnte mittels PCR in allen Klonen, die auf den Selektionsplatten gewachsen sind, bestätigt werden. Anschließend wurden die Klone über Nacht in LBHIS-Flüssigmedium ohne Kanamycin kultiviert, was eine Exzision des Integrationsvektors aus dem Chromosom ermöglicht. Diese Plasmidexzision erfolgt durch eine homologe Rekombination zwischen dem aktiven und dem inaktiven *tat*-Operon auf dem Chromosom, wobei entweder das Wildtyp *tatAC*-Operon auf dem Chromosom verbleibt oder, wie gewollt, das inaktivierte *tatAC**-Operon (Abbildung 24, C). Zur Selektion der Klone, bei denen tatsächlich während der über Nacht Kultivierung in Flüssigmedium eine Plasmidexzision stattgefunden hat, wurden die Übernachtskulturen auf LBHIS-Agarplatten mit 20% Sucrose ausplattiert. Zellen, die noch über den integrierten Vektor verfügen, können aufgrund der Levansucrase nicht auf den Sucrose-Platten wachsen. Da das Gen für die

Levansucrase auffallend häufig mutiert und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auch Klone auftreten, die trotz integriertem Vektor auf Sucrose-Platten wachsen können, wurden zur Kontrolle die Zellen auf der Sucrose-Platte auf LBHIS-Agarplatten mit 20% Sucrose und Kanamycin replikaplattiert. Die Zellen, die auf beiden Platten wuchsen, hatten einen Vektor im Chromosom integriert, bei dem das *sacB*-Gen mutiert war. Nur die Zellen, die nach der Replikaplattierung auf den LBHIS-Agarplatten mit 20% Sucrose und Kanamycin nicht wuchsen, hatten auch tatsächlich den Integrationsvektor verloren.

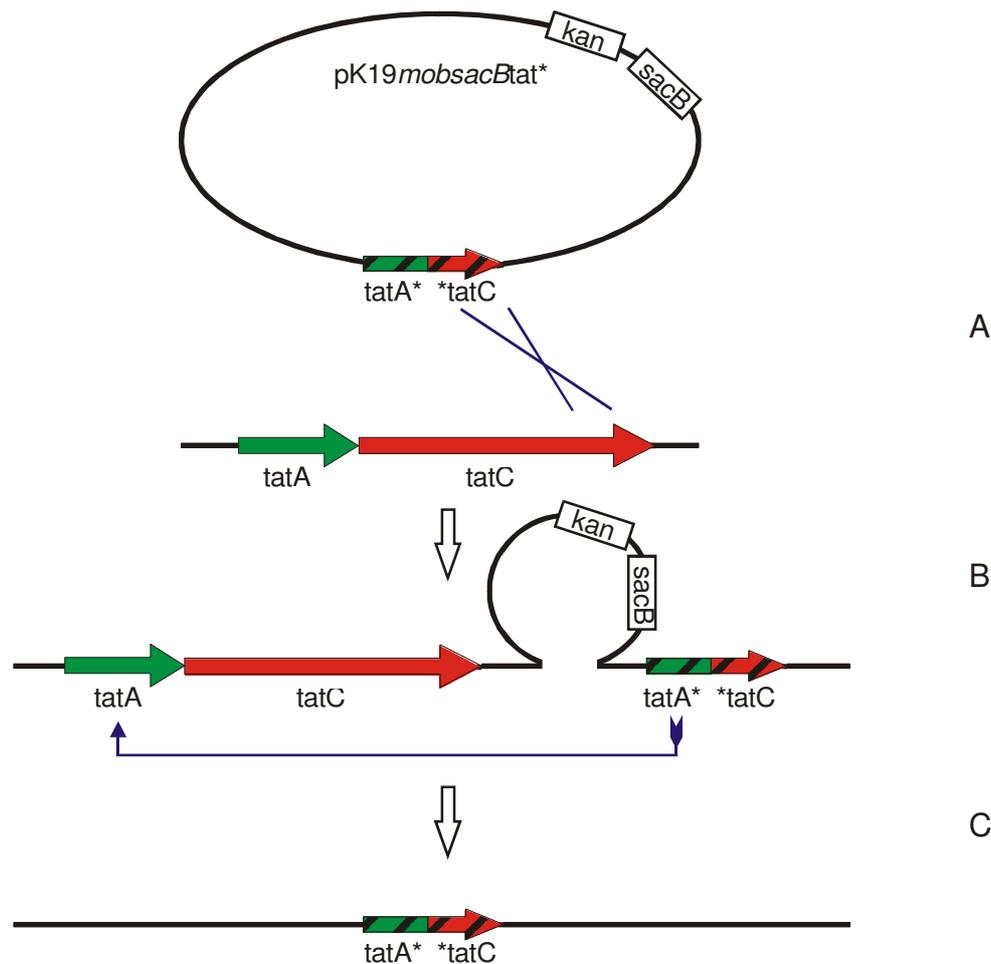


Abbildung 24: Schema zur Deletion des *tatAC*-Operons von *C. glutamicum*. Durch homologe Rekombination zwischen dem inaktivierten *tatAC*-Operon auf dem Plasmid und dem *tat*-Operon auf dem Chromosom (A) integriert der Vektor *pK19mobsacBtat** in das Chromosom (B). Homologe Rekombination zwischen dem inaktivierten *tat*-Operon und dem Wildtyp *tat*-Operon auf dem Chromosom führt zur Exzision des Plasmids (C). Bei der Exzision verbleibt entweder wieder das Wildtyp *tat*-Operon oder das inaktivierte *tat*-Operon auf dem Chromosom (letzteres ist in der Abbildung dargestellt). Weitere Erklärung im Text.

Bei den auf Plasmidexzision selektierten Klonen konnte nun eine von zwei möglichen Situationen auf dem Chromosom vorliegen: Entweder erfolgte durch die Plasmidexzision die Wiederherstellung der Wildtypsituation, oder das *tatAC*-Operon wurde durch die zweite homologe Rekombination, wie gewollt, deletiert. Zur Überprüfung, welche der Situationen vorlag, wurde die chromosomale DNA der selektierten Klone isoliert und mittels PCR und Southern Blot überprüft. In der PCR-Überprüfung wurde der chromosomale Bereich, auf dem

das *tatAC*-Operon lokalisiert ist, mittels PCR mit der chromosomalen DNA der selektierten Klone als „template“ und den Primern CgDel-for und CgDel-rev amplifiziert. Die Primer CgDel-for und CgDel-rev binden 500bp upstream des *tatAC*-Operon, bzw. 600bp downstream und sollten daher, da das *tatAC*-Operon eine Größe von ca. 1,5kb hat, in der PCR mit chromosomaler DNA aus dem Wildtyp ein Fragment von 2,6kb Größe amplifizieren. Das inaktivierte *tatAC**-Operon ist um ca. 1,4kb kleiner als intakte *tatAC*-Operon, und daher sollte bei den Klonen, bei denen ein Austausch des Operons stattgefunden hat, ein nur ca. 1,2kb großes Fragment in der PCR amplifiziert werden. In Abbildung 25(A) ist das Ergebnis der PCR-Untersuchung zu sehen. Im Gegensatz zum Wildtyp, wo die PCR erwartungsgemäß ein Fragment von 2,6kb ergab, wurde bei den drei ausgewählten Klonen ein Fragment von 1,2kb Größe amplifiziert. Zur Überprüfung mittels Southern Blot wurde die chromosomale DNA des Klons Nummer 1 aus der PCR-Überprüfung und die des Wildtyps als Kontrolle zum einen mit dem Restriktionsenzym EcoRI und zum anderen mit BamHI verdaut. Als Sonde wurde Fragment 1 verwendet (siehe oben), welches aus dem 400bp großen upstream Bereich des *tatAC*-Operons inklusive der ersten 17 Basenpaare des *tatA*-Gens besteht. Durch den EcoRI-Verdau liegt im Wildtyp der Bereich, den die Sonde im *C. glutamicum* Genom bindet, auf einem 3,4kb großen Fragment, durch den BamHI-Verdau auf einem 1,8kb großen Fragment. Durch die Deletion des *tatAC*-Operons sollte die Sonde in der Δ *tatAC*-Mutante nach dem EcoRI-Verdau ein 2kb großes Fragment des Genoms binden und nach dem BamHI-Verdau ein 2,6kb großes Fragment, was auch wie in Abbildung 25(B) zu sehen ist, erfolgte. Die PCR- und Southern Blot-Untersuchungen zeigten eindeutig, daß das Wildtyp *tatAC*-Operon gegen das deletierte *tatAC*-Operon ausgetauscht wurde und somit die Deletion von *tatAC* in *C. glutamicum* erfolgreich war.

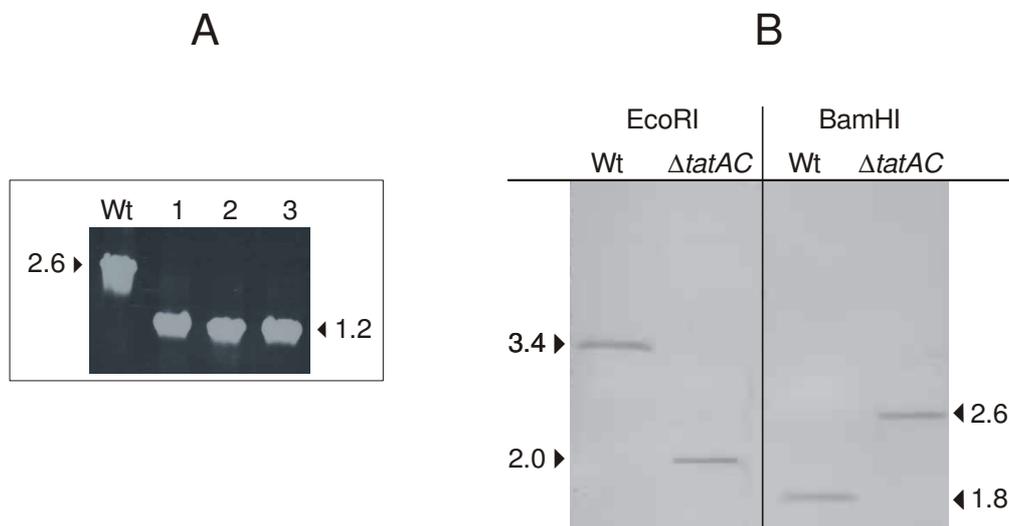


Abbildung 25: PCR (A) und Southern Blot-Analyse (B) der auf Plasmidexzision selektierten Klone. Wt: Wildtyp-Kontrolle, 1 – 3: ausgewählte Sucrose-resistente und Kanamycin-sensitive Klone.

Der Austausch des Wildtyp *tatAC*-Operons durch das inaktivierte *tatAC*-Operon wurde abschließend noch durch Sequenzierung eindeutig verifiziert. Klon 1 wurde für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Zur Vereinfachung wird der *C. glutamicum* Stamm im Folgenden nur noch als Δ *tatAC*-Mutante bezeichnet.

2.2.2 Die *C. glutamicum* Δ *tatAC*-Mutante zeigt erkennbare phänotypische Unterschiede zum Wildtypstamm

Schon bei der Konstruktion der Δ *tatAC*-Mutante fiel auf, daß bei der Selektionierung nach solchen Klonen, bei denen die Plasmidexzision stattgefunden hatte, zwei Klassen von Klonen mit unterschiedlichem Wachstumsverhalten auftraten: schnell wachsende Klone, die bereits 16h nach Ausplattieren sichtbar waren und langsam wachsende Klone, die erst nach ca. 24h sichtbar wurden. Es stellte sich im Nachhinein heraus, daß es sich bei den schnell wachsenden Klonen um solche handelte, bei denen durch die Plasmidexzision wieder die Wildtypsituation des *tatAC*-Operons hergestellt wurde, während bei den langsam wachsenden Klonen die Deletion des *tatAC*-Operons erfolgt war. Ein zunächst lichtmikroskopischer Vergleich von *C. glutamicum* Wildtyp und Δ *tatAC*-Mutante zeigte keinen offensichtlichen Unterschied in der Zellmorphologie (Abbildung 26, oben). Ein solcher Unterschied in der Zellmorphologie zwischen Wildtyp und *tat*-Mutante ist z. B. bei *E. coli* zu beobachten (siehe auch III.1.3).

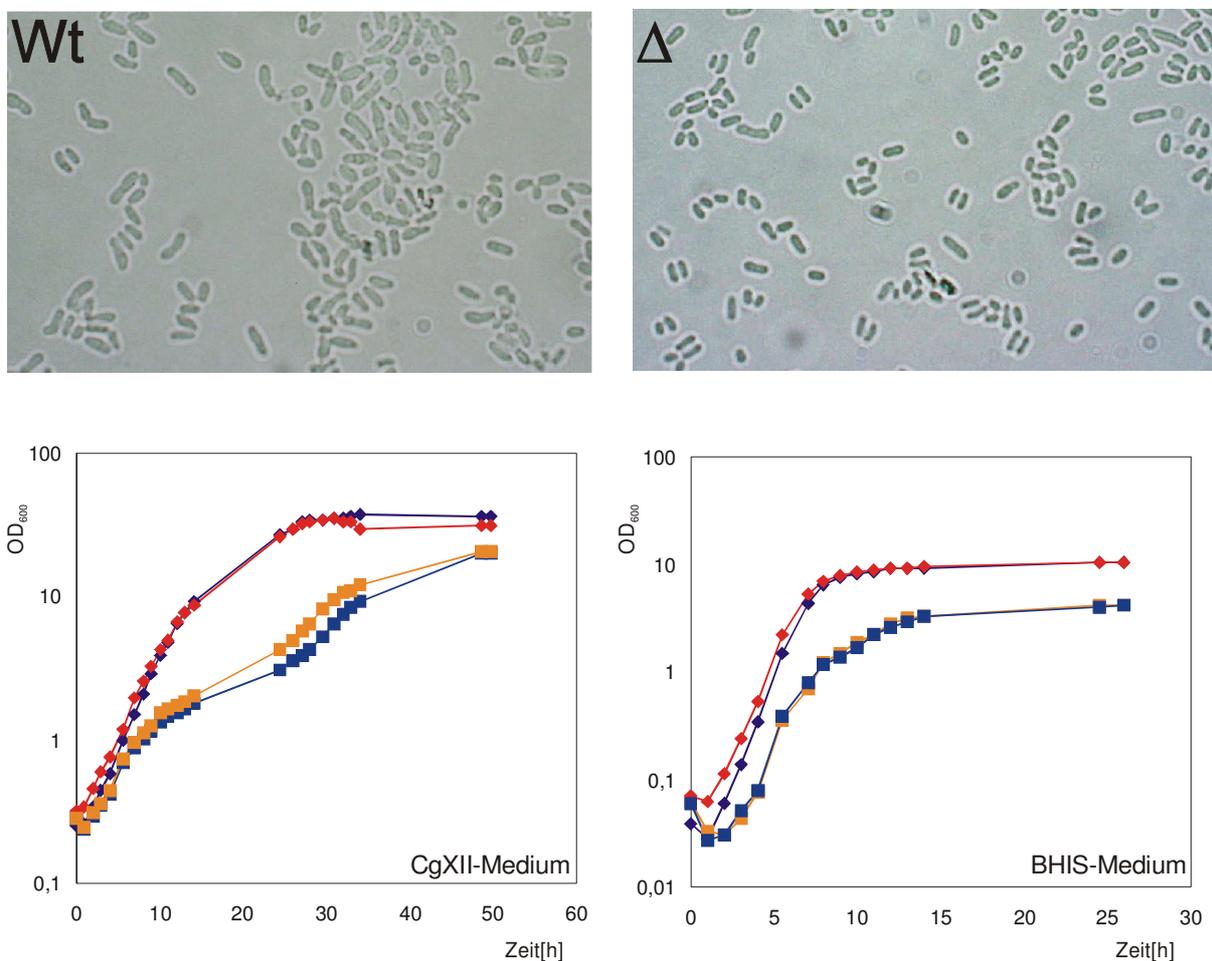


Abbildung 26: Vergleich der Phänotypen von *C. glutamicum* Wildtyp und Δ *tatAC*-Mutante. Oben: Mikroskopische Aufnahme von Wildtyp (Wt) und Δ *tatAC*-Mutante (Δ). Unten: Wachstumsvergleich von *C. glutamicum* Wildtyp und Δ *tatAC*-Mutante in CgXII-Minimal- und BHIS-Komplexmedium. *C. glutamicum* Wildtyp (\blacklozenge und \blacklozenge) und Δ *tatAC*-Mutante (\blacksquare und \blacksquare) wurden über Nacht als Vorkultur in 5ml BHIS-Komplexmedium angezogen und zu Beginn der Wachstumsmessung für das BHIS-Komplexmedium auf eine OD_{600} von 0,05 und für das CgXII-Medium auf eine OD_{600} von 0,5 angeimpft.

Das Wachstum von *C. glutamicum* Wildtyp und Δ tatAC-Mutante unterschied sich dagegen deutlich. So zeigt die Δ tatAC-Mutante sowohl in Komplex- als auch in Minimalmedium ein deutlich langsames Wachstum als der Wildtyp. Weiterhin erreichte die Δ tatAC-Mutante in der stationären Phase im Minimalmedium eine maximale OD₆₀₀ von ca. 12, während der Wildtyp eine OD₆₀₀ von über 20 erreichte. Auch im Komplexmedium erreichte die Δ tatAC-Mutante mit einer OD₆₀₀ von 5 nur etwa die Hälfte der maximalen OD₆₀₀, die der Wildtyp mit einer OD₆₀₀ von 11 erreichte (siehe Abbildung 26, unten).

Zu Beginn der Wachstumsuntersuchungen fiel ebenfalls auf, daß die Δ tatAC-Mutante, im deutlichen Kontrast zum Wildtyp, nicht in der Lage ist, in LB-Medium zu wachsen. Erst die Zugabe von Glucose in einer Endkonzentration von 0,5% ermöglichte ein Wachstum in LB-Medium. Erstaunlicherweise übertraf das Wachstum der Δ tatAC-Mutante in LB-Medium mit Glucose das Wachstum in BHIS-Komplexmedium deutlich (siehe Abbildung 27A). *C. glutamicum* Wildtyp, welcher in LB- und BHIS-Medium ein in etwa gleiches Wachstumsverhalten aufweist, zeigt ebenfalls eine Verbesserung des Wachstums in LB-Medium, wenn Glucose zugesetzt wird. Anscheinend ist die *C. glutamicum* Δ tatAC-Mutante auf Glucose als Kohlenstoffquelle angewiesen. In normalem LB-Medium, welches nur geringe Mengen an Glucose enthält, erfolgt kein Wachstum. Erst durch Zugabe von Glucose - BHIS-Medium enthält bereits mind. 0,15% Glucose - ist die Δ tatAC-Mutante in der Lage zu wachsen. Der Wildtyp ist auf Glucose nicht angewiesen, jedoch zeigt er mit Glucose ein besseres Wachstum. Diese Ergebnisse deuten an, daß das Tat-System in *C. glutamicum* anscheinend einen direkten oder indirekten Einfluß auf die Aufnahme oder die Verwertung von Kohlenstoffquellen nimmt.

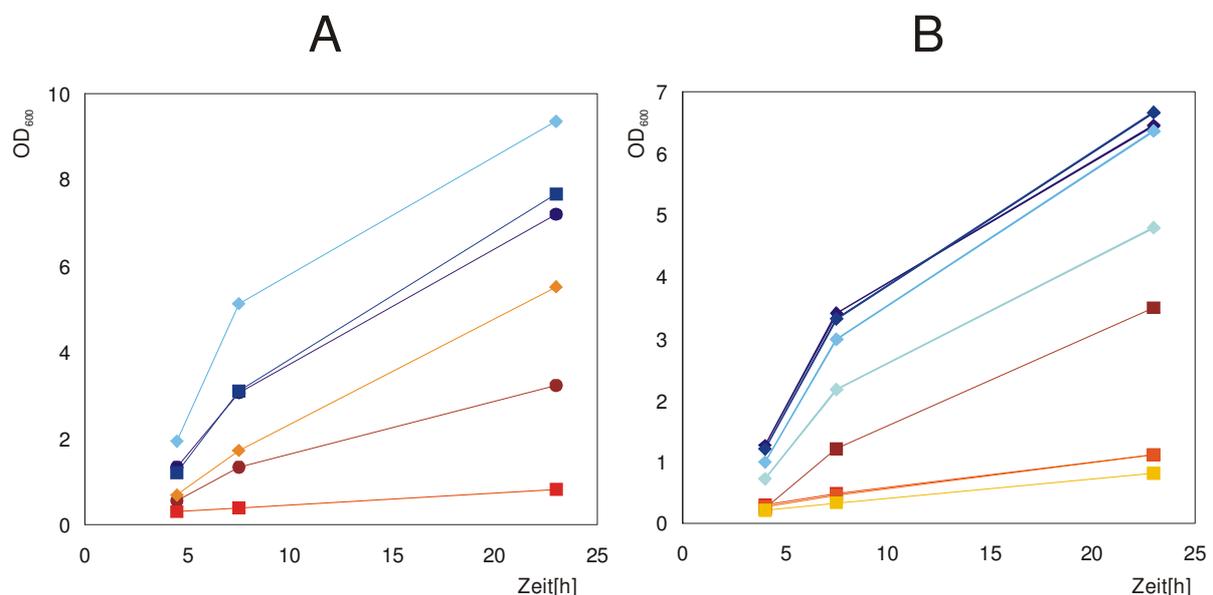


Abbildung 27: Wachstumsvergleich *C. glutamicum* Wildtyp und Δ tatAC-Mutante. A: Wildtyp und Δ tatAC-Mutante in BHIS- (● bzw. ●), in LB- (■ bzw. ■) und LB-Medium mit 0,5% Glucose (◆ bzw. ◆). B: Wildtyp und Δ tatAC-Mutante in BHIS-Medium mit 0,1M (◆ bzw. ■), 0,2M (◆ bzw. ■), 0,5M (◆ bzw. ■) und 1M NaCl-Konzentration (◆ bzw. ■). Die Stämme wurden über Nacht in BHIS-Medium angezogen, gewaschen und auf eine OD₆₀₀ von 0,05 in dem jeweiligen Medium angeimpft.

In einem weiteren Experiment zeigte sich, daß die *C. glutamicum* Δ tatAC-Mutante unter osmotischem Streß nicht mehr wachsen kann: Wird die Osmolalität des Mediums durch geringe Mengen an NaCl erhöht, zeigt die Δ tatAC-Mutante, im Gegensatz zum Wildtyp, einen deutlichen Wachstumsdefekt. In Abbildung 27B ist zu sehen, daß bereits eine NaCl-Konzentration von 0,1M das Wachstum komplett verhindert, wohingegen das Wachstum des Wildtyps erst ab einer NaCl-Konzentration von 0,5M beeinträchtigt wird. Dies ist ein Indiz dafür, der Tat-Weg auch an der Reaktion der Zelle auf osmotischen Streß, direkt oder indirekt, beteiligt ist.

Diese phänotypischen Untersuchungen der Δ tatAC-Mutante haben deutlich gezeigt, daß der Tat-Weg offensichtlich eine wichtige Rolle für *C. glutamicum* spielt. Nicht nur für das Wachstum der Zellen, sondern auch für die Kohlenstoffaufnahme oder -verwertung und für die Reaktion auf osmotischen Streß ist ein funktioneller Tat-Weg von Bedeutung. Dies steht bislang in einem deutlichen Kontrast zu *S. carnosus*, wo eine Inaktivierung des Tat-Weges offensichtlich keinerlei Auswirkung, zumindest unter den in dieser Arbeit getesteten Bedingungen, auf den Organismus hat.

2.3 *C. glutamicum* verfügt über ein funktionelles Tat-System mit mindestens einem authentischen Tat-Substrat

2.3.1 Identifizierung von potentiellen Tat-Substraten in *C. glutamicum*

Die vorangegangenen Untersuchungen haben gezeigt, daß das Tat-System von *C. glutamicum* offensichtlich, unter den verschiedenen Bedingungen, eine wichtige Rolle spielt. Es ist daher davon auszugehen, daß auch authentische Tat-Substrate vorhanden sind. Zur Identifizierung solcher Substrate wurden die Proteine der Kulturüberstände von *C. glutamicum* Wildtyp und Δ tatAC-Mutante mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Comassie Blau-Färbung auf Unterschiede in ihrem Proteinbandenmuster hin untersucht. Weiterhin bot sich die zusätzliche Option an, die annotierte Genomsequenz von *C. glutamicum* nach Signalsequenzen mit einem potentiellen Zwillingsargininmotiv zu durchsuchen. Beide Methoden haben ihre Vor- und Nachteile. So werden beim Vergleich der Proteinbandenmuster - wie bereits unter III.1.4 erwähnt - nicht zwangsläufig auch die Tat-Substrate entdeckt, die nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen synthetisiert und transloziert werden. Ein Vorteil dieser Methode ist aber, daß theoretisch auch solche Tat-Substrate identifiziert werden könnten, die kein typisches Zwillingsargininmotiv aufweisen und daher durch eine Sequenzanalyse nicht entdeckt würden. Der Vorteil der Sequenzanalyse ist, daß alle Tat-Substrate, die ein Konsensus Zwillingsargininmotiv aufweisen auch entdeckt würden. Die Schwierigkeit kann jedoch darin liegen, aus einem möglicherweise großen Pool an Proteinen, die ein Zwillingsargininmotiv aufweisen, diejenigen Proteine herauszufiltern, die auch tatsächlich über den Tat-Weg exportiert werden. Denn das Vorkommen von Zwillingsargininresten in der Signalsequenz ist nicht allein auf Tat-Signalsequenzen beschränkt, wie u. a. Untersuchungen bei *B. subtilis* zeigen. Durch Sequenzanalyse wurden in *B. subtilis* 69 potentielle Tat-

Substrate mit einem RR oder KR-Motiv gefunden (Jongbloed *et al.*, 2002), tatsächlich sind aber nur zwei der 69 Proteine auch wirklich Tat-Substrate (Jongbloed *et al.*, 2004).

In der annotierten Sequenz von *C. glutamicum* wurde nun mit Hilfe der Suchmaske „S/T-R-R“ nach potentiellen Tat-Substraten gesucht. Aus den 85 gefundenen Proteinen wurden diejenigen herausgefiltert und verworfen, bei denen das Zwillingsarginin nicht im N-terminalen Bereich des Proteins lag, also nicht im potentiellen Signalpeptid. Unter den übrigen Kandidaten besaßen nur die folgenden Proteine ein klassisches Signalpeptid und darüber hinaus ein Zwillingsargininmotiv, welches dem Konsensusmotiv (S/T-R-R-x-F-L-K) sehr ähnlich ist: NCgl2937 (Rieske-Protein), NCgl2865 (Laccase) und NCgl2185 (PhoD), wobei das zuletzt genannte PhoD-Protein in dieser Arbeit genauer untersucht wurde (siehe Abbildung 29A). Dieses Protein gehört zur Klasse der Phosphatasen und weist eine hohe Ähnlichkeit zur Phosphodiesterase PhoD aus *B. subtilis* auf. PhoD ist eines der beiden Substrate in *B. subtilis*, das definitiv Tat-abhängig exportiert wird. Somit war es sehr wahrscheinlich, daß das PhoD-Homolog in *C. glutamicum* ebenfalls Tat-abhängig exportiert wird.

Zum Proteinbandenvergleich wurden in drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen die Proteine der Kulturüberstände von *C. glutamicum* Wildtyp und Δ *tatAC*-Mutante, die über Nacht in BHIS-Medium kultiviert worden waren, isoliert, mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt und mit Comassie Blau angefärbt. In Abbildung 28 ist zu sehen, daß in allen drei Fällen im Proteinbandenmuster der Δ *tatAC*-Mutante ein Protein von ca. 22kDa Größe im Vergleich zum Proteinbandenmuster des Wildtyps fehlt. Dies bedeutet, daß die Deletion der *tat*-Gene in *C. glutamicum*, zumindest unter den hier gewählten Bedingungen, die Sekretion eines 22kDa großes Protein in den Kulturüberstand verhindert. Dieses Protein stellt somit ein potentielles Tat-Substrat dar.

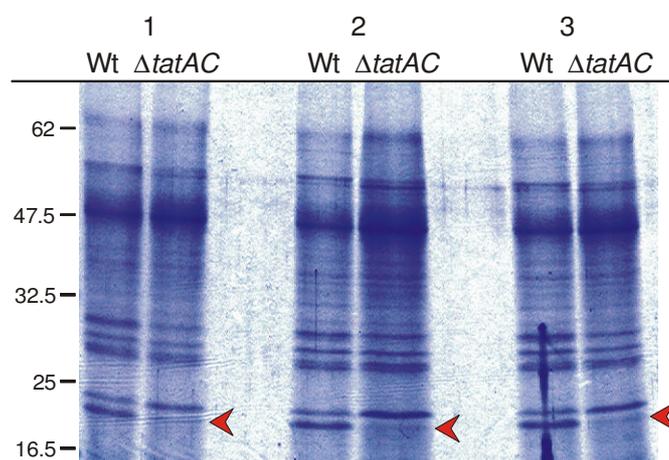


Abbildung 28: Proteinbandenvergleich: Vergleich der Proteine des Kulturüberstandes zwischen *C. glutamicum* Wildtyp und Δ *tatAC*-Mutante. Links ist die Angabe des Molekulargewichts zu sehen. 1 - 3: unabhängige Ansätze. Der rote Pfeil markiert die Proteinbande die in der Δ *tatAC*-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp fehlt.

Die Identifizierung dieses Proteins erfolgte durch Peptidmassenbestimmung mittels MALDI-TOF Massenspektroskopie. Dazu wurde das Protein aus dem Comassie-Gel isoliert und mit Trypsin verdaut. Die Proteinfragmente, die durch den Trypsinverdau entstanden,

wurden mittels MALDI-TOF Massenspektroskopie bestimmt und zur Suche in einer lokalen Datenbank mit 3312 *C. glutamicum* Proteinen genutzt. Dabei stellte sich heraus, daß es sich hierbei um ein hypothetisches Protein namens NCgl1588 handelt. Das Protein 1588 besitzt ein klassisches Signalpeptid, jedoch ein untypisches Zwillingsargininmotiv (siehe Abbildung 29). Es besitzt anstelle des Zwillingsarginin ein Arginin-Threonin und weist, bis auf das Serin zu Beginn des Motivs, keine weiteren Ähnlichkeiten zum Tat-Konsensusmotiv auf.

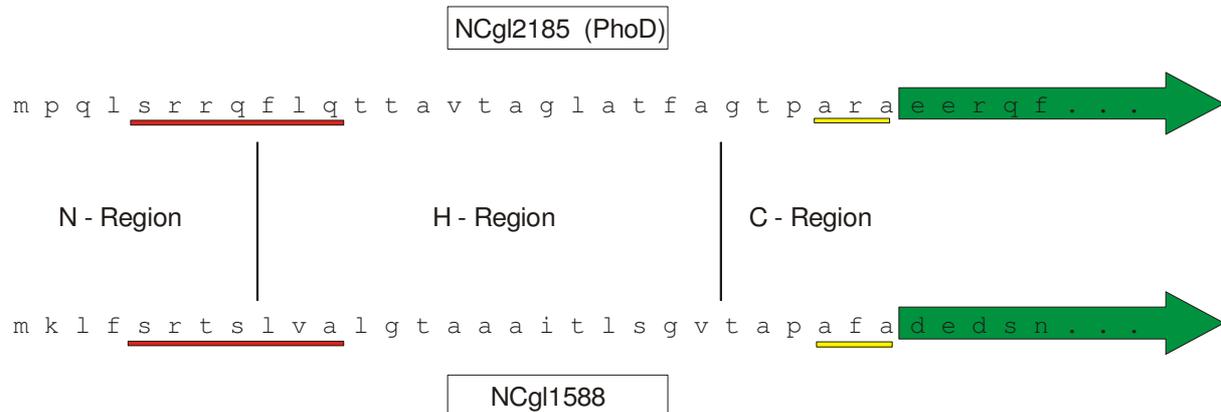


Abbildung 29: Schematische Darstellung von PhoD_{Cg} (NCgl2185) und des Proteins 1588 (NCgl1588). Zu sehen sind die Aminosäuresequenzen der Signalpeptide und die ersten fünf Aminosäuren des reifen Teils (grüner Pfeil). Die Aufteilung der Signalpeptide in die charakteristischen drei Regionen (n-, h- und c-Region) erfolgte auf Grundlage des Programms SignalP 3.0. Die mutmaßlichen Zwillingsargininmotive sind rot, das SPase I-Erkennungsmotiv ist gelb unterstrichen.

2.3.2 Konstruktion der Fusionsgene *phoD_{Cg}-gfp* und *1588_{Cg}-gfp*

Sowohl der Proteinbandenvergleich der Kulturüberstände von Wildtyp und Δ *tatAC*-Mutante wie auch die Sequenzanalysen führten zur Identifizierung von potentiellen Tat-Substraten. Es sollte nun überprüft werden, ob die Signalpeptide der potentiellen Tat-Substrate PhoD_{Cg} und 1588 tatsächlich ein Targeting an die Tat-Translokase vermitteln und einen Tat-abhängigen Export des reifen Proteins einleiten. Dazu wurden die Signalpeptide der beiden potentiellen Tat-Substrate inklusive der ersten vier Aminosäuren der jeweiligen reifen Teile mit dem GFP-Protein fusioniert (PhoD_{Cg}-GFP und 1588_{Cg}-GFP) und der Export dieser Fusionsproteine in *C. glutamicum* Wildtyp und Δ *tatAC*-Mutante untersucht.

Die Fusion der Signalsequenzen mit dem *gfp*-Gen wurde mittels Crossing-over PCR durchgeführt (siehe Abbildung 18A und B). Dazu wurde zunächst die Signalsequenz des Gens, welches für PhoD kodiert bzw. des Gens, welches für das Protein 1588 kodiert, inklusive einer Konsensus-RBS für *C. glutamicum* (AAGGAGATATAGAT) mittels PCR mit der chromosomalen DNA von *C. glutamicum* als ‚template‘ und den Primern Cg2185ss-for und Cg2185(+4)ss-rev bzw. Cg1588ss-for und Cg1588ss(+4)-rev amplifiziert. Weiterhin wurde das *gfp*-Gen ohne Startcodon mittels PCR mit dem Vektor pGFP_{uv} als ‚template‘ und den Primern GFP(maless)-for und CgGFP-rev amplifiziert. Die Primer Cg2185ss-rev bzw. Cg1588ss-rev und GFP(maless)-for wurden so konstruiert, daß sie einen überlappenden Bereich aufweisen. So konnten die PCR-Fragmente (*phoD_{Cg}* und *gfp* bzw. *1588_{Cg}* und *gfp*) als ‚template‘ für eine Crossing-over PCR eingesetzt werden, bei der mit den Primern

Cg2185ss-for bzw. Cg1588ss-for und CgGFP-rev ein Fragment amplifiziert wurde, welches aus der Signalsequenz des *phoD_{Cg}*-Gens bzw. der Signalsequenz des *1588_{Cg}*-Gens, inklusive der Basenpaare, die für die ersten vier Aminosäuren des reifen Teils des jeweiligen Proteins kodieren, und dem *gfp*-Gen besteht. Das PCR-Produkt *phoD_{Cg}-gfp* wurde mit KpnI und EcoRI geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen pEKEx2 Vektor ligiert (pEKEx2PhoD_{Cg}GFP). Das PCR-Produkt *1588_{Cg}-gfp* wurde mit SbfI und EcoRI geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen pEKEx2 Vektor ligiert (pEKEx21588_{Cg}GFP). Nach Sequenzierung der Genfusionen, wurden Wildtyp und Δ *tatAC*-Mutante von *C. glutamicum* mit dem Vektor pEKEx2PhoD_{Cg}GFP bzw. mit pEKEx21588_{Cg}GFP transformiert und Expression und Export der Fusionsproteine untersucht.

2.3.3 Untersuchungen zur Tat-Abhängigkeit des Exports von PhoD_{Cg}- und 1588_{Cg}-GFP

Handelt es sich bei PhoD_{Cg} und 1588_{Cg} tatsächlich um Tat-Substrate, dann sollten die Fusionsproteine PhoD_{Cg}-GFP und 1588_{Cg}-GFP in der *C. glutamicum* Δ *tatAC*-Mutante, im Gegensatz zum Wildtyp, nicht exportiert werden. Das Exportverhalten der beiden Fusionsproteine in *C. glutamicum* Wildtyp und Δ *tatAC*-Mutante wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse untersucht. Dazu wurden die Proteine der Zellen und des Überstandes getrennt aufgetragen, um eine Lokalisation der Proteine zu ermöglichen. In Abbildung 30 ist zu sehen, daß das 1588_{Cg}-GFP Fusionsprotein als reife Form sowohl im Wildtyp wie auch in der Δ *tatAC*-Mutante im Überstand vorlag, was einen Tat-abhängigen Export ausschließt. Weiterhin konnte der Vorläufer des 1588_{Cg}-GFP Fusionsprotein nicht in der Zellfraktion detektiert werden, was für eine für Sec-Substrate typische, sehr schnelle Prozessierung spricht. Es fällt auf, daß die Menge an reifem Protein, welches in der Δ *tatAC*-Mutante sekretiert wird, deutlich geringer ist, als dies im Wildtyp der Fall ist. Möglicherweise beeinflussen hier Sekundäreffekte der *tatAC*-Deletion den Export oder auch die Synthese des Sec-abhängigen 1588_{Cg}-GFP Fusionsproteins.

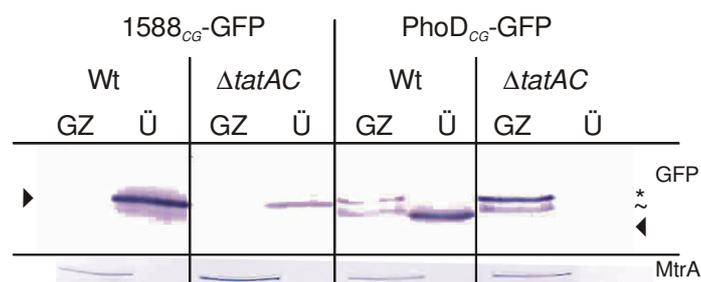


Abbildung 30: Lokalisierung der PhoD_{Cg}- und 1588_{Cg}-GFP Genprodukte. Die Isolierung der Proteine des Gesamtzellextraktes (GZ) und des Überstandes (Ü) erfolgte wie in II.5.2.3 und 5.2.4 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5, die Proteinmenge im Überstand 1ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1,0. *: PhoD_{Cg}-GFP Vorläuferprotein, ▶: reifes GFP, ~: cytosolisches Abbauprodukt.

Das PhoD_{C_g}-GFP Fusionsprotein zeigt ein deutlich anderes Exportverhalten als das 1588_{C_g}-GFP Fusionsprotein. So erfolgt nur im *C. glutamicum* Wildtyp eine Sekretion von reifem GFP, in der Δ tatAC-Mutante konnte kein Protein im Überstand detektiert werden. Sowohl im Wildtyp als auch in der Δ tatAC-Mutante sind der Vorläufer und ein Abbauprodukt in der Zellfraktion sichtbar. In der Δ tatAC-Mutante ist, im Vergleich zum Wildtyp, eine erhöhte Akkumulation an Vorläuferprotein und leicht erhöhte Menge an cytoplasmatischen Abbauprodukt zu erkennen, was beides auf den Exportblock zurückzuführen ist.

Um sicherzustellen, daß die hier beobachtete Sekretion von reifem GFP nicht auf Zell-Lyse zurückzuführen ist, wurde zusätzlich die Verteilung des cytoplasmatischen MtrA-Proteins in den Gesamtzell- und Überstandsproben untersucht. Da dieses nur im Cytoplasma detektiert wurde, kann eine Zell-Lyse ausgeschlossen werden.

Die Exportuntersuchungen haben deutlich gezeigt, daß das 1588_{C_g}-GFP Fusionsprotein unabhängig vom Vorhandensein der *tat*-Gene exportiert wird, also klar Sec-abhängig ist. PhoD_{C_g}-GFP dagegen wird strikt abhängig vom Vorhandensein der *tat*-Gene exportiert. Aus diesem Befund kann man darüber hinaus schließen, daß *C. glutamicum* über ein funktionelles Tat-System verfügt. Demnach ist das authentische 1588_{C_g}-Protein wahrscheinlich ein Sec-Substrat, das authentische PhoD_{C_g} dagegen ein Tat-Substrat. Die möglichen Gründe, warum das Sec-Substrat 1588 im Überstand der Δ tatAC-Mutante fehlt, werden in der Diskussion besprochen (siehe IV.2.2.3).

Was weiterhin durch diese Untersuchung deutlich wird ist, daß *C. glutamicum* trotz seiner komplexen Zellwand in der Lage ist, GFP Tat-abhängig, d. h. also in gefalteter Konformation, überraschend effizient in den Überstand zu sekretieren. Dies steht im deutlichen Gegensatz zu *S. carnosus*, beim dem eine Sekretion von Tat-abhängig transloziertem GFP nicht erfolgt, sondern das gefaltete GFP in der Zellwand steckenbleibt (siehe III.1.6).

2.4 GFP und Male werden mit dem Tat-Signalpeptid von TorA effizient sekretiert

Die vorherigen Untersuchungen haben gezeigt, daß *C. glutamicum* ein Fusionsprotein, bestehend aus dem Signalpeptid des authentischen Tat-Substrats PhoD und dem reifen GFP, effizient Tat-abhängig in den Überstand sekretiert. Untersuchungen zur Sekretion in *S. carnosus* haben gezeigt, daß ein Fusionsprotein bestehend aus dem *E. coli* Tat-Signalpeptid von TorA und dem reifen GFP in *S. carnosus* zwar Tat-abhängig über die Cytoplasmamembran transloziert, nicht aber in den Überstand sekretiert wird, sondern in der Zellwand stecken bleibt (siehe III.1.6.2). Um die Sekretionseigenschaften von *S. carnosus* und *C. glutamicum* anhand eines identischen Fusionsproteins qualitativ miteinander vergleichen zu können, wurde daher im Folgenden die Sekretion des TorA-GFP Fusionsproteins auch in *C. glutamicum* untersucht. Weiterhin wurde die Sekretion eines größeren Fusionsproteins untersucht, um zu überprüfen, ob die Größe des zu sekretierenden Proteins möglicherweise eine Limitation in der Proteinsekretion in *C. glutamicum* darstellt. Auch hier ist denkbar, daß nur Proteine bis zu einem bestimmten Molekulargewicht die

Zellwand problemlos passieren können. Hierzu wurde das TorA-MalE Fusionsprotein ausgewählt, welches ebenfalls aus dem Tat-Signalpeptid von TorA und dem reifen Teil des MalE, beides aus *E. coli* stammend, besteht. MalE hat eine Größe von ca. 42kDa und wird in *E. coli* als TorA-MalE Fusionsprotein strikt Tat-abhängig exportiert (siehe auch I.4.1.2).

2.4.1 Klonierung der *torA-malE* und *torA-gfp* Fusionsgene in einen Expressionsvektor für *C. glutamicum*

Das Fusionsgen *torA-gfp* wurde bereits für die Untersuchungen zur Sekretion von TorA-GFP in *S. carnosus* konstruiert (siehe III.1.6.1). Das Fusionsgen *torA-malE* wurde von Natascha Blaudeck (2001) für Untersuchungen zum Tat-abhängigen Export in *E. coli* konstruiert. Zur Expression der beiden Fusionsgene in *C. glutamicum* mußten sie aus dem *S. carnosus* bzw. *E. coli* Vektor herauskloniert und in den *C. glutamicum* Expressionsvektor pEKEx2 umgesetzt werden. Zusätzlich mußte upstream der Fusionsgene eine Konsensus-RBS für *C. glutamicum* eingefügt werden, damit eine Translation in *C. glutamicum* erfolgen kann. Die Klonierung erfolgte mittels PCR. Dazu wurde das *torA-gfp* Fusionsgen mit dem *S. carnosus* Vektor pXRTorAGFP als ‚template‘ und den Primern CgTorAGFP-for und CgTorAGFP-rev amplifiziert. Der Primer CgTorAGFP-for enthält die Konsensus-RBS für *C. glutamicum* (AAGGAGATATAGAT). Das PCR-Produkt wurde anschließend mit PstI und EcoRI verdaut und in den mit den gleichen Enzymen verdauten Vektor pEKEx2 ligiert (pEKEx2TorAGFP). Das *torA-malE* Fusionsgen wurde mit dem *E. coli* Vektor pBBRTorAMalE als ‚template‘ und den Primern CgRBSTorA-for und CgRBSTorA-rev amplifiziert. Der Primer CgRBSTorA-for enthält ebenfalls die oben genannte Konsensus-RBS für *C. glutamicum*. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit Sall und BamHI verdaut und in den mit den gleichen Enzymen verdauten Vektor pEKEx2 ligiert (pEKEx2TorAMalE). Nach Sequenzierung der Genfusionen wurden *C. glutamicum* Wildtyp und Δ *tatAC*-Mutante mit den beiden Vektoren transformiert und nachfolgend die Expression und der Export der Fusionsproteine untersucht.

2.4.2 Untersuchungen zur Sekretion von TorA-MalE und TorA-GFP

Um das Sekretionsverhalten der beiden Fusionsproteine in *C. glutamicum* zu untersuchen, wurde die Lokalisation der Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse in *C. glutamicum* Wildtyp und Δ *tatAC*-Mutante untersucht. Dazu wurden die Proteine der Zellen und des Überstandes getrennt aufgetragen und die Fusionsproteine durch Anti-GFP bzw. Anti-MalE Antikörper detektiert. Wie im Falle des PhoD_{Cg}-GFP wurden TorA-GFP und TorA-MalE sehr effizient in den Kulturüberstand sekretiert (siehe Abbildung 31). Dabei erfolgte die Sekretion beider Fusionsproteine nur im *C. glutamicum* Wildtyp, was eindeutig beweist, daß in beiden Fällen ein Tat-abhängiger Export stattfindet. Weiterhin war, vor allem im Fall des TorA-GFP Fusionsproteins, in der Δ *tatAC*-Mutante eine erhöhte Akkumulation an Vorläuferprotein relativ zum Wildtyp und ein im Gegensatz zum Wildtyp verstärkter cytosolischer Abbau zu beobachten, was auf den Exportblock zurückzuführen ist. Im Falle des TorA-MalE Fusionsprotein konnte nur eine schwache Akkumulation an Vorläufer

beobachtet werden, was ein Indiz dafür ist, daß das TorA-MalE Vorläuferprotein in der $\Delta tatAC$ -Mutante aufgrund des Exportblocks schneller abgebaut wird.

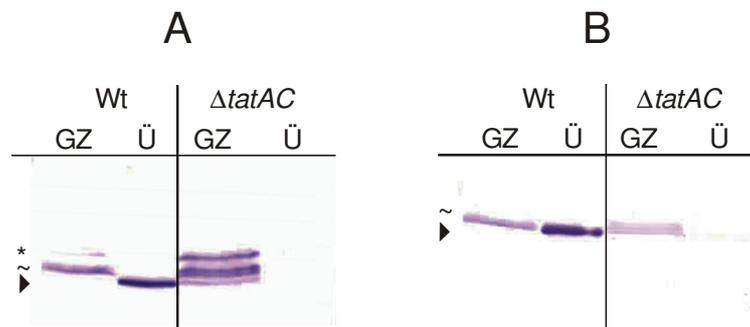


Abbildung 31: Western Blot Analyse zur Sekretion von TorA-GFP (A) und TorA-MalE (B): Die Isolierung der Proteine des Gesamtzellextraktes (GZ) und des Überstandes (Ü) erfolgte wie in II.5.2.3 und 5.2.4 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD600 von 0,5, die Proteinmenge im Überstand 1ml Kultur mit einer OD600 von 1,0. *: TorA-GFP bzw. TorA-MalE Vorläuferprotein, ▶: reifes GFP bzw. MalE, ~: cytosolisches Abbauprodukt.

Diese Untersuchungen zeigten jedoch deutlich, daß TorA-GFP und TorA-MalE Tat-abhängig und effizient von *C. glutamicum* in den Kulturüberstand sekretiert werden. Da aber nur die Proteine der Zellen und des Kulturüberstandes aufgetragen wurden, konnte damit keine Aussage über die Zellwand als mögliches „bottleneck“ in der Sekretion in *C. glutamicum* getroffen werden. Da in *S. carnosus* die Zellwand eine unüberwindbare Barriere für TorA-GFP ist, stellte sich die Frage, in wie weit die Zellwand von *C. glutamicum* die Sekretion behindert. Es ist denkbar, daß trotz der beobachteten starken Sekretionsleistung, ein Teil der reifen Proteine in der Zellwand steckenbleibt. Um diesen Einfluß der Zellwand auf die Sekretion des kleinen TorA-GFP und des etwa doppelt so großen TorA-MalE zu untersuchen, wurden im Folgenden auch die Proteine der Zellwandfraktion untersucht.

2.4.3 Fraktionierung von *C. glutamicum* zur Lokalisierung der Fusionsproteine TorA-GFP und TorA-MalE

Durch eine Fraktionierung von *C. glutamicum* Wildtyp und $\Delta tatAC$ -Mutante in Gesamtzell-, und Überstandsfraction und durch eine Isolierung der Proteine aus der Zellwand konnte eine genauere Lokalisierung der Fusionsproteine TorA-GFP und TorA-MalE erfolgen und überprüft werden, ob ein Teil des reifen Proteins in der Zellwand steckenbleibt.

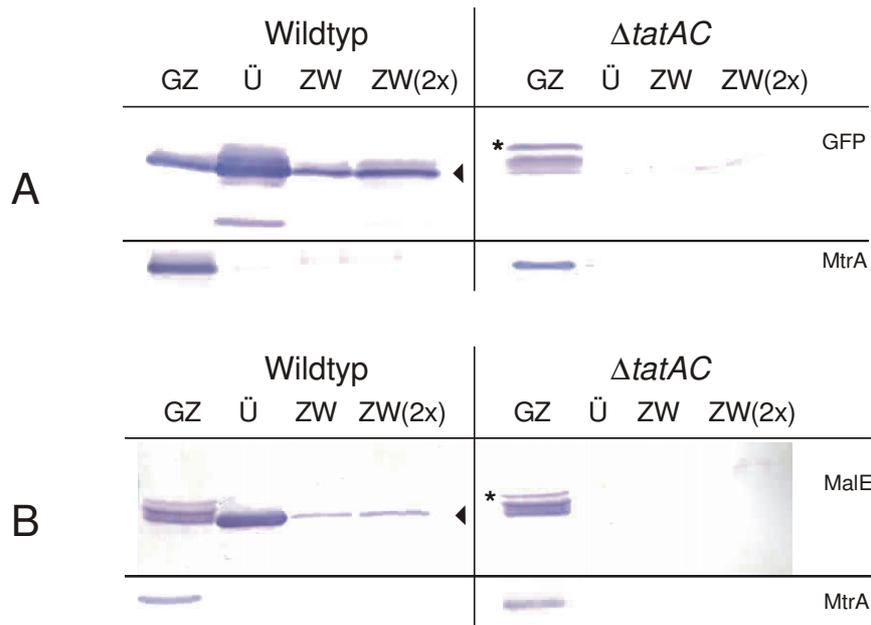


Abbildung 32: Zellfraktionierung und Western Blot zur Lokalisierung der TorA-GFP (A) und TorA-MalE (B) Fusionsproteine in *C. glutamicum* Wildtyp und $\Delta tatAC$ -Mutante. Die Isolierung der Proteine des Gesamtzellextraktes (GZ) und des Überstandes (Ü) erfolgte wie in II.5.2.3 und 5.2.4 beschrieben. Die Proteine in der Zellwand (ZW) wurden wie unter II.5.5 beschrieben isoliert. Die in der Gesamtzellfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD600 von 0,5, die Proteinmenge im Überstand und in der Zellwand 1ml Kultur mit einer OD600 von 1,5. Zur Kontrolle wurde die Zellwandfraktion zusätzlich doppelt aufgetragen (ZW(2x)). *: TorA-GFP bzw. TorA-MalE Vorläuferprotein, \blacktriangleright : reifes GFP bzw. MalE.

In Abbildung 32 ist zu erkennen, daß sowohl im Fall des TorA-GFP, als auch im Fall des TorA-MalE reifes Protein in der Zellwandfraktion detektiert werden konnte. Dabei ist die Menge an reifem GFP, welches in der Zellwand zu finden ist, mindestens um den Faktor 6 niedriger als die Menge an sekretiertem GFP im Kulturüberstand. Das fast doppelt so große MalE ist sogar um mindestens den Faktor 20 mehr im Kulturüberstand als in der Zellwandfraktion vorhanden. In der $\Delta tatAC$ -Mutante ist weder reifes GFP noch reifes MalE in der Zellwandfraktion und im Kulturüberstand vorhanden. Dies unterstreicht erneut, daß sowohl TorA-GFP als auch TorA-MalE Tat-abhängig exportiert werden und daher in der $\Delta tatAC$ -Mutante nicht über die Cytoplasmamembran transloziert werden können. Um auszuschließen, daß im Wildtyp eine Verunreinigung der Zellwandfraktionen durch Zell-Lyse mit cytoplasmatischen Proteinen stattgefunden hat, wurden die Proben zusätzlich auf das Vorhandensein des strikt cytoplasmatischen MtrA-Proteins überprüft. Da sowohl die Überstands- als auch die Zellwandfraktion kein MtrA-Protein aufwiesen, kann eine Zell-Lyse ausgeschlossen werden.

Die Zellfraktionierungen haben gezeigt, daß tatsächlich reifes Protein in der Zellwand zu finden ist. Hierbei bleibt das kleinere GFP in größerem Maße in der Zellwand stecken, als das größere MalE-Protein. Dies ist ein Hinweis darauf, daß in diesem Fall nicht die Größe der Proteine eine Limitation für die Zellwandpassage darstellt, sondern möglicherweise die Menge an transloziertem Protein die in den Zellwandbereich eindringt die Limitation bewirkt. Möglicherweise führen zu viele Exportproteine, die in die Zellwand gelangen zu einer Verstopfung der Zellwandporen, d. h. bei einer zu großen Menge an translozierten Proteinen

wäre die Kapazität der Zellwand Proteine durch ihre Poren zu lassen überschritten. Dies würde schließlich aufgrund der ständig weiter erfolgenden Translokation zu einer immer stärker werdenden Akkumulation von reifem Protein in der Zellwand führen. Eine andere Möglichkeit für das Auftreten des reifen Proteins in der Zellwand könnten z.B. elektrostatische Wechselwirkungen des Proteins mit der Zellwand sein, bei dem das Protein kurzzeitig an die Zellwand bindet und nach einer gewissen Zeitdauer die Zellwand verläßt und in den Überstand gelangt. Denkbar wäre auch, daß nur eine gewisse Anzahl an Proteinen an die Zellwand bindet, bis alle möglichen „Bindungsstellen“ belegt sind und daher die weiteren Proteine problemlos die Zellwand passieren können. In den beiden zuletzt genannten Fällen käme es nicht zu einer anwachsenden Akkumulation, sondern zu einer gleichbleibenden Menge an reifem Protein in der Zellwand. Daher wurde im Folgenden anhand des TorA-GFP Fusionsprotein untersucht, ob das reife Protein in der Zellwand im Verlaufe der Zeit zunehmend akkumuliert oder ob dessen Menge gleichbleibt. Dazu wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten Proben einer induzierten Kultur des Wildtyps, welcher TorA-GFP synthetisiert, genommen und die Proteine der Zellen, der Zellwand und des Überstandes isoliert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (siehe Abbildung 33).

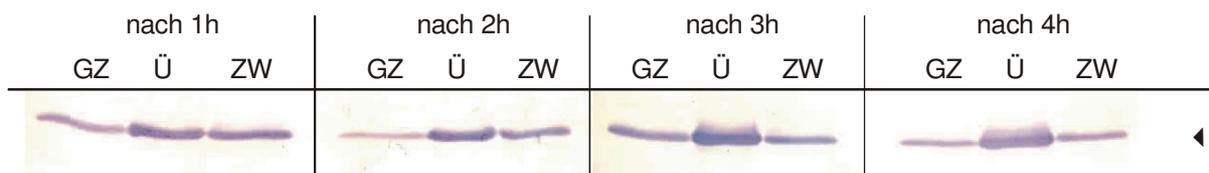


Abbildung 33: Untersuchung zur Verteilung von TorA-GFP in *C. glutamicum* Wildtyp zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Zellfraktionierung und Western Blot. Die Induktion wurde wie unter II.5.1 durchgeführt, jedoch wurden nach 1, 2, 3 und 4h 2ml Proben genommen. Die Isolierung der Proteine des Gesamtzellextraktes (GZ) und des Überstandes (Ü) der Proben 1- 4 erfolgte wie in II.5.2.3 und 5.2.4 beschrieben. Die Proteine in der Zellwand (ZW) der Proben 1 - 4 wurden wie unter II.5.5 beschrieben isoliert. Die in der Gesamtzellfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD600 von 0,5, die Proteinmenge im Überstand und in der Zellwand 1ml Kultur mit einer OD600 von 1,5. ▶ : reifes GFP.

Die Menge an reifem GFP, welches sich in der Zellwand befindet, bleibt über den Zeitraum von 4h konstant, eine Zunahme und damit eine Akkumulation konnte nicht beobachtet werden. Ebenso verhält es sich mit dem intrazellulären TorA-GFP Abbauprodukt, welches auch über den gesamten Zeitraum in der gleichen Menge vorliegt. Dieses Resultat widerspricht der Annahme, daß die Kapazität der Zellwand reifes Protein durchzulassen überschritten wird und somit ein Proteinstau entsteht, sondern unterstützt die Hypothese, daß während der Zellwandpassage ein Teil des GFP mit der Zellwand interagiert und dadurch nur verzögert in den Überstand freigesetzt wird, bzw. ein Teil des GFP die „Bindungsstellen“ der Zellwand besetzt und das restliche GFP die Zellwand problemlos passieren kann.

Das reife MalE geht anscheinend in nicht so starkem Maße wie das GFP Wechselwirkungen mit der Zellwand ein, da bei gleich großer Synthese beider Fusionsproteine deutlich weniger MalE als GFP in der Zellwand zu finden ist (siehe Abbildung 32).

2.5 MalE wird in *C. glutamicum* effizienter über den Tat- als über den Sec-Weg sekretiert

In den vorherigen Untersuchungen konnte eindeutig gezeigt werden, daß *C. glutamicum* in der Lage ist, GFP und MalE effizient über den Tat-Weg zu sekretieren. Das authentische MalE-Protein verfügt über ein Sec-Signalpeptid und wird daher normalerweise in *E. coli* Sec-abhängig exportiert. Falls das authentische MalE in *C. glutamicum* Sec-abhängig in den Überstand sekretiert wird, kann die Sec- und Tat-abhängige Sekretion von MalE in *C. glutamicum* direkt miteinander verglichen werden und so eine weitere Bewertung der Tat-abhängigen Sekretion in *C. glutamicum* ermöglichen. Dazu wurde im Folgenden die Sekretion von MalE mit der Tat-Signalsequenz von TorA mit der Sekretion von authentischem MalE mit seinem eigenen Sec-Signalpeptid verglichen. Hierbei wird die Sekretionseffizienz definiert als Anteil der Proteinmenge im Kulturüberstand an der Gesamtproteinmenge in Prozent. Die Ausbeute bezeichnet nur die Proteinmenge im Überstand.

2.5.1 Konstruktion des *malE*-Gens mit authentischer Signalsequenz für *C. glutamicum*

Das *malE*-Gen inklusive seiner authentischen Sec-Signalsequenz und einer *C. glutamicum* RBS wurde mittels PCR kloniert. Dazu wurde das *malE*-Gen mit chromosomaler DNA aus *E. coli* als ‚template‘ und den Primern MalECg-for und MalECg-rev amplifiziert. Der Primer MalECg-for enthält die Konsensus-RBS für *C. glutamicum* (AAGGAGATATAGAT). Das PCR-Produkt wurde anschließend mit SalI und BamHI verdaut und in den mit den gleichen Enzymen verdauten Vektor pEKEx2 ligiert (pEKEx2MalE). Nach Sequenzierung der Genfusion wurden *C. glutamicum* Wildtyp und Δ *tatAC*-Mutante mit dem Vektor transformiert und im Folgenden zuerst die Expression und der Export des MalE-Proteins untersucht.

2.5.2 Authentisches MalE wird in *C. glutamicum* Sec-abhängig in den Überstand sekretiert

Bevor die Tat-abhängige mit der Sec-anhängigen Sekretion von MalE verglichen werden konnte, mußte erst gezeigt werden, daß das authentische MalE auch tatsächlich in *C. glutamicum* Sec-abhängig sekretiert wird. In Abbildung 34 ist zu sehen, daß MalE sowohl im Wildtyp als auch in der Δ *tatAC*-Mutante effizient in den Kulturüberstand sekretiert wird, was zeigt, daß das authentische MalE, wie zu erwarten, Tat-unabhängig und somit tatsächlich mit größter Wahrscheinlichkeit Sec-abhängig ist. Jedoch ist auch hier - wie im Falle der Sec-abhängigen Sekretion von 1588 (siehe Abbildung 30) - deutlich weniger reifes Protein im Kulturüberstand der Δ *tatAC*-Mutante zu sehen als im Wildtyp. Auch hier zeigt sich wieder, daß ein Ausschalten des Tat-abhängigen Exports einen negativen Effekt auf die Sekretion eines Sec-Substrates hat. Um auszuschließen, daß Zell-Lyse aufgetreten ist, wurde parallel die Lokalisation des strikt cytoplasmatischen MtrA-Proteins untersucht. Wie erwartet befand sich kein MtrA-Protein im Überstand sondern nur in der Zellfraktion, womit eine Zell-Lyse ausgeschlossen werden konnte.

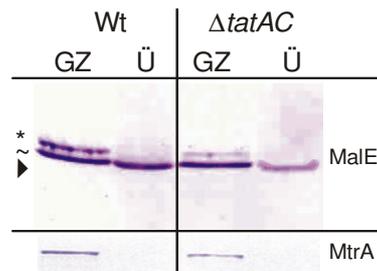


Abbildung 34: Untersuchung der Proteinverteilung von authentischem MalE in *C. glutamicum* Wildtyp und Δ tatAC-Mutante mittels SDS-PAGE und Western Blot. Die Isolierung der Proteine des Gesamtzellextraktes (GZ) und des Überstandes (Ü) erfolgte wie in II.5.2.3 und 5.2.4 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD600 von 0,5, die im Überstand aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD600 von 1,5. *: MalE-Vorläuferprotein, ▶ : reifes MalE, ∼: cytosolisches Abbauprodukt.

2.5.3 Vergleich der Tat- und Sec-abhängigen Sekretion von MalE

Im direkten Vergleich ist deutlich zu sehen, daß die Menge an reifen MalE, welches Tat-abhängig in den Kulturüberstand sekretiert wird, deutlich höher ist, als die Menge an reifen MalE, welches Sec-abhängig in den Kulturüberstand sekretiert wird (siehe Abbildung 35). 35% der Gesamtproteinmenge befinden sich im Falle der Tat-abhängigen Sekretion als reifes Protein im Überstand, wohingegen dies in der Sec-abhängigen Sekretion nur 16% sind. In der Δ tatAC-Mutante beträgt der Anteil an Sec-abhängig sekretiertem MalE sogar nur 6%. Das MalE-Vorläuferprotein, daß im Überstand zu sehen ist, ist durch eine Verunreinigung durch die benachbarte Spur und nicht auf Zell-Lyse zurückzuführen. Wie zu erwarten erfolgte in der Δ tatAC-Mutante kein Tat-abhängiger Export von TorA-MalE. Die Menge an synthetisiertem Protein ist in allen Fälle identisch, so daß ausgeschlossen werden kann, daß der Unterschied in der Sekretionseffizienz auf einen Mengeneffekt zurückzuführen wäre.

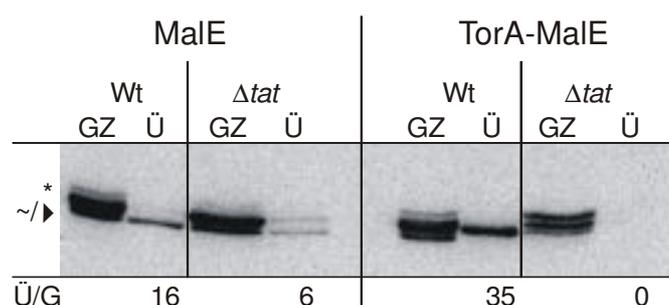


Abbildung 35: ECL-Blot zum quantitativen Vergleich der Sec- und Tat-abhängigen Sekretion von MalE. Die Isolierung der Proteine des Gesamtzellextraktes (GZ) und des Überstandes (Ü) erfolgte wie in II.5.2.3 und 5.2.4 beschrieben. Die in der Gesamtzell aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD600 von 0,5, die im Überstand aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD600 von 1. Die Entwicklung des Western Blots und die Quantifizierung erfolgten wie unter II.5.9 für ECL-Blots angegeben. *: MalE- bzw. TorA-MalE Vorläuferprotein, ▶ : reifes MalE, ∼: cytosolisches Abbauprodukt, Ü/G: Anteil an reifem MalE im Überstand an der Gesamtproteinmenge in %.

Überraschenderweise hat der Vergleich deutlich gezeigt, daß MalE mit mehr als doppelt so hoher Ausbeute sekretiert wird, wenn die Sekretion über den Tat- anstelle über den Sec-Weg

erfolgt. Möglicherweise spielen hier Faktoren wie die Stabilität des sekretierten Proteins im Überstand eine entscheidende Rolle. Die Stabilität wird in diesem Falle durch den Faltungszustand des sekretierten Proteins bestimmt, wobei natürlich hinsichtlich der Stabilität die gefaltete Form einen Vorteil gegenüber der ungefalteten Form aufweist. Es ist durchaus vorstellbar, daß die Sekretionseffizienz in beiden Fällen zwar gleich ist, es aber aufgrund der höheren Stabilität des über den Tat-Weg sekretierten und daher gefalteten MalE zu einer höheren Ausbeute an MalE als im Falle des über den Sec-Weg sekretierten MalE kommt.

2.6 Die Ausbeute an Tat-abhängig sekretiertem GFP und MalE in *C. glutamicum* ist je nach Medium unterschiedlich hoch

In den Wachstumsvergleichen zwischen *C. glutamicum* Wildtyp und $\Delta tatAC$ -Mutante fiel auf, daß die Unterschiede im Wachstum zwischen den beiden Stämmen je nach Medium variieren. D.h., daß anscheinend das Tat-System in den verschiedenen Medien unterschiedlich gefordert wird. Möglicherweise beeinflußt daher auch das Medium die Sekretionseffizienz der heterologen Proteine. Um dies zu überprüfen, wurde sowohl die Tat-abhängige Sekretion von TorA-GFP als auch die Sekretion des TorA-MalE Fusionsproteins in den Komplexmedien BHIS- und LB- und im Minimalmedium CgXII quantitativ mittels ECL-Blot miteinander verglichen. Im Falle des TorA-GFP Fusionsprotein zeigte der Vergleich, daß die Sekretionseffizienz in den drei unterschiedlichen Medien etwa auf dem gleichen Niveau ist (siehe Abbildung 36A), d. h. in allen drei Medien betrug die Menge an sekretiertem reifen GFP bezogen auf die Gesamtproteinmenge zwischen 70 und 86%. Die Gesamtproteinmenge zeigt jedoch deutliche Unterschiede. So ist diese im LB-Medium am höchsten, was bedeutet, daß in LB-Medium auch die höchste Synthese erfolgt ist. Im Gegensatz dazu ist in CgXII- und BHIS-Medium die Synthese gerade einmal in etwa ein viertel so hoch wie in LB-Medium. Dieses Verhältnis ist auch bei der Proteinmenge im Überstand zu beobachten. Dies heißt, daß sich das LB-Medium für die Sekretion von GFP in *C. glutamicum*, verglichen mit BHIS- und CgXII-Medium, am besten eignet, da hier aufgrund der höchsten Synthese an TorA-GFP Vorläuferprotein auch die größte Menge an reifen GFP in den Überstand sekretiert wird.

Die Situation im Falle des TorA-MalE Proteins sieht anders aus (siehe Abbildung 36B): Hier variiert die Gesamtproteinmenge nicht so stark, sondern die Ausbeute an reifem MalE im Kulturüberstand. So werden in LB-Medium bis zu 50% der Gesamtproteinmenge in den Überstand sekretiert, im Gegensatz zum CgXII-Medium, in dem nur 22% der Gesamtproteinmenge, und im Gegensatz zu BHIS-Medium, in dem sogar nur 10% der Gesamtproteinmenge in den Überstand sekretiert werden. So ergibt sich auch für die tatsächliche Menge an sekretiertem Protein auch folgende Reihenfolge: LB-Medium, mit der größten Menge an sekretiertem MalE, gefolgt von CgXII-Medium, das bereits nur noch die Hälfte an sekretiertem MalE aufweist und BHIS-Medium, wo die Menge an sekretiertem MalE nur noch ein viertel beträgt. Daher scheint sich für die Sekretion von MalE auch wieder das LB-Medium am besten zu eignen, jedoch hier aufgrund der höchsten Sekretionsleistung und nicht primär aufgrund der höchsten Synthese.

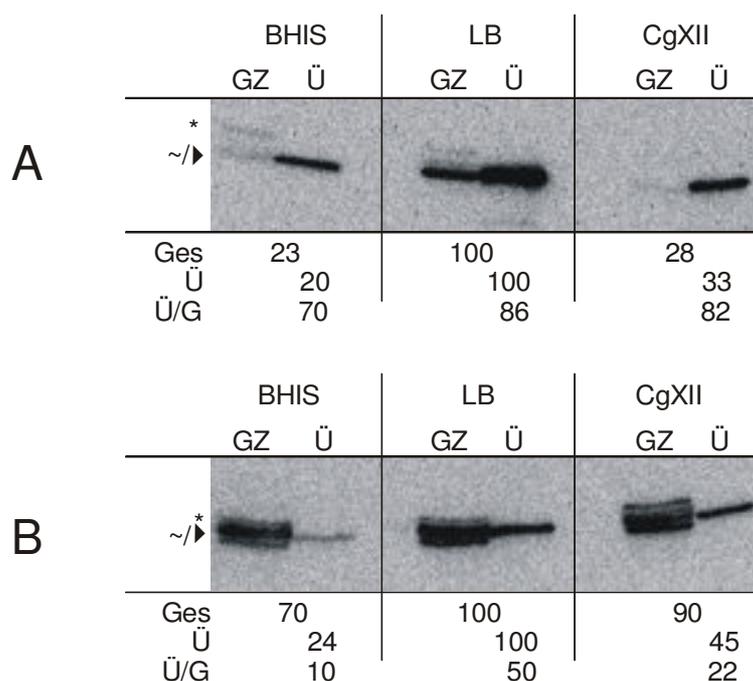


Abbildung 36: ECL-Blot zum quantitativen Vergleich der Tat-abhängigen Sekretion von TorA-GFP (A) und TorA-MalE (B) in verschiedenen Medien. Die Isolierung der Proteine des Gesamtzellextraktes (GZ) und des Überstandes (Ü) erfolgte wie in II.5.2.3 und 5.2.4 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD_{600} von 0,5, die im Überstand aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD_{600} von 1. Die Entwicklung des Western Blots und die Quantifizierung erfolgten wie unter II.5.9 für ECL-Blots angegeben. *: TorA-GFP bzw. TorA-MalE Vorläuferprotein, ▶: reifes GFP bzw. MalE, ~: cytosolisches Abbauprodukt, Ges: Gesamtmenge an synthetisiertem Protein, Ü: Gesamtmenge an reifem Protein im Überstand (der jeweils höchste Wert wurde auf 100% gesetzt), Ü/G: Anteil an reifem GFP bzw. MalE im Überstand von der Gesamtproteinmenge in %.

2.7 Die Effizienz der Tat-abhängigen Sekretion von GFP in *C. glutamicum* variiert je nach verwendetem Signalpeptid

Als abschließende quantitative Untersuchung wurde schließlich der Effekt des Signalpeptids auf die Sekretion in *C. glutamicum* untersucht. Dazu wurde die Sekretion von GFP, vermittelt durch drei verschiedene Tat-Signalpeptide, miteinander verglichen. Bei den Signalpeptiden handelte es sich um das bisher verwendete TorA-Signalpeptid aus *E. coli*, das PhoD_{Cg}-Signalpeptid aus *C. glutamicum* und das PhoD_{B.s.}-Signalpeptid aus *B. subtilis*. Wenn Spezies-Spezifische Unterschiede in der Erkennung des Signalpeptids durch die *C. glutamicum* Tat-Translokase die Translokation beeinflussen (siehe dazu I.4.1.4), sollte sich das in der Sekretionseffizienz widerspiegeln. Die Gene für die Fusionsproteine TorA-GFP und PhoD_{Cg}-GFP lagen bereits vor. Zur Konstruktion des Fusionsprotein PhoD_{B.s.}-GFP siehe III.3.2.1. Das Fusionsprotein mußte aber noch, wie im folgendem Kapitel beschrieben, für die Expression in *C. glutamicum* umkonstruiert werden.

2.7.1 Konstruktion des *phoD_{Bs}-gfp* Fusionsgens für *C. glutamicum*

Das Fusionsgen *phoD_{Bs}-gfp* lag bereits für Untersuchungen in *B. subtilis* auf dem *B. subtilis* Vektor pWHPhoD_{Bs}GFP vor (III.3.2.1). Zur Expression des Fusionsgens in *C. glutamicum* mußte dieses aus dem *B. subtilis* Vektor herauskloniert und in den *C. glutamicum* Expressionsvektor pEKEx2 umgesetzt werden. Zusätzlich mußte upstream des Fusionsgens eine Konsensus-RBS für *C. glutamicum* eingefügt werden, damit eine Translation in *C. glutamicum* erfolgen konnte. Die Klonierung erfolgte mittels PCR. Dazu wurde das *phoD_{Bs}-gfp* Fusionsgen mit dem Vektor pWHPhoD_{Bs}GFP als ‚template‘ und den Primern PhoDss(Cg)-for und CgTorAGFP-rev amplifiziert. Der Primer PhoDss(Cg)-for enthält die Konsensus-RBS für *C. glutamicum* (AAGGAGATATAGAT). Das PCR-Produkt wurde anschließend mit PstI und EcoRI verdaut und in den mit den gleichen Enzymen verdauten Vektor pEKEx2 ligiert (pEKExPhoD_{Bs}GFP). Nach Sequenzierung der Genfusion, wurden *C. glutamicum* Wildtyp und Δ *tatAC*-Mutante mit dem Vektor transformiert.

2.7.2 Vergleich der Sekretion von GFP mit TorA-, PhoD_{Bs}- und PhoD_{Cg}-Signalpeptid

Das PhoD_{Bs}-GFP Fusionsprotein wird in *C. glutamicum* exprimiert und effizient Tat-abhängig in den Kulturüberstand sekretiert (siehe Abbildung 37A). Beim Vergleich der Sekretion dieses Fusionsproteins mit der Sekretion der TorA-GFP und PhoD_{Cg}-GFP Fusionsproteine zeigte sich unerwartet, daß die Sekretionseffizienzen von GFP in *C. glutamicum* mit den fremden Signalpeptiden, TorA aus *E. coli* und PhoD aus *B. subtilis*, doppelt so hoch waren, wie mit dem *C. glutamicum* Signalpeptid (siehe Abbildung 37B).

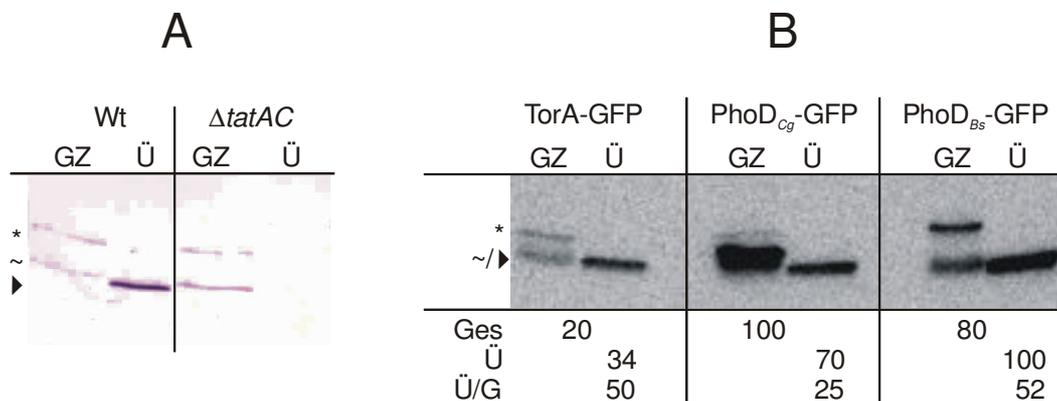


Abbildung 37: A: Untersuchung der Expression und des Exports von PhoD_{Bs}-GFP in *C. glutamicum* Wildtyp und Δ *tatAC*-Mutante mittels SDS-PAGE und Western Blot. Die Isolierung der Proteine des Gesamtzell-extraktes (GZ) und des Überstandes (Ü) erfolgte für A und B wie in II.5.2.3 und 5.2.4 beschrieben. Die in der Gesamtzell aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5, die im Überstand aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1,5. *: PhoD_{Bs}-GFP Vorläuferprotein, ▶: reifes GFP, ~: cytosolisches Abbauprodukt. **B: ECL-Blot zum quantitativen Vergleich der Tat-abhängigen Sekretion von TorA-, PhoD_{Cg}- und PhoD_{Bs}-GFP.** Die in der Gesamtzell aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5, die im Überstand aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1. Die Entwicklung des Western Blots und die Quantifizierung erfolgten wie unter II.5.9 für ECL-Blots angegeben. *: Vorläuferprotein, Ü: Gesamtmenge an reifen Protein im Überstand (der jeweils höchste Wert wurde auf 100% gesetzt), Ü/G: Anteil an reifem GFP im Überstand von der Gesamtproteinmenge in %.

So befanden sich im Falle der beiden fremden Signalpeptide 50 bzw. 52% der Gesamtproteinmenge im Überstand, im Gegensatz zum eigenen Signalpeptids mit nur 25%. PhoD_{Cg}-GFP wies zwar die höchste Gesamtproteinmenge und damit höchste Syntheserate auf, hatte aber jedoch 30% weniger reifes Protein im Überstand als das PhoD_{Bs}-GFP Fusionsprotein. TorA-GFP zeigte eine fünffach niedriger Synthese als PhoD_{Cg}-GFP und wies dementsprechend auch weniger Protein im Überstand auf.

Anscheinend werden die fremden Signalpeptide von TorA aus *E. coli* und PhoD aus *B. subtilis* mindestens genauso gut von der Tat-Translokase von *C. glutamicum* erkannt, wie das authentische PhoD_{Cg}-Signalpeptid. Demnach spielt die Spezies-Spezifität in diesen Fällen keine entscheidende Rolle in der Sekretionsleistung. Überraschenderweise zeigte das Fusionsprotein mit dem *C. glutamicum* Signalpeptid die geringste Sekretionseffizienz. Entweder wird im Falle von PhoD_{Cg}-GFP aufgrund der höchsten Synthese die Kapazität der Tat-Translokase überschritten oder das TorA- und PhoD_{Bs}-Signalpeptid werden tatsächlich von der *C. glutamicum* Tat-Translokase besser erkannt als das eigene Signalpeptid.

2.8 Das von *C. glutamicum* Tat-abhängig sekretierte GFP ist aktiv

Die bislang durchgeführten Untersuchungen haben deutlich gezeigt, daß *C. glutamicum* GFP effizient über den Tat-Weg in den Überstand sekretiert. Exportuntersuchungen von GFP in *E. coli* haben gezeigt, daß dieses Protein nur im Cytoplasma in seine aktive Konformation falten kann und deshalb nicht über den Sec-Weg sondern nur über den Tat-Weg in aktiver Form exportiert wird (Thomas *et al.*, 2001, siehe I.4.4). Daher sollte hier abschließend zu den Untersuchungen zur Tat-abhängigen Sekretion in *C. glutamicum* überprüft werden, ob das von *C. glutamicum* Tat-abhängig in den Überstand sekretierte GFP ebenfalls in aktiver Form vorliegt. Da aktives GFP bei einer Bestrahlung mit Licht mit einer Wellenlänge von ca. 400nm grün fluoresziert, wurde der Kulturüberstand von den *C. glutamicum* Stämmen, die GFP sekretieren, auf diese Fluoreszenz hin untersucht.

In Abbildung 38 (A) ist deutlich zu sehen, daß die Kulturüberstände von den *C. glutamicum* Stämmen, die GFP sekretieren, tatsächlich grün fluoreszieren. Der Kulturüberstand der Negativkontrolle, ein *C. glutamicum* Stamm mit Leervektor, zeigt dagegen wie erwartet keine Fluoreszenz. Weiterhin ist erkennbar, daß die Intensität der Fluoreszenz von TorA-GFP über PhoD_{Cg}-GFP zu PhoD_{Bs}-GFP hin zunimmt, was im Einklang mit den Quantifizierungsexperimenten stünde (siehe III.2.7). Um die Fluoreszenzintensität genauer bestimmen zu können, wurde daher eine Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz in den Kulturüberständen vorgenommen (siehe Abbildung 38B). Zur Quantifizierung der Fluoreszenz wurde das GFP im Kulturüberstand mit Licht der Wellenlänge 385nm angeregt und das Emissionsspektrum des GFP, das in der Graphik als Kurve zu sehen ist, im Wellenlängenbereich von 400 bis 650nm aufgezeichnet. Je mehr aktives GFP im Kulturüberstand vorhanden ist, desto größer ist die Anzahl der GFP-Emissionen, was sich auf die Peakhöhe auswirkt.

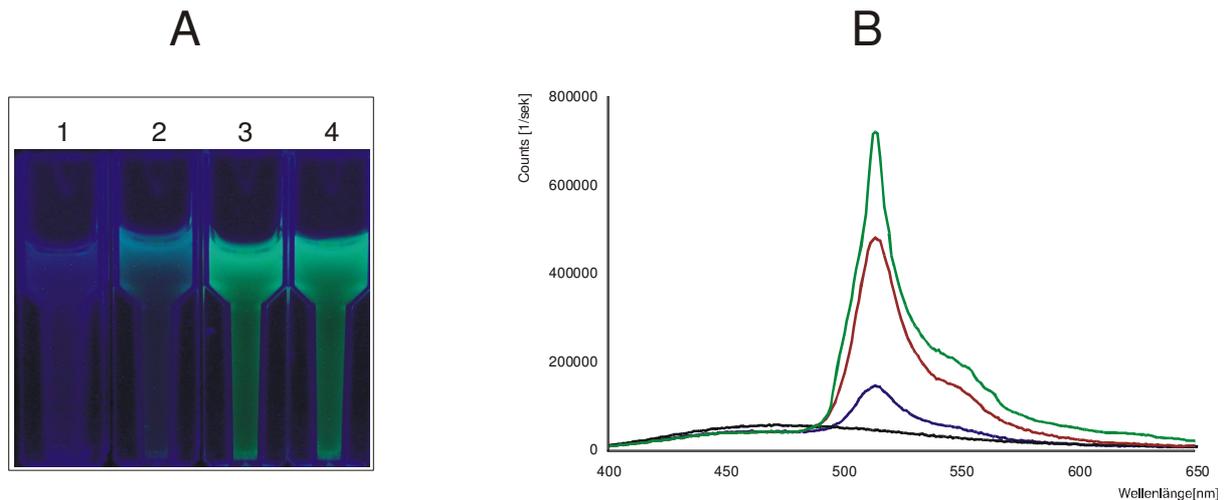


Abbildung 38A: Detektion der GFP-Fluoreszenz in Kulturüberständen von *C. glutamicum*. Die Proteine aus 50ml Kulturüberstand wurden auf 1ml aufkonzentriert und in 1ml-Küvetten umgefüllt (siehe II.5.11). Die Proben wurden mit einer UV-Lampe, die Licht mit einer Wellenlänge von 366nm emittiert, bestrahlt. 1: Negativkontrolle (Leervektor), 2: TorA-GFP, 3: PhoD_{Cg}-GFP, 4: PhoD_{Bs}-GFP. **B: Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz:** (siehe I. 5.11). –: Negativkontrolle, –: TorA-GFP, –: PhoD_{Cg}-GFP, –: PhoD_{Bs}-GFP.

Aus dieser Quantifizierung ist ersichtlich, daß die Fluoreszenz des Stammes, der GFP mittels des *B. subtilis* PhoD-Signalpeptids sekretiert, um ca. den Faktor 1.5 größer ist, als die des Stammes, der GFP mittels des PhoD-Signalpeptids aus *C. glutamicum* sekretiert, und sogar um den Faktor 6 größer als die des Stammes, der GFP mit der TorA-Signalsequenz sekretiert. Dies entspricht zumindest tendenziell dem Ergebnis, welches mittels Quantifizierung der Proteinbanden im ECL-Blot erzielt wurde.

Zusammenfassend kann daher gesagt werden, daß überraschenderweise mit dem PhoD-Signalpeptid aus *B. subtilis* die größte Menge an aktivem GFP in *C. glutamicum* sekretiert wird. Mit dem PhoD-Signalpeptid aus *C. glutamicum* wird weniger aktives GFP als mit dem PhoD-Signalpeptid aus *B. subtilis* sekretiert, mit dem TorA-Signalpeptid ist Menge an sekretierten aktiven GFP am geringsten.

2.9 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in *C. glutamicum*

C. glutamicum besitzt ein funktionelles Tat-System, welches aus einem TatA- und einem TatC-Protein besteht. Er besitzt somit - wie auch *S. carnosus* und *B. subtilis* - eine Tat-Minimaltranslokase. Schaltet man das Tat-System in *C. glutamicum* durch Deletion der *tat*-Gene aus, so äußert sich dies in verschiedenen Phänotypen. Dies steht in einem deutlichen Kontrast zu der Situation bei *S. carnosus*, bei dem eine Inaktivierung des Tat-Systems keinen sichtbaren Phänotyp zeigte. So weist die *C. glutamicum* *tat*-Mutante neben einem deutlich schlechteren Wachstum auch Defizite auf, unter osmotischen Streß zu wachsen. Weiterhin konnte beobachtet werden, daß sich die Ausschaltung des Tat-Systems indirekt auch auf den Sec-abhängigen Export auswirkt. Zwei untersuchte Sec-Substrate wurden in der *tat*-Mutante

signifikant schlechter sekretiert als im Wildtyp. Ganz im Gegensatz zu *S. carnosus* scheint in *C. glutamicum* das Tat-System eine bedeutendere Rolle zu spielen. Dies erklärt wohl möglicherweise auch die Befunde zur Sekretionsleistung in *C. glutamicum*. So sekretiert *C. glutamicum* die hier untersuchten Substrate im Gegensatz zu *S. carnosus* sehr effizient Tat-abhängig in den Kulturüberstand. Es wird zwar auch reifes Protein in der Zellwand gefunden, jedoch in einem sehr geringen Maße. Es zeigte sich überraschenderweise auch, daß sich die Sekretion des Reporterproteins MalE effizienter war, wenn sie Tat-abhängig erfolgte, als wenn sie Sec-abhängig war. Weiterhin stellte sich heraus, daß es einen Einfluß des Mediums nicht nur auf die Synthese der Fusionsproteine gibt, sondern auch auf die Tat-abhängige Sekretion. So erfolgt unter den hier verwendeten Medien in LB-Medium die effektivste Tat-abhängige Sekretion. Beim Vergleich der Sekretion des GFP-Proteins mit unterschiedlichen Signalsequenzen zeigte sich völlig unerwartet, daß das fremde PhoD-Signalpeptid aus *B. subtilis* zu einer höheren Sekretion von GFP führte, als das eigene *C. glutamicum* PhoD-Signalpeptid. In allen Fällen konnte aber gezeigt werden, daß GFP Tat-abhängig in aktiver Form in den Kulturüberstand sekretiert wurde.

3. Untersuchungen zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in *B. subtilis*

B. subtilis Stämme werden schon seit Jahren für sekretorische Gewinnung homologer Proteine verwendet, dabei wurde bislang ausschließlich der Sec-Weg genutzt. Die sekretorische Gewinnung von heterologen Proteine mittels des Sec-Weges ist in *B. subtilis* aber aufgrund der in Kapitel I.3.6 bereits beschriebenen „bottlenecks“ sehr ineffizient. Möglicherweise bietet hier der Tat-Weg für die heterologe Proteinsekretion eine Alternative gegenüber dem Sec-Weg. Das Tat-System von *B. subtilis* ist schon seit längerem bekannt und auch schon eingehend charakterisiert. *B. subtilis* besitzt demnach zwei unabhängige funktionelle TatAC-Systeme, TatAC_D und TatAC_Y – somit zwei Minimaltranslokasen. Für beide Systeme ist bislang jedoch erst je ein authentisches Tat-Substrat bekannt, welches jeweils strikt nur durch eine der beiden Translokasen transloziert wird: PhoD, welches nur durch TatAC_D, und YwbN, welches nur durch TatAC_Y transloziert wird (Jongbloed *et al.*, 2004). Demnach liegt hier eine Substratspezifität der beiden Tat-Systeme innerhalb eines Organismus vor, die vergleichbar mit der Spezies-Spezifität in der Signalerkennung von Tat-Substraten durch die Translokase zwischen verschiedenen Organismen ist. Weitere Tat-Substrate sind in *B. subtilis* bislang nicht bekannt.

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich *B. subtilis* auch für die Tat-abhängige Sekretion von heterologen Substraten eignet. Als Reporterproteine wurden dazu die bisher auch bei *S. carnosus* und *C. glutamicum* verwendeten Fusionsproteine genutzt, um auch einen qualitativen Vergleich zwischen den verschiedenen Organismen zu ermöglichen.

3.1 *B. subtilis* sekretiert TorA-GFP und TorA-MalE effizient in der Überstand

In *S. carnosus* wird GFP nicht sekretiert, wohingegen in *C. glutamicum* eine effiziente Sekretion sowohl des GFP wie auch des größeren MalE-Proteins stattfindet. Daher wurde im Folgenden zunächst untersucht, ob beide Fusionsproteine in *B. subtilis* Tat-abhängig sekretiert werden und ob eine Akkumulation des reifen Proteins bzw. eines Teils des reifen Proteins in der Zellwand auftritt.

3.1.1 Konstruktion der Fusionsgene *torA-malE* und *torA-gfp* für *B. subtilis*

Das Fusionsgen *torA-malE* lag aus Exportuntersuchungen in *E. coli* vor (Blaudeck, 2001) und das Fusionsgen *torA-gfp* wurde in dieser Arbeit bereits für Untersuchungen zur Sekretion in *S. carnosus* konstruiert (siehe III.1.6.1). Aus früheren Versuchen war bekannt, daß die authentische *torA* RBS zur Expression von Genen in *B. subtilis* ausreichend ist. Daher konnte im Fall des *torA-malE* Fusionsgens darauf verzichtet werden, mittels PCR eine *B. subtilis* RBS vor das Fusionsgen zu klonieren. *torA-malE* wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI aus dem pBBRTorAMalE Vektor geschnitten und in den mit dem gleichen Enzym geschnittenen Vektor pWH1520 ligiert (pWHTorAMalE). Im Falle des *torA-gfp* Fusionsgens mußte die UTR der *S. hyicus* Lipase, die für die Expression in *S. carnosus* nötig war, gegen die RBS von *torA* mittels PCR ausgetauscht werden. *torA-gfp* wurde mittels PCR mit dem *S. carnosus* Vektor pXRTorAGFP (siehe III.1.6.1) als ‚template‘ und den Primern TorAGFPBs-for, welcher die RBS von *torA* enthält, und TorAGFPBs-rev amplifiziert. Das PCR-Konstrukt wurde mit KpnI und SphI geschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen pWH1520 Vektor ligiert (pWHTorAGFP). Nach Sequenzierung der Genfusionen wurde *B. subtilis* mit den Vektoren pWHTorAGFP und pWHTorAMalE transformiert und Expression und Export der Fusionsproteine untersucht.

3.1.2 Lokalisierung von TorA-GFP und TorA-MalE in *B. subtilis*

Die Tat-Abhängigkeit und das Sekretionsverhalten der beiden Fusionsproteine TorA-GFP und TorA-MalE wurde durch Proteinlokalisierungsexperimente in *B. subtilis* Wildtyp und in *B. subtilis* Δ *tatAC_{DY}*, ein Stamm, in dem beide Tat-Systeme ausgeschaltet sind, überprüft. Es ist deutlich zu sehen, daß im Wildtyp eine effiziente Sekretion sowohl des reifen GFP als auch des reifen MalE-Proteins in den Kulturüberstand stattfindet (siehe Abbildung 39A und C). Darüber hinaus konnte weder bei TorA-GFP noch bei TorA-MalE reifes Protein in der Zellwandfraktion detektiert werden (siehe Abbildung 39B und D). Dies bedeutet, daß beide Proteine effizient und ohne in der Zellwand stecken zu bleiben in den Überstand sekretiert werden. Erstaunlicherweise findet aber auch in der Δ *tatAC_{DY}*-Mutante eine leicht verminderte Sekretion von MalE statt (siehe Abbildung 39C), im Gegensatz zu GFP, welches nur im Wildtyp sekretiert wird (siehe Abbildung 39A). Zell-Lyse als Grund für das Auftreten von reifem MalE im Kulturüberstand der Δ *tatAC_{DY}*-Mutante kann ausgeschlossen werden, da das strikt cytoplasmatische, bzw. membranassoziierte SecA-Protein von *B. subtilis* nur in der Zellfraktion und nicht im Kulturüberstand detektiert wurde.

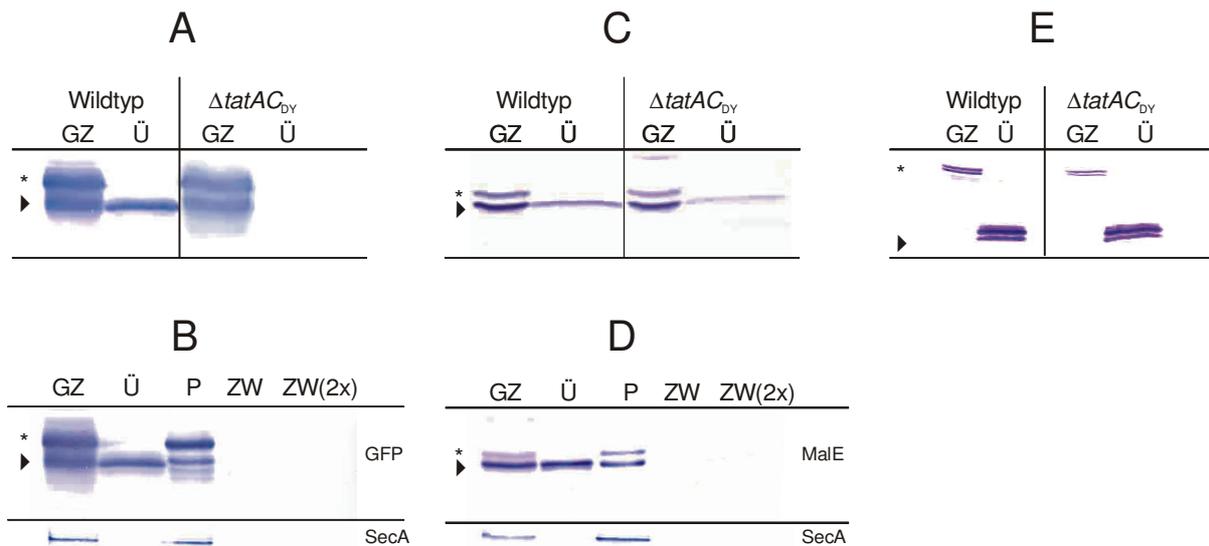


Abbildung 39: Zellfraktionierung und Western Blot zur Lokalisierung der TorA-GFP (A und B) und TorA-MalE (C und D) Fusionsproteine und von OmpA (E) in *B. subtilis* Wildtyp und $\Delta tatAC_{DY}$ -Mutante. Die Isolierung der Proteine des Gesamtzellextraktes (GZ) und des Überstandes (Ü) erfolgte wie in II.5.2.2 und 5.2.4 beschrieben. Die Proteine in der Zellwand (ZW) und der Protoplasten (P) wurden wie unter II.5.3 beschrieben isoliert. Die in der Gesamtzell- und Protoplastenfraction aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD600 von 0,5, die Proteinmenge im Überstand und in der Zellwand 1ml Kultur mit einer OD600 von 1. Zur Kontrolle wurde die Zellwandfraction zusätzlich doppelt aufgetragen (ZW(2x)). *: Vorläuferprotein, ▶ : reifes GFP, MalE bzw. die 18- und 19kDa-Abbauprodukte des sekretierten OmpA.

Falls TorA-MalE Sec-abhängig sekretiert wird und in *B. subtilis* ein Ausschalten der Tat-Systeme auch die Sec-abhängige Translokation beeinträchtigt, würde das die reduzierte Sekretionseffizienz in der $\Delta tatAC_{DY}$ -Mutante erklären. Um einen möglichen Effekt der Deletion der *tat*-Gene auf den Sec-abhängigen Export genauer zu untersuchen, wurde der Export eines weiteren Sec-Substrates in Wildtyp und $\Delta tatAC_{DY}$ -Mutante verglichen. Dazu wurden beide *B. subtilis* Stämme mit dem Vektor pWHOmpA transformiert, der das Gen für das Sec-abhängige Außenmembranprotein OmpA aus *E. coli* trägt. Es stellte sich bei dieser Untersuchung heraus, daß das OmpA-Protein im Wildtyp und der $\Delta tatAC_{DY}$ -Mutante mit gleicher Effizienz in den Kulturüberstand sekretiert wird und dort als die für OmpA typischen 18- und 19kDa-Abbauprodukte in Erscheinung tritt (siehe Abbildung 39E). Dieses Ergebnis deutet daher eher darauf hin, daß der Sec-abhängige Export in *B. subtilis* durch die Deletion der *tat*-Gene nicht beeinträchtigt wird, sondern möglicherweise TorA-MalE sowohl Tat- als auch Sec-abhängig exportiert werden kann, wobei der Tat-abhängige Export bevorzugt zu sein scheint. Eine Mutation im „Sec-Avoidance“-Motiv des TorA-Signalpeptids, was einen Sec-abhängigen Export erlauben würde (siehe II.4.1.3), konnte durch nachträgliche Sequenzierung ausgeschlossen werden. D. h. trotz dieses Motivs wird TorA-MalE offensichtlich in *B. subtilis* vom Sec-Weg akzeptiert. Dies bedeutet anscheinend, daß in *B. subtilis* ein „Sec-Avoidance“-Motiv die Sec-abhängige Translokation nicht vollständig verhindern kann. Möglicherweise benötigen Tat-Signalpeptide aus *B. subtilis* neben der niedrigen Hydrophobizität andere Faktoren im Signalpeptid, um eine Sec-Translokation verhindern. Anscheinend ist hier aber auch das reife Protein für die Wahl des jeweiligen Exportweges von Bedeutung, da GFP mit dem TorA-Signalpeptid nur Tat-abhängig sekretiert wird.

3.2 TorA-, PhoD_{Bs}- und PhoD_{Cg}-GFP werden mit unterschiedlichen Ausbeuten sekretiert

GFP wird, wie oben gezeigt, in *B. subtilis* effizient und Tat-abhängig durch das TorA-Signalpeptid in den Kulturüberstand sekretiert. Im Folgenden wurde anschließend die Sekretion von GFP mit dem TorA-Signalpeptid mit der Sekretion von GFP mit dem *B. subtilis* und dem *C. glutamicum* PhoD-Signalpeptid verglichen. Hierbei sollte untersucht werden, ob es, ähnlich wie bei *C. glutamicum*, durch die verschiedenen Signalpeptide zu unterschiedlichen Ausbeuten an sekretiertem GFP kommt. So ist es zum einen für die Ausbeute von Bedeutung, wie hoch die Synthese des jeweiligen Fusionsproteins ist und zum anderen, ob mögliche Unterschiede in der Erkennung der verschiedenen Signalpeptide durch die *B. subtilis* Tat-Translokasen aufgrund von Spezies-Spezifität die Ausbeute an reifen GFP beeinflussen. In *C. glutamicum* konnte überraschenderweise gezeigt werden, daß das fremde PhoD-Signalpeptid aus *B. subtilis* zu einer höheren Sekretion von GFP führte als das eigene PhoD-Signalpeptid.

3.2.1 Konstruktion der *phoD_{Bs}-gfp* und *phoD_{Cg}-gfp* Fusionsgene für *B. subtilis*

Das *phoD_{Bs}-gfp* Fusionsgen wurde so konstruiert, daß es für ein Fusionsprotein kodiert, das aus dem Signalpeptid inklusive der ersten vier Aminosäuren des reifen Teils des PhoD-Proteins und dem GFP-Proteins als Reporterprotein besteht. Die Fusion der Signalsequenz mit dem *gfp*-Gen wurde mittels Crossing-over PCR durchgeführt (siehe Abbildung 18A und B). Dazu wurde zunächst die Signalsequenz des *phoD_{Bs}*-Gens inklusive der RBS von *torA* von *phoD* mittels PCR mit der chromosomalen DNA von *B. subtilis* als ‚template‘ und den Primern PhoDss(Bs)-for und PhoDss(GFP)-rev amplifiziert. Weiterhin wurde das *gfp*-Gen ohne Startcodon mittels PCR mit dem Vektor pGFP_{uv} als ‚template‘ und den Primern GFP(malss)-for und GFP(UTR)-rev amplifiziert. Die Primer PhoDss(GFP)-rev und GFP(malss)-for wurden so konstruiert, daß sie einen überlappenden Bereich aufweisen. So konnten die beiden PCR-Fragmente (*phoD_{Bs}* und *gfp*) als ‚template‘ für eine Crossing-over PCR eingesetzt werden, bei der mit den Primern PhoDss(Bs)-for und GFP(UTR)-rev ein Fragment amplifiziert wurde, welches aus der Signalsequenz des *phoD_{Bs}*-Gens inklusive der Basenpaare, die für die ersten vier Aminosäuren des reifen Teils des Proteins kodieren, und dem *gfp*-Gen besteht. Das PCR-Produkt *phoD_{Bs}-gfp* wurde mit KpnI und SphI geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen pWH1520 Vektor ligiert (pWHPhoD_{Bs}GFP). Das Fusionsgen *phoD_{Cg}-gfp* lag bereits auf dem *C. glutamicum* Vektor pEKExPhoD_{Cg}GFP vor. Zur Expression von *phoD_{Cg}-gfp* in *B. subtilis* mußte die Konsensus-RBS von *C. glutamicum* gegen die RBS von *torA* mittels PCR ausgetauscht werden. *phoD_{Cg}-gfp* wurde mittels PCR mit dem *C. glutamicum* Vektor pEKExPhoD_{Cg}GFP (Konstruktion siehe III.2.3.2) als ‚template‘ und den Primern PhoDCg-Bs-for, welcher die RBS von *torA* enthält, und TorAGFPBs-rev amplifiziert. Das PCR-Konstrukt wurde mit KpnI und SphI geschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen pWH1520 Vektor ligiert (pWHPhoD_{Cg}GFP). Nach Sequenzierung der beiden Genfusionen, wurde *B. subtilis* Wildtyp und *ΔtatAC_{DY}* mit den beiden entsprechenden Vektoren transformiert und Expression und Export der Fusionsproteine untersucht.

3.2.2 Vergleich der Sekretion von TorA-, PhoD_{Bs}- und PhoD_{Cg}-GFP in *B. subtilis*

Sowohl das PhoD-Signalpeptid aus *B. subtilis* als auch das PhoD-Signalpeptid aus *C. glutamicum* bewirken in *B. subtilis*, wie schon zuvor auch für das TorA-Signalpeptid gezeigt, eine Sekretion von GFP in den Kulturüberstand. Diese Sekretion von GFP ist in allen drei Fällen eindeutig Tat-abhängig, da nur im Wildtyp GFP in den Überstand sekretiert wird und im Gegensatz dazu in der Δtat_{DY} -Mutante kein GFP-Export zu beobachten ist (Abbildung 40). Im Vergleich der Expression der TorA-, PhoD_{Bs}- und PhoD_{Cg}-GFP Fusionsproteine fiel sofort auf, daß PhoD_{Cg}-GFP in den *B. subtilis* Stämmen nur sehr geringem Maße exprimiert wird, TorA-GFP und PhoD_{Bs}-GFP dagegen eine vergleichbar hohe Expression zeigten. Die geringe Synthese von PhoD_{Cg}-GFP wirkt sich offensichtlich auf die Ausbeute an GFP im Kulturüberstand aus, da in diesem Falle auch am wenigsten GFP im Kulturüberstand vorliegt.

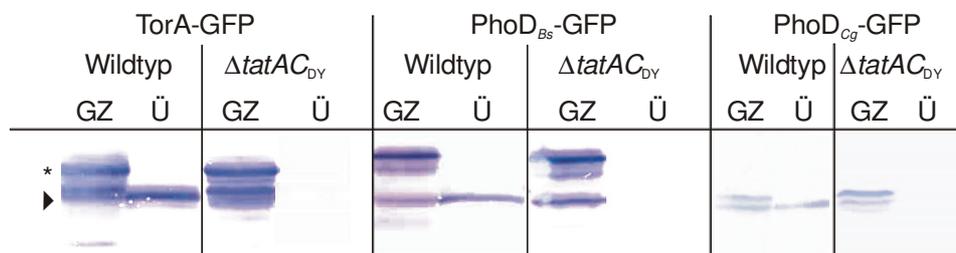


Abbildung 40: Lokalisierung der TorA-, PhoD_{Bs}- und PhoD_{Cg}-GFP Fusionsproteine in *B. subtilis* Wildtyp und $\Delta tat_{AC_{DY}}$. Die Isolierung der Proteine des Gesamtzellextraktes (GZ) und des Überstandes (Ü) erfolgte wie in II. 5.2.2 und 5.2.4 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5, die Proteinmenge im Überstand 1ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1,0. *: Vorläuferprotein, ► : reifes GFP.

Die Wahl des Tat-Signalpeptids scheint hier hingegen auf die Sekretionseffizienz in *B. subtilis* keinen deutlichen Einfluß zu nehmen. Sowohl unter Verwendung der PhoD-Signalpeptide aus *B. subtilis* und *C. glutamicum* als auch unter Verwendung des TorA-Signalpeptids aus *E. coli* scheint das Verhältnis von Gesamtproteinmenge zu reifen Protein im Überstand sich bei den drei verschiedenen Fusionsproteinen kaum voneinander zu unterscheiden und somit eine ähnliche Sekretionseffizienz in allen drei Fällen vorzuliegen. Die ähnliche Sekretionseffizienz könnte bedeuten, daß anscheinend das PhoD-Signalpeptid aus *B. subtilis* keinen entscheidenden Vorteil in der Erkennung durch das *B. subtilis* Tat-System gegenüber den beiden fremden Tat-Signalpeptiden hat. Möglicherweise ist die Spezies-Spezifität in der Erkennung dieser beiden fremden Tat-Signalpeptide durch eine der *B. subtilis* Tat-Translokasen nicht ausgeprägt genug, um eine Beeinträchtigung der Tat-abhängigen Translokation von PhoD_{Cg}-GFP und TorA-GFP im Vergleich zum PhoD_{Bs}-GFP zur Folge zu haben.

Das PhoD-Signalpeptid aus *B. subtilis* wird, wie bereits zuvor erwähnt, nur von der TatAC_D-Translokase erkannt. Für das TorA-Signalpeptid aus *E. coli* und das PhoD-Signalpeptid aus *C. glutamicum* ist dagegen nicht bekannt, an welcher der beiden Translokasen, TatAC_D oder TatAC_Y, sie erkannt werden und eine Translokation vermitteln können. Im Folgenden wurde daher untersucht, an welcher *B. subtilis* Tat-Translokasen das TorA-Signalpeptid eine

Translokation vermitteln kann. Da sich bereits gezeigt hatte, daß das reife Protein offensichtlich auch einen Einfluß auf die Wahl des Exportweges hat (III.3.1.2), wurde sowohl die Translokation von TorA-GFP als auch von TorA-MalE in Bezug auf die beiden möglichen Translokasen untersucht. Dieses konnte jedoch aufgrund seiner niedrigen Synthese in *B. subtilis* nicht für das PhoD_{Cg}-GFP Fusionsproteins untersucht werden.

3.3 Das PhoD_{Bs}-GFP Fusionsprotein wird als einziges Fusionsprotein strikt nur von der TatAC_D-Translokase in *B. subtilis* exportiert

In *B. subtilis* liegen, wie bereits erwähnt, zwei unabhängige TatAC-Systeme vor. Die *tatAC_D*-Gene, welche downstream des Gens für das Tat-Substrat PhoD lokalisiert sind, werden mit der Expression von *phoD* coreguliert. D. h. Phosphatmangel, was die Expression von *phoD* induziert, führt gleichzeitig zur Induktion der *tatAC_D*-Gene. Die *tatAC_Y*-Gene befinden sich an einem anderen Locus im Chromosom und sind von dieser Regulation nicht betroffen. Im Folgenden sollte nun unterschieden werden, über welches Tat-System in *B. subtilis* die Fusionsproteine TorA-GFP, TorA-MalE und PhoD_{Bs}-GFP sekretiert werden. Dazu wurde die Sekretion dieser Fusionsproteine in *B. subtilis* Wildtyp, einer Δ *tatAC_D*-Mutante, einer Δ *tatAC_Y*-Mutante und der Δ *tatAC_{DY}*-Mutante sowohl in Medium mit Phosphatmangel (LPDM) als auch in Medium mit hoher Phosphatkonzentration (HPDM) untersucht (siehe Abbildung 41).

Das Fusionsprotein PhoD_{Bs}-GFP wird bei hohen Phosphatkonzentrationen in keinem der verwendeten *B. subtilis* Stämme in den Kulturüberstand sekretiert (Abbildung 41A, 1-8), wohl aber unter Phosphatmangelbedingungen (Abbildung 41A, 9-16). Da PhoD_{Bs}-GFP aber nur im Wildtyp und in Δ *tatAC_Y* in den Kulturüberstand sekretiert wird, erfolgt die Translokation des Fusionsproteins damit strikt über die TatAC_D- und nicht über die TatAC_Y-Translokase. Dies steht im vollen Einklang mit den von Jongbloed *et al.* (2000) gewonnenen Erkenntnissen, daß die *tatAC_D*-Gene unter Phosphatlimitierenden Bedingungen induziert werden und daß das authentische Tat-Substrat PhoD strikt über die TatAC_D-Translokase transloziert wird.

Unter Verwendung des TorA- anstelle des PhoD_{Bs}-Signalpeptids liegt eine etwas andere Situation vor. TorA-GFP wird sowohl bei Phosphatmangel als auch bei hohen Phosphatkonzentrationen in den Kulturüberstand sekretiert (Abbildung 41C, 1-8 und 9-16). Hierbei erfolgt die Sekretion in allen Stämmen, bis auf die Δ *tatAC_{DY}*-Mutante. D.h., TorA-GFP kann sowohl über die TatAC_D- als auch über die TatAC_Y-Translokase transloziert werden. Eine Translokasenspezifität, wie sie im Falle des PhoD-Proteins gegeben ist, liegt im Falle des TorA-Signalpeptids offensichtlich nicht vor und beide Translokasen können scheinbar das TorA-Signalpeptid problemlos erkennen.

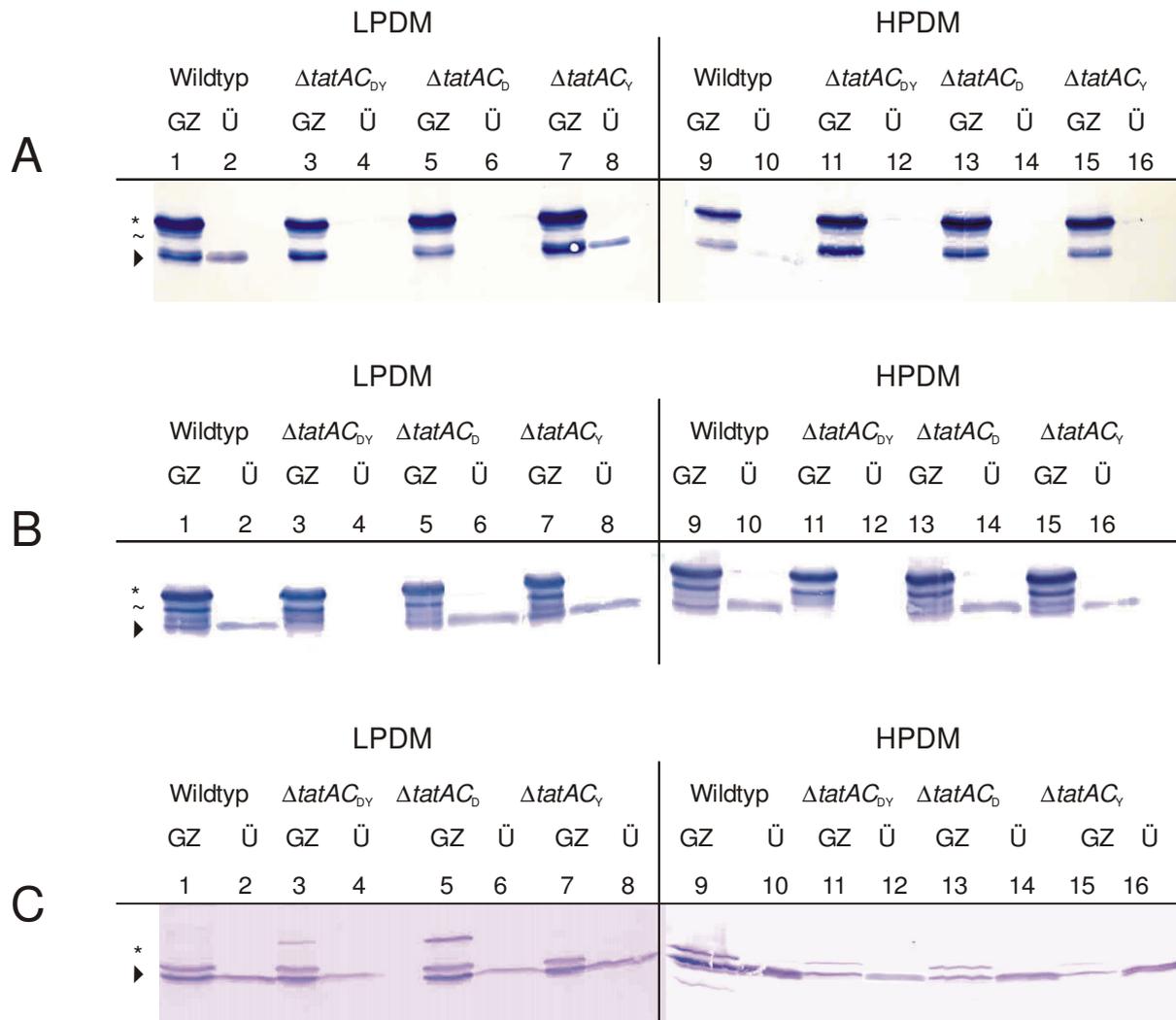


Abbildung 41: Lokalisierung der PhoD_{Bs}-GFP (A), TorA-GFP (B) und TorA-MaleE (C) Genprodukte in *B. subtilis* Wildtyp, $\Delta tatAC_D$, $\Delta tatAC_Y$ und $\Delta tatAC_{DY}$ in Medium mit Phosphatmangel (LPDM) und mit hoher Phosphatkonzentration (HPDM). Die Stämme wurden ÜN in HPDM angezogen, gewaschen und in HPDM und LPDM 4h induziert. Die Isolierung der Proteine des Gesamtzellextraktes (GZ) und des Überstandes (Ü) erfolgte wie in II.5.2.2 und 5.2.4 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5, die Proteinmenge im Überstand 1ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1,0. *: Vorläuferprotein, ▶ : reifes Protein, ~: cytosolisches Abbauprodukt.

Das Sekretionsverhalten von TorA-MaleE ist in Abbildung 41C zu sehen. MaleE wird in allen Stämmen, sowohl bei Phosphatmangel (Abbildung 41C, 1-8) als auch bei hohen Phosphatkonzentrationen (Abbildung 41C, 9-16) transloziert. Reifes MaleE ist sowohl im *B. subtilis* Wildtyp, als auch in den drei verschiedenen *tat*-Mutanten ($\Delta tatAC_{DY}$, $\Delta tatAC_D$ und $\Delta tatAC_Y$) im Kulturüberstand vorhanden. Jedoch ist die Menge an sekretiertem MaleE in der $\Delta tatAC_{DY}$ -Mutante (Abbildung 41C, 4 und 12), also in der Mutante in der beide Tat-Translokasen ausgeschaltet sind, geringer als in den beiden Stämmen in denen jeweils nur eine Tat-Translokase ausgeschaltet ist (Abbildung 41C, 6 und 14 bzw. 8 und 16) und deutlich geringer als im Wildtyp (Abbildung 41C, 2 und 10). D.h., die Sekretion von MaleE erfolgt zwar auch Sec-abhängig, jedoch wird eine Tat-abhängige Sekretion unter Verwendung beider Tat-

Systeme bevorzugt. Dies bedeutet, daß das TorA-Signalpeptid, wie schon im Falle des TorA-GFP Fusionsprotein gezeigt, beide Tat-Systeme in *B. subtilis* benutzen kann, TorA-MalE aber auch, im deutlichen Gegensatz zu TorA-GFP, zusätzlich auch noch Sec-abhängig sekretiert werden kann. Da beide Fusionsproteine über das gleiche Signalpeptid verfügen, muß das reife Protein hier der Grund für die zusätzlich beobachtete Sec-abhängige Translokation sein.

3.4 Das von *B. subtilis* Tat-abhängig sekretierte GFP ist inaktiv

C. glutamicum sekretiert GFP Tat-abhängig in aktiver Form in den Überstand. Dies konnte mittels Fluoreszenzmessung deutlich gezeigt werden. Um nun zu überprüfen, ob *B. subtilis* ebenfalls GFP in aktiver Form sekretiert, wurde analog zur Vorgehensweise bei *C. glutamicum* die Fluoreszenz des sekretierten GFP untersucht und mittels eines Spektrometers gemessen (siehe Abbildung 42).

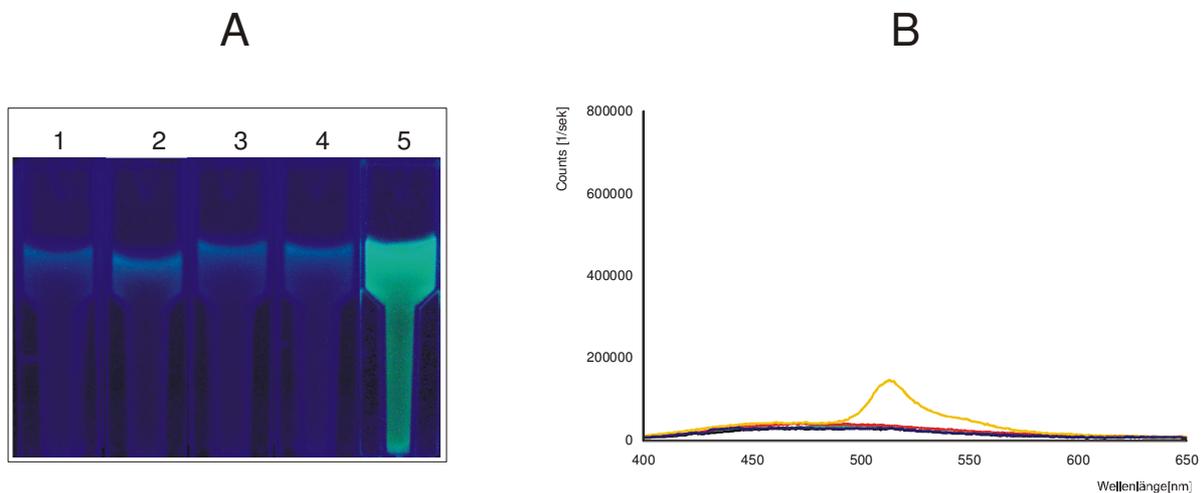


Abbildung 42A: Detektion der GFP-Fluoreszenz in Kulturüberständen von *B. subtilis*. Die Proteine aus 50ml Kulturüberstand wurden auf 1ml aufkonzentriert und in 1ml-Küvetten umgefüllt (siehe II.5.11). Die Proben wurden mit einer UV-Lampe, die Licht mit einer Wellenlänge von 366nm emittiert, bestrahlt. 1: Negativkontrolle (Leervektor), 2: TorA-GFP, 3: PhoD_{Cg}-GFP, 4: PhoD_{Bs}-GFP, 5: Positivkontrolle (TorA-GFP in *C. glutamicum*). **B: Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz:** (siehe II.5.11). -: Negativkontrolle, -: Positivkontrolle, -: TorA-GFP, -: PhoD_{Cg}-GFP, -: PhoD_{Bs}-GFP.

Die Kulturüberstände von *B. subtilis* Wildtyp zeigen weder im Falle des TorA-GFP, noch im Fall von PhoD_{Bs}- und PhoD_{Cg}-GFP keine grüne Fluoreszenz. Dies deutet an, daß GFP entweder in inaktiver Form und/oder im Falle des PhoD_{Cg}-GFP Fusionsproteins in zu niedriger Konzentration im Kulturüberstand vorliegt - im deutlichen Kontrast zur Positivkontrolle, bei der der Kulturüberstand von *C. glutamicum* Wildtyp, der TorA-GFP sekretiert, verwendet wurde (siehe Abbildung 42A). Die Messung der Fluoreszenz mittels Spektroskopie erhärtet den überraschenden Befund. Weder im Fall von TorA-GFP, noch im Fall von PhoD_{Bs}- oder PhoD_{Cg}-GFP konnte Fluoreszenz in den Proben des Kulturüberstandes detektiert werden.

In den Untersuchungen zur Proteinlokalisierung der TorA-, PhoD_{Bs}- und PhoD_{Cg}-GFP Fusionsproteinen konnte gezeigt werden, daß in allen drei Fällen reifes GFP in den Überstand sekretiert wurde. Im Falle von TorA-GFP und PhoD_{Bs}-GFP ist die Ausbeute an GFP im Überstand relativ hoch, im Gegensatz zum PhoD_{Cg}-GFP Fusionsprotein, bei dem die Menge an sekretiertem GFP, höchstwahrscheinlich aufgrund der niedrigeren Synthese, deutlich geringer ist (siehe Abbildung 40). Daher besteht zumindest im Falle des PhoD_{Cg}-GFP Fusionsprotein die Möglichkeit, daß zu wenig reifes GFP im Überstand vorliegt als das die Fluoreszenz meßbar wäre. Im Falle der TorA- und PhoD_{Bs}-GFP Fusionsproteine ist diese Erklärung sehr unwahrscheinlich, da die Western Blot Experimente gezeigt haben, daß eine große Menge an reifem GFP im Überstand vorliegt. Dies bedeutet, daß das sekretierte GFP im Kulturüberstand von *B. subtilis* im deutlichen Gegensatz zu der Situation in *C. glutamicum* in inaktiver Form vorliegt.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in *B. subtilis*

Bei den Fusionsproteinen TorA-MalE, TorA-GFP und PhoD_{Bs}-GFP erfolgt in *B. subtilis* eine effiziente Sekretion des reifen MalE bzw. GFP mit einer hohen Ausbeute in den Kulturüberstand. Im Falle des PhoD_{Cg}-GFP Fusionsprotein erfolgt ebenfalls eine effizient Sekretion, jedoch ist die Expression von *phoD_{Cg}-gfp* in *B. subtilis* sehr niedrig, was in einer niedrigen Ausbeute an reifem GFP im Kulturüberstand resultiert. In keinem Fall wurde reifes Protein in der Zellwand detektiert, was bedeutet kann, daß die reifen Proteine scheinbar problemlos und ohne störende Wechselwirkungen die Zellwand von *B. subtilis* passieren können. Es ist aber auch denkbar, daß in der Zellwand steckengebliebenes reifes Protein sehr schnell durch Proteasen abgebaut wird und daher nicht detektiert werden konnte. Bei der Analyse, über welchen der beiden in *B. subtilis* vorhandenen Tat-Wege, TatAC_D und TatAC_Y, die Fusionsproteine transloziert werden, zeigten sich Unterschiede zwischen den Fusionsproteinen. So wird unter Verwendung des PhoD-Signalpeptids aus *B. subtilis* GFP spezifisch nur über TatAC_D transloziert. Dies steht im Einklang mit dem Befund, daß das authentische *B. subtilis* Tat-Substrat PhoD ebenfalls spezifisch nur über TatAC_D transloziert wird. Unter Verwendung des TorA-Signalpeptids dagegen erfolgt sowohl eine Translokation des GFP über die TatAC_D- als auch über die TatAC_Y-Translokase, die Sekretionseffizienz zwischen beiden Translokasen scheint sich dabei nicht zu unterscheiden. Die Sekretion von MalE mit dem TorA-Signalpeptid zeigte ein überraschendes Ergebnis, da es sowohl Tat-abhängig durch beide TatAC-Systeme als auch Sec-abhängig transloziert werden kann. Dabei wird aber die Tat-abhängige Translokation anscheinend bevorzugt, da im Fall der Tat-abhängigen Sekretion über TatAC_D und TatAC_Y größere Mengen an sekretiertem reifen MalE im Kulturüberstand gefunden wurden.

Erstaunlicherweise ist das GFP, das in allen Fällen zwar strikt Tat-abhängig sekretiert wird, nicht in aktiver Form im Kulturüberstand vorhanden. Entweder kommt es schon vor der Translokation zu einer Falschfaltung des GFP, oder es wird während der Zellwandpassage oder im Kulturüberstand durch Proteasen in eine inaktive Form überführt.

4. Untersuchungen zur Spezies-Spezifität bei der Signalpeptiderkennung im Tat-abhängigen Proteinexport

In der Signalerkennung von Tat-Substraten durch die Tat-Translokase sind Fälle bekannt, bei denen ein fremdes Tat-Signalpeptid nicht durch die Tat-Translokase eines bestimmten Organismus erkannt wird und dadurch der Export des Substrates nicht stattfindet. Dieses Phänomen wird Spezies-Spezifität genannt (siehe auch I.4.1.4).

In den vorrangegangenen Untersuchungen zur Sekretion in *S. carnosus*, *C. glutamicum* und *B. subtilis* konnte bereits gezeigt werden, daß das Signalpeptid von TorA aus *E. coli* von bisher allen untersuchten Tat-Translokasen erkannt wird und so zu einer Tat-abhängigen Translokation des jeweiligen reifen Proteins führt. Auch die Signalpeptide von PhoD aus *C. glutamicum* und *B. subtilis* wurden in *C. glutamicum* und *B. subtilis* von der jeweils anderen Tat-Translokase erkannt und führten zu einer Translokation der Fusionsproteine über die Cytoplasmamembran und schließlich zur Sekretion der reifen Proteine in den Kulturüberstand.

Im Folgenden wurden weiterführende Untersuchungen zur Spezies-Spezifität durchgeführt und zusammen mit den bisher durchgeführten Untersuchungen global betrachtet. D.h. zusätzlich zu dem Signalpeptid von TorA wurden auch die Signalpeptide von PhoD aus *C. glutamicum* und *B. subtilis* in allen Organismen einschließlich *E. coli* in Bezug auf die Erkennung durch die Tat-Translokase untersucht.

4.1 Konstruktion des *torA-gfp* Fusionsgens zur Expression in *E. coli* und der *phoD_{Cg}*- und *phoD_{Bs}-gfp* Fusionsgene zur Expression in *E. coli* und *S. carnosus*

4.1.1 Konstruktion des *torA-gfp* Fusionsgens für die Expression in *E. coli*

Die Fusion der *torA*-Signalsequenz mit dem *gfp*-Gen wurde mittels Crossing-over PCR durchgeführt (siehe Abbildung 18A und B). Dazu wurde zunächst die *torA*-Signalsequenz und die Basen, die für die ersten vier Aminosäuren des reifen TorA kodieren, inklusive der authentischen RBS des *torA*-Gens mittels PCR mit dem Vektor pBBRTorAMalE als ‚template‘ und den Primern TorA(GFP)Ec-for und TorA(UTR)-rev amplifiziert (Fragment 1). Weiterhin wurde das *gfp*-Gen ohne Startcodon mittels PCR mit dem Vektor pGFP_{uv} als ‚template‘ und den Primern Tor/GFP-for und GFP(UTR)-rev amplifiziert (Fragment 2). Die Primer TorA(UTR)-rev und TorA/GFP-for wurden so gewählt, daß sie einen überlappenden Bereich aufweisen. So konnten die beiden PCR-Fragmente als ‚template‘ für eine Crossing-over PCR eingesetzt werden, bei der mit den Primern TorA(GFP)Ec-for und GFP(UTR)-rev ein Fragment amplifiziert wurde, welches aus der *torA*-Signalsequenz, inklusive der Basenpaare, die für ersten vier Aminosäuren des reifen TorA kodieren, und dem *gfp*-Gen besteht (siehe Abbildung 18C). Das PCR-Produkt wurde mit HindIII und EcoRI geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen pBBR1MCS-2 Vektor ligiert (pBBRTorAGFP). Nach Sequenzierung der Genfusion, wurden Wildtyp und Δ *tatABC/E*-Mutante von *E. coli* mit dem Vektor pBBRTorAGFP transformiert.

4.1.2 Konstruktion der *phoD_{Cg}*- und *phoD_{Bs}-gfp* Fusionsgene für die Expression in *E. coli*

Die Fusionsgene *phoD_{Bs}-gfp* und *phoD_{Cg}-gfp* wurden bereits für die Untersuchungen zur Sekretion in *C. glutamicum* konstruiert (siehe III.2.7.1 und 2.3.2). In früheren Versuchen hatte sich gezeigt, daß die Konsensus-RBS von *C. glutamicum* zur Expression von Genen in *E. coli* ausreichend ist und so konnte darauf verzichtet werden, mittels PCR eine *E. coli* RBS vor die Fusionsgene zu klonieren. *phoD_{Cg}-gfp* wurde mit den Restriktionsenzymen KpnI und EcoRI aus dem pEKExPhoD_{Cg}GFP Vektor geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pBBR1MCS-2 ligiert (pBBRPhoD_{Cg}GFP). Im Falle des *phoD_{Bs}-gfp* Fusionsgens mußten mittels PCR neue Schnittstellen eingefügt werden. Dazu wurde *phoD_{Bs}-gfp* mittels PCR mit dem *C. glutamicum* Vektor pEKExPhoD_{Bs}GFP als ‚template‘ und den Primern PhoDCgRBS-for und CgTorAGFP-rev amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit KpnI und EcoRI geschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen pBBR1MCS-2 Vektor ligiert (pBBRPhoD_{Bs}GFP). Nach Sequenzierung der Genfusionen, wurden Wildtyp und Δ *tatABC/E*-Mutante von *E. coli* mit den beiden Vektoren transformiert.

4.1.3 Konstruktion der *phoD_{Cg}*- und *phoD_{Bs}-gfp* Fusionsgene für die Expression in *S. carnosus*

Wie schon unter III.4.1.2 für die Umklonierung der *phoD_{Cg}*- und *phoD_{Bs}-gfp* Fusionsgene für die Expression in *E. coli* beschrieben, wurden für die Adaptation der Fusionsgene für die Expression in *S. carnosus* die bereits für *C. glutamicum* konstruierten Fusionsgene als ‚templates‘ verwendet. Frühere Versuche hatte gezeigt, daß für die Expression von Genen in *S. carnosus* die *C. glutamicum* RBS nicht verwendet werden kann, so daß mittels PCR die RBS der *S. hyicus* Lipase upstream der Genfusion eingefügt werden mußte. Dazu wurde das *phoD_{Cg}-gfp* Fusionsgen mit dem Vektor pEKExPhoD_{Cg}GFP als ‚template‘ und den Primern ScPhoDCg-for und CgTorAGFP-rev amplifiziert. Der Primer CgTorAGFP-for enthält die RBS der *S. hyicus* Lipase (GAAGGGACTGGTTTA). Das *phoD_{Bs}-gfp* Fusionsgen wurde mit dem Vektor pEKExPhoD_{Bs}GFP als ‚template‘ und den Primern ScPhoDBs-for und CgTorAGFP-rev amplifiziert. Der Primer CgRBSTorA-for enthält ebenfalls die oben genannte Konsensus-RBS für *S. carnosus*. Beide PCR-Produkte wurden anschließend mit SphI und EcoRI verdaut und in den mit den gleichen Enzymen verdauten Vektor pXR100 ligiert (pXRPhoD_{Cg}GFP bzw. pXRPhoD_{Bs}GFP). Nach Sequenzierung der Genfusionen, wurden *S. carnosus* Wildtyp und Δ *tatC*-Mutante mit den beiden Vektoren transformiert.

4.2 Das *E. coli* Signalpeptid von TorA wird in allen untersuchten Organismen von der jeweiligen Tat-Translokase erkannt

In den Kapiteln III.1.6, 2.4 und 3.1 wurde bereits gezeigt, daß das Tat-Signalpeptid des TorA-Proteins aus *E. coli* in allen drei hier untersuchten Organismen von der Tat-Translokase erkannt wird und anschließend eine Translokation des TorA-GFP Fusionsprotein über die Cytoplasmamembran erfolgt. In *E. coli* wurde der Export von TorA-GFP im Folgenden untersucht und im Zusammenhang mit den Exportverhalten in den drei anderen Organismen betrachtet (siehe Abbildung 43). In *E. coli* wird das TorA-GFP Fusionsprotein ebenfalls, wie erwartet, Tat-abhängig exportiert. D. h im *E. coli* Wildtyp wird TorA-GFP effizient über die Cytoplasmamembran transloziert und das reife GFP akkumuliert im Periplasma (Abbildung 43, 1-2), wohingegen in der *E. coli* Δ tatABC/E-Mutante kein reifes Protein im Periplasma vorkommt, sondern eine cytoplasmatische Akkumulation von TorA-GFP Abbauprodukten auftritt (Abbildung 43, 3-4). In den Wildtypstämmen von *C. glutamicum* (Abbildung 43, 5-6), *S. carnosus* (Abbildung 43, 9-10) und *B. subtilis* (Abbildung 43, 13-14) wird TorA-GFP ebenfalls effizient, wie bereits bekannt, über die Cytoplasmamembran transloziert. Jedoch erfolgt nur in *C. glutamicum* und *B. subtilis* eine Sekretion des reifen GFP in den Kulturüberstand, in *S. carnosus* kann das reife GFP die Zellwand nicht passieren, da es in ihr stecken bleibt. In den jeweiligen *tat*-Mutanten der drei Organismen kommt es, wie in *E. coli*, zu keiner Translokation von GFP (Abbildung 43, 7-8, 11-12 und 15-16).

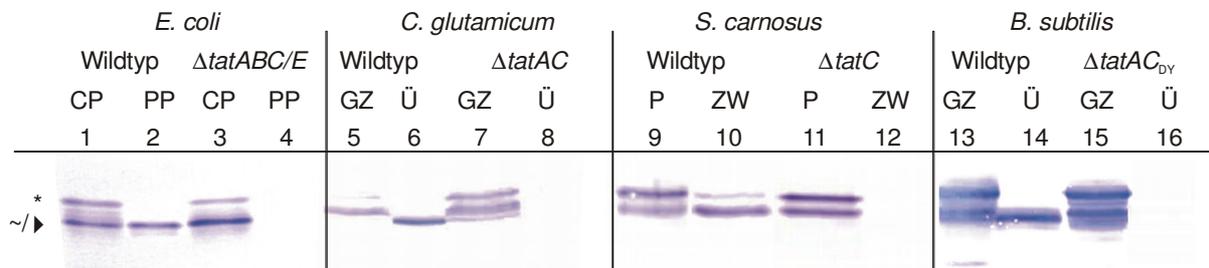


Abbildung 43: Lokalisation der TorA-GFP Genprodukte in *E. coli*, *C. glutamicum*, *S. carnosus* und *B. subtilis*. Die Isolierung der Proteine des Cytoplasmas und der Membran (CP), sowie des Periplasmas (PP) in *E. coli* erfolgte mittels Osmoschock wie in II.5.6 beschrieben. Die Isolierung der Proteine des Gesamtzellextraktes (GZ) und des Überstandes (Ü) bei *C. glutamicum* und *B. subtilis* erfolgte wie in II.5.2.2 bzw. 5.2.3 und II.5.2.4 beschrieben. Die Isolierung der Proteine der Protoplasten und Zellwand bei *S. carnosus* erfolgte wie in II.5.4 beschrieben. Die in der Gesamtzellfraktion bzw. Protoplastenfraktion aufgetragene Proteinmenge entspricht 1ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5, die Proteinmenge im Überstand 1ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1,0 für *B. subtilis* und *C. glutamicum* und 1,5 für *S. carnosus*. Die in der Cytoplasma-/Membran und Periplasma aufgetragene Proteinmenge beträgt 10µg. *: TorA-GFP Vorläuferprotein, ▶ : reifes GFP.

Scheinbar ist das TorA-Signalpeptid universell einsetzbar, da es bislang von allen bisher untersuchten Tat-Translokasen erkannt wird. Möglicherweise gibt es bei den Tat-Signalpeptiden, bei denen Spezies-Spezifität in der Erkennung durch eine fremde Tat-Translokase vorhanden ist, Elemente im Signalpeptid, die eine Erkennung oder eine Translokation durch die fremde Translokase verhindern. Solche Elemente fehlen anscheinend im TorA-Signalpeptid, was zu der problemlosen Translokation von den bisher untersuchten Proteinen mit TorA-Signalpeptid auch in fremden Organismen führt.

4.3 Das Tat-Signalpeptid von PhoD aus *C. glutamicum* wird nur von *C. glutamicum* selbst und *B. subtilis* erkannt

Das Signalpeptid des PhoD-Proteins aus *C. glutamicum* führte sowohl in *C. glutamicum* selbst (Abbildung 44, 5-6) als auch in *B. subtilis* Wildtyp (Abbildung 44, 13-14) zu einer Tat-abhängigen Translokation von PhoD_{Cg}-GFP und zu einer Sekretion des reifen GFP in den Überstand. In *E. coli* und *S. carnosus* konnte keine Tat-abhängige Translokation des PhoD_{Cg}-GFP Fusionsproteins beobachtet werden. In beiden Fällen wurde nur die cytoplasmatisch lokalisierte Vorläuferform bzw. Abbauprodukte derselben detektiert (Abbildung 44, 1-4 und 13-16). D. h., in *E. coli* und *S. carnosus* wird das PhoD-Signalpeptid von *C. glutamicum* offensichtlich aufgrund von Spezies-spezifischen Unterschieden in der Signalerkennung nicht von der jeweiligen Tat-Translokase erkannt, ganz im Gegensatz zu der Situation bei *B. subtilis*, wo mindestens eine der beiden Tat-Translokasen das Signalpeptid aus *C. glutamicum* erkennt.

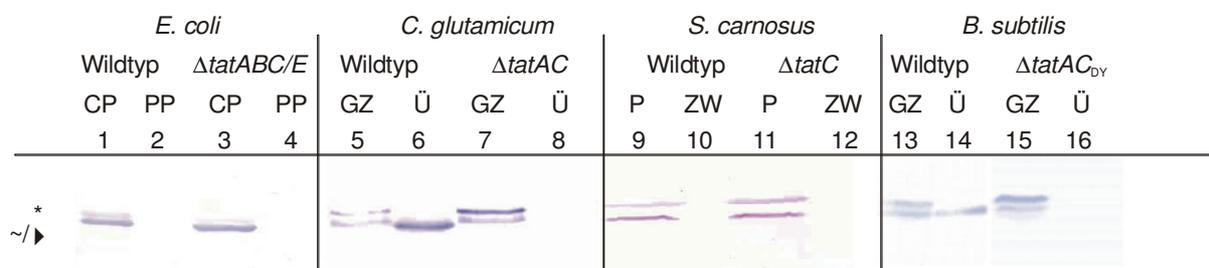


Abbildung 44: Lokalisation der PhoD_{Cg}-GFP Genprodukte in *E. coli*, *C. glutamicum*, *S. carnosus* und *B. subtilis*. Weitere Erläuterungen siehe Legende zu Abbildung 43. *: PhoD_{Cg}-GFP Vorläuferprotein, ▶: reifes GFP, ~: cytoplasmatischen Abbauprodukt.

4.4 Das Signalpeptid von PhoD aus *B. subtilis* wird nur von *B. subtilis* selbst und *C. glutamicum* erkannt

Wie schon im Fall des PhoD-Signalpeptids aus *C. glutamicum*, wird auch das PhoD-Signalpeptid aus *B. subtilis* nur in den Wildtypstämmen von *C. glutamicum* (Abbildung 45, 5-8) und *B. subtilis* (Abbildung 45, 13-16) erkannt und Tat-abhängig transloziert. In *E. coli* und *S. carnosus* wurde für das PhoD_{Bs}-GFP Fusionsprotein keine Tat-abhängige Translokation beobachtet. In beiden Fällen konnte erneut nur die cytoplasmatisch lokalisierte Vorläuferform bzw. Abbauprodukte derselben detektiert werden (Abbildung 45, 1-4 und 9-12). Wie bereits im Falle des PhoD-Signalpeptids von *C. glutamicum* kann in *E. coli* und *S. carnosus* auch das PhoD-Signalpeptid von *B. subtilis* aufgrund von Spezies-spezifischen Unterschieden in der Signalerkennung nicht von der jeweiligen Tat-Translokase erkannt werden kann, im Gegensatz zu der Situation bei *C. glutamicum*, wo das *B. subtilis* Signalpeptid von der Tat-Translokase erkannt wird.

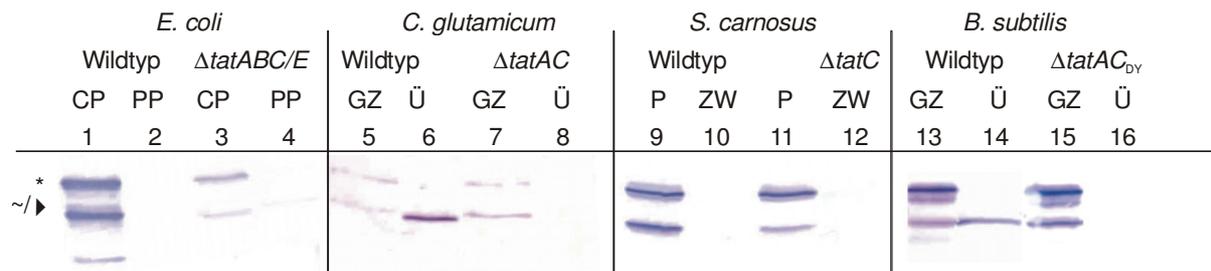


Abbildung 45: Lokalisation des PhoD_{Bs}-GFP Fusionsprotein in *E. coli*, *C. glutamicum*, *S. carnosus* und *B. subtilis*. Weitere Erläuterungen siehe Legende zu Abbildung 43. *: PhoD_{Bs}-GFP Vorläuferprotein, ▶: reifes GFP, ~: cytoplasmatisches Abbauprodukt.

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Spezies-Spezifität bei der Signalpeptid-erkennung im Tat-abhängigen Proteinexport

Das TorA-Signalpeptid aus *E. coli* wird in allen hier untersuchten Organismen durch die jeweilige Tat-Translokase erkannt und über die Cytoplasmamembran transloziert. Die Eigenschaften des TorA-Signalpeptid sind somit mit den hier untersuchten Tat-Translokasen in *B. subtilis*, *C. glutamicum* und *S. carnosus* kompatibel. Das PhoD-Signalpeptid von *B. subtilis* wird nur von den Tat-Translokasen von *B. subtilis* und von *C. glutamicum* erkannt, nicht jedoch von *S. carnosus* und *E. coli*. Genauso verhält es sich auch mit dem PhoD-Signalpeptid von *C. glutamicum*, welches ebenfalls nur von den Tat-Translokasen von *B. subtilis* und *C. glutamicum* erkannt wird. Offensichtlich weisen die PhoD-Signalpeptide aus *B. subtilis* und aus *C. glutamicum* Eigenschaften auf, welche aus bislang unbekanntem Gründen nicht mit den Tat-Translokasen in *E. coli* und *S. carnosus* kompatibel sind und so eine Erkennung und den Export in *E. coli* und *S. carnosus* verhindern. Die Eigenschaften im PhoD-Signalpeptid von *B. subtilis* und *C. glutamicum* scheinen aber von ähnlich Natur zu sein, da die Signalpeptide sowohl von der Tat-Translokase in *C. glutamicum* als auch von mindestens einer der Tat-Translokasen in *B. subtilis* erkannt werden. Möglicherweise ist die große Homologie der PhoD-Proteine aus *B. subtilis* und *C. glutamicum* zueinander der Grund dafür, daß sie über ähnliche Eigenschaften verfügen und deshalb deren Signalpeptide in beiden Organismen von der Tat-Translokase erkannt und Tat-abhängig exportiert werden.

IV. Diskussion

Gram-positive Bakterien werden schon lange erfolgreich als Sekretionssysteme für die industrielle Gewinnung von homologen Proteinen genutzt. So werden bei der Sekretion von Amylasen, Lipasen und Proteasen in *Bacillus*-Arten Ausbeuten von bis zu 20g/l dieser Enzyme im Kulturüberstand erzielt (Ferrari *et al.*, 1993). Als Exportweg wurde hierbei bislang der Sec-Weg verwendet. Im Sec-Weg nehmen die translozierten Proteine ihre aktive, vollständig gefaltete Konformation erst nach der Translokation ein, da der Sec-Weg die Proteine nur in ungefalteter Form über die Cytoplasmamembran translozieren kann. Dies stellt auch das Hauptproblem in der Sekretion von heterologen Proteinen mittels des Sec-Weges dar. Bei heterologen Proteinen treten oftmals aufgrund von fehlenden oder unzureichenden Faltungsfaktoren auf der *trans*-Seite der Membran Faltungsprobleme auf, die in einer langsamen oder inkorrekten Faltung resultieren. Dies hat zur Folge, daß ein Großteil der sekretierten Proteine schnell Opfer des extrazellulären proteolytischen Abbaus wird und dadurch die Ausbeute an sekretierten heterologen Proteinen sehr gering ist (Bolhuis *et al.*, 1999; Bolhuis *et al.*, 1996; Kontinen und Sarvas, 1993).

Bakterien verfügen neben dem Sec-Weg noch über einen weiteren Hauptexportweg für Proteine, nämlich über den Tat-Weg. Der Tat-Weg hat die herausragende Eigenschaft vollständig gefaltete Proteine über die Cytoplasmamembran translozieren zu können, d. h. die Substrate des Tat-Weges nehmen bereits im Cytoplasma vor der Translokation ihre vollständig gefaltete und aktive Konformation ein. Somit sollten extrazelluläre Faltungsprobleme und die damit verbundene Anfälligkeit gegenüber dem extrazellulären proteolytischen Abbau kein „bottleneck“ in der Tat-abhängigen Sekretion darstellen. Trotzdem wurde für die sekretorische Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien als Wirtssysteme der Tat-Weg bislang noch nicht verwendet.

In dieser Arbeit wurde die Tat-abhängige Sekretion von verschiedenen heterologen Substraten in den Gram-positiven Bakterien *S. carnosus*, *C. glutamicum* und *B. subtilis* untersucht. Diese Organismen wurden ausgewählt, da sie alle drei eine unterschiedliche Zellform und Zusammensetzung der Zellwand aufweisen und somit untersucht werden konnte, ob dies einen Einfluß auf die Sekretionsleistung hat. Nur das Tat-System von *B. subtilis* war bisher identifiziert und charakterisiert, so daß in dieser Arbeit auch die Identifizierung und Charakterisierung der Tat-Systeme von *S. carnosus* und *C. glutamicum* erfolgte.

1. Untersuchungen zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in *S. carnosus*

S. carnosus gehört zur Gruppe der Gram-positiven Kokken und ist ein enger Verwandter des pathogenen *S. aureus*, welcher u. a. Haut- und Wundinfektionen auslösen kann. *S. carnosus* wird seit langem in der Lebensmittelindustrie als Starterkultur eingesetzt (Liepe, 1982) und gewinnt aufgrund seiner relativ hohen Sekretionsleistung von bis zu 2g/l (Dilsen *et al.*, 2000) als Produktionsorganismus für biotechnologisch relevante Proteine immer mehr an Bedeutung. Im Gegensatz zu seinem pathogenen Verwandten *S. aureus* ist das Genom von

S. carnosus noch nicht vollständig sequenziert und annotiert, so daß bisher nicht bekannt war, ob *S. carnosus* über *tat*-Gene verfügt. *S. aureus* besitzt laut Analyse seiner Genomsequenz ein *tatA*- und einem *tatC*-Gen, somit gehört sein Tat-System zur Klasse der Tat-Minimaltranslokasen.

1.1 *S. carnosus* verfügt über eine funktionelle Tat-Minimaltranslokase

Mittels der *tat*-Gene aus *S. aureus* als Sonden konnten in *S. carnosus* zwei *tat*-Gene, *tatA* und *tatC*, identifiziert werden. Somit besitzt *S. carnosus* ebenfalls, wie *S. aureus*, mindestens die Gene für eine Tat-Minimaltranslokase. Das Fehlen von weiteren Tat-Komponenten, wie TatB und/oder TatE, ist typisch für den Stamm der Firmicuten, zu der neben den Bacillus-Arten auch die *Staphylococce*n gehören. Es kann aber trotzdem nicht ganz ausgeschlossen werden, daß *S. carnosus* über die Gene für weitere Tat-Komponenten, wie z. B. TatB oder sogar TatE, verfügt, die auf einem anderen Bereich des Chromosoms liegen. Gewißheit darüber kann erst erlangt werden, sobald das komplette Genom von *S. carnosus* sequenziert und ausgewertet ist. Um die Funktionalität des TatAC-Systems von *S. carnosus* beweisen zu können, mußte gezeigt werden, daß der Export eines Tat-Substrates, der im Wildtyp stattfindet, in einer *tat*-Mutante blockiert ist. Dazu wurde ein Stamm konstruiert, bei dem das *tatC*-Gen deletiert wurde (Δ *tatC*), da sich gezeigt hatte, daß das TatC-Protein bei allen bisher untersuchten Tat-Systemen eine essentielle Komponente ist (zur Übersicht: Palmer und Berks, 2003).

Da kein authentisches *S. carnosus* Tat-Substrat bekannt war, wurde das TorA-CGTase Fusionsprotein als Tat-abhängiges Reporterprotein verwendet um das Exportverhalten in *S. carnosus* Wildtyp und Δ *tatC* zu überprüfen. Dieses Fusionsprotein besteht aus dem Tat-Signalpeptid der TMAO-Reduktase (TorA) aus *E. coli* und dem reifen Teil der Cyclodextrin-Glycosyltransferase (CGTase) aus *A. gottschalkii*. Das TorA-Signalpeptid wurde verwendet, da bekannt war, daß es den Export von Fremdproteinen in heterologen Systemen vermitteln kann.

Das Exportverhalten des TorA-CGTase Fusionsproteins wurde anhand der Prozessierungskinetik und subzellulären Lokalisierung des TorA-CGTase Fusionsproteins in *S. carnosus* Wildtyp und Δ *tatC* untersucht. Im Pulse Chase-Experiment konnte gezeigt werden, daß im Wildtyp das TorA-CGTase Fusionsprotein in einer für den Tat-Weg typischen, im Vergleich zum Sec-Weg langsamen Kinetik prozessiert wird, während in der Δ *tatC*-Mutante, die kein TatC synthetisieren kann, die Prozessierung blockiert ist (Abbildung 13). Dies zeigt eindeutig, daß in Abwesenheit des TatC-Proteins in *S. carnosus* keine Prozessierung und somit auch kein Export des TorA-CGTase Fusionsproteins stattfindet. Somit kann anhand dieser Ergebnisse die klare Aussage getroffen werden, daß das Tat-Signalpeptid von TorA einen Tat-abhängigen Export in *S. carnosus* vermittelt und daraus resultierend *S. carnosus* über ein funktionelles TatAC-System verfügt.

1.2 Das Tat-System von *S. carnosus* scheint physiologisch eine untergeordnete Rolle zu spielen

Bei allen bislang untersuchten Bakterien ist das Tat-System im Gegensatz zum Sec-System nicht essentiell. Dies bedeutet aber nicht, daß es keine wichtige Rolle spielt. In mehreren Bakterien zeigte sich, daß ein Ausschalten des Tat-Weges drastische Konsequenzen haben kann. In *E. coli* ist das Tat-System u. a. sowohl von entscheidender Bedeutung für die Integrität der Zellhülle, was sich in der Resistenz gegenüber Detergenzien äußert, als auch für die Zellteilung. So konnte gezeigt werden, daß eine *E. coli* *tat*-Mutante eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Detergenz SDS aufweist und Zellketten bildet, die aufgrund einer fehlerhaften Zellteilung entstehen (Stanley *et al.*, 2001). In beiden Fällen ist der Phänotyp das Resultat einer Mislokalisierung zweier Tat-abhängiger Amidasen, die in den Zellwandmetabolismus involviert sind (Ize *et al.*, 2003). Auch im Gram-positiven Bakterium *Streptomyces coelicolor* scheint der Tat-Weg eine extrem wichtige Rolle zu spielen, da *tatB*- und *tatC*-Mutanten ein deutliches Wachstumsdefizit aufweisen und mittels Sequenzanalyse bis zu 230 potentielle Tat-Substrate identifiziert werden konnten (Schaerlaekens *et al.*, 2004a). In Halobakterien stellt der Tat-Weg augenscheinlich sogar den wichtigsten Exportweg dar, da hier anscheinend die überwiegende Mehrheit aller Exportproteine ein potentielles Tat-Signalpeptid aufweist (Rose *et al.*, 2002).

Um abschätzen zu können, in wie weit der Tat-Weg in *S. carnosus* genutzt wird, wurde daher die Δ *tatC*-Mutante auf phänotypische Merkmale untersucht, die sie vom Wildtyp unterscheidet. Dies schloß sowohl die Zellmorphologie als auch das Wachstumsverhalten ein. Die Untersuchungen ergaben, daß das Ausschalten des Tat-Weges in *S. carnosus* unter den hier untersuchten verschiedenen Laborbedingungen weder einen Effekt auf das Wachstum noch auf die Zellmorphologie hatte (Abbildung 14). Die Δ *tatC*-Mutante zeigte keine offensichtlichen phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp. Auch in der Anwendung der Methoden zu den Exportuntersuchungen, wie z. B. Aufschluß der *S. carnosus* Zellen mittels Zell-Lyse, zeigten sich keine Unterschiede im Lyseverhalten zwischen Wildtyp und Δ *tatC*-Mutante, was auf mögliche Defekte in der Zellwand und somit auf eine Rolle des Tat-Systems im Zellwandmetabolismus hingewiesen hätte. Diese Resultate lassen darauf schließen, daß der Tat-Weg in *S. carnosus*, zumindest unter den hier gewählten Laborbedingungen, keine wichtige Rolle spielt.

Die Suche nach potentiellen Tat-Substraten bietet eine Möglichkeit, weitere Hinweise auf die Bedeutung des Tat-Weges für *S. carnosus* zu erhalten. Aufgrund des noch nicht vollständig sequenzierten Genoms konnte jedoch nicht mittels Sequenzanalyse nach Tat-Substraten gesucht werden. Daher wurden alternativ dazu die Proteinbandenmuster von Cytoplasmamembran und Kulturüberstand von Wildtyp und Δ *tatC*-Mutante miteinander verglichen.

Es wurden weder Unterschiede im Proteinbandenmuster des Kulturüberstandes noch der Cytoplasmamembran, auch unter verschiedenen Wachstumsbedingungen, gefunden. Daher kann nur spekuliert werden, daß *S. carnosus* nur über solche Tat-Substrate verfügt, die nur zu speziellen noch unbekanntem Bedingungen exprimiert werden und deshalb mit dieser Suche nur sehr schwer oder gar nicht erfaßt werden können.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde unter der Leitung von Professor Götz, Universität zu Tübingen, damit begonnen, das Genom von *S. carnosus* zu sequenzieren und zu annotieren, was die Möglichkeit eröffnete, nun auch mittels Sequenzanalyse nach potentiellen Tat-Substraten zu suchen. Bislang konnte aber noch kein einziges potentielles Tat-Substrat identifiziert werden. Im vollständig sequenzierten Genom des engen Verwandten *S. aureus* wurde bisher auch nur ein mögliches Tat-Substrat identifiziert. Dieses Protein, SA1978, ist ein hypothetisches Membranprotein und erste Untersuchungen zeigten, daß ein Fusionsprotein, welches aus dem potentiellen Tat-Signalpeptid dieses Proteins und dem reifen MalE-Protein besteht, in *E. coli* Sec-abhängig exportiert wird (eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Möglicherweise ist in *S. aureus* die Anzahl an Tat-Substraten auch nur sehr gering.

Obwohl noch keine Tat-Substrate in *S. carnosus* gefunden wurden, spricht die Tatsache, daß in diesem Organismus ein funktionelles Tat-System vorliegt, für das Vorhandensein von Tat-Substraten. Die bisher erzielten Ergebnisse deuten jedoch alle darauf hin, daß *S. carnosus* höchstwahrscheinlich nur über sehr wenige Tat-Substrate verfügt, die für das Wachstum und den allgemeinen Metabolismus, zumindest unter den hier gewählten Laborbedingungen, keine Rolle spielen, sondern wahrscheinlich nur speziell in seinem natürlichen Habitat genutzt werden. Da auch *S. aureus* als weiterer Vertreter der *Staphylococci* anscheinend ebenfalls nur über eine geringe Anzahl an Tat-Substraten verfügt, wird der Tat-Weg möglicherweise generell in *Staphylococci* nur unter speziellen Bedingungen genutzt. Somit stellt sich die Frage, ob der Organismus, trotz seines unter Laborbedingungen anscheinend kaum genutzten Tat-Systems, überhaupt als Sekretionssystem für heterologe Tat-Substrate geeignet ist.

Die Untersuchungen zur Tat-abhängigen Sekretion in *S. carnosus* erfolgten mittels Fusionsproteinen, die das *E. coli* TorA-Signalpeptid aufwiesen, da einerseits kein authentisches *S. carnosus* Tat-Substrat bekannt war und andererseits in dieser Arbeit und der Doktorarbeit von Angela Vollstedt gezeigt werden konnte, daß das TorA-Signalpeptid von der *S. carnosus* Tat-Translokase erkannt wird.

1.3 Die Zellwand von *S. carnosus* stellt eine Barriere für die Sekretion von heterologen Tat-Substraten dar

Die ersten Untersuchungen zur Funktionalität des Tat-Weges in *S. carnosus* hatten deutlich gezeigt, daß das Fusionsprotein TorA-CGTase in *S. carnosus* einer Tat-abhängigen Prozessierung unterliegt. Anhand dieser Untersuchungen kann jedoch keine Aussage über die Sekretionseigenschaften getroffen werden, da nur die Prozessierungskinetik und somit indirekt auch nur die Translokation über die Membran erfaßt wird. Daher wurde mittels einer Lokalisation der TorA-CGTase Genprodukte die Verteilung von cytoplasmatischem Vorläuferprotein, Abbauprodukten und translozierter, bzw. sekretierter reifer CGTase überprüft, um eine Aussage über die Sekretionseigenschaften treffen zu können. Diese Lokalisierung erbrachte ein überraschendes Ergebnis: das TorA-CGTase Fusionsprotein wird zwar im *S. carnosus* Wildtyp Tat-abhängig über die Cytoplasmamembran transloziert, es erfolgt jedoch keine Sekretion des reifen Proteins in den Kulturüberstand, sondern eine Akkumulation in der Zellwand (Abbildung 16). Nun ist die Zellwand von Gram-positiven

Bakterien ein sehr komplexes Gebilde, bestehend aus einem Peptidoglykangerüst mit porenartigen Strukturen, welches wie ein Sieb wirken kann. Laut Demchick und Koch (1996) können Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von bis zu 50kDa diese Poren, die einen Durchmesser von ca. 4nm aufweisen, problemlos passieren. Es ist daher anzunehmen, daß das Molekulargewicht der CGTase von ca. 70kDa ein Passieren der Zellwand nicht erlaubt. So wird die CGTase durch den Siebeffekt der Poren in der Zellwand zurückgehalten bzw. bleibt stecken. Daß die Größe eines Substrats offensichtlich einen Einfluß auf die Zellwandpassage hat, konnte auch schon für Sec-Substrate gezeigt werden. So passiert eine verkürzte Version des S-Layer Proteins P2 in *C. glutamicum* die Zellwand in *C. glutamicum* mit einer schnelleren Kinetik als das ungekürzte P2-Protein (Houssin *et al.*, 2002). Daher ist die Größe anscheinend generell, d. h. sowohl für Tat- als auch für Sec-Substrate, für die Zellwandpassage limitierend.

Falls tatsächlich die Größe der gefalteten Proteine der einzige limitierende Faktor in der Zellwandpassage von Tat-Substraten in *S. carnosus* ist, sollten Proteine von geringerer Größe in den Kulturüberstand sekretiert werden. Um dies zu überprüfen, wurde das Exportverhalten des TorA-GFP Fusionsproteins in *S. carnosus* untersucht. Dieses Fusionsprotein besteht aus dem reifen GFP welches an das TorA-Signalpeptid fusioniert ist. Das GFP hat ein Molekulargewicht von ca. 25kDa und sollte daher theoretisch durch die Poren des Peptidoglykangerüsts in den Kulturüberstand diffundieren können. Wie bei den Untersuchungen zum TorA-CGTase Fusionsprotein, erfolgte auch in diesem Falle eine Zellfraktionierung von *S. carnosus* zur Lokalisierung der verschiedenen TorA-GFP Proteinformen. Die Lokalisierung zeigte eindeutig, daß TorA-GFP Tat-abhängig über die Cytoplasmamembran transloziert wird, das reife GFP jedoch, wie die reife CGTase nicht in den Kulturüberstand sekretiert wird, sondern ebenfalls in der Zellwand akkumuliert (Abbildung 19). Demnach kann auch das GFP trotz seines geringen Molekulargewichts die Zellwand nicht passieren. Das GFP Protein faltet in eine stabile und kompakte β -Faß-Struktur mit einem Molekulargewicht von 25kDa und sollte daher theoretisch die Poren – einen Porendurchmesser bei *S. carnosus* von 4nm vorausgesetzt – passieren können. Da dies nicht der Fall ist, beeinflussen anscheinend neben der Größe und der Konformation auch die elektrostatischen Eigenschaften eines Proteins die Zellwandpassage. An das Peptidoglykan der Zellwand sind kovalent Teichon-, Lipoteichon und/oder Teichuronsäuren gebunden, die der Zellwand eine stark negative Ladung geben. Aufgrund dieser Ladungseigenschaft der Zellwand können Proteine, die eine insgesamt positive Nettoladung aufweisen oder exponierte Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten aufweisen, Wechselwirkungen mit der Zellwand eingehen und somit die Sekretion mindern bzw. verhindern. So konnte gezeigt werden, daß in *B. subtilis* die Sekretion von positiv geladenen Derivaten der Sec-abhängigen α -Amylase AmyL in den Kulturüberstand im Vergleich zu ungeladenen bzw. negativ geladenen Derivaten dieses Proteins deutlich verlangsamt ist, da es zu Wechselwirkungen dieser Proteine mit der Zellwand kommt (Stephenson *et al.*, 2000). Auch in der Sec-abhängigen Sekretion weiterer heterologer Proteine in *B. subtilis* wurden Verzögerungen in der Zellwandpassage beobachtet, wobei die Gründe hierfür ebenfalls in der Ladung der Proteine, aber auch in der Größe vermutet werden (Simonen und Palva, 1993). Im Falle der Tat-abhängigen Sekretion von GFP in *S. carnosus* wird diese nicht nur verzögert, sondern erfolgt gar nicht. Die elektrostatischen Eigenschaften des GFP sind anscheinend nicht kompatibel zu denen der *S. carnosus*

Zellwand, so daß es zu dauerhaften Wechselwirkungen des Proteins mit der Zellwand dieses Organismus kommt und somit eine Sekretion in den Kulturüberstand nicht nur verlangsamt, sondern komplett verhindert wird. Im Gegensatz dazu ist im Falle der Tat-abhängig exportierten CGTase nicht auszuschließen, daß sie primär aufgrund ihres hohen Molekulargewichts in der Zellwand stecken bleibt.

Die Zellwand von Gram-positiven Bakterien kann vollständig gefaltete Tat-Substrate, und wie gezeigt auch heterologe Substrate (Gerlach *et al.*, 2004; Schaerlaekens *et al.*, 2004b), durchlassen und diese in den Kulturüberstand freisetzen. Die bisherigen Untersuchungen in *S. carnosus* deuten aber an, daß hier die Zellwand anscheinend ein größeres Hindernis für die Tat-abhängige Proteinsekretion darstellt als in den bisher in Bezug auf heterologe Proteinsekretion untersuchten Organismen *B. subtilis* und *S. lividans*.

Möglicherweise kann aber auch die Barriere, die die Zellwand in *S. carnosus* für die Sekretion darstellt, umgangen werden. Es gibt nämlich vielversprechende Ansätze um die Sekretion von solchen Proteinen, für die die Zellwandpassage ein Problem darstellt, zu steigern, in dem Mutanten verwendet werden, die über Strukturdefekte oder sogar über gar keine Zellwand verfügen (Ito *et al.*, 1993; Maruo und Tojo, 1985; Saunders *et al.*, 1987). Der Nachteil hierbei ist jedoch, daß diese Stämme meist sehr instabil sind und nur unter sehr schwierigen Bedingungen kultivierbar sind.

Das Peptidoglykangerüst der Zellwand unterliegt während der Zellteilung und des Zellwachstums einem ständigen Turnover, bei dem altes Zellwandmaterial hydrolysiert und neu-synthetisiertes eingebaut wird (Blackman *et al.*, 1998; Foster und Popham, 2002). Daher wäre theoretisch zu erwarten, daß in der Zellwand aufgrund ihrer Größe steckengebliebene Moleküle mit der Zeit doch noch langsam durch Zellwandturnover in Überstand freigesetzt werden, was jedoch weder für GFP noch für die CGTase beobachtet werden konnte. Möglicherweise ist das Turnover an Zellwandmaterial in *S. carnosus* aufgrund seiner Kokken-Form nur sehr gering, wodurch eine Freisetzung an in der Zellwand steckengebliebenen Molekülen sehr gering ist und damit unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Dies könnte erklären, warum Proteine, die in der Zellwand nur aufgrund ihrer Größe steckengeblieben sind, nicht freigesetzt werden. Für Proteine, die aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Zellwand und nicht aufgrund ihrer Größe diese nicht passieren können, wird dagegen ein Zellwandturnover keine Freisetzung zur Folge haben. Dieses ist höchstwahrscheinlich für das kleine GFP die Ursache für die Zellwandakkumulation.

Aufgrund der hier erzielten Ergebnisse stellt die Tat-abhängige Sekretion in *S. carnosus* keine Alternative zur Sec-abhängigen Sekretion dar. Eine Vielzahl an Arbeiten konnte zeigen, daß die bisher erzielten Ergebnisse zur Sec-abhängigen Sekretion in *S. carnosus* deutlich erfolgsversprechender sind (Dilsen *et al.*, 2000; Pschorr *et al.*, 1994; Schnappinger *et al.*, 1995; Sturfels *et al.*, 2001; Thudt *et al.*, 1985). Das Potential, das *S. carnosus* in der Sekretion heterologer Substrate hat, liegt somit eindeutig in der Sec-abhängigen und nicht in der Tat-abhängigen Sekretion.

2. Untersuchungen zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in *C. glutamicum*

C. glutamicum gehört zu der Gruppe der Gram-positiven coryneformen Bakterien, zu denen u. a. auch die humanpathogenen Vertreter *Corynebacterium diphtheriae* und *Mycobacterium tuberculosis* gehören. Die *Corynebacterianae* nehmen vor allem aufgrund ihrer Zellwandzusammensetzung eine Sonderstellung innerhalb der Gruppe der Gram-positiven Bakterien ein. Sie weisen eine komplexere Zellwandstruktur auf und besitzen einzigartige Zellwandkomponenten, die in anderen Gram-positiven Bakterien nicht vorkommen. So sind hier vor allem die Mykolsäuren zu nennen, die als höchst geordnete Struktur die komplette Zelle als Doppelschicht umgeben (Minnikin *et al.*, 1978). Diese Mykolsäureschicht hat eine ähnliche Wirkung wie die äußere Membran bei Gram-negativen Bakterien, das heißt sie wirkt als zusätzliche Permeabilitätsbarriere. Da aber trotzdem auch Sekretion von Proteinen in *Corynebacterianae* zu beobachten ist, wird angenommen, daß entweder ein spezifischer Translokationsapparat oder große Substrat-unspezifische Poren die Sekretion von Proteinen erlauben (Houssin *et al.*, 2002). Falls es sich tatsächlich um Poren handelt, müssen diese verschließbar sein, um die Eigenschaft der Mykolsäureschicht als Permeabilitätsbarriere zu erhalten.

C. glutamicum kann nach spezifischer Behandlung große Mengen an Glutamat und anderer Aminosäuren in die Nährlösung ausscheiden, weshalb dieser Mikroorganismus auch für die industrielle Aminosäureproduktion von großer Bedeutung ist (Eggeling und Bott, 2005). Die Möglichkeit, *C. glutamicum* für die sekretorische Proteingewinnung einzusetzen, ist dagegen bislang weitestgehend unerforscht.

2.1 *C. glutamicum* verfügt über eine funktionelle Tat-Minimaltranslokase

Das Genom von *C. glutamicum* liegt vollständig sequenziert und annotiert vor. Eine Analyse der Genomsequenz ergab, daß *C. glutamicum* über ein *tatA*- und ein *tatC*-Gen verfügt, die in einem Operon vorliegen. Somit besitzt es wie auch *S. carnosus* die genetische Ausstattung für eine Tat-Minimaltranslokase. In der Gattung der *Corynebakterien* ist es bei den bisher untersuchten Bakterien anscheinend die Regel, daß nur *TatA* und *TatC* vorkommen. Bei den nahen Verwandten, den *Actinomyceten*, wozu auch *M. tuberculosis* gehört, findet sich im Genom außerhalb des *tatAC*-Operons zusätzlich ein potentiell *tatB*-Gen (Wu *et al.*, 2000; Yen *et al.*, 2002).

Analog zur Vorgehensweise bei *S. carnosus* wurde die Funktionalität des *TatAC*-Systems von *C. glutamicum* überprüft, indem der Export von Tat-abhängigen Reporterproteinen im Wildtyp und einem Stamm, in dem das *Tat*-System ausgeschaltet war (Δ *tatAC*-Mutante), miteinander verglichen wurde. Es konnte gezeigt werden, daß u. a. das *TorA*-GFP Fusionsprotein in *C. glutamicum* Wildtyp, im Gegensatz zu der Situation in der Δ *tatAC*-Mutante, über die Cytoplasmamembran transloziert und reifes GFP in den Überstand sekretiert wird. Ohne ein funktionelles *Tat*-System erfolgt eine Akkumulation von *TorA*-GFP Vorläuferprotein im Cytosol und intrazellulären Abbauprodukten (Abbildung 32). Diese

Akkumulation von Vorläuferprotein ist Folge der ausbleibenden Translokation des Fusionsproteins aufgrund der Ausschaltung des Tat-Systems.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß TorA-GFP Tat-abhängig in *C. glutamicum* sekretiert wird und somit *C. glutamicum* über ein funktionelles Tat-System verfügt.

2.2 Das Tat-System spielt in *C. glutamicum* eine wichtige physiologische Rolle

Das Tat-System von *C. glutamicum* wurde ausgeschaltet, indem das komplette *tatAC*-Operon im Genom deletiert wurde. Es zeigt sich hierbei, daß *C. glutamicum* ohne funktionelles Tat-System deutlicher schlechter wächst als der Wildtyp. Dieser phänotypische Unterschied der Δ *tatAC*-Mutante war der erste Hinweis, daß das Tat-System von *C. glutamicum* zumindest unter den hier gewählten Laborbedingungen eine weitaus größere Rolle spielt als das von *S. carnosus*. Auf die Zellmorphologie von *C. glutamicum* hat die Deletion der *tat*-Gene jedoch keinen offensichtlichen Effekt. Weder eine Veränderung der Zellform noch eine Kettenbildung, wie sie für *E. coli* *tat*-Mutanten typisch ist (Stanley *et al.*, 2001), konnte beobachtet werden (Abbildung 26). Damit scheint zumindest ein Einfluß des Tat-Systems auf die Zellteilung wie bei *E. coli*, ob indirekt oder direkt, nicht gegeben zu sein. In *E. coli* *tat*-Mutanten ist, wie bereits zuvor erwähnt, die fehlerhafte Zellteilung das Resultat einer Mislokalisierung zweier Tat-abhängiger Amidasen, die am Zellwandmetabolismus beteiligt sind (Ize *et al.*, 2003).

2.2.1 Das Tat-System ist in *C. glutamicum* an Zellwachstum und -stoffwechsel beteiligt

Das Ausschalten des Tat-Systems hat in *C. glutamicum* einen deutlichen Wachstumsdefekt zur Folge, der sich darin äußert, daß die Zellen ohne Tat-System zum einen langsamer als der Wildtyp wachsen und zum anderen nur noch die Hälfte der maximalen optischen Dichte des Wildtyps erreichen. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß der Tat-Weg direkt oder indirekt am Zellwachstum in *C. glutamicum* beteiligt ist. Da es in *C. glutamicum* aber, im Gegensatz zu der Situation in *E. coli*, keine phänotypischen Hinweise auf einen direkten Einfluß des Tat-Systems auf die Zellteilung gibt, ist das Tat-System anscheinend an anderen Prozessen während des Zellwachstums beteiligt. Möglicherweise spielt das Tat-System in *C. glutamicum* eine Rolle im Aufbau der Zellwand, oder aber auch im allgemeinen Stoffwechsel der Zelle. Für beide Möglichkeiten konnten Hinweise erhalten werden. So spricht für eine Beteiligung des Tat-Weges am Zellwandaufbau die Tatsache, daß die Δ *tatAC*-Mutante deutlich früher auf osmotischen Streß, hervorgerufen durch eine steigende Osmolalität des Mediums, reagiert als der Wildtyp. So verstärkt eine Steigerung der Osmolalität des Mediums, erzeugt durch eine Erhöhung der NaCl-Konzentration, den Wachstumsdefekt der Δ *tatAC*-Mutante deutlich (Abbildung 27, rechts). Solch ein Verhalten einer *tat*-Mutante gegenüber osmotischem Streß wurde in ähnlicher Weise auch in *Pseudomonas aeruginosa* beobachtet (Ochsner *et al.*, 2002). Offensichtlich ist der Tat-Weg in *C. glutamicum*, wie auch in *E. coli* und scheinbar auch in *P. aeruginosa*, in den Zellwandmetabolismus involviert. Die Zellwand stabilisiert normalerweise die Form der Zelle und bietet ihr einen mechanischen

Schutz. Wird die Zellwand durch das Fehlen von Zellwandkomponenten oder einen fehlerhaften Aufbau ihrer Struktur in ihrer Funktion eingeschränkt, wird sich das nachteilig auf das Wachstum der Zelle, aber auch auf Reaktion auf mechanischen und osmotischen Streß auswirken. Falls Tat-Substrate für die Funktionalität der Zellwand essentiell sind, also direkt oder indirekt in den Zellwandmetabolismus involviert sind, kann das den Wachstumsdefekt und die erhöhte Sensitivität gegenüber osmotischen Streß erklären.

Für eine Beteiligung des Tat-Weges in *C. glutamicum* am allgemeinen Stoffwechsel sprechen die folgenden Befunde. So hatte sich in den Wachstumsuntersuchungen gezeigt, daß *C. glutamicum* ohne ein funktionelles Tat-System in den hier verwendeten Medien ohne Glucose, im Gegensatz zum Wildtyp, nicht in der Lage war zu wachsen. Offensichtlich ist die Δ tatAC-Mutante auf eine einfach zugängliche Kohlenstoffquelle, wie in diesem Falle Glucose, angewiesen. Andere Kohlenstoffquellen, die noch im Medium vorliegen und die der Wildtyp noch nutzen kann, können nicht mehr aufgenommen oder verwertet werden. Dies bedeutet, daß das Tat-System in *C. glutamicum* nicht an der Aufnahme und Verwertung von Glucose, sondern anscheinend, direkt oder indirekt, an der Aufnahme oder Verwertung anderer Nährstoffe aus der Nährlösung beteiligt ist. Denkbar ist, daß Tat-Substrate z. B. spezifische Poren in der Zellwand bzw. der Mykolsäureschicht für die Aufnahme spezieller Kohlenstoffverbindungen bilden oder direkt Kohlenstoffquellen binden und somit eine Aufnahme dieser ermöglichen. Im Falle des Sec-Weges sind viele Fälle bekannt an, bei denen Sec-Substrate an der Aufnahme von Nährstoffen beteiligt sind. So ist z.B. das Sec-abhängig exportierte MalE-Protein ein Teil des Aufnahmesystems von Maltose in *E. coli*. Wird MalE nicht exportiert, können die Zellen nicht in Medien wachsen, in denen Maltose die einzige Kohlenstoffquelle darstellt (Dassa und Lambert, 1997).

2.2.2 Der Export des PhoD-Proteins aus *C. glutamicum* ist Tat-abhängig

Das Tat-System von *C. glutamicum* hat unter den hier gewählten Bedingungen einen deutlichen Einfluß auf das Wachstum und den Stoffwechsel, was bedeutet, daß *C. glutamicum* auf jeden Fall über eigene Tat-Substrate verfügen muß. Zur Identifizierung von authentischen Tat-Substraten von *C. glutamicum* wurden zum einen, wie bei *S. carnosus*, die Proteinbandenmuster der Kulturüberstände von Wildtyp und Δ tatAC-Mutante miteinander verglichen und zum anderen die Genomsequenz von *C. glutamicum* untersucht. Die Suche nach potentiellen Tat-Substraten in der annotierten Genomsequenz erfolgt generell mit Suchmasken, die das für den Tat-Weg typische Zwillingsarginin und definierte Bedingungen für die übrigen Aminosäuren des Tat-Konsensusmotivs einbeziehen (Bronstein *et al.*, 2004; Dilks *et al.*, 2003). Mit der in dieser Dissertation verwendeten Suchmaske „S/T-R-R“ konnte u. a. das Protein mit der Bezeichnung NCgl2185 als mögliches Tat-Substrat identifiziert werden. Dieses Protein weist ein dem klassischen Tat-Konsensusmotiv sehr ähnliches Motiv auf und besitzt sehr große Homologien zur Phosphodiesterase PhoD aus *B. subtilis*, welche Tat-abhängig sekretiert wird. Der Vergleich der Proteinbandenmuster des Kulturüberstandes von Wildtyp und Δ tatAC-Mutante führte zur Identifizierung eines weiteren potentiellen Tat-Substrats (hypothetisches Protein, NCgl1588), welches jedoch in seinem Signalpeptid

deutliche Unterschiede zum Tat-Konsensusmotiv zeigt und u. a. anstelle des Zwillingsarginins nur über ein einziges Arginin verfügt (Abbildung 29).

Die Überprüfung, ob beide potentiellen Tat-Substrate auch tatsächlich Tat-abhängig exportiert werden, erfolgte *in vivo*. Da jedoch keine Antikörper für die jeweiligen Proteine zur Verfügung standen, wurden die entsprechenden Signalpeptide an das GFP fusioniert und das Exportverhalten der so resultierenden Fusionsproteine im *C. glutamicum* Wildtyp und der Δ *tatAC*-Mutante überprüft. Da ein Tat-Signalpeptid allein für das „Targeting“ zur Tat-Translokase ausreichend ist und darüber hinaus gezeigt wurde, daß sich GFP als Tat-abhängiges Reporterprotein eignet, sollte das Exportverhalten dieser GFP-Fusionen zeigen, ob der Export der authentischen Proteine 1588 und 2185 (PhoD_{Cg}) Tat-abhängig ist.

Überraschenderweise bewirkt das Signalpeptid von 1588 sowohl im Wildtyp als auch in der Δ *tatAC*-Mutante eine Sekretion von GFP in den Kulturüberstand (Abbildung 30). Dies bedeutet, daß die Sekretion Tat-unabhängig und daher Sec-abhängig ist. Darüber hinaus konnte keine Vorläuferform dieses Fusionsprotein detektiert werden, was ein deutlicher Hinweis auf eine für den Sec-Weg typische schnelle Prozessierung des Vorläuferproteins ist. Somit ist offensichtlich, daß das authentische 1588-Protein in *C. glutamicum* kein Tat- sondern ein Sec-Substrat ist. Es ist jedoch auffällig, daß im Falle des 1588-Fusionsproteins im Wildtyp deutlich mehr reifes GFP in den Kulturüberstand sekretiert wird, als in der Δ *tatAC*-Mutante und das authentische 1588-Protein gar nicht in der Δ *tatAC*-Mutante sekretiert wird. Die möglichen Gründe hierfür werden im nächsten Kapitel diskutiert.

Im deutlichen Gegensatz zum Signalpeptid von 1588 bewirkt das Signalpeptid von PhoD_{Cg} einen Tat-abhängigen Export von GFP (Abbildung 30), was beweist, daß das PhoD-Protein aus *C. glutamicum*, wie sein Homolog aus *B. subtilis*, ein Tat-Substrat ist. Es ist anzunehmen, daß die Induktion von PhoD in *C. glutamicum*, wie bei seinem Homolog in *B. subtilis* (Jongbloed *et al.*, 2000), nur unter Phosphatmangelbedingungen erfolgt. Da die Anzucht der Stämme für den Proteinbandenvergleich von Wildtyp und Δ *tatAC*-Mutante nicht unter Phosphatmangelbedingungen erfolgte, konnte daher PhoD auch nicht identifiziert werden, sondern nur über die Analyse der Genomsequenz.

2.2.3 Der Sec-abhängige Export von MalE und des authentischen 1588-Proteins ist in der Δ *tatAC*-Mutante von *C. glutamicum* stark beeinträchtigt

Das authentische 1588-Protein fehlt im Kulturüberstand der Δ *tatAC*-Mutante, obwohl das Signalpeptid des 1588-Protein sowohl in *C. glutamicum* Wildtyp als auch in der Δ *tatAC*-Mutante eine Sec-abhängige Sekretion von GFP vermitteln kann. Die Ausbeute an GFP ist jedoch in der Mutante deutlich niedriger als im Wildtyp. Einen ähnlichen Unterschied in der Ausbeute zwischen *C. glutamicum* Wildtyp und Δ *tatAC*-Mutante wurde auch in der Sekretion des heterologen Sec-Substrates MalE beobachtet (Abbildung 34). Die verminderte Sekretion läuft jedoch nicht parallel mit einer Zunahme an cytoplasmatischem Abbauprodukten und einer Akkumulation von Vorläuferprotein, was für einen Exportblock der Proteine sprechen würde (Blaudeck, 2001). Hätte das Tat-System einen direkten Einfluß auf die Sec-abhängige Translokation von MalE und 1588, würde somit ein Ausschalten des Tat-Systems eine Akkumulation der Vorläuferproteine bewirken, sofern es in der Δ *tatAC*-Mutante nicht zu einem erhöhten Abbau von Vorläuferproteinen von Sec-Substraten kommt. Somit kann davon

ausgegangen werden, daß die reduzierte Ausbeute des Sec-abhängig sekretierten MalE und GFP auf einer verminderten Synthese beruht. Zumindest für MalE und das das 1588-GFP Fusionsprotein ist anzunehmen, daß in der $\Delta tatAC$ -Mutante, vermutlich aufgrund einer generell reduzierten Proteinbiosynthese in der Mutante, weniger MalE-Protein und 1588-GFP synthetisiert und damit auch sekretiert wird. Dies wird durch die niedrigere Menge an MalE-Vorläufer in der $\Delta tatAC$ -Mutante im Vergleich zu der Situation beim Wildtyp bestätigt. Dies erklärt jedoch nicht das Fehlen des authentischen 1588-Proteins im Kulturüberstand der $\Delta tatAC$ -Mutante. Die generell verminderte Proteinsynthese in der $\Delta tatAC$ -Mutante wird eine Reduzierung der gesamten Sec-abhängigen Proteinsekretion zur Folge haben. Da aber explizit das 1588-Protein komplett nicht sekretiert wird, ist anzunehmen, daß hier der allgemeine Syntheseeffekt, der in der $\Delta tatAC$ -Mutante vorliegt, nicht der alleinige Grund sein kann, sondern anscheinend ein direkter Einfluß des Tat-Systems auf die Synthese von 1588 vorliegt. Es könnte spekuliert werden, daß die Synthese des 1588-Proteins durch eine Substanz, z.B. eine Nährstoffquelle, induziert wird, für dessen Aufnahme mindestens ein Tat-Substrat nötig ist. In der $\Delta tatAC$ -Mutante würde die Aufnahme der Substanz nicht erfolgen, was zur Konsequenz hätte, daß 1588 nicht synthetisiert und folglich auch nicht in den Kulturüberstand sekretiert würde.

2.3 GFP und MalE werden in *C. glutamicum* mit hoher Ausbeute Tat-abhängig in den Kulturüberstand sekretiert

Die Untersuchungen zur Tat-abhängigen Sekretion in *C. glutamicum* haben gezeigt, daß sowohl MalE als auch GFP mit überraschend hoher Ausbeute in den Kulturüberstand sekretiert werden (Abbildung 31). Aus den vorangegangenen Untersuchungen zur Proteinsekretion in *S. carnosus* war bekannt, daß dort die Zellwand für die untersuchten heterologen Tat-Substrate, unabhängig von deren Größe, eine Barriere darstellt und eine Sekretion der reifen Proteine komplett verhindert. Auch in *C. glutamicum* bleibt, trotz der beobachteten hohen Sekretionsleistung, ebenfalls eine geringe Menge an reifem Protein in der Zellwand stecken, wobei jedoch die Menge an sekretiertem Protein deutlich höher ist (Abbildung 32). Es akkumuliert aber eine größere Menge reifes GFP als reifes MalE in der Zellwand und das trotz der Tatsache, daß das Molekulargewicht von GFP mit 25kDa deutlich niedriger ist als das des MalE-Proteins mit 42kDa. Darüber hinaus sollten beide Proteine problemlos aufgrund ihrer Größe unter 50kDa die Poren der Zellwand passieren können (Demchick und Koch, 1996). Da aber dennoch, wenn auch in geringem Maße, ein Steckenbleiben von beiden Proteinen, MalE und GFP, auftritt, limitieren offensichtlich in beiden Fällen die elektrostatischen Eigenschaften der Proteine die Zellwand- und/oder Mykolsäureschichtpassage. Die geringere Menge an MalE im Zellwandkompartiment im Vergleich zu GFP zeigt, daß MalE offensichtlich schwächere Wechselwirkungen mit der Zellwand eingeht als GFP. Daß unterschiedliche Ladungseigenschaften eines Proteins die Zellwandpassage beeinflussen könne, wurde bereits in *B. subtilis* beobachtet. So zeigen unterschiedliche Derivate der α -Amylase (AmyL), die zwar keine signifikanten Unterschiede im Molekulargewicht jedoch aber in ihrer Ladung aufwiesen, deutliche Unterschiede in ihren Bindungseigenschaften an die Zellwand (Stephenson *et al.*, 2000).

Dennoch kann auch weiterhin die Größe eines Proteins in *C. glutamicum* die Sekretion limitieren. In den Untersuchungen zur Diffusionskinetik von zwei unterschiedlich großen Derivaten des S-Layer Proteins PS2 über die Zellwand von *C. glutamicum* zeigte sich ein Effekt des Molekulargewichts: Houssin *et al.* (2002) hatten beobachtet, daß ein verkürztes PS2-Derivat mit einem Molekulargewicht von 21kDa schneller durch die Zellwand diffundiert als das ungekürzte PS2 mit einem Molekulargewicht von 52kDa. Das ungekürzte PS2 befindet sich mit seinem Molekulargewicht bereit im Grenzbereich der Proteine, die theoretisch die Zellwand noch problemlos passieren können, was somit auch die schnellere Kinetik gekürzte PS2 in der Zellwandpassage erklärt.

Eine weitere Möglichkeit für die Akkumulation von GFP und MaleE im Zellwandkompartiment neben den elektrostatischen Eigenschaften könnte aber auch sein, daß durch die Überexpression der Fusionsproteine mehr reifes Protein auf einmal in die Zellwand gelangt als durch sie diffundieren kann. Dies würde zu einer Akkumulation der translozierten Proteine vor der Zellwandpassage führen. Da fortlaufend neu synthetisiertes Protein über die Membran transloziert wird und ins Zellwandkompartiment gelangt, müßte die Menge an akkumuliertem Protein anwachsen. Da aber nicht beobachtet werden konnte, daß die Akkumulation zunimmt (Abbildung 33), kann diese Hypothese ausgeschlossen werden.

Für eine Akkumulation von reifen Protein in der Zellwand aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen gibt es zwei Hypothesen: (1) das reife Protein bindet nur kurzfristig an die Zellwand gelangt dann in den Überstand. Im Western Blot werden dann in der Zellwandfraktion immer die Proteine erfaßt, die gerade eine Bindung eingegangen sind. (2) Zu Beginn der Sekretion besetzt ein Teil der reifen Proteine alle möglichen Bindungsstellen für die Wechselwirkungen zwischen reifen Protein und Zellwand, so daß die nachfolgenden Proteine problemlos die Zellwand passieren können. Natürlich ist auch eine Kombination aus beiden Hypothesen denkbar.

Diese Untersuchungen zur Tat-abhängigen Sekretion von GFP und MaleE haben deutlich gezeigt, daß die hier untersuchten Tat-Substrate, im deutlichen Kontrast zu der Situation in *S. carnosus*, die Zellwand von *C. glutamicum* trotz des komplexeren Aufbaus und der zusätzlichen Mykolsäureschicht, welche durchaus eine weitere Barriere für die Proteinsekretion darstellen kann, nahezu problemlos passieren können. Es wurde weiterhin deutlich, daß die elektrostatischen Eigenschaften der Proteine, die die Zellwandpassage limitieren können, offensichtlich abhängig von der Zellwand des jeweiligen Organismus einen unterschiedlichen Effekt auf die Zellwandpassage haben. So bewirken die elektrostatischen Eigenschaften des GFP in der Zellwand von *S. carnosus* ein Steckenbleiben, wohingegen sie in *C. glutamicum* eine Sekretion erlauben.

Die ersten Untersuchungen zur Proteinsekretion in *C. glutamicum* überhaupt erfolgten *in vivo* vor allem mit PS2. Dieses Protein wird Sec-abhängig über die Cytoplasmamembran transloziert und sehr schnell und effizient sekretiert (Houssin *et al.*, 2002). Die Sekretion von PS2 wird in zwei Schritte unterteilt: die Sec- und damit energieabhängige Translokation über die Cytoplasmamembran und der Energie-unabhängigen Passage durch die Zellwand und die Mykolsäureschicht. Dabei scheint der Transport von PS2 über die Mykolsäureschicht

mindestens genau so effizient wie der Sec-abhängige Transport über die Cytoplasmamembran zu sein und die Kinetik der Sekretion im Vergleich zu der Sekretionskinetik in Gram-positiven Bakterien ohne zusätzliche Außenmembran, wie *B. subtilis*, nicht zu beeinflussen (Houssin *et al.*, 2002; Leloup *et al.*, 1999). Diese schnelle und effiziente Überwindung der Mykolsäureschicht durch PS2 und auch die in dieser Arbeit beobachteten hohen Ausbeuten an GFP und MalE lassen vermuten, daß diese Außenmembran entweder über große Poren, die eine unspezifische Proteindiffusion ermöglichen, verfügen muß oder einen spezifischen Translokationsapparat für Proteine besitzt. Falls es sich um Substrat-unspezifische Poren handelt, müssen diese groß genug für gefaltete Proteine sein. Dies gilt nicht nur für Tat-, sondern auch für Sec-Substrate, da diese noch vor bzw. während der Zellwandpassage ihre partiell oder vollständig gefaltete Form einnehmen (Bolhuis *et al.*, 1999; Leloup *et al.*, 1997; Stephenson *et al.*, 1998). Zumindest für *M. tuberculosis* konnte schon gezeigt werden, daß die Mykolsäureschicht eine starke Permeabilitätsbarriere darstellt und sogar die Diffusion von Antibiotika deutlich erschwert (Brennan und Nikaido, 1995). Daher ist es sehr unwahrscheinlich, daß so große, unspezifische Poren in der Mykolsäureschicht existieren, daß auch vollständig gefaltete Proteine durch sie hindurchpassen. Immerhin müßten diese Poren ungefähr einen Durchmesser von 20-70Å haben, sofern man die Größe von PhoD und anderer Tat-Substrate als Berechnungsgrundlage nimmt (Berks *et al.*, 2000a). Falls die Sekretion aber tatsächlich über unspezifische Poren und nicht über Translokasekomplexe erfolgt, müssen die Poren auf jeden Fall verschließbar sein um die Integrität der Mykolsäureschicht gewährleisten zu können. Bislang wurden jedoch weder solche großen Poren noch spezifische Protein-Translokasekomplexe in der Mykolsäureschicht von *C. glutamicum* entdeckt. Somit bleibt weiterhin unklar, wie Proteine über die Mykolsäureschicht in Überstand gelangen.

2.3.1 Die Tat-abhängige Sekretion von MalE führt in *C. glutamicum* zu einer höheren Ausbeute als die Sekretion über den Sec-Weg

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, daß *C. glutamicum* MalE sowohl Sec-abhängig, mit seinem eigenen Signalpeptid, als auch Tat-abhängig, mit dem TorA-Signalpeptid, mit hoher Ausbeute in den Überstand sekretiert (Abbildung 31 und 34). Eine anschließende Quantifizierung des Sec- und Tat-abhängig sekretierten MalE führte zum überraschenden Ergebnis, daß die Ausbeute an MalE mehr als doppelt so hoch ist, wenn die Sekretion von MalE Tat-abhängig erfolgt als wenn sie Sec-abhängig erfolgt (Abbildung 35). Tat-Substrate weisen meist eine viel langsamere Exportkinetik als Sec-Substrate auf, da sie vor ihrer Translokation im Gegensatz zu Sec-Substraten noch ihre vollständig gefaltete Konformation einnehmen und gegebenenfalls Cofaktoren einbauen und ihre Untereinheiten assemblieren. Dies konnte auch bereits im Fall des MalE-Proteins in *E. coli* mittels Pulse Chase-Experimenten gezeigt werden. So wird authentisches Sec-abhängiges MalE-Vorläuferprotein so schnell in die reife Form prozessiert, daß bereits nach 10s kein Vorläufer mehr detektiert werden kann, ganz im Gegensatz zum Tat-abhängigen TorA-MalE, bei dem auch nach 20min noch Vorläuferprotein vorliegt (Blaudeck, 2001). Dies bedeutet, daß Sec-Substrate aufgrund der schnellen Translokation einen Vorteil in der Geschwindigkeit der Membrantranslokation gegenüber Tat-Substraten haben. Der Grund, daß aber nun doch die Ausbeute von MalE in *C. glutamicum* im Falle der Tat-abhängigen Sekretion trotz der

langsamere Exportkinetik größer ist, liegt daher möglicherweise in einem Ereignis nach der Translokation über die Cytoplasmamembran. Möglicherweise ist Sec-abhängig exportiertes MalE, welches erst nach der Translokation seine vollständig gefaltete Konformation einnehmen kann, während der Zellwandpassage oder im Kulturüberstand noch vor bzw. während seiner Faltung einem proteolytischen Abbau ausgesetzt, der die Sekretionseffizienz deutlich verringert. Da es sich bei MalE um ein heterologes Protein für *C. glutamicum* handelt, ist es durchaus denkbar, daß nach der Membrantranslokation nur eine langsame Faltung stattfindet, die den proteolytischen Verdau natürlich begünstigt. Dies ist eines der typischen „bottlenecks“, welches für die Sec-abhängige heterologe Proteinsekretion in Gram-positiven Bakterien, vor allem in *B. subtilis*, beschrieben ist und hier vor allem auch aufgrund der hohen Anzahl an extrazellulären und Zellwand-assoziierten Proteasen für drastische Einbußen in der Sekretionsausbeute führt (Bolhuis *et al.*, 1999, siehe auch I.3.6). *C. glutamicum* verfügt laut Genomanalysen nicht über so viele extrazelluläre und Zellwand-assoziierte Proteasen wie *B. subtilis* (Lothar Eggeling, persönliche Mitteilung) und daher sind die Einbußen in der Proteinausbeute in *C. glutamicum* offensichtlich nicht so dramatisch wie bei *B. subtilis*. Jedoch sind diese Einbußen groß genug, um den Vorteil der Tat-abhängigen Sekretion zumindest für MalE deutlich zu machen. Für Tat-abhängig exportiertes MalE stellen diese extrazellulären Proteasen nämlich kein „bottleneck“ mehr dar, da das MalE, aufgrund seiner bereits im Cytoplasma eingenommenen vollständig gefalteten Konformation, nach der Translokation im Zellwandkompartiment nicht mehr durch Proteasen angegriffen werden kann. Somit macht in der Tat-abhängigen Sekretion heterologer Proteine der Schutz vor extrazellulären Proteasen durch die vollständig gefaltete Konformation den Nachteil, der durch die langsame Kinetik bei der Membrantranslokation gegeben ist, deutlich wett - zumindest in *C. glutamicum* mit dem hier untersuchten heterologen MalE-Protein. Für homologe Proteine oder heterologe Protein, die nach der Translokation schnell in eine stabile Konformation falten können und somit ebenfalls vor extrazellulären Proteasen geschützt sind, wäre demnach der Sec-Weg aufgrund seiner schnelleren Exportkinetik die bessere Alternative in der Proteinsekretion. Die hohen Ausbeuten an Sec-anhängig sekretierten homologen Proteinen, die mit *B. subtilis* erzielt werden, zeigen dies deutlich (Ferrari *et al.*, 1993).

Ein weiterer Aspekt, der die Ausbeute an sekretiertem Protein beeinflusst, ist auch die Exportkapazität der jeweiligen Translokase für das jeweilige zu exportierende Protein. Eine Überexpression von Sec-Substraten kann dazu führen, daß eine Sättigung der Sec-Translokase auftritt, was zu einem Proteinstau an der Translokase führt und die Exportrate und damit auch die Ausbeute deutlich reduziert. Dies trifft aber nicht nur auf heterologe Substrate zu, sondern auch auf homologe Proteine. So führt z. B. die Überexpression von OmpA oder PhoD in *E. coli* zu einer Sättigung Sec-Translokase und folglich zu einer deutlich verzögerten Translokation und einem intrazellulären Stau der Vorläuferproteine (Bremer *et al.*, 1980; Pages *et al.*, 1984). Darüber hinaus kann eine Sättigung von Sec-Translokasen durch Überexpression von Exportproteinen auch zu einer herabgesetzten Vitalität der Zellen führen, da essentielle Sec-Substrate nicht mehr, bzw. nur verzögert exportiert werden können (Diderichsen und Christiansen, 1988). Solch eine Sättigung der Translokase ist natürlich auch für die Tat-Translokase bei einer Überexpression von Tat-Substraten wahrscheinlich, was durch die Arbeiten von Barret *et al.* (2003) bestätigt wird, da sie zeigen konnten, daß die Translokation von Tat-Substraten direkt abhängig von der Menge an Tat-Komponenten ist.

Im Falle des Sec-abhängig exportierten MalE in *C. glutamicum* konnte keine im Vergleich zu der Situation des Tat-abhängig exportierten MalE erhöhte Akkumulation von Vorläuferprotein oder cytosolischen Abbauprodukten beobachtet werden, auch eine Veränderung im Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* Stämmen, die MalE überexprimieren, konnte nicht festgestellt werden. Somit kann anhand dieser Ergebnisse ausgeschlossen werden, daß die Überexpression des Sec-Substrates MalE zu einer Sättigung der Sec-Translokase führt und somit der Grund für die niedrigere Ausbeute ist.

Der Vergleich von Tat-abhängiger mit Sec-abhängiger Sekretion heterologer Substrate in Gram-positiven Bakterien wurde bislang erst einmal beschrieben: Schaerlaekens *et al.* (2004a) verglichen dabei den Sec- und Tat-abhängigen Export der menschlichen Proteine TNF α und IL-10 im Gram-positiven Organismus *S. lividans*. Es stellte sich dabei heraus, daß die Ausbeuten an Tat-abhängig sekretiertem TNF α und IL-10 deutlich niedriger waren im Vergleich zur Ausbeute der Sec-abhängig sekretierten Varianten. Die Sekretionseffizienz, die als Quotient [extrazelluläre Proteinmenge/(intra- + extrazelluläre Proteinmenge)x100] definiert ist, war jedoch für die Tat-abhängige Sekretion von TNF α und IL-10 generell höher als für die Sec-abhängige Sekretion. Die Autoren begründeten dies damit, daß im Falle der Tat-abhängigen Sekretion von TNF α und IL-10 eine deutlich geringere Menge an intrazellulärem Protein vorläge, als im Falle der Sec-abhängigen heterologen Proteine, was natürlich die Effizienz für die Tat-abhängige Sekretion erhöht. Somit liegt der Grund für die geringere Ausbeute an Tat-abhängig sekretiertem TNF α und IL-10 offensichtlich nicht in der Sekretionseffizienz, sondern in der im Vergleich zu den Sec-abhängigen TNF α und IL-10 Vorläuferproteinen geringen Menge an Tat-abhängigem Vorläuferprotein von TNF α und IL-10. Entweder ist hier im Falle der Tat-abhängigen Substrate die Synthese niedriger oder der Abbau der Vorläuferproteine deutlich höher als die der Sec-abhängigen Substrate. Dies bedeutet, daß im Falle von TNF α und IL-10 die Ausbeute primär durch Synthese oder Stabilität der Vorläuferproteine bestimmt wird, wohingegen im Falle des in dieser Arbeit untersuchten MalE die Ausbeute offensichtlich durch die Stabilität des reifen Proteins bestimmt wird.

2.3.2 Das Medium hat einen großen Einfluß auf die Ausbeute an Tat-abhängig sekretiertem GFP und MalE

In den hier durchgeführten Untersuchungen zur Tat-abhängigen Sekretion von GFP und MalE wurde beobachtet, daß die Ausbeute an GFP und MalE je nach verwendetem Medium variiert. Die Sekretionseffizienz, d. h. der Quotient aus der Proteinmenge im Überstand und der Gesamtproteinmenge, war im Falle von GFP in allen verwendeten Medien gleich hoch, wohingegen die Gesamtproteinmenge deutliche Unterschiede zeigte. Im Falle von MalE variierte die Sekretionseffizienz von Medium zu Medium, wohingegen die Gesamtproteinmenge in allen Medien gleich war (Abbildung 36, A und B).

Die Menge an Gesamtprotein kann die Höhe der Synthese eines Proteins widerspiegeln, d.h. je höher die Synthese eines Proteins ist desto größer sollte die Gesamtproteinmenge sein. Da aber auch intra- und extrazellulärer proteolytischer Abbau die Proteinmenge je nach Protein oder Medium unterschiedlich beeinflussen kann, entspricht die nachweisbare Gesamtprotein-

menge der Menge an synthetisiertem Protein, welches nicht abgebaut wurde. Somit kann diese nicht nur aufgrund einer veränderten Syntheseleistung sondern auch durch eine unterschiedlich hohe proteolytischen Aktivität in den verschiedenen Medien variieren. So ist denkbar, daß ein Protein im Medium A in hohen Mengen synthetisiert aber gleichzeitig einem hohen Proteaseverdau ausgesetzt ist und im Medium B deutlich schlechter synthetisiert aber nicht abgebaut wird und somit eine höhere Gesamtproteinmenge aufweist als im Medium A. Der als Sekretionseffizienz definierte Quotient aus Proteinmenge im Überstand und Gesamtproteinmenge wird gleichermaßen durch die Faktoren Synthese und Abbau beeinflusst. Das heißt, daß die hier beobachteten höchsten Ausbeuten an GFP und MalE in den verschiedenen Medien nicht nur allein auf eine höhere Synthese des Proteins, bzw. eine bessere Sekretionseffizienz zurückzuführen sind, sondern auch durch die Abbaurate des jeweiligen Proteins im verwendeten Medium beeinflusst werden. Daher zeigen diese Untersuchungen zur Sekretion von MalE und GFP in verschiedenen Medien nur eindeutig in welchem Medium letztendlich die Ausbeute des jeweiligen Proteins am höchsten ist.

Für GFP und MalE kann anhand der hier gewonnenen Ergebnisse spekuliert werden, daß je nach verwendetem Medium in *C. glutamicum* unterschiedliche Proteasen induziert werden und die Proteine eine andere Empfindlichkeit gegen die jeweils vorhandenen Proteasen aufweisen. Dies verdeutlicht daß es ratsam ist, bei jedem neuen Fusionsprotein die Ausbeute in verschiedenen Medien zu untersuchen.

2.3.3 Ein heterologes Signalpeptid führt zur höchsten Sekretionseffizienz von GFP in *C. glutamicum*

GFP wird in *C. glutamicum* effizient Tat-abhängig in den Kulturüberstand sekretiert. Dieses wurde sowohl unter Verwendung des homologen Tat-Signalpeptids von PhoD, als auch unter Verwendung der heterologen Tat-Signalpeptide von TorA aus *E. coli* und von PhoD aus *B. subtilis* beobachtet, wobei sich aber die Sekretionseffizienz und auch die Ausbeute an GFP je nach verwendetem Signalpeptid unterscheiden (Abbildung 37). Die nachweisbare Gesamtproteinmenge in Zellen und Überstand nimmt von PhoD_{Cg}-GFP über PhoD_{Bs}-GFP zu TorA-GFP deutlich ab. Der Grund dafür kann nicht in einer unterschiedlichen Expression der einzelnen Fusionsgene liegen, da in allen Fällen ein identisches Expressionssystem verwendet wurde, sondern es ist wahrscheinlich, daß sich entweder die Stabilitäten der mRNA und/oder die der Fusionsproteine unterscheiden und sich dadurch eine unterschiedliche Gesamtproteinmenge ergibt. Somit weist das Fusionsprotein mit dem homologen Signalpeptid die höchste Stabilität auf. Die Sekretionseffizienz von GFP war überraschenderweise mit den heterologen Signalpeptiden TorA und PhoD_{Bs} doppelt so hoch wie mit dem homologen Signalpeptid.

Im Falle des PhoD_{Cg}-GFP Fusionsproteins verursacht möglicherweise die große Menge an Vorläuferprotein eine Reduzierung der Sekretionseffizienz im Vergleich zu TorA-GFP und PhoD_{Bs}-GFP. So ist denkbar, daß es hier in Folge einer Überschreitung der Exportkapazität der Tat-Translokase aufgrund der zu hohen Menge an PhoD_{Cg}-GFP Vorläuferproteinen zu einer Sättigung der Tat-Translokase kommt und dadurch die Translokation und zwangsläufig auch die Sekretion verzögert wird. Solch ein Translokase-„Jamming“ durch Überexpression von Exportproteinen ist für die Sec-Translokase bereits beschrieben (Bremer *et al.*, 1980;

Pages *et al.*, 1984) und für den Tat-Weg ebenfalls höchst wahrscheinlich, da eine Abhängigkeit der Translokationseffizienz von Tat-Substraten durch die Menge der Tat-Komponenten bereits gezeigt wurde (Barrett *et al.*, 2003). Möglicherweise könnte eine Überexpression der *tat*-Gene die Sekretionseffizienz und damit auch die Ausbeute steigern.

Es muß jedoch bedacht werden, daß ein Translokase-„Jamming“ im Endeffekt nur das Resultat unterschiedlicher Synthesemengen oder Vorläuferstabilitäten und somit eine indirekte Konsequenz anderer Primärereignisse ist.

Neben solch einem Translokase-„Jamming“ kann es jedoch noch weitere Ursachen für die Unterschiede in der Sekretionseffizienz von GFP mit dem homologen und den heterologen Signalpeptiden geben. So ist denkbar, daß die fremden Signalpeptide aufgrund einer besseren Erkennung durch die *C. glutamicum* Tat-Translokase im Vergleich zum homologen Signalpeptid zu einer besseren Sekretionseffizienz zu führen. Dazu müßten die fremden Signalpeptide Eigenschaften aufweisen, die eine effizientere Translokation des reifen Proteins erlauben als dies mit dem eigenen PhoD-Signalpeptid der Fall ist. Tat-Signalpeptide sind höchstwahrscheinlich nahezu perfekt an eine Erkennung durch die eigene Tat-Translokase angepaßt, aber es gibt auch zwischen den verschiedenen Tat-Signalpeptiden eines Bakteriums Unterschiede in der Qualität der Erkennung durch die Tat-Translokase, so daß es durchaus möglich ist, daß ein heterologes Tat-Signalpeptid besser als ein homologes Tat-Signalpeptid durch eine bestimmte Tat-Translokase erkannt wird.

Der Effekt des Mediums und des verwendeten Signalpeptids auf die Ausbeute an sekretiertem Protein machen deutlich, daß es keine generelle Musterlösung für die Sekretion von heterologen Proteinen gibt. Vielmehr zeigen die Ergebnisse, daß für jedes zu sekretierende Protein erst einmal ausprobiert werden muß, mit z. B. welchem Signalpeptid und in welchem Medium die größten Ausbeuten erzielt werden. Dieses oftmals verwendete „tool box“-Prinzip, in dem verschiedene Fusionen, Wirtssysteme, Sekretionswege und Bedingungen für jedes Protein individuell ausprobiert werden, ist somit auch weiterhin die Methode der Wahl, um das optimale Sekretionssystem für ein bestimmtes Protein zu finden.

2.3.4 Das durch *C. glutamicum* Tat-abhängig in den Kulturüberstand sekretierte GFP ist aktiv

Die natürlichen Substrate des Tat-Weges nehmen bereits im Cytoplasma ihre native Konformation ein und werden daher in aktiver Form über die Cytoplasmamembran transloziert. Auch für das heterologe GFP, das kein natürliches Tat-Substrat ist, konnte in *E. coli* gezeigt werden, daß es mit einem Tat-Signalpeptid über den Tat-Weg in aktiver Form exportiert wird (Thomas *et al.*, 2001, siehe auch I.4.4). Das GFP kann in *E. coli* zwar auch Sec-abhängig exportiert werden, liegt jedoch dann nach dem Export inaktiv vor. Offensichtlich kann das GFP nur im Cytoplasma seine aktive Konformation falten und daher ist eine Sekretion mittels des Sec-Weges, der nur weitgehend ungefaltete Proteine translozieren kann, ungeeignet (Feilmeier *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001, siehe auch I.4.4). Die Untersuchungen zur Aktivität des mit hoher Ausbeute in den Kulturüberstand über den Tat-Weg sekretierte GFP in *C. glutamicum* zeigten, daß auch in diesem Organismus eine

korrekte cytoplasmatische Faltung von GFP erfolgt und dieses in aktiver Form Tat-abhängig sekretiert wird.

Diese Untersuchungen zeigen zum ersten Mal in Gram-positiven Bakterien, daß der Tat-Weg heterologe Proteine in aktiver Form in den Kulturüberstand sekretieren kann. Der Tat-abhängige Export von aktiven Substraten in Gram-negativen Bakterien konnte schon an mehreren Beispielen gezeigt werden, wie z.B. der Export von aktivem GFP (Thomas *et al.*, 2001) oder MalE (Blaudeck *et al.*, 2003) in *E. coli*.

3. Untersuchungen zur Tat-abhängigen Proteinsekretion in *B. subtilis*

Der Sec-Weg wird schon seit vielen Jahren in *B. subtilis* Stämmen erfolgreich als Sekretionssystem für homologe Proteine genutzt. Für die Sekretion heterologer Proteine weist der Sec-Weg aufgrund einiger „bottlenecks“, vor allem nach der Membranpassage, deutliche Nachteile auf, die mittels des Tat-Weges umgangen werden könnten (siehe dazu I.3.6 und I.4.4). Erste Untersuchungen zum Tat-System in *B. subtilis* haben bereits gezeigt, daß es in der Lage ist heterologe Proteine zu sekretieren (Gerlach *et al.*, 2004) und somit das Potential besitzt, als alternatives Sekretionssystem zum Sec-Weg für heterologe Proteine zu fungieren.

B. subtilis besitzt zwei voneinander unabhängige funktionelle Tat-Translokasen (TatAC_D und TatAC_Y). Es konnten jedoch bislang erst zwei Tat-Substrate gefunden werden, wobei das eine, PhoD, nur über die TatAC_D- und das andere, YwbN, nur durch die TatAC_Y-Translokase transloziert wird und somit die beiden Tat-Systeme in *B. subtilis* zumindest für diese beiden Proteine eine Substratspezifität aufweisen (Jongbloed *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu den Genen der TatAC_Y-Translokase werden die Gene der TatAC_D-Translokase, die mit dem Gen des PhoD-Proteins in einem Operon vorliegen, nur unter Phosphat-limitierenden Bedingungen induziert. Dies bedeutet, daß erst unter den Bedingungen, unter denen PhoD benötigt wird, auch die Komponenten der TatAC_D-Translokase synthetisiert werden.

3.1 MalE und GFP werden in *B. subtilis* mit hoher Ausbeute Tat-abhängig sekretiert

Die Untersuchungen zur Sekretion in *C. glutamicum* hatten gezeigt, daß in diesem Organismus das Tat-Signalpeptid von TorA eine effiziente Tat-abhängige Sekretion sowohl von GFP als auch von MalE vermittelt. Um die Sekretionseigenschaften von *C. glutamicum* mit denen von *B. subtilis* zu vergleichen, wurde das Sekretionsverhalten der heterologen Fusionsproteine TorA-MalE und TorA-GFP auch in *B. subtilis* untersucht. Hierbei zeigte sich, daß TorA-GFP und TorA-MalE ebenfalls mit hohen Ausbeuten in den Überstand sekretiert werden (Abbildung 39A). Eine Akkumulation von reifem GFP oder MalE in der Zellwand, wie sie in *C. glutamicum* stattfindet, konnte nicht beobachtet werden, was möglicherweise auf eine problemlose Passage der Proteine durch die Zellwand in *B. subtilis* schließen läßt (Abbildung 39B). Für die Poren in der Zellwand von *B. subtilis* wurde berechnet, daß sie Proteine bis zu einem Molekulargewicht von mindestens 50kDa durchlassen können (Demchick und Koch, 1996), was für MalE und GFP, die ein Molekulargewicht von 42 bzw.

25kDa haben, auch mit diesen Ergebnissen bestätigt werden konnte. Da kein reifes GFP oder MalE in der Zellwand von *B. subtilis* detektiert werden konnte, treten entweder keine, oder wenn dann nur sehr schwache Wechselwirkungen von GFP und MalE mit der Zellwand auf, oder die reifen Proteine, die in der Zellwand akkumulieren, werden effizient von zellwandassoziierten Proteasen abgebaut. *B. subtilis* besitzt sehr viele extrazelluläre und zellwandassoziierte Proteasen, die oftmals für einen effizienten Abbau von translozierten heterologen Sec-Substraten (Bolhuis *et al.*, 1999; Bolhuis *et al.*, 1996; Kontinen und Sarvas, 1993), aber auch von heterologen Tat-Substraten (Gerlach *et al.*, 2004) verantwortlich sind.

Eine Tat-abhängige Sekretion von heterologen Substraten in *B. subtilis*, wie sie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist bereits zuvor beobachtet worden. So konnten Gerlach *et al.* (2004) zeigen, daß ein Fusionsprotein, welches aus dem Signalpeptid des *B. subtilis* Tat-Substrats PhoD und der *E. coli* Phytase AppA besteht, in *B. subtilis* Tat-abhängig in den Kulturüberstand sekretiert wird. Im Gegensatz zu den hohen Ausbeuten an GFP und MalE waren die Ausbeuten an AppA jedoch sehr gering, da ein Großteil des reifen Proteins durch zellwandassoziierte Proteasen abgebaut wurde. Möglicherweise ist die Kinetik der Zellwandpassage des AppA langsamer als die von GFP und MalE, so daß zellwandassoziierte Proteasen mehr Zeit haben AppA abzubauen. Da AppA ein Molekulargewicht von 45kDa hat und somit durch die Poren der Zellwand passen sollte, müssen seine elektrostatischen Eigenschaften für eine langsamere Zellwandpassage verantwortlich sein. Andererseits sind vielleicht das gefaltete GFP und MalE einfach nur stabiler als das gefaltete AppA-Protein und führen deshalb zu der beobachteten höheren Ausbeute. Dies bedeutet, daß die Kinetik der Zellwandpassage und die Stabilität des nativen Zielproteins in der Tat-abhängigen Sekretion, zumindest in *B. subtilis* aufgrund seiner Vielzahl an zellwandassoziierten und extrazellulären Proteasen, einen entscheidenden Faktor im Hinblick auf die Ausbeute darstellt, wohingegen in der Sec-abhängigen Sekretion zusätzlich die Faltungsgeschwindigkeit der heterologen Proteine nach der Translokation entscheidend ist (Bolhuis *et al.*, 1999).

Die hohen Ausbeuten, die bei den Tat-abhängig sekretierten heterologen Proteinen GFP und MalE beobachtet werden, deuten an, daß das Tat-System in *B. subtilis* zumindest für die hier untersuchten Substrate als Sekretionssystem genutzt werden kann und möglicherweise eine Alternative zum Sec-abhängigen Export darstellt. Da jedoch ein Vergleich der Tat- und Sec-abhängigen Sekretion von GFP und MalE in *B. subtilis* bislang nicht durchgeführt wurde, kann noch nicht die Aussage getroffen werden, welcher der beiden Exportwege die besser Alternative für die Sekretion für GFP und MalE ist.

Der Export von TorA-GFP und TorA-MalE zeigt einen gravierenden Unterschied: Im Gegensatz zu TorA-GFP, welches nur Tat-abhängig transloziert wird, erfolgt im Falle des TorA-MalE Fusionsproteins auch in der $\Delta\text{tatAC}_{\text{DY}}$ -Mutante eine geringe Sekretion von MalE. Dies bedeutet, daß TorA-MalE trotz des Tat-Signalpeptids Sec-abhängig sekretiert wird, wobei anscheinend das reife Protein den Ausschlag für die Wahl des Exportwegs gibt. Ähnliches wurde bereits in *E. coli* beobachtet: Das Tat-Signalpeptid der Glucose-Fructose Oxidoreduktase (GFOR) aus *Z. mobilis* kann aufgrund von Spezies-spezifischen Unterschieden in der Erkennung von Tat-Signalpeptiden durch die Tat-Translokase in *E. coli* keinen Tat-abhängigen Export der reifen GFOR vermitteln. Wird jedoch das GFOR-Signalpeptid vor das reife MalE-Protein fusioniert, erfolgt ein Sec-abhängiger Export des MalE-Proteins in *E. coli*

(Blaudeck, 2001). So beeinflusst anscheinend auch hier das reife Protein die endgültige Entscheidung, über welchen Weg der Export erfolgt. Möglicherweise ist in *E. coli* die Faltungskinetik von GFOR-MalE langsamer als die der authentischen GFOR, wodurch das GFOR-MalE Fusionsprotein länger in einer ungefalteten und damit in einer, im Gegensatz zur authentischen GFOR, für den Sec-Weg kompatiblen Form vorläge. Weiterhin ist auch denkbar, daß das GFOR-MalE Protein nach seiner Faltung auch wieder im Cytoplasma entfaltet werden kann, im Gegensatz zur authentischen GFOR, die möglicherweise irreversibel in eine stabile Konformation faltet. Darüber hinaus weist das GFOR-Signalpeptid kein „Sec-Avoidance“-Motiv auf, das einen Sec-abhängigen Export verhindern könnte. Dies würde erklären, warum MalE in *E. coli* mit GFOR-Signalpeptid Sec-abhängig, aber mit TorA-Signalpeptid, welches ein „Sec-Avoidance“-Motiv aufweist, nur Tat-abhängig exportiert wird.

Die Ausbeute an sekretiertem MalE ist im Wildtyp deutlich höher als in der $\Delta\text{tatAC}_{\text{DY}}$ -Mutante. Dieser verminderte Export in der $\Delta\text{tatAC}_{\text{DY}}$ -Mutante könnte damit erklärt werden, daß, wie bereits in *C. glutamicum* beobachtet, das Ausschalten des Tat-Weges auch in *B. subtilis* einen allgemeinen Einfluß auf den Sec-abhängigen Export hat. Untersuchungen zur Sekretion des Sec-abhängigen *E. coli* Außenmembranproteins OmpA in *B. subtilis* zeigten jedoch, daß diese sowohl im Wildtyp als auch in der *tat*-Mutante mit gleicher Effizienz erfolgte, so daß eine allgemeine Beeinträchtigung des Sec-abhängigen Exports durch Ausschalten des Tat-Weges in *B. subtilis* ausgeschlossen werden kann und somit ein anderer Grund für die verminderte Sekretion von MalE in der $\Delta\text{tatAC}_{\text{DY}}$ -Mutante vorliegen muß. Offensichtlich wird das TorA-MalE Fusionsprotein sowohl Tat- als auch Sec-abhängig exportiert. Da daher im Wildtyp MalE sowohl über beide Exportwege, Tat- und Sec-Weg, und in der Δtat -Mutante nur über den Sec-Weg exportiert wird, ist im Wildtyp die Ausbeute an MalE auch höher als in der *tat*-Mutante.

Das Tat-Signalpeptid von TorA weist eine für Tat-Signalpeptide untypisch hohe Hydrophobizität auf, die der von Sec-Signalpeptiden sehr ähnlich ist. Nur das „Sec-Avoidance“-Motiv in der c-Region des TorA-Signalpeptids verhindert in *E. coli* einen Sec-abhängigen Export, da gezeigt werden konnte, daß eine Entfernung dieses Motivs in einem TorA-MalE Fusionsprotein eine Umleitung des zuvor Tat-abhängigen Fusionsproteins in den Sec-Weg zur Folge hatte (Blaudeck *et al.*, 2003). Das in der c-Region modifizierte TorA-MalE wurde jedoch sowohl über den Sec- als auch über den Tat-Weg exportiert, wobei aber der Sec-Weg kinetisch favorisiert war. Weiterhin konnten De Lisa *et al.* (2003) in *E. coli* Fusionsproteine mit Tat-Signalpeptiden beobachten, die bei Blockierung des Tat-Weges in den Sec-Weg umgeleitet wurden, somit also einen bifunktionellen Charakter aufwiesen.

Das TorA-Signalpeptid scheint in *B. subtilis* trotz seines „Sec-Avoidance“-Motivs also auch einen bifunktionellen Charakter zu haben, da es im Falle des TorA-MalE Fusionsproteins sowohl einen Sec- als auch einen Tat-abhängigen Export vermittelt. Anscheinend kann das „Sec-Avoidance“-Motiv, welches in *E. coli* den Sec-abhängigen Export verhindert, in *B. subtilis* diesen nicht verhindern, da in *B. subtilis* nicht als solches erkannt wird. Darüber hinaus weisen die Tat-Signalpeptide der authentischen *B. subtilis* Substrate PhoD und YwbN beide in ihren c-Regionen keine positiv geladenen Aminosäuren auf, die für solch ein Motiv charakteristisch wären. Da aber die h-Regionen beider Proteine eine für den Sec-Weg typische hohe Hydrophobizität besitzen, existiert möglicherweise ein anderes, bislang unbekanntes,

„Sec-Avoidance“-Motiv in den Signalpeptiden von PhoD und YwbN, welches einen Sec-abhängigen Export dieser Tat-Substrate in *B. subtilis* verhindert.

Hierbei muß aber weiterhin bedacht werden, daß das reife Protein in diesem Fall offensichtlich bestimmt, über welchen Weg exportiert wird, da GFP mit dem TorA-Signalpeptid im deutlichen Gegensatz zu MalE strikt Tat-abhängig exportiert wird. Ohne sein eigenes Sec-Signalpeptid faltet MalE im Cytoplasma rasch in seine stabile native Konformation (Weiss und Bassford, 1990). Im Gegensatz zum authentischen Sec-Signalpeptid von MalE, daß eine Faltung des reifen Proteins verzögert und es damit in einer für Sec-Weg kompatiblen Form hält, erlaubt im Fusionsprotein TorA-MalE das Tat-Signalpeptid von TorA eine cytoplasmatische Faltung und somit einen Tat-abhängigen Export von MalE. Da aber dennoch ein Sec-abhängiger Export von TorA-MalE in *E. coli* noch möglich ist, was, wie bereits oben erwähnt, anhand des MalE-Proteins mit dem TorA-Signalpeptid ohne „Sec-Avoidance“-Motiv gezeigt wurde, muß auch entfaltetes und damit für den Sec-Weg kompatibles MalE vorhanden sein. Anscheinend ist die Faltung von TorA-MalE nicht so stabil, als daß keine Entfaltung mehr möglich wäre.

Möglicherweise kann TorA-MalE in *B. subtilis* nach seiner Faltung im Cytoplasma auch wieder entfaltet und somit auch Sec-abhängig exportiert werden, im Gegensatz zu TorA-GFP, das offensichtlich in eine zu stabile Konformation faltet. Diese Entfaltung von TorA-MalE könnte z. B. an der Sec-Translokase durch die Translokation erfolgen. D.h. MalE wird durch das „Ziehen“ durch die Translokase entfaltet. Die Sec-abhängige Translokation von TorA-GFP würde demnach auch initiiert werden, eine Translokation von GFP könnte aber aufgrund der stabilen gefalteten Konformation nicht erfolgen

3.2 GFP wird in *B. subtilis* in Abhängigkeit vom Signalpeptid mit unterschiedlichen Ausbeuten sekretiert

Das GFP-Protein wird in *B. subtilis* nicht nur mittels des TorA-Signalpeptids, sondern auch, wie schon bei *C. glutamicum* beobachtet, mittels der PhoD-Signalpeptide aus *B. subtilis* und *C. glutamicum* Tat-abhängig in den Kulturüberstand sekretiert (Abbildung 40). Dabei unterscheiden sich die Ausbeuten an GFP mit TorA- und PhoD_{B_s}-Signalpeptid offensichtlich nicht, wohingegen im Falle des PhoD_{C_g}-GFP Fusionsprotein deutlich weniger GFP sekretiert wird. Da auch die Gesamtproteinmenge von PhoD_{C_g}-GFP signifikant niedriger ist, als die der beiden anderen Fusionsproteine, liegt der Grund für die geringe Ausbeute offensichtlich in Ereignissen vor der Translokation. Da in allen drei Fällen ein identisches Expressionssystem verwendet wurde, kann eine unterschiedliche Expression der einzelnen Fusionsgene sein als Ursache für die verschiedenen Gesamtproteinmengen ausgeschlossen werden. Es ist daher anzunehmen, daß sich die Stabilität der mRNA und/oder die der Fusionsproteine unterscheidet. Möglicherweise faltet das PhoD_{C_g}-GFP Fusionsprotein langsamer als die TorA- und PhoD_{B_s}-GFP Fusionsproteine und ist deswegen deutlich sensitiver gegenüber cytosolischen Proteasen. Auch für *C. glutamicum* konnte in dieser Arbeit schon gezeigt werden, daß die Fusionsproteine TorA-, PhoD_{B_s}- und PhoD_{C_g}-GFP mit unterschiedlicher Ausbeute sekretiert werden, wobei auch hier der Grund in der Stabilität der Fusionsproteine liegt (siehe IV.2.3.3).

Diese Ergebnisse zeigen wieder deutlich, wie wichtig es ist, verschiedene Fusionen, Sekretionssysteme und Bedingungen auszutesten und somit nach dem „tool box“-Prinzip vorzugehen, um eine optimale Ausbeute eines Proteins zu erreichen.

3.3 Die Signalpeptide TorA und PhoD_{Bs} zeigen eine unterschiedliche Translokasespezifität in *B. subtilis*

Das GFP wird mittels des TorA-Signalpeptids aus *E. coli* und mittels des PhoD-Signalpeptids aus *B. subtilis* strikt und das MalE-Protein mittels des TorA-Signalpeptids zumindest zum Teil Tat-abhängig in *B. subtilis* sekretiert. Da *B. subtilis* über zwei unabhängige, funktionelle Tat-Systeme, TatAC_D und TatAC_Y verfügt, die zumindest für die *B. subtilis* Tat-Substrate PhoD und YwbN eine Substratspezifität aufweisen, wurde untersucht über welche Translokase der Tat-abhängige Export von TorA-GFP, TorA-MalE und PhoD_{Bs}-GFP erfolgt. Dazu wurde das Exportverhalten der Fusionsproteine in *B. subtilis* Wildtyp, in der $\Delta\text{tatAC}_{\text{DY}}$ -Mutante und in zwei Mutanten, in denen jeweils nur eines der beiden Tat-Systeme ausgeschaltet ist ($\Delta\text{tatAC}_{\text{D}}$ und $\Delta\text{tatAC}_{\text{Y}}$) untersucht. Da die Gene für die TatAC_D-Translokase nur bei Phosphatmangel voll exprimiert werden, erfolgte die Untersuchung sowohl unter Phosphatüberschuß- als auch unter Phosphatmangelbedingungen.

Die Sekretion von GFP mittels des *B. subtilis* Signalpeptid von PhoD erfolgt nur unter Phosphatmangel und da auch nur, sofern die TatAC_D-Translokase nicht ausgeschaltet ist, also nur im Wildtyp und der $\Delta\text{tatAC}_{\text{Y}}$ -Mutante (Abbildung 41A, Spur 2 und 8). Dies steht im vollen Einklang mit den Befunden von Jongbloed *et al.* (2000), in denen gezeigt wurde, daß das authentische PhoD in *B. subtilis* strikt über die TatAC_D- und nicht über die TatAC_Y-Translokase exportiert wird und daß der Export nur unter Phosphatmangelbedingungen erfolgt. Dies bedeutet, daß die Translokasenspezifität allein durch das PhoD-Signalpeptid bestimmt wird, da es sowohl für das reife PhoD als auch für das reife GFP eine strikte Translokation über die TatAC_D-Translokase vermittelt.

Im Fall des TorA-GFP Proteins liegt eine andere Situation vor. Hier erfolgte eine Sekretion von GFP in allen Stämmen außer in der Mutante, in der beide Tat-Systeme ausgeschaltet sind (Abbildung 41B). Die Sekretion erfolgte sowohl bei Phosphatüberschuß als auch bei Phosphatmangel, wobei unter Phosphatüberschußbedingung die Menge an sekretierten GFP in der $\Delta\text{tatAC}_{\text{Y}}$ -Mutante im Vergleich zu der Menge an sekretiertem GFP unter Phosphatmangelbedingung signifikant niedriger ist (Abbildung 41B, Spur 8 und 16). Dies bedeutet, daß TorA-GFP in *B. subtilis* im Gegensatz zu PhoD_{Bs}-GFP über beide Tat-Systeme exportiert wird. Dabei ist der Export über TatAC_Y, im Gegensatz zum Export über TatAC_D unabhängig von der Phosphatkonzentration, da unter beiden unterschiedlichen Phosphatbedingungen die gleiche Menge an GFP in der $\Delta\text{tatAC}_{\text{D}}$ -Mutante sekretiert wird.

Das Signalpeptid von TorA kann im Gegensatz zu den Signalpeptiden der authentischen *B. subtilis* Tat-Substrate PhoD und YwbN von beiden Tat-Translokasen in *B. subtilis* erkannt werden, so daß TorA-GFP sowohl über die TatAC_D- als auch die TatAC_Y-Translokase exportiert wird. Offensichtlich verfügt das Signalpeptid von PhoD bzw. das Signalpeptid von YwbN über Eigenschaften, die eine Erkennung durch die TatAC_Y- bzw. TatAC_D-Translokase verhindern und somit nicht im TorA-Signalpeptid vorhanden sein können.

TorA-MalE wird in allen *B. subtilis* Stämmen, sowohl unter Phosphatüberschuß- als auch unter Phosphatmangelbedingungen exportiert (Abbildung 41). Dieses bestätigt die bisherigen Ergebnisse: das TorA-Signalpeptid wird offensichtlich aufgrund seiner unter IV.3.1 besprochenen Eigenschaften und aufgrund der Faltungseigenschaften des MalE-Proteins auch über den Sec-Weg exportiert und das TorA-Signalpeptid wird aufgrund seiner Eigenschaften durch beide Tat-Systeme erkannt, was den Export sowohl in der ΔtatAC_D -Mutante als auch in der ΔtatAC_Y -Mutante erklärt. Da die Ausbeute von MalE in der ΔtatAC_D - und in der ΔtatAC_Y -Mutante im gleichen Maße höher ist wie in der ΔtatAC_{DY} -Mutante, kann ausgeschlossen werden, daß in einer der beiden Mutanten nur Sec-abhängiger Export erfolgt.

3.4 Das in *B. subtilis* Tat-abhängig sekretierte GFP ist inaktiv

Die Untersuchungen zur Tat-abhängigen Sekretion von GFP in *C. glutamicum* hatten gezeigt, daß GFP in aktivem Zustand sekretiert wird. Dies stand im Einklang zu den Befunden von Thomas *et al.* (2001) zum Tat-abhängigen Export von GFP in *E. coli*. Überraschenderweise zeigte das GFP, welches in *B. subtilis* Tat-abhängig in den Kulturüberstand sekretiert wurde, unabhängig vom verwendeten Signalpeptid (TorA, PhoD_{Cg} und PhoD_{Bs}), im Gegensatz zu der Situation in *C. glutamicum*, trotz identischer Konstruktion keine Fluoreszenz im Kulturüberstand (Abbildung 42A und B). Mögliche Gründe für die fehlende Fluoreszenz im Falle des in *B. subtilis* sekretierten GFP könnten sein: (1) die Menge an aktivem GFP im Überstand ist zu gering, als daß eine Fluoreszenz detektierbar wäre, (2) das GFP-Protein wird in der Zellwand oder im Überstand von *B. subtilis* durch Proteasen in einen inaktiven Zustand überführt oder (3) das GFP wird bereits im Cytoplasma falsch gefaltet.

Punkt (1) kann nur die fehlende Aktivität im Falle des PhoD_{Cg}-GFP Fusionsproteins erklären, da hier tatsächlich eine vergleichsweise geringe Menge an GFP im Überstand vorhanden ist. Im Falle der Fusionsproteine TorA-GFP und PhoD_{Bs}-GFP ist die Ausbeute an reifen GFP im Kulturüberstand sehr hoch und vergleichbar mit der Menge an reifen GFP, die im Kulturüberstand von *C. glutamicum* vorliegt und dort für sichtbare Fluoreszenz ausreicht. Daher scheidet ein Mengeneffekt als Grund für die fehlende Fluoreszenz zumindest für TorA-GFP und PhoD_{Bs}-GFP aus.

Tat-abhängig sekretierte Proteine können scheinbar in *B. subtilis* trotz ihrer gefalteten Konformation durchaus Opfer von extrazellulären Proteasen werden, wie die Untersuchungen von Gerlach *et al.* (2004) gezeigt haben. Dennoch scheint Punkt (2) nicht als Ursache für die hier fehlende Aktivität des GFP in Betracht zu kommen, da keinerlei Anzeichen auf einen Abbau des reifen GFP vorliegen. Wird das GFP durch Proteasen in eine inaktive Konformation überführt, würde erwartet werden, daß sich die Größe des GFP und damit auch das Laufverhalten im SDS-Gel verändern würde. Da aber das im Überstand von *B. subtilis* vorkommende GFP das typische Laufverhalten zeigt und keine extrazellulären Degradationsprodukte zu finden sind, wird Proteaseverdau als Ursache für die fehlende Aktivität ebenfalls ausgeschlossen.

Anscheinend ist hier Punkt (3), eine Falschfaltung des GFP im Cytoplasma, der Grund für die Inaktivität des GFP, obwohl dies auch aufgrund der folgenden Argumente unwahrscheinlich

scheint. Das GFP ist durchaus in der Lage sich in *B. subtilis* auch als Teil einer Fusion in seine aktive und damit fluoreszierende Konformation zu falten (Webb und Resnekov, 1999; Webb *et al.*, 1995). Darüber hinaus konnte für das GFP der verwendeten Fusionsproteine, TorA-GFP, PhoD_{Bs}-GFP und PhoD_{Cg}-GFP in *C. glutamicum* eindeutig Aktivität nachgewiesen werden. Dies würde bedeuten, daß das GFP in diesen Fusionen nur in *B. subtilis* aus bisher unbekanntem Gründen nicht in seine aktive Konformation falten kann.

Die Untersuchungen zu Tat-abhängigen Sekretion in *B. subtilis* haben gezeigt, daß dieser Organismus durchaus in der Lage ist heterologe Substrate mit hoher Ausbeute Tat-abhängig in den Überstand zu sekretieren und somit auch das Potential besitzt für die Gewinnung heterologer Proteine mittels des Tat-System eingesetzt zu werden. Zumindest für die hier untersuchten Tat-abhängig sekretierten Proteine stellt die Zellwand in *B. subtilis*, im Gegensatz, zu der Situation in *S. carnosus* offensichtlich keine Barriere in der Proteinsekretion dar.

4. Untersuchungen zur Spezies-Spezifität bei der Signalpeptiderkennung im Tat-abhängigen Proteinexport

Studien zum Sec-abhängigen Proteinexport haben gezeigt, daß Sec-Signalpeptide im allgemeinen innerhalb der Bakterien austauschbar sind ohne dabei den Export des jeweiligen reifen Proteins deutlich zu beeinträchtigen (Izard und Kendall, 1994; von Heijne, 1989). Dies scheint dagegen für Tat-Signalpeptide nicht uneingeschränkt zu gelten. So wird die GFOR, ein Tat-Substrat aus *Z. mobilis*, in *E. coli* nicht transloziert, sondern akkumuliert als Vorläuferform im Cytoplasma. Erst das Austauschen des Tat-Signalpeptids der GFOR gegen das Tat-Signalpeptid von TorA aus *E. coli* ermöglicht eine Tat-abhängige Translokation der reifen GFOR in *E. coli* (Blaudeck *et al.*, 2003). Dieses Phänomen des Nicht-Erkennens von Tat-Signalpeptiden wird aber nicht nur zwischen verschiedenen Organismen, sondern auch innerhalb eines Organismus beobachtet. So wird in *B. subtilis* das Tat-Substrat PhoD nur über die TatAC_D-Translokase exportiert, wohingegen das Tat-Substrat YwbN nur über die TatAC_Y-Translokase exportiert wird (Jongbloed *et al.*, 2004).

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit deuten an, daß einige Tat-Signalpeptide nicht von bestimmten fremden Tat-Translokasen erkannt werden. So konnte kein Export von GFP mit den Tat-Signalpeptiden der PhoD-Proteine aus *B. subtilis* und *C. glutamicum* in *E. coli* und *S. carnosus* beobachtet werden (Abbildung 44, Spalte 1-4, 9-12 und Abbildung 45, Spalte 1-4, 9-12), im Gegensatz zu der Situation in *B. subtilis* und *C. glutamicum*, wo GFP mit beiden PhoD-Signalpeptiden, aus *B. subtilis* und *C. glutamicum*, Tat-abhängig exportiert wird. Das Fehlen von reifem Protein auf der *trans*-Seite der Membran heißt aber nicht zwangsläufig, daß kein Export stattgefunden hat. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß in *E. coli* und *S. carnosus* ein Export auch mit den PhoD-Signalpeptiden stattfindet, GFP aber nach der Translokation effizient abgebaut wird und daher kein reifes GFP im Periplasma bzw. im Überstand zu finden ist.

Das TorA-Signalpeptid dagegen wird neben *E. coli* von allen Tat-Translokasen der bisher untersuchten Organismen erkannt. So vermittelt es in *E. coli*, *S. carnosus*, *C. glutamicum* und *B. subtilis* einen Tat-abhängigen Export von GFP (Abbildung 43), wobei das TorA-Signalpeptid in *B. subtilis* sogar von beiden Tat-Translokasen erkannt wird (Abbildung 41B). Bislang ist nicht genau bekannt, was die Spezies-Spezifität in den Signalpeptiden von Tat-Substraten ausmacht. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß einige Signalpeptide über Eigenschaften verfügen, die eine Erkennung durch andere Translokasen verhindern. Da es oftmals Unterschiede, z.B. in der Hydrophobizität und /oder der Nettoladung der Tat-Signalpeptide gibt, ist es denkbar daß diese Eigenschaften eine wichtige Rolle in der Spezies-Spezifität ausmachen. So ist die Nettoladung der beiden PhoD-Signalpeptide geringer als die des TorA-Signalpeptids. Möglicherweise kann die *E. coli* Tat-Translokase aufgrund dieses Ladungsunterschiedes die Signalpeptide der PhoD-Proteine nicht erkennen, wohingegen die Tat-Translokasen aus *C. glutamicum* und *B. subtilis* keine Probleme mit der Erkennung von Tat-Signalpeptiden mit höherer Nettoladung hat. Diese Eigenschaften der Tat-Signalpeptide werden im Laufe der Evolution als eine spezifische Anpassung an die eigene Translokase entstanden sein.

Weiterhin könnten aber auch andere Ereignisse vor der Translokation verhindern, daß ein fremdes Signalpeptid von einer Tat-Translokase erkannt wird. So ist denkbar, daß fremde Signalpeptide von cytosolischen Chaperonen gebunden werden und aufgrund dieser Bindung eine Maskierung der Signalpeptide erfolgt, was eine Erkennung durch die Tat-Translokase verhindert. In *E. coli* wurden Chaperone gefunden, die Tat-Signalpeptide binden und solange maskieren können, bis das Protein alle Co-Faktoren eingebaut hat und vollständig gefaltet ist und dadurch den Export von unreifen Protein verhindern (Hatzixanthis *et al.*, 2005; Sargent *et al.*, 2002). Möglicherweise werden in *E. coli* und *S. carnosus* die PhoD-Signalpeptide ebenfalls durch solche cytosolischen Chaperone gebunden, jedoch dauerhaft maskiert, da die Chaperone im Falle des heterologen Substrats nicht feststellen können, ob tatsächlich alle Co-Faktoren eingebaut sind und es vollständig gefaltet ist.

5. Vergleich von *S. carnosus*, *C. glutamicum* und *B. subtilis* in Bezug auf die Anwendbarkeit als Tat-abhängiges Sekretionssystem für die Gewinnung heterologer Proteine

Die vorliegenden Untersuchungen haben deutlich gezeigt, daß alle drei Gram-positiven Bakterien in der Lage sind, heterologe Proteine Tat-abhängig über die Cytoplasmamembran zu translozieren. In den Sekretionseigenschaften zeigen die Organismen jedoch gravierende Unterschiede. *C. glutamicum* und *B. subtilis* sekretieren die hier untersuchten heterologen Proteine in fast allen Fällen mit einer hohen Ausbeute in den Kulturüberstand. Für *C. glutamicum* konnte sogar am Beispiel des MalE-Proteins gezeigt werden, daß die Ausbeute, die mittels Tat-abhängiger Sekretion erreicht wird, diejenige, welche mittels Sec-abhängiger Sekretion erzielt wird, übertrifft. Die Eigenschaft des Tat-Weges vollständig gefaltete Proteine zu translozieren ist hier im Falle des MalE-Proteins offensichtlich der

entscheidende Faktor für die hohen Ausbeute: Dadurch daß das heterologen MalE bereits in gefalteter Konformation ins Zellwandkompartiment gelangen, ist es von vorneherein stabiler und resistenter gegenüber Proteasen als das Sec-abhängig und daher in ungefalteter Konformation translozierte MalE. Dieses Ergebnis zeigt aber nur, daß im Falle der Sekretion von MalE in *C. glutamicum* der Tat-Weg die bessere Alternative als der Sec-Weg ist und schließt nicht aus, daß viele andere heterologe Proteine wahrscheinlich Sec-abhängig mit höherer Ausbeute in den Überstand sekretiert werden. Jedoch für die Sekretion von Proteinen, die nur im Cytoplasma in ihre aktive Konformation falten können, ist wahrscheinlich nur der Tat-Weg die einzige Alternative, da hier die Proteine auch in aktiver gefalteter Form über die Cytoplasmamembran transloziert und in den Überstand sekretiert werden können, wie es für das GFP in *C. glutamicum* in dieser Arbeit auch gezeigt wurde.

Die Zellwand von *C. glutamicum* und *B. subtilis* scheint zumindest bei den hier untersuchten heterologen Proteinen GFP und MalE keine unüberwindliche Barriere darzustellen, da in *B. subtilis* weder MalE noch GFP und in *C. glutamicum* nur geringe Mengen beider Proteine in der Zellwand akkumulieren. Beide Proteine weisen aber beide ein Molekulargewicht von unter 50kDa auf und können daher zumindest aufgrund ihrer Größe die Poren der Zellwand problemlos passieren. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß die Zellwand von *C. glutamicum* und *B. subtilis* für große heterologe Substrate sehr wohl eine Barriere ist. Einen deutlichen Gegensatz stellt die Situation bei *S. carnosus* dar. Die hier untersuchten Proteine blieben ausnahmslos in der Zellwand stecken und wurden deshalb auch nicht in den Überstand sekretiert. Hierbei scheinen besonders elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Substraten und der Zellwand eine Rolle zu spielen, die in *S. carnosus* für die hier untersuchten Proteine offensichtlich von größerem Ausmaß sind als in *C. glutamicum* und *B. subtilis*. Daher scheint in *S. carnosus* die Zellwand, zumindest für die hier untersuchten Proteine, eine unüberwindliche Barriere darzustellen. Dies schließt natürlich nicht aus, daß es authentische Tat-Substrate in diesem Organismus gibt, die problemlos die Zellwand passieren können.

In einer abschließenden Bewertung kann eindeutig gesagt werden, daß sich *C. glutamicum* und auch *B. subtilis* für die sekretorische Tat-abhängige Proteingewinnung von heterologen Substraten zu eignen scheinen und daher auch das Potential für die industrielle Anwendung aufweisen. Die Untersuchungen haben aber auch gezeigt, daß es unerlässlich ist, für jedes zu sekretierende Protein Fusionen mit unterschiedlichen Signalpeptiden und unterschiedliche Bedingungen auszuprobieren, um optimale Ausbeuten zu erreichen. *S. carnosus* hat sein Potential in der sekretorischen Proteingewinnung von heterologen Substraten dagegen offensichtlich wohl eher in der Sec-abhängigen als in der Tat-abhängigen Sekretion.

V. Zusammenfassung

Für die sekretorische Proteingewinnung in Gram-positiven Bakterien wurde bislang ausschließlich der Sec-Weg genutzt. Hierbei verläuft die Sekretion heterologer Substrate in vielen Fällen ineffizient, da diese nach der Membranpassage oft nur sehr langsam oder falsch falten und so Opfer extrazellulärer Proteasen werden. Im Tat-Weg erfolgt die Faltung der Substrate bereits im Cytoplasma, wodurch Faltungsprobleme von heterologen Substraten nach der Translokation vermieden werden. Somit ist der Tat-Weg, bei dem die Untersuchungen zu seinem biotechnologischen Potential gerade erst begonnen haben, möglicherweise eine Alternative zum Sec-Weg in der sekretorischen Gewinnung heterologer Proteine. Dieses wurde in der vorliegenden Arbeit anhand der Gram-positiven Bakterien *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum* und *Bacillus subtilis* näher untersucht, wobei zu Beginn nur bekannt war, daß *B. subtilis* ein funktionelles Tat-System besitzt. Für *S. carnosus* und *C. glutamicum* wurde dies hier zum ersten Mal gezeigt. Bei der Charakterisierung der Tat-Systeme zeigte sich, daß unter den hier getesteten Bedingungen der Tat-Weg in *C. glutamicum*, im deutlichen Gegensatz zur Situation in *S. carnosus*, eine wichtige Rolle sowohl für das Wachstum als auch für den Stoffwechsel spielt.

Zur vergleichenden Bewertung der Sekretionseigenschaften dieser Bakterien wurde die Tat-abhängige Sekretion von verschiedenen Fusionsproteinen untersucht. In *S. carnosus* stellte sich heraus, daß die Modellproteine CGTase und GFP in der Zellwand stecken bleiben und nicht sekretiert werden. Wobei im Fall der CGTase anscheinend das hohe Molekulargewicht von 70kDa die Zellwandpassage limitiert und beim GFP (25kDa) nicht die Größe, sondern offensichtlich elektrostatische Wechselwirkungen zwischen GFP und der Zellwand die Sekretion verhindern. In *C. glutamicum* und *B. subtilis* konnte dagegen gezeigt werden, daß GFP und auch ein weiteres Substrat (MalE) Tat-abhängig mit hoher Ausbeute sekretiert werden. Eine Lokalisierung der Proteine ergab, daß hier nur eine geringe Menge in der Zellwand steckenbleibt und somit die Wechselwirkungen zwischen GFP bzw. MalE und der Zellwand von *B. subtilis* und *C. glutamicum* offensichtlich nicht so stark sind wie die im Falle von GFP in *S. carnosus*. Darüber hinaus zeigte ein Vergleich von Tat- und Sec-abhängiger Sekretion von MalE in *C. glutamicum*, daß eine deutlich höhere Ausbeute über den Tat-Weg erzielt wird. Dies ist anscheinend eine Folge der höheren Stabilität des über den Tat-Weg exportierten MalE-Proteins. Weiterhin konnte mit der Beobachtung, daß GFP in *C. glutamicum* in aktiver Form Tat-abhängig sekretiert wird, deutlich gemacht werden, daß der Tat-Weg möglicherweise vor allem für solche Proteine als Sekretionsweg genutzt werden kann, die wie GFP cytosolische Faltungsfaktoren benötigen und daher nicht über den Sec-Weg in aktiver Form sekretiert werden können.

Eine Tat-abhängige Sekretion von GFP in *B. subtilis* und in *C. glutamicum* konnte sowohl mit heterologen, als auch mit homologen Tat-Signalpeptiden vermittelt werden. Hierbei wurden jedoch je nach verwendetem Fusionsprotein unterschiedliche Ausbeuten erzielt, wobei hierfür offensichtlich die Stabilität der jeweiligen mRNA und/oder des Fusionsproteins entscheidend ist. Darüber hinaus konnte in *C. glutamicum* gezeigt werden, daß auch das verwendete Medium einen großen Einfluß auf die Ausbeute hat, wobei auch hier vermutet wird, daß die Stabilität der mRNA und/oder des Fusionsproteins, die je nach Medium variiert, dafür verantwortlich ist. Die erhaltenen Befunde machen deutlich, daß es kein generelles System für die heterologe Proteinsekretion gibt, sondern daß für jedes zu sekretierende Protein zuerst nach dem „tool-box“-Prinzip überprüft werden muß, in welcher Fusion, in welchem Wirt und unter welchen Bedingungen, die höchsten Ausbeuten erzielt werden.

Tat-Signalpeptide können im Gegensatz zu Sec-Signalpeptiden nicht generell ausgetauscht werden. So wurde auch in dieser Arbeit beobachtet, daß die Tat-Signalpeptide von PhoD aus *B. subtilis* und *C. glutamicum* offensichtlich keinen Export von GFP in *E. coli* und *S. carnosus* vermitteln, was auf Spezies-spezifische Unterschiede in der Signalpeptiderkennung durch die jeweiligen Tat-Translokasen hindeutet. Dies ist beim TorA-Signalpeptid aus *E. coli* nicht der Fall, da es bei allen hier untersuchten Organismen einen Tat-abhängigen Export vermitteln kann. Offensichtlich weisen die PhoD-Signalpeptide Eigenschaften auf, die eine Erkennung durch die Tat-Translokasen in *E. coli* und *S. carnosus* verhindern.

VI. Literatur

- Abe, S., Takayama, K. I. & Kinoshita, S. (1967).** Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J Gen Appl Microbiol* **13**, 279-301.
- Alami, M., Luke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H. G., Brunner, J. & Muller, M. (2003).** Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Mol Cell* **12**, 937-946.
- Alder, N. N. & Theg, S. M. (2003a).** Energetics of protein transport across biological membranes. a study of the thylakoid DeltapH-dependent/cpTat pathway. *Cell* **112**, 231-242.
- Alder, N. N. & Theg, S. M. (2003b).** Energy use by biological protein transport pathways. *Trends Biochem Sci* **28**, 442-451.
- Barrett, C. M., Ray, N., Thomas, J. D., Robinson, C. & Bolhuis, A. (2003).** Quantitative export of a reporter protein, GFP, by the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 279-284.
- Behrendt, J., Standar, K., Lindenstrauss, U. & Bruser, T. (2004).** Topological studies on the twin-arginine translocase component TatC. *FEMS Microbiol Lett* **234**, 303-308.
- 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**, 3628-3638.
- Berks, B. C., Sargent, F. & Palmer, T. (2000a).** The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* **35**, 260-274.
- Berks, B. C., Sargent, F., De Leeuw, E., Hinsley, A. P., Stanley, N. R., Jack, R. L., Buchanan, G. & Palmer, T. (2000b).** A novel protein transport system involved in the biogenesis of bacterial electron transfer chains. *Biochim Biophys Acta* **1459**, 325-330.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Blackman, S. A., Smith, T. J. & Foster, S. J. (1998).** The role of autolysins during vegetative growth of *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology* **144** (Pt 1), 73-82.
- Blaudeck, N. (2001).** Charakterisierung der Tat-abhängigen Proteintranslokation in Gram-negativen Bakterien. Berichte des Forschungszentrums Jülich; Jül-3827.
- Blaudeck, N., Kreutzenbeck, P., Freudl, R. & Sprenger, G. A. (2003).** Genetic analysis of pathway specificity during posttranslational protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Bacteriol* **185**, 2811-2819.
- Blaudeck, N., Kreutzenbeck, P., Muller, M., Sprenger, G. A. & Freudl, R. (2005).** Isolation and characterization of bifunctional *Escherichia coli* TatA mutant proteins that allow efficient tat-dependent protein translocation in the absence of TatB. *J Biol Chem* **280**, 3426-3432.
- Bogsch, E., Brink, S. & Robinson, C. (1997).** Pathway specificity for a delta pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein. *Embo J* **16**, 3851-3859.

- Bolhuis, A., Mathers, J. E., Thomas, J. D., Barrett, C. M. & Robinson, C. (2001).** TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**, 20213-20219.
- Bolhuis, A., Tjalsma, H., Smith, H. E., de Jong, A., Meima, R., Venema, G., Bron, S. & van Dijl, J. M. (1999).** Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2934-2941.
- Bolhuis, A., Sorokin, A., Azevedo, V., Ehrlich, S. D., Braun, P. G., de Jong, A., Venema, G., Bron, S. & van Dijl, J. M. (1996).** *Bacillus subtilis* can modulate its capacity and specificity for protein secretion through temporally controlled expression of the sipS gene for signal peptidase I. *Mol Microbiol* **22**, 605-618.
- Bost, S. & Belin, D. (1997).** prl mutations in the *Escherichia coli* secG gene. *J Biol Chem* **272**, 4087-4093.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Bremer, E., Beck, E., Hindennach, I., Sonntag, I. & Henning, U. (1980).** Cloned structural gene (ompA) for an integral outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12: localization on hybrid plasmid pTU100 and expression of a fragment of the gene. *Mol Gen Genet* **179**, 13-20.
- Brennan, P. J. & Nikaido, H. (1995).** The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* **64**, 29-63.
- Breyton, C., Haase, W., Rapoport, T. A., Kuhlbrandt, W. & Collinson, I. (2002).** Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* **418**, 662-665.
- Brink, S., Bogsch, E. G., Edwards, W. R., Hynds, P. J. & Robinson, C. (1998).** Targeting of thylakoid proteins by the delta pH-driven twin-arginine translocation pathway requires a specific signal in the hydrophobic domain in conjunction with the twin-arginine motif. *FEBS Lett* **434**, 425-430.
- Bronstein, P., Marrichi, M. & DeLisa, M. P. (2004).** Dissecting the twin-arginine translocation pathway using genome-wide analysis. *Res Microbiol* **155**, 803-810.
- 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**, 649-657.
- Brüser, T., Deutzmann, R. & Dahl, C. (1998).** Evidence against the double-arginine motif as the only determinant for protein translocation by a novel Sec-independent pathway in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **164**, 329-336.
- Buchanan, G., Sargent, F., Berks, B. C. & Palmer, T. (2001).** A genetic screen for suppressors of *Escherichia coli* Tat signal peptide mutations establishes a critical role for the second arginine within the twin-arginine motif. *Arch Microbiol* **177**, 107-112.
- Casadaban, M. J. (1976).** Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* **104**, 541-555.
- Chaddock, A. M., Mant, A., Karnauchov, I., Brink, S., Herrmann, R. G., Klosgen, R. B. & Robinson, C. (1995).** A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *Embo J* **14**, 2715-2722.

- Clauser, K. R., Baker, P. & Burlingame, A. L. (1999).** Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal Chem* **71**, 2871-2882.
- Cline, K. & Mori, H. (2001).** Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J Cell Biol* **154**, 719-729.
- Cristobal, S., de Gier, J. W., Nielsen, H. & von Heijne, G. (1999).** Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *Embo J* **18**, 2982-2990.
- Dassa, E. & Lambert, P. (1997).** Activity of protein MalE (maltose-binding protein) fused to cytoplasmic and periplasmic regions of an *Escherichia coli* inner membrane protein. *Res Microbiol* **148**, 389-395.
- De Leeuw, E., Porcelli, I., Sargent, F., Palmer, T. & Berks, B. C. (2001).** Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway. *FEBS Lett* **506**, 143-148.
- de Leeuw, E., Granjon, T., Porcelli, I., Alami, M., Carr, S. B., Muller, M., Sargent, F., Palmer, T. & Berks, B. C. (2002).** Oligomeric properties and signal peptide binding by *Escherichia coli* Tat protein transport complexes. *J Mol Biol* **322**, 1135-1146.
- DeLisa, M. P., Tullman, D. & Georgiou, G. (2003).** Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6115-6120.
- DeLisa, M. P., Samuelson, P., Palmer, T. & Georgiou, G. (2002).** Genetic analysis of the twin arginine translocator secretion pathway in bacteria. *J Biol Chem* **277**, 29825-29831.
- Demchick, P. & Koch, A. L. (1996).** The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**, 768-773.
- 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**, 11994-12004.
- Derman, A. I., Puziss, J. W., Bassford, P. J., Jr. & Beckwith, J. (1993).** A signal sequence is not required for protein export in prlA mutants of *Escherichia coli*. *Embo J* **12**, 879-888.
- Diderichsen, B. & Christiansen, L. (1988).** Cloning of a maltogenic alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**, 53-60.
- Dilks, K., Rose, R. W., Hartmann, E. & Pohlschroder, M. (2003).** Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey. *J Bacteriol* **185**, 1478-1483.
- Dilsen, S., Paul, W., Sandgathe, A., Tippe, D., Freudl, R., Thommes, J., Kula, M. R., Takors, R., Wandrey, C. & Weuster-Botz, D. (2000).** Fed-batch production of recombinant human calcitonin precursor fusion protein using *Staphylococcus carnosus* as an expression-secretion system. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**, 361-369.
- Driessen, A. J., Manting, E. H. & van der Does, C. (2001).** The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. *Nat Struct Biol* **8**, 492-498.
- Duong, F. & Wickner, W. (1997).** The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *Embo J* **16**, 4871-4879.
- Duong, F. & Wickner, W. (1999).** The PrlA and PrlG phenotypes are caused by a loosened association among the translocase SecYEG subunits. *Embo J* **18**, 3263-3270.

- Economou, A. & Wickner, W. (1994).** SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* **78**, 835-843.
- Economou, A., Pogliano, J. A., Beckwith, J., Oliver, D. B. & Wickner, W. (1995).** SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecE. *Cell* **83**, 1171-1181.
- Eggeling, L. & Bott, M. (2005).** Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. CRC Press. 439-531.
- Eikmanns, B. J., Kleinertz, E., Liebl, W. & Sahm, H. (1991).** A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* **102**, 93-98.
- Emr, S. D., Hanley-Way, S. & Silhavy, T. J. (1981).** Suppressor mutations that restore export of a protein with a defective signal sequence. *Cell* **23**, 79-88.
- Feilmeier, B. J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H. & Phillips, G. J. (2000).** Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**, 4068-4076.
- Fekkes, P., van der Does, C. & Driessen, A. J. (1997).** The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *Embo J* **16**, 6105-6113.
- Ferrari, E., Jarnagin, A. S. & Schmidt, B. F. (1993).** Commercial production of extracellular enzymes. *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. *ASM Press*, 917-937.
- Fikes, J. D. & Bassford, P. J., Jr. (1989).** Novel secA alleles improve export of maltose-binding protein synthesized with a defective signal peptide. *J Bacteriol* **171**, 402-409.
- Flower, A. M., Doebele, R. C. & Silhavy, T. J. (1994).** PrlA and PrlG suppressors reduce the requirement for signal sequence recognition. *J Bacteriol* **176**, 5607-5614.
- Foster, S. J. & Popham, D. L. (2002).** Structure and Synthesis of Cell Wall, Spore Cortex, Teichoic Acids, S-Layers, and Capsules. In *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives*. ASM Press: 21-41.
- Fountoulakis, M. & Langen, H. (1997).** Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, nonvolatile buffer and simplified peptide recovery. *Anal Biochem* **250**, 153-156.
- Gerard, F., Angelini, S. & Wu, L. F. (2002).** Export of *Thermus thermophilus* cytoplasmic beta-glycosidase via the *E. coli* Tat pathway. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 533-538.
- Gerlach, R., Pop, O. & Muller, J. P. (2004).** Tat dependent export of *E. coli* phytase AppA by using the PhoD-specific transport system of *Bacillus subtilis*. *J Basic Microbiol* **44**, 351-359.
- Götz, F. & Schumacher, B. (1987).** Improvements of protoplast transformation in *Staphylococcus carnosus*. *FEMS Microbiol Lett* **40**, 285-288.
- Gouffi, K., Santini, C. L. & Wu, L. F. (2002).** Topology determination and functional analysis of the *Escherichia coli* TatC protein. *FEBS Lett* **525**, 65-70.
- Gouffi, K., Gerard, F., Santini, C. L. & Wu, L. F. (2004).** Dual topology of the *Escherichia coli* TatA protein. *J Biol Chem* **279**, 11608-11615.

- Halbig, D., Wiegert, T., Blaudeck, N., Freudl, R. & Sprenger, G. A. (1999).** The efficient export of NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase to the periplasm of *Zymomonas mobilis* depends both on an intact twin-arginine motif in the signal peptide and on the generation of a structural export signal induced by cofactor binding. *Eur J Biochem* **263**, 543-551.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hanahan, D. (1985).** Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA Cloning: A practical approach* (ed. D.M. Glover) vol. 1 p.109. IRL Press, Oxford.
- Hardy, S. J. & Randall, L. L. (1991).** A kinetic partitioning model of selective binding of nonnative proteins by the bacterial chaperone SecB. *Science* **251**, 439-443.
- Hartl, F. U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J. P. & Wickner, W. (1990).** The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell* **63**, 269-279.
- Harwood, C. R. (1992).** *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends Biotechnol* **10**, 247-256.
- Hatzixanthis, K., Clarke, T. A., Oubrie, A., Richardson, D. J., Turner, R. J. & Sargent, F. (2005).** Signal peptide-chaperone interactions on the twin-arginine protein transport pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8460-8465.
- Henry, R., Carrigan, M., McCaffrey, M., Ma, X. & Cline, K. (1997).** Targeting determinants and proposed evolutionary basis for the Sec and the Delta pH protein transport systems in chloroplast thylakoid membranes. *J Cell Biol* **136**, 823-832.
- Hinsley, A. P., Stanley, N. R., Palmer, T. & Berks, B. C. (2001).** A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the 'invariant' arginine residues of the consensus targeting motif. *FEBS Lett* **497**, 45-49.
- Houben, E. N., Urbanus, M. L., Van Der Laan, M., Ten Hagen-Jongman, C. M., Driessen, A. J., Brunner, J., Oudega, B. & Luirink, J. (2002).** YidC and SecY mediate membrane insertion of a Type I transmembrane domain. *J Biol Chem* **277**, 35880-35886.
- Houssin, C., Nguyen, D. T., Leblon, G. & Bayan, N. (2002).** S-layer protein transport across the cell wall of *Corynebacterium glutamicum*: in vivo kinetics and energy requirements. *FEMS Microbiol Lett* **217**, 71-79.
- Ignatova, Z., Hornle, C., Nurk, A. & Kasche, V. (2002).** Unusual signal peptide directs penicillin amidase from *Escherichia coli* to the Tat translocation machinery. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 146-149.
- Ito, S., Ohta, Y., Shimooka, M., Takaiwa, M., Ozaki, K., Adachi, S. & Okamoto, K. (1993).** Enhanced production of extracellular enzymes by mutants of *Bacillus* that have acquired resistance to vancomycin and ristocetin. *Agric Biol Chem.* **55**, 2387-2391.
- Izard, J. W. & Kendall, D. A. (1994).** Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol Microbiol* **13**, 765-773.
- Ize, B., Gerard, F. & Wu, L. F. (2002a).** In vivo assessment of the Tat signal peptide specificity in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **178**, 548-553.
- Ize, B., Stanley, N. R., Buchanan, G. & Palmer, T. (2003).** Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity. *Mol Microbiol* **48**, 1183-1193.

- Ize, B., Gerard, F., Zhang, M., Chanal, A., Voulhoux, R., Palmer, T., Filloux, A. & Wu, L. F. (2002b).** In vivo dissection of the Tat translocation pathway in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **317**, 327-335.
- Jack, R. L., Sargent, F., Berks, B. C., Sawers, G. & Palmer, T. (2001).** Constitutive expression of *Escherichia coli* tat genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth. *J Bacteriol* **183**, 1801-1804.
- Jilaveanu, L. B., Zito, C. R. & Oliver, D. (2005).** Dimeric SecA is essential for protein translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7511-7516.
- Jongbloed, J. D., Grieger, U., Antelmann, H., Hecker, M., Nijland, R., Bron, S. & van Dijl, J. M. (2004).** Two minimal Tat translocases in *Bacillus*. *Mol Microbiol* **54**, 1319-1325.
- Jongbloed, J. D., Martin, U., Antelmann, H., Hecker, M., Tjalsma, H., Venema, G., Bron, S., van Dijl, J. M. & Muller, J. (2000).** TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway. *J Biol Chem* **275**, 41350-41357.
- Jongbloed, J. D., Antelmann, H., Hecker, M., Nijland, R., Bron, S., Airaksinen, U., Pries, F., Quax, W. J., van Dijl, J. M. & Braun, P. G. (2002).** Selective contribution of the twin-arginine translocation pathway to protein secretion in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **277**, 44068-44078.
- Kawamura, F. & Doi, R. H. (1984).** Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. *J Bacteriol* **160**, 442-444.
- Kebir, M. O. & Kendall, D. A. (2002).** SecA specificity for different signal peptides. *Biochemistry* **41**, 5573-5580.
- Keilhauer, C., Eggeling, L. & Sahm, H. (1993).** Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J Bacteriol* **175**, 5595-5603.
- Ki, J. J., Kawarasaki, Y., Gam, J., Harvey, B. R., Iverson, B. L. & Georgiou, G. (2004).** A periplasmic fluorescent reporter protein and its application in high-throughput membrane protein topology analysis. *J Mol Biol* **341**, 901-909.
- Kontinen, V. P. & Sarvas, M. (1993).** The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high-level secretion. *Mol Microbiol* **8**, 727-737.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175-176.
- Kreutzenbeck, P. & Freudl, R. (unveröffentlichte Ergebnisse).**
- 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**, 249-256.
- Lämml, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Leloup, L., Haddaoui el, A., Chambert, R. & Petit-Glatron, M. F. (1997).** Characterization of the rate-limiting step of the secretion of *Bacillus subtilis* alpha-amylase overproduced during the exponential phase of growth. *Microbiology* **143 (Pt 10)**, 3295-3303.

- Leloup, L., Le Saux, J., Petit-Glatron, M. F. & Chambert, R. (1999).** Kinetics of the secretion of *Bacillus subtilis* levanase overproduced during the exponential phase of growth. *Microbiology* **145** (Pt 3), 613-619.
- Liepe, H.-U. (1982).** Starter cultures and dry suassage. *Focus Mikrobiologie* **5**, 10-15.
- Luirink, J., Samuelsson, T. & de Gier, J. W. (2001).** YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS Lett* **501**, 1-5.
- Madsen, S. M., Beck, H. C., Ravn, P., Vrang, A., Hansen, A. M. & Israelsen, H. (2002).** Cloning and inactivation of a branched-chain-amino-acid aminotransferase gene from *Staphylococcus carnosus* and characterization of the enzyme. *Appl Environ Microbiol* **68**, 4007-4014.
- Manting, E. H. & Driessen, A. J. (2000).** Escherichia coli translocase: the unravelling of a molecular machine. *Mol Microbiol* **37**, 226-238.
- Maruo, B. & Tojo, T. (1985).** Stepwise enhancement of productivity of thermostable amylase in *Bacillus licheniformis* by a series of mutations. *J Gen Appl Microbiol* **31**, 323-328.
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Minnikin, D. E., Goodfellow, M. & Collins, M. D. (1978).** Lipid composition in the classification and identification of coryneform and related taxa. In Bousfield, I. J. and Calley, A. G (ed.), *Coryneform bacteria*. Academic Press, London. 85-159.
- Mori, H. & Cline, K. (2002).** A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid [Delta]pH/Tat translocase. *J Cell Biol* **157**, 205-210.
- Navarre, W. W., Daefler, S. & Schneewind, O. (1996).** Cell wall sorting of lipoproteins in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **178**, 441-446.
- Nikaido, H. (1994).** Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**, 382-388.
- Nishiyama, K., Suzuki, H. & Tokuda, H. (2000).** Role of the non-essential region encompassing the N-terminal two transmembrane stretches of Escherichia coli SecE. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 2121-2127.
- Niviere, V., Wong, S. L. & Voordouw, G. (1992).** Site-directed mutagenesis of the hydrogenase signal peptide consensus box prevents export of a beta-lactamase fusion protein. *J Gen Microbiol* **138**, 2173-2183.
- Nouwen, N. & Driessen, A. J. (2002).** SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC. *Mol Microbiol* **44**, 1397-1405.
- Oates, J., Barrett, C. M., Barnett, J. P., Byrne, K. G., Bolhuis, A. & Robinson, C. (2005).** The Escherichia coli twin-arginine translocation apparatus incorporates a distinct form of TatABC complex, spectrum of modular TatA complexes and minor TatAB complex. *J Mol Biol* **346**, 295-305.
- Ochsner, U. A., Snyder, A., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (2002).** Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8312-8317.
- Or, E., Navon, A. & Rapoport, T. (2002).** Dissociation of the dimeric SecA ATPase during protein translocation across the bacterial membrane. *Embo J* **21**, 4470-4479.

- Pages, J. M., Anba, J., Bernadac, A., Shinagawa, H., Nakata, A. & Lazdunski, C. (1984).** Normal precursors of periplasmic proteins accumulated in the cytoplasm are not exported post-translationally in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **143**, 499-505.
- Palmer, T. & Berks, B. C. (2003).** Moving folded proteins across the bacterial cell membrane. *Microbiol* **149**, 547-556.
- 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**, 1033-1035.
- Peyret, J. L., Bayan, N., Joliff, G., Gulik-Krzywicki, T., Mathieu, L., Schechter, E. & Leblon, G. (1993).** Characterization of the *cspB* gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **9**, 97-109.
- Pogliano, J. A. & Beckwith, J. (1994).** SecD and SecE facilitate protein export in *Escherichia coli*. *Embo J* **13**, 554-561.
- Porcelli, I., de Leeuw, E., Wallis, R., van den Brink-van der Laan, E., de Kruijff, B., Wallace, B. A., Palmer, T. & Berks, B. C. (2002).** Characterization and membrane assembly of the TatA component of the *Escherichia coli* twin-arginine protein transport system. *Biochemistry* **41**, 13690-13697.
- Poritz, M. A., Strub, K. & Walter, P. (1988).** Human SRP RNA and *E. coli* 4.5S RNA contain a highly homologous structural domain. *Cell* **55**, 4-6.
- Pradel, N., Santini, C. L., Ye, C. Y., Fevat, L., Gerard, F., Alami, M. & Wu, L. F. (2003).** Influence of *tat* mutations on the ribosome-binding protein translocation in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 786-791.
- Prinz, W. A., Spiess, C., Ehrmann, M., Schierle, C. & Beckwith, J. (1996).** Targeting of signal sequenceless proteins for export in *Escherichia coli* with altered protein translocase. *Embo J* **15**, 5209-5217.
- Pschorr, J., Bieseler, B. & Fritz, H. J. (1994).** Production of the immunoglobulin variable domain REIV via a fusion protein synthesized and secreted by *Staphylococcus carnosus*. *Biol Chem Hoppe Seyler* **375**, 271-280.
- Rodrigue, A., Chanal, A., Beck, K., Muller, M. & Wu, L. F. (1999).** Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial *tat* pathway. *J Biol Chem* **274**, 13223-13228.
- 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**, 478-482.
- Rose, R. W., Bruser, T., Kissinger, J. C. & Pohlschroder, M. (2002).** Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Mol Microbiol* **45**, 943-950.
- Rygun, T., Scheler, A., Allmansberger, R. & Hillen, W. (1991).** Molecular cloning, structure, promoters and regulatory elements for transcription of the *Bacillus megaterium* encoded regulon for xylose utilization. *Arch Microbiol* **155**, 535-542.
- Sadaie, Y. & Kada, T. (1983).** Formation of competent *Bacillus subtilis* cells. *J Bacteriol* **153**, 813-821.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning. A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Sankaran, K. & Wu, H. C. (1994).** Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglyceryl moiety from phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* **269**, 19701-19706.
- Santini, C. L., Ize, B., Chanal, A., Muller, M., Giordano, G. & Wu, L. F. (1998).** A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in Escherichia coli. *Embo J* **17**, 101-112.
- Santini, C. L., Bernadac, A., Zhang, M., Chanal, A., Ize, B., Blanco, C. & Wu, L. F. (2001).** Translocation of jellyfish green fluorescent protein via the Tat system of Escherichia coli and change of its periplasmic localization in response to osmotic up-shock. *J Biol Chem* **276**, 8159-8164.
- Sargent, F., Berks, B. C. & Palmer, T. (2002).** Assembly of membrane-bound respiratory complexes by the Tat protein-transport system. *Arch Microbiol* **178**, 77-84.
- Sargent, F., Stanley, N. R., Berks, B. C. & Palmer, T. (1999).** Sec-independent protein translocation in Escherichia coli. A distinct and pivotal role for the TatB protein. *J Biol Chem* **274**, 36073-36082.
- Sargent, F., Bogsch, E. G., Stanley, N. R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B. C. & Palmer, T. (1998).** Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *Embo J* **17**, 3640-3650.
- Sargent, F., Gohlke, U., De Leeuw, E., Stanley, N. R., Palmer, T., Saibil, H. R. & Berks, B. C. (2001).** Purified components of the Escherichia coli Tat protein transport system form a double-layered ring structure. *Eur J Biochem* **268**, 3361-3367.
- Saunders, C. W., Schmidt, B. J., Mallonee, R. L. & Guyer, M. S. (1987).** Secretion of human serum albumin from Bacillus subtilis. *J Bacteriol* **169**, 2917-2925.
- Schaerlaekens, K., Van Mellaert, L., Lammertyn, E., Geukens, N. & Anne, J. (2004a).** The importance of the Tat-dependent protein secretion pathway in Streptomyces as revealed by phenotypic changes in tat deletion mutants and genome analysis. *Microbiology* **150**, 21-31.
- Schaerlaekens, K., Lammertyn, E., Geukens, N., De Keersmaeker, S., Anne, J. & Van Mellaert, L. (2004b).** Comparison of the Sec and Tat secretion pathways for heterologous protein production by Streptomyces lividans. *J Biotechnol* **112**, 279-288.
- Schafer, A., Schwarzer, A., Kalinowski, J. & Puhler, A. (1994).** Cloning and characterization of a DNA region encoding a stress-sensitive restriction system from Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 and analysis of its role in intergeneric conjugation with Escherichia coli. *J Bacteriol* **176**, 7309-7319.
- Schiebel, E., Driessen, A. J., Hartl, F. U. & Wickner, W. (1991).** Delta mu H⁺ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* **64**, 927-939.
- Schleifer, K. H. & Fischer, U. (1982).** Description of a new species of the genus Staphylococcus: *Staphylococcus carnosus*. *Int Syst Bacteriol* **32**, 153-156.
- Schnappinger, D., Geissdorfer, W., Sizemore, C. & Hillen, W. (1995).** Extracellular expression of native human anti-lysozyme fragments in Staphylococcus carnosus. *FEMS Microbiol Lett* **129**, 121-127.

- Schwarzer, A. & Pühler, A. (1991).** Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Biotechnology (N Y)* **9**, 84-87.
- Settles, A. M., Yonetani, A., Baron, A., Bush, D. R., Cline, K. & Martienssen, R. (1997).** Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science* **278**, 1467-1470.
- Simonen, M. & Palva, I. (1993).** Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol Rev* **57**, 109-137.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Stader, J., Gansheroff, L. J. & Silhavy, T. J. (1989).** New suppressors of signal-sequence mutations, prIG, are linked tightly to the secE gene of *Escherichia coli*. *Genes Dev* **3**, 1045-1052.
- Stanley, N. R., Palmer, T. & Berks, B. C. (2000).** The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 11591-11596.
- Stanley, N. R., Findlay, K., Berks, B. C. & Palmer, T. (2001).** *Escherichia coli* strains blocked in Tat-dependent protein export exhibit pleiotropic defects in the cell envelope. *J Bacteriol* **183**, 139-144.
- Stephenson, K., Carter, N. M., Harwood, C. R., Petit-Glatron, M. F. & Chambert, R. (1998).** The influence of protein folding on late stages of the secretion of alpha-amylases from *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett* **430**, 385-389.
- Stephenson, K., Jensen, C. L., Jorgensen, S. T., Lakey, J. H. & Harwood, C. R. (2000).** The influence of secretory-protein charge on late stages of secretion from the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Biochem J* **350 Pt 1**, 31-39.
- Sturmfels, A., Gotz, F. & Peschel, A. (2001).** Secretion of human growth hormone by the food-grade bacterium *Staphylococcus carnosus* requires a propeptide irrespective of the signal peptide used. *Arch Microbiol* **175**, 295-300.
- Tauch, A., Kirchner, O., Löffler, B., Gotker, S., Pühler, A. & Kalinowski, J. (2002).** Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Curr Microbiol* **45**, 362-367.
- Thomas, J. D., Daniel, R. A., Errington, J. & Robinson, C. (2001).** Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **39**, 47-53.
- Thudt, K., Schleifer, K. H. & Gotz, F. (1985).** Cloning and expression of the alpha-amylase gene from *Bacillus stearothermophilus* in several staphylococcal species. *Gene* **37**, 163-169.
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S. & van Dijl, J. M. (2000).** Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 515-547.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Tseng, T. T., Gratwick, K. S., Kollman, J., Park, D., Nies, D. H., Goffeau, A. & Saier, M. H., Jr. (1999).** The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 107-25.

- Urbanus, M. L., Scotti, P. A., Froderberg, L., Saaf, A., de Gier, J. W., Brunner, J., Samuelson, J. C., Dalbey, R. E., Oudega, B. & Luirink, J. (2001). Sec-dependent membrane protein insertion: sequential interaction of nascent FtsQ with SecY and YidC. *EMBO Rep* **2**, 524-529.
- van den Berg, B., Clemons, W. M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C. & Rapoport, T. A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* **427**, 36-44.
- van der Sluis, E. O., Nouwen, N. & Driessen, A. J. (2002). SecY-SecY and SecY-SecE contacts revealed by site-specific crosslinking. *FEBS Lett* **527**, 159-165.
- van der Wolk, J. P., de Wit, J. G. & Driessen, A. J. (1997). The catalytic cycle of the escherichia coli SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *Embo J* **16**, 7297-7304.
- van der Wolk, J. P., Fekkes, P., Boorsma, A., Huie, J. L., Silhavy, T. J. & Driessen, A. J. (1998). PrlA4 prevents the rejection of signal sequence defective preproteins by stabilizing the SecA-SecY interaction during the initiation of translocation. *Embo J* **17**, 3631-3639.
- van 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**, 437-454.
- Veenendaal, A. K., van der Does, C. & Driessen, A. J. (2001). Mapping the sites of interaction between SecY and SecE by cysteine scanning mutagenesis. *J Biol Chem* **276**, 32559-32566.
- Vieira, J. & Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268.
- von Heijne, G. (1984). How signal sequences maintain cleavage specificity. *J Mol Biol* **173**, 243-251.
- von Heijne, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* **184**, 99-105.
- von Heijne, G. (1986). Net N-C charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria. *J Mol Biol* **192**, 287-290.
- von Heijne, G. (1989). Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature* **341**, 456-458.
- Webb, C. D. & Resnekov, O. (1999). Use of green fluorescent protein for visualization for cell-specific gene expression and subcellular protein localization in *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol* **302**, 136-153.
- Webb, C. D., Decatur, A., Teleman, A. & Losick, R. (1995). Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**, 5906-5911.
- Weiner, J. H., Bilous, P. T., Shaw, G. M., Lubitz, S. P., Frost, L., Thomas, G. H., Cole, J. A. & Turner, R. J. (1998). A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell* **93**, 93-101.
- Weiss, J. B. & Bassford, P. J., Jr. (1990). The folding properties of the *Escherichia coli* maltose-binding protein influence its interaction with SecB in vitro. *J Bacteriol* **172**, 3023-3029.

Wexler, M., Sargent, F., Jack, R. L., Stanley, N. R., Bogsch, E. G., Robinson, C., Berks, B. C. & Palmer, T. (2000). TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export. *J Biol Chem* **275**, 16717-16722.

Wiegert, T., Sahm, H. & Sprenger, G. A. (1996). Export of the periplasmic NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. *Arch Microbiol* **166**, 32-41.

Wiegert, T., Sahm, H. & Sprenger, G. A. (1997). Expression of the *Zymomonas mobilis* gfo gene or NADP-containing glucose:fructose oxidoreductase (GFOR) in *Escherichia coli*. Formation of enzymatically active preGFOR but lack of processing into a stable periplasmic protein. *Eur J Biochem* **244**, 107-112.

Wieland, K. P., Wieland, B. & Gotz, F. (1995). A promoter-screening plasmid and xylose-inducible, glucose-repressible expression vectors for *Staphylococcus carnosus*. *Gene* **158**, 91-96.

Wu, L. F., Ize, B., Chanal, A., Quentin, Y. & Fichant, G. (2000). Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**, 179-189.

Wu, S. C., Ye, R., Wu, X. C., Ng, S. C. & Wong, S. L. (1998). Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by coproduction of molecular chaperones. *J Bacteriol* **180**, 2830-2835.

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

Yen, M. R., Tseng, Y. H., Nguyen, E. H., Wu, L. F. & Saier, M. H., Jr. (2002). Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. *Arch Microbiol* **177**, 441-450.

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

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

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

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

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Proteinsekretion“ Astrid Bida, Henrike Brundiek, Michael Caspers, Gaby Decker, Peter Kreutzenbeck, Frank Lausberg und Carsten Kröger danke ich für das sehr gute Arbeitsklima und eine anregende, abwechslungsreiche Zeit im Labor. Hier gilt ein besonderer Dank Astrid Bida, für ihre tatkräftige Unterstützung u. a. bei den Bacillus-Arbeiten, sowie Michael Caspers, dem sympathischen Mitstreiter im glorreichen Labor 225.

Ebenso gilt mein Dank unseren ehemaligen Mitgliedern Natascha Blaudeck, Grit Hehmann, Maren Hintz, Oliver Köberling, Anna Rumpf, Stephanie Schnicke und Angela Vollstedt für gute Ratschläge bei den alltäglichen Arbeiten im Labor.

Der FAB-Runde, bestehend aus Roland Gande, Eva Radmacher und Andrea Veit danke ich für das angenehme Ausklingen so mancher Arbeitstage.

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

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

Nicht zuletzt danke ich Esther, die mich in den letzten Jahren so tapfer ausgehalten hat.

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

Düsseldorf, den 11.12.2005

(Daniel Meißner)