



**Coexpression von Chaperonen und Faltungskatalysatoren aus  
*Pseudomonas aeruginosa*:  
Neue Strategien zur Optimierung mikrobieller Expressionssysteme**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

**Diplom-Biologin**

**Andrea Kreuz**

aus Krefeld

Düsseldorf, August 2006

---

*„This is not the end. It is not even  
the beginning of the end. But it is,  
perhaps, the end of the beginning!“*  
(Winston Churchill).

---

---

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

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jäger

Korreferent: Prof. Dr. Michael Bott

Tag der mündlichen Prüfung: 10. November 2006

---

---

**Veröffentlichungen im Rahmen Promotion:**

**Kreuz, A., Rosenau, F., and Jaeger, K.E. (2006).** Kombination von Faltungshelfern zur Optimierung heterologer Proteinproduktion. Patent in Vorbereitung.

**Posterpräsentationen:**

**Heckmann, S., Kreuz, A., Rosenau F., Wilhelm, S., and Jaeger, K. E. (2005).** HalS effects quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Biospektrum: Sonderausgabe zur VAAM Jahrestagung 2005, p. 165

**Kreuz, A., Jaeger, K. E., Wilhelm, S., and Rosenau, F. (2005).** Dissection of Lipase Folding and Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. Biospektrum: Sonderausgabe zur VAAM Jahrestagung 2005, p. 28

**Kreuz, A., Wilhelm, S., Rosenau, F., and Jaeger, K. E. (2005).** Chaperones and Folding Catalysts of *Pseudomonas aeruginosa* – a tool in Biotechnology. Book of abstracts, *Pseudomonas* 2005, Marseille, Frankreich, p.164

**Vorträge:**

**Kreuz, A., Gruetzmacher S., Wilhelm, S., Rosenau, F., and Jaeger, K. E. (2004).** Chaperones and Folding catalysts from *Pseudomonas aeruginosa*. Book of abstracts, 3rd EU-meeting Nanofoldex, Düsseldorf, p. 12

**Kreuz, A., Hausmann, S., Hacker, S., Rosenau, F., Wilhelm S., and Jaeger, K. E. (2004).** Factors affecting lipase production in *Pseudomonas aeruginosa*. Book of abstracts, 2nd EU-meeting Nanofoldex, Visp, Schweiz, p.9

---

---

## Danksagungen

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas und die guten Arbeitsbedingungen im Institut für Molekulare Enzymtechnologie. Ferner möchte ich mich für das stetige Interesse am Fortgang meiner Arbeit sowie die regen und fruchtbaren Diskussionen in den letzten Jahren bedanken.

Herrn Prof. Dr. Michael Bott danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei der Europäischen Union bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Projektes: „Nanofoldex – Exploiting the secretion machinery of *Pseudomonads* for the nanotechnological production of pharmaceuticals“.

Herrn Dr. Günter Wich und Herrn Dr. Tobias Daßler, Wacker - Consortium für elektrochemische Industrie (München), danke ich für die gute Kooperation und finanzielle Unterstützung im Rahmen des Interferon-Projektes.

Bei Frau Dr. Susanne Wilhelm und Herrn Dr. Frank Rosenau bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Arbeiten, die zahlreichen Gespräche und konstruktiven Diskussionen sowie die Durchsicht des Manuskriptes. Herrn Dr. Thomas Drepper danke ich für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und hilfreichen Anregungen während meiner Promotion und die lustigen Momente außerhalb der Arbeitszeit.

Für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft im Laufe meiner Promotion möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie bedanken. Für die Unterstützung bei der Durchführung einiger Experimente danke ich Frau Vera Svensson und Frau Lena Rempel.

Für die entspannte und fröhliche Atmosphäre im und außerhalb des Büros 418 und die freundschaftliche Unterstützung danke ich Herrn Dr. Christian Leggewie und Frau Dr. Silke Heckmann, der ich zusätzlich für die Durchsicht des Manuskriptes danke.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für die Unterstützung in den letzten Jahren und vor allem im Laufe meiner Promotion besonders danken.

Mein herzlichster Dank gilt Mathias, der jederzeit für mich da war, mich liebevoll unterstützt hat und mir stets Halt gegeben hat.

---

## Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	IV
Abkürzungen	VI
<b>A Einleitung</b>	<b>1</b>
1 Heterologe Expression	2
1.1 Expressionssysteme zur Produktion rekombinanter Proteine	2
1.1.1 Expression in prokaryotischen Wirten	3
1.1.2 Expression in eukaryotischen Organismen	5
1.2 Probleme und ihre Lösungen bei der heterologen Expression in <i>E. coli</i>	7
2 Proteinfaltung	10
2.1 Molekulare Chaperone	11
2.2 Peptidyl-Prolyl <i>cis-trans</i> Isomerasen	17
2.3 Dsb-Proteine	18
3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
4 Zielsetzung dieser Arbeit	21
<b>B Material und Methoden</b>	<b>23</b>
1 Chemikalien & Enzyme	23
2 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	23
3 Verwendete Oligonukleotide	25
4 Anzucht von Bakterien	26
4.1 Nährmedien	26
4.2 Testmedien	26
4.3 Kultivierung und Lagerung von Bakterien	27
5 Isolierung von Nukleinsäuren	27
6 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	28
7 <i>In vitro</i> -Rekombination von DNA	28
8 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA	28
9 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation	28
10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
11 Reverse Transkription	29
12 <i>RealTime</i> PCR	29

13	Sequenzierung von DNA	30
14	Gewinnung von Kulturüberständen und Gesamtzellextrakten	30
15	Fraktionierung von <i>E. coli</i> -Zellen	30
16	Enzymaktivitätstests	31
16.1	Bestimmung der Aktivität von Alkoholdehydrogenasen	31
16.2	Bestimmung der Lipase Aktivität im <i>pNPP</i> -Test (Winkler & Stuckmann (1979))	31
16.3	Aktivitätsbestimmung der Esterase EstA	31
16.4	Fluoreszenzmessung des Grün-fluoreszierenden Proteins	31
16.5	Zymogrammgele	32
17	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	32
18	Präzipitation von Proteinen (Peterson, 1977)	32
19	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
20	Immunodetektion von Interferon 2 $\alpha$ b	33
21	Computerprogramme und Online-Datenbanken	33
<b>C</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
1	Identifizierung von Chaperonen und Faltungskatalysatoren in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
2	Erzeugung einer <i>P. aeruginosa</i> <i>skp</i> -Mutante	39
3	Erstellen einer Chaperon-Genexpressionsbank	42
3.1	Amplifikation der identifizierten Gene	44
3.2	Klonierung der Faltungshelfergene	46
3.3	Konstruktion von Expressionsplasmiden	47
3.4	Herstellung von <i>Multisite</i> -Expressionsplasmiden	49
3.4.1	Konstruktion der Ausgangsvektoren für <i>Multisite</i> -Rekombinationen	51
3.4.2	Erzeugen von Expressionsvektoren	54
4	Untersuchungen zur Transkription von Chaperongenen aus <i>P. aeruginosa</i> im heterologen Wirt <i>E. coli</i>	56
5	Einfluß der Chaperonexpression auf das Wachstum von <i>E. coli</i> Zellen	58
6	Coexpression von Chaperonkombinationen mit Zielproteinen	60
6.1	Coexpression von Chaperonen mit Alkoholdehydrogenasen aus <i>Rhodococcus</i> Spezies	62
6.2	Coexpression von Faltungsmodulatoren mit dem katalytisch aktiven Teil der Esterase EstA aus <i>P. aeruginosa</i>	69

6.3	Untersuchungen zur Coexpression von Faltungsmodulatoren aus <i>P. aeruginosa</i> mit der <i>Serratia marcescens</i> Lipase LipA	72
6.4	Coexpression von Faltungshelfern aus <i>P. aeruginosa</i> mit der Lipase B (CALB) aus der Hefe <i>Candida antarctica</i>	74
6.5	Coexpression von Chaperonen und Faltungskatalysatoren mit dem Grün-fluoreszierenden Protein (GFP)	78
6.6	Verbesserung der Produktion von humanem Interferon 2ab	79
6.7	Einfluß von coexprimierten Faltungsmodulatoren in <i>P. aeruginosa</i> PAH11	81
<b>D Diskussion</b>		<b>84</b>
1	Strategien zur Expression rekombinanter Proteine	84
1.1	Vorteile mikrobieller Expressionssysteme	86
1.2	Expression rekombinanter Proteine in <i>Escherichia coli</i>	88
1.3	Konstruktion einer Chaperon-Genexpressionsbank	90
2	Einfluß einzelner Chaperone und Faltungskatalysatoren auf die Produktion biotechnologisch relevanter Proteine	93
2.1	<i>Inclusion bodies</i> – Probleme und Nutzen in der Biotechnologie	94
2.2	Einfluß molekularer Chaperone auf die Bildung von <i>Inclusion bodies</i>	95
2.3	Einsatz einzelner Faltungsmodulatoren aus <i>P. aeruginosa</i> bei der Produktion rekombinanter Proteine	96
3	Kombinationen von Faltungsmodulatoren verbessern die Ausbeute aktiven Proteins in Überexpressionsversuchen	99
3.1	Einsatz von Chaperonkombinationen in Überexpressionsansätzen	99
3.2	<i>Screening</i> der Genexpressionsbank mit kombinierten Genen von Faltungshelfern aus <i>P. aeruginosa</i>	100
4	Ausblick	106
<b>E Zusammenfassung</b>		<b>109</b>
<b>F Literatur</b>		<b>111</b>
<b>G Anhang</b>		<b>125</b>
1	DNA-Sequenzen der identifizierten Chaperon- und Faltungskatalysatorgene aus dem Bakterium <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	125
2	Isolierung der Chaperon- und Faltungskatalysatorgene aus <i>P. aeruginosa</i>	137

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. A-1	Struktur des GroELS-Chaperonsystems aus <i>Escherichia coli</i>	12
Abb. A-2	Aufbau des DnaK-Proteins aus <i>E. coli</i>	14
Abb. C-1	Schematische Darstellung der Genregion und der Lage der Interposonmutation zur Erzeugung von <i>skp</i> -Mutanten in <i>P. aeruginosa</i>	40
Abb. C-2	Übersicht über die Klonierungsstrategie zur Erzeugung einer Chaperon-Genexpressionsbank	43
Abb. C-3	Überprüfung der durchgeführten Amplifikationsreaktionen auf einem Agarosegel	45
Abb. C-4	Schematische Darstellung der Klonierung von Chaperon- und Faltungshelfergenen in den Vektor pENTR/SD/D-TOPO	47
Abb. C-5	Reaktionsschema der Rekombination von Zielgenen in den Expressionsvektor pDEST-VLT31	48
Abb. C-6	Rekombinationsschema zur Erzeugung von Plasmiden mit mehreren hintereinander geschalteten Genen	50
Abb. C-7	Anfügen von verschiedenen <i>att</i> -Stellen an die Gene von Faltungshelfern aus den verfügbaren pENTR-Plasmiden mittels PCR	52
Abb. C-8	Nachweis des Transkriptes verschiedener Chaperongene im heterologen Wirt <i>E. coli</i>	57
Abb. C-9	Wuchsverhalten ausgewählter <i>E. coli</i> Stämme während einer Inkubation bei 46 °C	59
Abb. C-10	Einfluß einzelner <i>P. aeruginosa</i> Faltungshelfer auf die Aktivität der RE-ADH	63
Abb. C-11	Einfluß von <i>P. aeruginosa</i> Faltungshelfern auf die Löslichkeit und Aktivität der <i>R. erythropolis</i> ADH in <i>E. coli</i>	64
Abb. C-12	Einfluß von einzelnen <i>P. aeruginosa</i> Faltungshelfern auf die Aktivität der <i>R. ruber</i> ADH in <i>E. coli</i>	66
Abb. C-13	Einfluß von <i>P. aeruginosa</i> Faltungshelfern auf die Löslichkeit und Aktivität der <i>R. ruber</i> ADH in <i>E. coli</i>	67
Abb. C-14	Bestimmung der Esteraseaktivität des katalytisch aktiven N-Terminus von EstA aus <i>P. aeruginosa</i> nach Coexpression mit Chaperonen oder Foldasen und Nachweis von EstA $\alpha$ -Protein	70
Abb. C-15	Bestimmung der Esteraseaktivität der katalytisch aktiven EstA $\alpha$ -Domäne aus <i>P. aeruginosa</i> nach Coexpression mit Chaperon- und Foldase-Kombinationen	71
Abb. C-16	Einfluß der Coexpression von verschiedenen Faltungshelferkombinationen auf die Löslichkeit und Aktivität des LipA Proteins aus <i>S. marcescens</i>	73
Abb. C-17	Bestimmung der lipolytischen Aktivität von CALB durch Umsatz des Substrates Tributyrin auf Agarplatten	75
Abb. C-18	Nachweis der Aktivität löslichen CALB-Proteins nach einer Überexpression in Flüssigmedium	76
Abb. C-19	Einfluß von <i>P. aeruginosa</i> Faltungshelfern auf die relative Fluoreszenz des Faltungsreporters GFP	79
Abb. C-20	Einfluß von Chaperonen und Faltungskatalysatoren aus <i>P. aeruginosa</i> auf die Stabilität des humanen IF2 $\alpha$ b-Proteins	80

Abb. C-21	Einfluß einzelner Faltungsmodulatoren aus <i>P. aeruginosa</i> auf die Produktion sekretierter Protease im hypersekretierenden Stamm PAH11	83
Abb. D-1	Übersicht über mögliche Prozesse bei der Faltung rekombinanter Proteine	107
Tab. A-1	Charakteristika verschiedener Expressionssysteme für die heterologe Synthese von eukaryotischen Proteinen	3
Tab. B-1	Übersicht über verwendete Bakterienstämme	23
Tab. B-2	Übersicht der verwendeten Vektoren	24
Tab. B-3	Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide	25
Tab. B-4	Anzuchtbedingungen bei der Überexpression verschiedener Zielprotein im heterologen Wirt <i>E. coli</i>	27
Tab. B-5	Konzentration der zur Selektion eingesetzten Antibiotika	27
Tab. B-6	Ablauf der RealTime PCR	30
Tab. C-1	Durch Sequenzvergleiche identifizierte molekulare Chaperone und Hitzeschockproteine in <i>P. aeruginosa</i>	35
Tab. C-2	Putative Chaperone und Hitzeschockproteine aus <i>P. aeruginosa</i>	36
Tab. C-3	Auflistung der putativen Peptidyl-Prolyl <i>cis-trans</i> Isomerasen aus <i>P. aeruginosa</i>	37
Tab. C-4	Putative Peptidyl-Prolyl <i>cis-trans</i> Isomerasen aus <i>P. aeruginosa</i>	38
Tab. C-5	Aufstellung der Dsb-Proteine aus <i>P. aeruginosa</i>	38
Tab. C-6	Zusammenfassung der erfolgreich durchgeführten Polymerasekettenreaktionen und Klonierungsschritte zur Erzeugung einer Chaperon-Genexpressionsbank	53
Tab. C-7	Auflistung der erzeugten <i>Multisite</i> -Expressionsplasmide	55
Tab. C-8	Auflistung der in Co-Überexpressionen mit der Chaperon-Genexpressionsbank untersuchten Zielproteine	61
Tab. D-1	Auflistung diverser industriell genutzter Enzyme	85
Tab. D-2	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Chaperon-Coexpressionsversuchen mit verschiedenen biotechnologisch relevanten Proteine	105
Tab. G-1	Übersicht der verwendeten Primer zur Isolierung der identifizierten Gene von Faltungsmodulatoren aus dem Bakterium <i>P. aeruginosa</i>	136

## Abkürzungen

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

AAA	<i>ATPase associated with various cellular activities</i>
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
C	Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Cm <sup>r</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
C-Terminus	Carboxyterminus
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dsb	<i>disulfide bond formation</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FKBP	<i>FK506-binding protein</i>
Gm <sup>r</sup>	Gentamycin-Resistenz
GZE	Gesamtzellextrakt(e)
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KP <sub>i</sub>	Kaliumphosphatpuffer
KÜ	Kulturüberstand
$\lambda$	Wellenlänge
LPS	Lipopolysaccharidschicht
LV	Leervektor
M	Molar
Mbp	Megabasenpaare
MCS	<i>multiple cloning site</i> , Polylinker
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
N-Terminus	Aminoterminal
o.D.	optische Dichte
<i>orf</i>	<i>open reading frame(s)</i> , offene(r) Leserahmen
p.A.	<i>per analyse</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPIase	Peptidyl-Prolyl <i>cis-trans</i> Isomerase
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
Tc <sup>r</sup>	Tetracyclin-Resistenz
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	<i>unit</i> (Enzymeinheit)
ÜK	Übernachtskultur(en)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

## A Einleitung

In der Natur kommt eine Vielzahl von Proteinen vor, die unterschiedlichste Funktionen übernehmen können. Neben strukturbildenden Aufgaben im Zell- oder Gewebeaufbau, sind sie in Form von Antikörpern an Abwehrreaktionen beteiligt, oder ermöglichen als Enzyme die Beschleunigung wichtiger chemischer Reaktionen und spielen so die zentrale Rolle im Stoffwechsel aller Lebensformen. Aufgrund dieser Funktionsvielfalt sind sie nicht nur für die Wissenschaft, sondern auch in der industriellen Nutzung, von besonderem Interesse.

Im Bereich der Biotechnologie wird versucht, diese in der Natur existierenden Prinzipien und Ressourcen zu nutzen. Die Biotechnologie wird in drei Bereiche unterteilt: a) die grüne (pflanzliche) Biotechnologie, b) die rote (medizinisch/ pharmazeutische) Biotechnologie und c) die weiße (industrielle) Biotechnologie (Kircher, 2006). Darunter besitzt die weiße Biotechnologie wohl den höchsten Stellenwert (Ernst & Young, 2005) und ermöglicht die Produktion von Chemikalien, Bioenergie oder von Biokraftstoffen (EuropaBio, 2003). Hier werden beispielsweise enzymatische Syntheseprozesse alternativ zu kostspieligen und meistens ökologisch schädlichen chemischen Prozessen im Bereich der Bulk- und Feinchemikalien, der Lebensmittelproduktion oder bei der Herstellung von Kosmetika und Pharmaprodukten eingesetzt. Dadurch besteht ein großer Bedarf an neuen Enzymen, die weitere besondere Reaktionen katalysieren können, um immer mehr industrielle Prozesse unter Verwendung biotechnologischer Verfahren durchführen zu können bzw. neue bislang chemisch nicht herstellbare Produkte zu erzeugen.

Dazu wurden in den letzten Jahren viele Technologien entwickelt, welche die Entwicklung und die Identifizierung neuer geeigneter Biokatalysatoren ermöglichen. Mit Hilfe von Metagenomansätzen kann beispielsweise die gesamte DNA einer individuellen Umweltprobe isoliert, kloniert und auf das Vorhandensein funktioneller Gene untersucht werden. Auf diese Weise konnte eine Vielzahl von Enzymen identifiziert werden, die Anwendung in industriellen Prozessen finden (Cowman *et al.*, 2004; Steele & Streit, 2005; Streit *et al.*, 2004). Auch die Möglichkeit, genetische Veränderung durchzuführen, z.B. durch gerichtete oder zufällige Mutagenese, und mittels Hochdurchsatz-Selektionsverfahren solche Varianten zu identifizieren, die eine gewünschte Katalyse ermöglichen, zeigen das enorme Potential auf, welches in Zukunft ausgeschöpft werden kann (Bornscheuer, 2005; Jaeger *et al.*, 2001; Jaeger & Eggert, 2004; Lutz & Patrick, 2004).

Zur Erfüllung ihrer natürlichen Aufgaben werden die meisten Proteine in dem jeweiligen Organismus ausschließlich in geringen Mengen erzeugt, was weder die Erforschung noch die

industrielle Produktion in großem Maßstab ermöglicht. Zudem sind viele Organismen, die Proteine mit interessanten Funktionen besitzen, derzeit kaum zugänglich, weil sie nicht oder nur unter hohem finanziellen und technischen Aufwand kultivierbar sind bzw. geeignete genetische oder physiologische Charakterisierungen fehlen. Deshalb ist es wichtig, die Produktion großer Mengen solcher Proteine, die entweder näher untersucht und charakterisiert werden oder aufgrund ihres hohen biotechnologischen Potentials in industrielle Prozesse eingesetzt werden sollen, zu ermöglichen. Dies kann durch die Expression solcher Proteine in heterologen Wirten erzielt werden. Ziel der heterologen Expression ist es, kostengünstig und technisch einfach Protein in seiner aktiven Konformation sowie in großen Mengen in gut handhabbaren Organismen zu produzieren.

## 1 Heterologe Expression

Seit der Entdeckung der *in vitro* Gentechnologie vor nahezu 50 Jahren wurde die Manipulation von Genen und ihre Expression in heterologen Organismen immer mehr verstanden, genutzt und weiterentwickelt. Seitdem wird der Anspruch an die zur Verfügung stehenden Expressionssysteme immer größer und Proteine mit komplexen Strukturen (z.B. Polyketidsynthasen; Wenzel & Müller, 2005) oder Proteine, die posttranslationale Modifikationen benötigen (z.B. monoklonale Antikörper; Schuster *et al.*, 2006), rücken mehr und mehr in den Fokus des Interesses.

Diese Tatsache führte dazu, daß zu dem Bakterium *E. coli* alternative Expressionswirte etabliert und charakterisiert wurden, was Mitte der 80er Jahre dazu beitrug, daß sogar tierische Zellsysteme (u.a.: CHO- (chinese hamster ovary), BHK- (baby hamster kidney), oder Insektenzellen) zur Expression heterologer Proteine eingesetzt wurden (Schmidt, 2004). Aufgrund der Anzahl der verfügbaren Expressionssysteme muß im Grunde für jedes individuelle Produkt das am besten geeignete System identifiziert und gegebenenfalls weiter optimiert werden. Im Folgenden soll ein Überblick über die gängigsten Expressionswirte gegeben werden, die für die Produktion rekombinanter Proteine eingesetzt werden können.

### 1.1 Expressionssysteme zur Produktion rekombinanter Proteine

Expressionssysteme unterscheiden sich hinsichtlich des Wirtsorganismus, in dem die Produktion des rekombinanten Proteins erfolgt: Bakterien, Hefen, mehrzellige Pilze, Pflanzen, Insektenzellen bis hin zu menschlichen Zellen.

Aufgrund der geringen Kosten bei ihrer Verwendung und wegen der effizienten Ausbeute an

Protein, werden Bakterien am häufigsten bei der Produktion von Biokatalysatoren in der Industrie eingesetzt. Vor allem aber, wenn das Zielprotein eukaryotischer Herkunft ist und posttranslationale Modifikationen benötigt, um biologisch aktiv zu sein, werden eukaryotische Organismen zur Produktion verwendet (s. Tab. A-1).

**Tabelle A-1: Charakteristika verschiedener Expressionssysteme für die heterologe Synthese von eukaryotischen Proteinen (nach Fernandez & Hoeffler, 1999).**

Charakteristikum	<i>E. coli</i>	Hefe und Pilze	Insektenzellen	menschliche Zellen
Generationszeit	schnell (30 min)	moderat (ca. 90 min)	langsam (18-24 h)	langsam (24 h)
Komplexität des Kulturmediums	minimal	minimal	komplex	komplex
Kosten des Mediums	gering	gering	hoch	hoch
Expressionslevel	hoch	niedrig	niedrig	gering
Sekretion der Zielproteine	ja	ja	ja	ja
Proteinfaltung	ja, aber oftmals Bildung von <i>Inclusion bodies</i> / <i>in vitro</i> Renaturierung wird dann nötig	ja, in seltenen Fällen <i>in vitro</i> Rückfaltung nötig	ja	ja
N-Glycosylierungen	nein	ja, Mannose	ja, außer Salinsäure	ja
O-Glycosylierungen	nein	ja	ja	ja
Phosphorylierung, Acetylierung, Acylierung	nein	ja	ja	ja
$\gamma$ -Carboxylierung	nein	nein	nein	ja

In den folgenden Kapiteln erfolgt eine detaillierte Vorstellung der derzeit verfügbaren gängigen Expressionssysteme pro- und eukaryotischer Organismen.

### 1.1.1 Expression in prokaryotischen Wirten

Am häufigsten werden Bakterien als Expressionswirte gewählt, da sie einfach und kostengünstig kultiviert und leicht genetisch manipuliert werden können. Darunter zählt wiederum das Enterobakterium *E. coli* zu den am besten untersuchten und am meisten eingesetzten Expressionswirten (Jana & Deb, 2005; Makrides, 1996; Sørensen & Mortensen, 2005). Für dieses Bakterium wurde eine Fülle an Vektorsystemen entwickelt, die zur Produktion großer Proteinmengen eingesetzt werden können. Ein Expressionsvektor, der zur Produktion rekombinanter Proteine eingesetzt werden soll, muß gut aufeinander abgestimmte Elemente enthalten (Shatzman, 1995). Zu diesen Elementen zählt a) ein starker, induzierbarer Promotor mit geringer Basalaktivität. Dadurch soll erreicht werden, daß erst ab einer hohen

Zelldichte die Expression des Zielgens beginnt und schließlich ca. 10-40 % des Gesamtproteins in Form des Zielproteins in den Zellen vorliegt (Alldread *et al.*, 1992). Die Induktion verläuft entweder Temperatur-abhängig (z.B. Kälte-abhängige Induktion: *csaA*-Promotor; Mujacic *et al.*, 1999) oder chemisch (u.a. *lac*- oder *tac*-Promotoren; Makrides, 1996; Jana & Deb, 2005), wobei der artifizielle Induktor Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid (IPTG) in diesem Falle die am meisten eingesetzte Verbindung ist (Hannig & Makrides, 1998). Außerdem muß b) eine Ribosomenbindestelle (RBS) auf dem Vektor enthalten sein, die während der Translationsinitiation mit dem 3'-Ende der 16S rRNA interagiert (Ringquist *et al.*, 1992). Stromabwärts der codierenden Sequenz ist c) ein Transkriptionsterminator auf dem Expressionsvektor vorteilhaft, der als Signal für das Transkriptionsende dient (Richardson, 1993), aber vor allem die mRNA stabilisiert (Hayashi & Hayashi, 1985; Ross, 1995) und somit die Ausbeute erhöhen kann. Zusätzlich zu den Elementen, die direkten Einfluß auf die Effizienz der Genexpression nehmen, enthalten geeignete Expressionsvektoren einen Selektionsmarker, z.B. ein Antibiotikaresistenzgen, und einen Replikationsursprung, der die Kopienzahl des Plasmides in der Bakterienzelle bestimmt. Neben den Wirtseigenen RNA-Polymerasen können auch heterologe Polymerasen für die Expression der Zielgene genutzt werden. So wird zur Expression heterologer Gene in *E. coli* am häufigsten das auf der Verwendung der RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 basierende pET-Expressionssystem (Novagen, Madison, USA) genutzt (Dubendorff & Studier, 1991; Studier *et al.*, 1990).

Alternativen zu dem Bakterium *E. coli* stellen vor allem Gram-positive Bakterien der Gattung *Bacillus* dar. Diese Bakterien besitzen, im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien, keine äußere Membran, sondern nur eine Cytoplasmamembran und eine Zellwand. Außerdem besitzen *Bacillus* Spezies sehr effektive Sekretionsapparate, die große Mengen Protein aus der Bakterienzelle heraus transportieren. Ende der 80er Jahre wurde *Bacillus subtilis* mehr und mehr als alternatives Expressionssystem verwendet und seitdem immer weiter entwickelt (Brockmeier *et al.*, 2006; Yansura & Henner, 1984; Wu *et al.*, 1991). Zusammen mit dem Zielprotein kann *B. subtilis* eine große Anzahl von Proteasen ins Medium sekretieren. Durch die kontinuierliche Entwicklung von Protease-defizienten Bakterienstämmen (Wu *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 2005) konnte die Ausbeute an sekretiertem Protein immer weiter verbessert werden. Der Vorteil dieses Expressionssystems liegt also vor allem darin, daß bedeutende Mengen Protein produziert und ins Kulturmedium sekretiert werden können, was einen leichten Zugang zum gewünschten Produkt ermöglicht.

Außerdem werden die Bakterien *B. licheniformis* oder *B. megaterium* (Rygus & Hillen, 1991) zur Expression heterologer Proteine eingesetzt. Ähnliche Vorzüge wie diese Stämme

liefert *B. brevis*, das sich, im Gegensatz zu den bisher genannten *Bacillus* Spezies, durch seine geringe proteolytische Aktivität auszeichnet (Ebisu *et al.*, 1995; Yamagata *et al.*, 1989).

Ein weiteres Gram-positives Bakterium, welches Anwendung bei der Herstellung rekombinanter Moleküle findet, ist *Staphylococcus carnosus*. Mit Hilfe dieses Bakteriums konnten Dilsen *et al.* im Jahr 2000 das humane Calcitonin in großen Mengen produzieren.

Weiter besitzen *Streptomyces* ein großes Potential, Proteine ins Kulturmedium zu sekretieren, was sie zu einem geeigneten Kandidaten zur Expression von Proteinen macht (Anné & Mellaert, 1993; Binnie *et al.*, 1997; Gilbert *et al.*, 1995). Zur Produktion von rekombinanter  $\alpha$ -Amylase wurde ein Vergleich der Effizienz zwischen *E. coli* und *Streptomyces lividans* durchgeführt. Dabei lag sowohl die Gesamtausbeute an diesem Protein, als auch die gemessene Enzymaktivität bei *S. lividans* deutlich höher als in *E. coli*, wo das Enzym im Periplasma akkumulierte (Pierce *et al.*, 2002).

### 1.1.2 Expression in eukaryotischen Organismen

Wie viele Bakterien können auch Hefen leicht und preisgünstig kultiviert werden und sind für Hochzelldichte-Fermentationen einsetzbar (Ausbeute der Zellmasse: 130 g/l; Schmidt, 2004). Neben der Fähigkeit komplexe posttranslationale Modifikationen durchzuführen, zeichnen sie sich zusätzlich durch effiziente Sekretionssysteme aus. Zu den am besten etablierten Hefestämmen gehören *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* (van Ooyen *et al.*, 2006), *Pichia pastoris* (Macauley-Patrick *et al.*, 2005) und *Hansenula polymorpha* (Mayer *et al.*, 1999; Weydemann *et al.*, 1995).

Der genetisch am besten untersuchte Organismus ist *S. cerevisiae*, der in der Wissenschaft und in der Industrie häufig zur Produktion von Proteinen eingesetzt wird. Zu den mit *S. cerevisiae* industriell erzeugten Produkten zählen unter anderem das humane Serumalbumin (Okabayashi *et al.*, 1991; Sleep *et al.*, 1991), das Tetanus Toxin C-Fragment (Romanos *et al.*, 1991) oder die Glucoseoxidase aus *Aspergillus niger* (Park *et al.*, 2000).

Am häufigsten wird mittlerweile allerdings die Hefe *P. pastoris* zur Produktion von heterologen Proteinen verwendet. Bis heute werden über 400 Proteine in diesem Organismus hergestellt (Goodrick *et al.*, 2001; Lin Cereghino & Cregg, 2000; Lin Cereghino *et al.*, 2002). Dies liegt in der enormen Expressions- und Sekretionskapazität begründet. Außerdem ist diese Hefe im Gegensatz zu *K. lactis* den GRAS (**g**enerally **r**egarded **a**s **s**afe)-Organismen zugeordnet, so daß *P. pastoris* auch in der Lebensmittelproduktion oder der pharmazeutischen Industrie eingesetzt werden kann.

Ein Vorteil der Expression von Proteinen in eukaryotischen Systemen gegenüber der

Produktion in Bakterien liegt vor allem auch darin begründet, daß hier Zielproteine durch Glycosylierung posttranslational modifiziert werden können. Dies ist für die biologische Aktivität vieler eukaryotischer Proteine unerlässlich. Da sich die Form der Glycosylierung unter den Eukaryoten stark unterscheiden kann, war die Herstellung von Hefestämmen, die eine humane Glycosylierung erlauben, von großer Bedeutung. Die Firma GlycoFi (Lebanon, NH, USA) konnte Hefestämme erzeugen, die 26 menschliche Glycosylierungen ermöglichen, welche für die Produktion von therapeutischen Proteinen einen Durchbruch bedeuten (Gerngross, 2004; Hamilton *et al.*, 2003; Wildt & Gerngross, 2005).

Auch einige Pilze wurden hinsichtlich ihrer Kapazität, heterologe Proteine zu produzieren, untersucht. Sie sind höher organisierte Organismen als Hefen und besitzen komplexere posttranslationale Modifikations-Systeme, die den menschlichen ähnlich sind. Hinsichtlich der homologen Expression von Enzymen wie der Amylase oder der Cellulase weisen unterschiedliche Pilze, z.B. *Penicillium chrysogenum* oder *Acremonium chrysogenum*, ein extrem hohes Produktions- und Sekretionspotential auf (Kjeldsen *et al.*, 2002; Schmidt, 2004). Diese Effizienz konnte bisher allerdings nicht auf die Expression heterologer Proteine übertragen werden (Schmidt, 2004). Ein industriell in dem Pilz *Aspergillus niger* produziertes Protein ist das menschliche Interleukin 6, das dort mit Ausbeuten von ca. 150 mg/ l heterolog hergestellt wird (Punt *et al.*, 2002). Vor allem wegen der geringen Proteinausbeuten stellen Pilze bisher keine wirklich effiziente Alternative zu anderen Expressionssystemen dar.

Seit einiger Zeit nimmt auch die Forschung um das molekulare *Farming* zu. Dies ist eine Methode, wodurch die Expression rekombinanter Proteine, z.B. Allergene, in pflanzlichen Expressionssystemen ermöglicht wird (Breiteneder *et al.*, 2001). Hierdurch wird garantiert, daß etwaige Verunreinigungen mit humanpathogenen Viren oder Toxinen in den produzierten Substanzen ausgeschlossen werden können. Bis zum Einsatz von Pflanzen in der industriellen Produktion von Proteinen sind jedoch noch viele Untersuchungen und Verbesserungen nötig. Weitere Expressionssysteme wurden für tierische und menschliche Zellen entwickelt. Hinsichtlich der Produktion wichtiger therapeutisch nutzbarer Proteine, stellen sie die einzige Möglichkeit dar, die notwendigen posttranslationalen Modifikationen durchzuführen, die für die biologische Aktivität eines komplexen eukaryotischen Proteins essentiell sind. Wegen kosten- und zeitaufwendiger Prozesse in der Herstellung und Kultivierung von Zelllinien, und aufgrund ihrer Anfälligkeit gegenüber Zellyse durch Viren, die zur Konstruktion rekombinanter Zellen eingesetzt werden, werden diese Expressionssysteme deutlich seltener verwendet als beispielsweise Hefe- oder Bakteriensysteme (Ikonomou *et al.*, 2003; McCarroll & King, 1997). Auch hinsichtlich der Ausbeute heterologen Proteins sind diese Expressionssysteme deutlich ineffizienter als die bisher vorgestellten. Um solche Zellsysteme

auch industriell effektiv nutzen zu können, müssen unter anderem folgende Dinge verbessert werden: a) die Sauerstoff-Verfügbarkeit (Reiter & Blüml, 1994), b) die Reduzierung der Kohlenstoffdioxid-Akkumulation (Ikonomou *et al.*, 2003), c) die Stabilität der Zelllinien und d) die Sekretionskapazität, die nach Infektion mit Baculoviren deutlich abnimmt (McCarroll & King, 1997).

## 1.2 Probleme und ihre Lösung bei der heterologen Expression in *E. coli*

Das Bakterium *E. coli* ist in Bezug auf die Produktion rekombinanter Proteine sehr vielseitig. Dennoch kann in vielen Fällen das gewünschte Protein nicht erzeugt oder die biologisch aktive Konformation nicht erzielt bzw. nicht aufrecht erhalten werden. Die Ursachen für diese Phänomene sind vielfältig aber teilweise bekannt und lösbar.

Bereits bei der Translation eines Zielgenes kann es zu Engpässen kommen. Unterschiedliche Organismen bevorzugen beispielsweise verschiedene alternative Codons, die für eine bestimmte Aminosäure codieren (Gutman & Hatfield, 1989). Die Präferenz für ein bestimmtes Codon wird auch als *Codon-bias* bezeichnet (Carbone *et al.*, 2003) und kann nicht nur zwischen unterschiedlichen Organismen, sondern auch innerhalb einer Zelle voneinander abweichen, je nachdem ob ein Gen stark oder schwach exprimiert wird (Makrides, 1996). So können Gene aus anderen bakteriellen Organismen oder gar eukaryotischer Herkunft Codons enthalten, die in *E. coli* nur selten vorkommen. Wird dieses Gen in großen Mengen transkribiert, kann die Verfügbarkeit der korrespondierenden tRNA limitierend sein (Kane, 1995; Smith, 1996). Dies kann dazu führen, daß die Elongation der wachsenden Polypeptidkette verzögert wird (Zahn, 1996), Leserasterverschiebungen auftreten (McNulty *et al.*, 2003), falsche Aminosäuren in die Polypeptidkette eingebaut werden (Calderone *et al.*, 1996; Forman *et al.*, 1998; McNulty *et al.*, 2003), oder, daß die Translation schon vorzeitig endet (Kurland & Gallant, 1996; Sørensen *et al.*, 2003b). Diese Probleme können allerdings auf zwei unterschiedlichen Wegen umgangen werden. Zum einen ist es möglich, die Codons des Zielgens, die in dem Expressionsstamm nur selten genutzt werden, durch zielgerichtete Mutagenese gegen häufig verwendete Codons auszutauschen. Dadurch kann das Expressionslevel erhöht werden (Calderone *et al.*, 1996; Kane *et al.*, 1992). Zum anderen besteht die Möglichkeit, Cotransformationen des Expressionsstammes vorzunehmen, so daß Plasmide eingebracht werden, die Gene für seltene tRNAs enthalten (Baca & Hol., 2000; Dieci *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1998; Sørensen *et al.*, 2003b). Die möglichen Fehler im Translationsprozeß bei der Produktion heterologer Proteine können so aufgehoben werden. Ein anderes Problem stellt die Produktion toxischer Proteine dar. Die toxische Wirkung eines

rekombinanten Proteins kann entweder zum Verlust des Expressionsplasmides oder gar, z.B. durch Einfluß auf die Zellteilung, zum Zelltod führen, so daß die Ausbeute des gewünschten Proteins sehr gering ausfällt oder überhaupt nicht möglich ist. Seit kurzem wird versucht, solche toxischen Proteine in zellfreien Systemen zu produzieren (Swartz, 2001). Um Einfluß auf den Metabolismus einer Zelle und damit auf das Zellwachstum (Andersson *et al.*, 1996) oder das Überleben (Dong *et al.*, 1995) zu nehmen, muß das rekombinante Protein nicht generell toxisch sein. Allein durch die immens hohen Proteinmengen oder durch die ständige Expression des Zielgens können der Zelle wichtige Ressourcen und Energie entzogen werden, was wiederum die Funktion wichtiger Zellprozesse und somit auch die Proteinausbeute beeinflussen kann (Hoffmann & Rinas, 2001). In solchen Fällen sollten strikt regulierbare Promotoren verwendet werden, die die Expression erst bei Erreichen einer ausreichenden Zellmasse durch Induktion erlauben (Jonasson *et al.*, 2002; Studier, 1991). Eine andere Möglichkeit, die Ausbeute rekombinanten Proteins zu erhöhen, ist die Sekretion des Zielproteins ins Periplasma, wodurch ihre cytoplasmatische Konzentration gering gehalten werden kann (Hockney, 1994; Jana & Deb, 2005).

Die korrekte Faltung kann ebenfalls ein Engpaß bei der Synthese eines aktiven rekombinanten Proteins darstellen. Für die biologische Aktivität des Zielproteins muß die korrekte Faltung erfolgen. Bei kleinen Proteinen bis zu einer Größe von ca. 100 Aminosäuren (AS) oder bei Proteinen, die aus einer einzigen Domäne bestehen, erfolgt die Faltung in der Regel spontan und solche Zielproteine erreichen die native Konformation in heterologen Systemen meist ohne Probleme (Baneyx & Mujacic, 2004). Andere Proteine sind allerdings auf die Hilfe von spezifischen Faltungsmodulatoren angewiesen, die in *E. coli* entweder nicht vorkommen oder für die korrekte Faltung des Zielproteins nicht ausreichen (Schlieker *et al.*, 2002). So ist die Bildung von Disulfidbrücken, die für die Faltung vieler Proteine unerlässlich ist, im Cytoplasma von *E. coli* normalerweise ausgeschlossen und kann nur im Periplasma dieses Bakteriums stattfinden (Missiakas & Raina, 1997; Rietsch & Beckwith, 1998). Wird nun ein Protein produziert, das die Ausbildung von Disulfidbrücken für seine Stabilität bzw. biologische Aktivität benötigt, kann man dies auf unterschiedliche Weise erreichen. Zum einen kann das Zielprotein mit einer N-terminalen Signalsequenz versehen werden, die den Transport über den Sec-Weg ins Periplasma von *E. coli* ermöglicht (Manting & Driessen, 2000). Häufig verwendete Signalsequenzen für den Transport über die innere Membran stammen beispielsweise von den Genen *ompT*, *ompA*, *pelB*, *malE*, *lamB* oder *phoA* (Blight *et al.*, 1994). Konnte das rekombinante Protein ins Periplasma transportiert werden, kann die Bildung der Disulfidbrücken erfolgen. Allerdings kann es auch hier zu Problemen kommen, wenn ein Zielprotein sehr viele Disulfidbrücken enthält (Qiu *et al.*, 1998).

Im Cytoplasma von *E. coli* sorgen die Proteine Thioredoxin und Glutaredoxin für die Reduktion von Cysteinen, so daß eine Ausbildung von Disulfidbrücken verhindert wird. Diese Proteine wiederum werden durch die Enzyme Thioredoxin-Reduktase, codiert durch das Gen *trxB*, bzw. Glutathion-Reduktase, Produkt des *gor*-Gens, reduziert. Mutationen in einem ( $\Delta\textit{trxB}$  = *E. coli* AD494; Novagen, Madison, USA) oder in beiden Reduktase-Genen ( $\Delta\textit{trxB}$   $\Delta\textit{gor}$  = *E. coli* Origami; Novagen, Madison, USA) ermöglichen die Bildung von Disulfidbrücken im Cytoplasma von *E. coli*. Die Expression des Ziegens in einem solchen Expressionsstamm kann zu hohen Ausbeuten aktiven Proteins führen (Bessette *et al.*, 1999; Lehmann *et al.*, 2003; Premkumar *et al.*, 2003).

Die Bildung von unlöslichen Zelleinschlüssen, sogenannte *Inclusion bodies*, ist ein allgemeines Problem bei der Expression rekombinanter Gene in *E. coli*. Über den Mechanismus der Bildung dieser Proteinaggregate und ihre Struktur ist wenig bekannt. Eine Vermutung ist, daß diese Strukturen durch ein passives Ereignis zustande kommen, bei dem hydrophobe, exponierte Bereiche ungefalteter Proteine miteinander interagieren (Villaverde & Carrio, 2003). Bei der heterologen Expression führt die Bildung von *Inclusion bodies* dazu, daß sie zu 50-95 % aus dem rekombinanten Protein bestehen. Diesen Vorteil nutzt man aus, um große Mengen Protein zu erhalten, die vor proteolytischem Abbau geschützt sind (Medina *et al.*, 2002) und in nachfolgenden Renaturierungs- und Rückfaltungsschritten in ihre aktive Konformation überführt werden können (Middelberg, 2002; Sørensen *et al.*, 2003a). Dieser Prozeß ist allerdings kosten- und zeitaufwendig und hat oftmals einen großen Verlust der Proteinausbeute zur Folge. Daher wurden unterschiedliche Strategien entwickelt, um die Bildung von *Inclusion bodies* zu reduzieren oder sogar zu verhindern. Dazu zählen a) das Herabsetzen der Inkubationstemperatur, b) die Reduktion der Expressionsrate, c) die Wahl eines anderen Expressionswirtes, d) die Veränderung des Zielgens, oder e) die Coexpression von Faltungsmodulatoren (Jonasson *et al.*, 2002). Der Einsatz der *E. coli* Stämme C41(DE3) und C43(DE3) (Miroux & Walker, 1996) ermöglichte beispielsweise die Überexpression von Genen, die für globuläre oder Membranproteine codieren, die in der Produktion löslichen oder membranlokalisierten Proteins resultierte (Arechaga *et al.*, 2003; Smith & Walker, 2003). Auch die Coexpression von molekularen Chaperonen konnte in vielen Versuchen als geeignetes Mittel genutzt werden, um die Ausbeute aktiven Proteins zu erhöhen. Sowohl Untersuchungen, in denen einzelne Chaperone, wie der Triggerfaktor Tig coexprimiert wurden (Ikura *et al.*, 2002; Nishihara *et al.*, 2000), als auch die Coexpression mehrerer Chaperone, wie DnaK kombiniert mit ClpB (Schlieker *et al.*, 2002) oder GroELS mit DnaKJ (Nishihara *et al.*, 2000), führte zu einer Verbesserung der Proteinausbeute. Dennoch gibt es keine Garantie, daß die Coexpression von Faltungshelfern in jedem Fall eine Verbesserung

der Expression hervorruft. Daher muß für jedes Zielprotein getestet werden, ob solche Faltungshelfer die Proteinproduktion beeinflussen können, und welche dies im speziellen Fall sind (Baneyx & Mujacic, 2004; Walter & Buchner, 2004).

## **2 Proteinfaltung in Bakterien**

Die physiologischen Funktionen einer Zelle oder eines Zellverbandes sind direkt mit der Aufrechterhaltung der nativen Konformation zellulärer Proteine verbunden. Proteine, deren Struktur nicht korrekt ist, können ihre Aufgabe nicht erfüllen und somit im schlimmsten Fall toxisch für die Zelle sein. Um den Zustand sämtlicher Proteine einer Zelle zu kontrollieren, verfügen alle Organismen über komplexe Netzwerke, welche die Faltung neu synthetisierter Proteine überwachen und nicht-native Proteine dem proteolytischen Abbau zuführen. Die Funktion und Gruppen der an diesem Kontrollnetzwerk beteiligten Proteine sind in allen Reichen der Organismen hoch konserviert (Frydman *et al.*, 1994; Langer *et al.*, 1992; Siegers *et al.*, 1999).

In Proteinrückfaltungsexperimenten konnte gezeigt werden, daß die native Faltung eines Proteins durch die Aminosäuresequenz bestimmt wird (Anfinsen, 1973; Dobson & Karplus, 1999). Dies konnte vor allem für kleine Proteine, ca. 60-85 % aller Proteine einer Zelle, beobachtet werden, die aus einer einzelnen Domäne bestehen. Dennoch ist die Faltung eines Proteins nicht immer ein spontaner Prozeß. Große, komplexere Proteine können beispielsweise nur ineffizient zurückfalten und bilden dann Faltungsintermediate. Auch viele neugebildete Polypeptidstränge benötigen die Hilfe von molekularen Chaperonen und Faltungskatalysatoren, um die aktive Konformation zu erzielen (Frydman, 2001; Gething & Sambrock, 1992; Hartl, 1996). Dabei bewahren molekulare Chaperone nicht-native Proteine vor Fehlfaltungen oder der Akkumulation mit anderen Proteinen. Dabei besitzen die Faltungshelfer selber keine Information über den eigentlichen Faltungsprozeß des Zielproteins. Bei neu-synthetisierten oder fehlgefalteten Proteinen werden oftmals hydrophobe Bereiche oder Aminosäuren exponiert, die schnell miteinander assoziieren, was in der Ausbildung hydrophober Bindungen resultiert (Dobson & Karplus, 1999; Radford, 2000). Durch zelluläre Faltungsmodulatoren wird die Ausbildung dieser irreversiblen Bindungen verhindert. Die Tendenz, Proteinaggregate in der Zelle auszubilden ist beträchtlich, da eine hohe lokale Konzentration von Proteinen, vor allem an Ribosomen, vorliegt (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). So werden beispielsweise Proteinkonzentrationen von 300-400 g/l in dem Bakterium *E. coli* vorhergesagt (Ellis, 2001).

In einer solchen Umgebung wirken molekulare Chaperone, die später noch detailliert

vorgestellt werden, der Akkumulation von Proteinen entgegen, indem sie bei der Proteinneubildung, aber auch nach Stresseinwirkung ihre Funktion erfüllen. Hier werden hauptsächlich zwei Mechanismen unterschieden wie Faltungshelfer wirken können. Proteine wie der Triggerfaktor oder Vertreter der Hsp70- (**H**itzes**ch**ock**p**rotein; 70 kDa) Chaperone binden an ein Substrat, halten es in einem faltungskompetenten Zustand, und geben es später wieder an die Umgebung oder an nachgeschaltet wirkende Chaperone ab (Deuerling *et al.*, 1999). Ungefähr 10-15 % aller Zellproteine können nur langsam falten und zählen zu den Aggregations-sensitiven Proteinen, die anschließend noch mit Chaperoninen interagieren. Chaperonine, zylindrische Proteinkomplexe, stellen dem jeweiligen Substrat ein definiertes Kompartiment, getrennt vom Cytosol, zur Verfügung, das optimale Faltungsbedingungen liefert.

Kommt es dennoch zu Fehlfaltungen oder zur Akkumulation von Proteinen, besitzt die Zelle mit den Hsp100-Chaperonen eine Proteinklasse, die ATP-abhängig kleine Akkumulationen aufheben oder fehlgefaltete Proteine entfalten kann (Ben-Zvi & Goloubinoff, 2001). Viele molekulare Chaperone besitzen die Möglichkeit, geschwindigkeitsbestimmende Bindungen zu katalysieren. Dazu zählen die Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen (PPIasen) oder Disulfidbrücken-bildende Proteine (Dsb-Proteine). Letztere befinden sich im Periplasma von Bakterien. In dieses Kompartiment werden viele Proteine in ungefalteter Form transportiert und erst hier durch molekulare Chaperone, wie dem Skp-Protein, Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen (PPIasen) oder Dsb-Proteine in die native Konformation gebracht.

## 2.1 Molekulare Chaperone

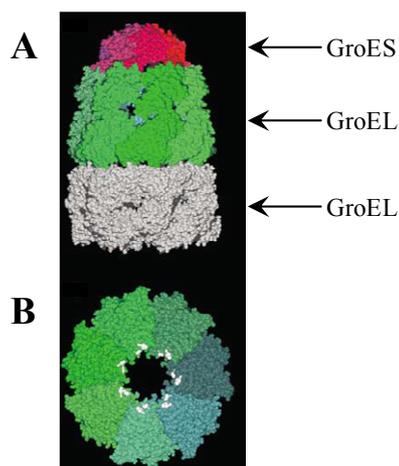
Molekulare Chaperone bilden eine Gruppe verwandter Proteine, die aufgrund ihrer Molekulargewichte in Klassen oder Familien unterteilt werden können. Manche Zellen besitzen eine Vielzahl von Vertretern einer Chaperonfamilie. In der Hefe *S. cerevisiae* konnten beispielsweise 14 verschiedene Hsp70-Varianten identifiziert werden (Craig *et al.*, 1999). Chaperone einer Familie weisen signifikante Sequenzhomologien auf und sind sich strukturell und funktionell ähnlich. Vertreter unterschiedlicher Chaperonfamilien haben hingegen kaum Homologien (Walter & Buchner, 2002). Die allgemeine Funktion aller Chaperone ist die Bindung ungefalteter oder fehlgefalteter Polypeptide, die durch hydrophobe Bereiche zur Akkumulation tendieren, und die Unterstützung dieser Substratproteine beim Erreichen ihrer nativen Konformation. Die unterschiedlichen Chaperonfamilien werden im Folgenden vorgestellt.

## Hsp60

In Bakterien ist der Vertreter dieser Chaperonfamilie das Chaperon GroEL, das in *E. coli* ein Molekulargewicht von 57 kDa aufweist. Es ist zusammen mit dem Co-Chaperon GroES (10 kDa), an der Faltung einer Vielzahl von Proteinen beteiligt. Eine Deletion des *groEL* Gens führt in *E. coli* zu einem letalen Phänotyp (Dougan *et al.*, 2002; Fayet *et al.*, 1989), was die Wichtigkeit dieses Chaperons im Protein-Kontrollnetzwerk verdeutlicht.

Ein funktionelles GroEL/GroES- (GroELS-) System (Abb. A-1) besteht aus 2 komplexen Strukturen (Abb. A-1, A), die einem Faß ähneln und mindestens ein offenes Ende besitzen (Braig *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1997).

Eine dieser komplexen Faß-Strukturen wiederum besteht aus sieben ringförmig angeordneten Untereinheiten (Abb. A-1, B), so daß zwei voneinander unabhängige Hohlräume vorhanden sind. An hydrophoben Bereichen der GroEL-Untereinheiten (Abb. A-1, B) erfolgt die Bindung des zu faltenden Substrates.



**Abb. A-1: Struktur des GroELS-Chaperonsystems aus *Escherichia coli*.** In A ist eine Seitenansicht des GroE-Komplexes dargestellt, der aus zwei GroEL-Doppelringen (grau und grün), sowie einem GroES-Ring (rot) besteht. GroES bindet am oberen Ende des einen GroEL-Ringes, was zur Ausbildung einer Faltungshöhle führt und die Faltung eines vorliegenden Substrates erlaubt. Ein GroEL-Ring wiederum besteht aus sieben GroEL-Untereinheiten (B), die durch unterschiedliche grün-Töne dargestellt sind. Die in weiß dargestellten Bereiche zeigen hydrophobe Bereiche der GroEL-Untereinheiten, die an der Bindung des Substrates beteiligt sind.

Bindet das Co-Chaperon GroES an einen der beiden GroEL-Ringe (Abb. A-1, A), entsteht eine von der Umgebung abgeschlossene Höhle, in der die Faltung des Zielproteins erfolgen kann (Xu *et al.*, 1997). Der GroE-Faltungszyklus wiederum umfaßt drei Schritte: a) Bindung des Substrates an den Chaperonkomplex, b) Faltung und c) Freilassung des gefalteten Proteins ins Cytoplasma (Thirumalai & Lorimer, 2001; Walter, 2002). Beide GroEL-Untereinheiten sind gleichzeitig aktiv, allerdings erfolgt der Durchlauf des Faltungszyklus

zeitversetzt. Während in der einen Untereinheit (*trans*) der Faltungsprozeß abläuft, kann ein neues Substrat an die andere Untereinheit (*cis*) binden. Im Anschluß an die Aufnahme des Substrates erfolgt die Bindung von ATP und GroES an die GroEL-Struktur, was eine Konformationsänderung von GroEL verursacht (Roseman, *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1997). Dadurch nimmt die Affinität von GroEL zu dem Substrat ab, was zur Freilassung desselben in die gebildete Faltungshöhle führt, wo seine Faltung erfolgen kann (Mayhew *et al.*, 1996; Weissman *et al.*, 1995).

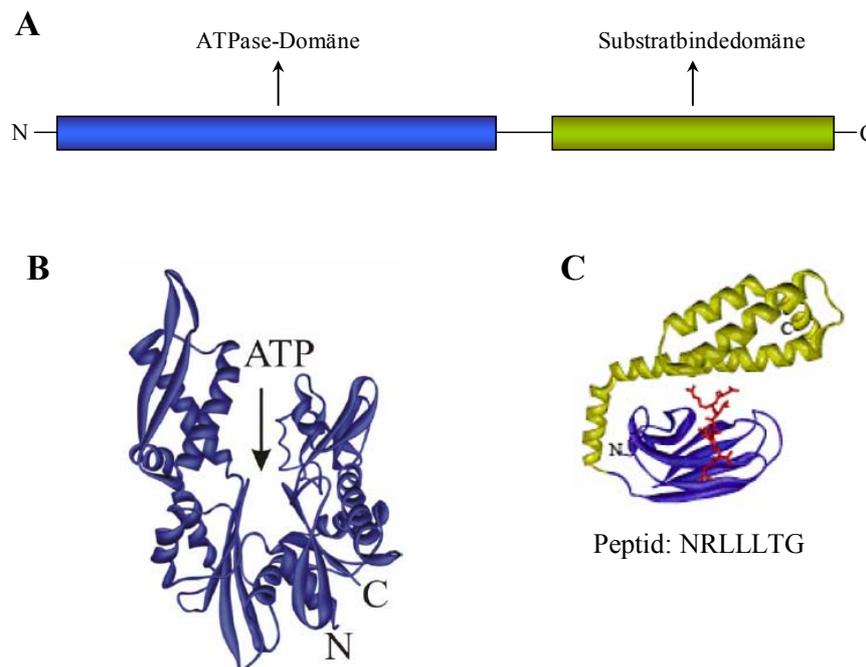
Aufgrund des begrenzten Volumens der Faltungshöhle können durch dieses Chaperon nur solche Substrate gefaltet werden, die weniger als 60 kDa groß sind (Sakikawa *et al.*, 1999); eine Beschränkung durch strukturelle Eigenschaften des Substrates ist bei der GroE-katalysierten Faltung nicht bekannt (Erbse, *et al.*, 2003; Houry *et al.*, 1999). Durch Hydrolyse des ATP-Moleküls kommt es anschließend zu einer weiteren Änderung der GroEL-Struktur. Dadurch kann die Bindung des GroES-Moleküls an dem zweiten (*trans*) GroEL-Ring aufgehoben und das gefaltete Protein wieder entlassen werden. Dieser Komplex kann im Folgenden neues Substrat aufnehmen, da an diesem GroEL-Komplex kein ATP gebunden ist und er deshalb eine hohe Affinität gegenüber dem zu faltenden Protein besitzt. Währenddessen kann der Faltungsprozeß im Inneren des *cis* GroEL-Komplexes vollendet werden (Walter & Buchner, 2002).

## **Hsp70**

Die Familie der Hsp70-Chaperone stellt die zentrale Gruppe im Protein-Kontrollnetzwerk dar. Vertreter dieser Familie kommen in fast allen Kompartimenten eukaryotischer Zellen, in Eubakterien aber auch bei den Archaea vor (Walter & Buchner, 2002). Die Gruppe dieser Chaperonfamilie ist außerdem an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, in denen sie unter anderem an der Faltung und Entfaltung von Proteinen beteiligt sind (Hartl, 1996). Durch Bindung kurzer, hydrophober Segmente in teilweise gefalteten und fehlgefalteten Substraten, können Hsp70-Chaperone die Aggregation und weitere Faltungsprozesse unterbinden (Craig *et al.*, 1999; Flynn *et al.*, 1991). Das bestuntersuchte Chaperon dieser Proteingruppe, das DnaK-Protein, stammt aus dem Gram-negativen Bakterium *E. coli*. Das Chaperon DnaK und viele weitere Hsp70-Proteine interagieren mit zwei Klassen von Partnerproteinen, einem Vertreter der Hsp40-Gruppe (in *E. coli* DnaJ) und dem GrpE-Protein. Beide Proteine regulieren katalytische Schritte im Faltungszyklus von DnaK.

Hsp70-Proteine sind in eine N-terminale ATP-Bindedomäne und eine kleinere C-terminale Substratbindedomäne unterteilt (Abb. A-2, **A**). Die Kristallstrukturen beider Domänen des DnaK-Proteins aus *E. coli* konnten gelöst werden (Abb. A-2, **B** und **C**; Harrison *et al.*, 1997;

Zhu *et al.*, 1996).



**Abb. A-2: Aufbau des DnaK-Proteins aus *E. coli*.** In **A** ist die Domänenstruktur des DnaK-Proteins dargestellt. Dieses Protein kann in eine N-terminale ATPase- und eine C-terminale Substratbindedomäne unterteilt werden. Die Kristallstruktur beider Domänen konnte separat voneinander aufgeklärt werden. Die Kristallstruktur der ATPase-Domäne ist in **B** gezeigt. ATP gibt die genaue Position der Bindestelle an (nach Harrison *et al.*, 1997). In **C** ist die Kristallstruktur der Substratbindedomäne dargestellt (Zhu *et al.*, 1996), an die ein Peptid (rot) gebunden ist. Die Aminosäuresequenz des Peptids ist angegeben. Diese Domäne unterteilt sich in eine aus  $\beta$ -Faltblättern bestehende (blau) und eine aus  $\alpha$ -Helices gebildeten (gelb) Subdomäne.

Die Bindung des Substrates an das Chaperon DnaK erfolgt nicht direkt. Zunächst tritt das Co-Chaperon DnaJ mit dem Zielprotein in Kontakt (Schröder *et al.*, 1993) und assoziiert so an das DnaK-Protein, welches wiederum mit einem ATP-Molekül im Komplex vorliegt. Erst dann kann der Transfer des Proteins auf das eigentliche Chaperon erfolgen. In diesem Prozeß stimuliert das DnaJ-Protein die ATP-Hydrolyse am DnaK (Bukau & Horwich, 1998), was zu einer Konformationsänderung führt. Durch diese Änderung in der Struktur kann das Substrat an das DnaK-Protein verankert werden (Pellecchia *et al.*, 2000). Schließlich muß das Zielprotein entlassen und das nach der ATP-Hydrolyse entstandene ADP-Molekül am DnaK-Protein gegen ein ATP ausgetauscht werden, um mit einem neuen Peptid in Kontakt treten zu können. Diesen Geschwindigkeitsbestimmenden Schritt katalysiert das GrpE-Protein (Liberek *et al.*, 1991). Dabei setzt GrpE in einem ersten Schritt die Affinität vom Chaperon DnaK gegenüber dem Nukleotid ADP herab, welches sich daraufhin von diesem Protein ablöst. Danach kann das GrpE-Protein mit DnaK interagieren, bis, in einem zweiten Schritt, neues

ATP an das DnaK-Chaperon bindet und das GrpE-Protein den Komplex verläßt (Schönfeld *et al.*, 1995). In diesem Zustand kann der DnaK-ATP-Komplex ein neues Substrat aufnehmen und der beschriebene Zyklus erneut ablaufen.

Während des Kontaktes zwischen dem Chaperon DnaK und dem Zielprotein stellt das Chaperon keine abgetrennte Faltungsumgebung zur Verfügung, wie bei dem Chaperon GroELS, und es findet keine Konformationsänderung am Substrat statt.

Statt dessen wird das Zielprotein ausschließlich vor Aggregations- oder weiteren Faltungsprozessen bewahrt. Nach dem Ablösen des Substrates von dem DnaK-Protein, kann es entweder spontan die richtige Konformation einnehmen, oder tritt mit spezielleren Proteinen der Proteinmaschinerie, wie Vertretern der Hsp60- oder Hsp90-Chaperonfamilien, in Kontakt.

Ein weiterer in *E. coli* beschriebener Vertreter der Hsp70-Familie ist das HscA-Protein. Das *hscA*-Gen wird konstitutiv mit dem *dnaJ*-ähnlichen *hscB*-Gen cotranskribiert, ein *grpE*-verwandtes Gen konnte hier aber nicht identifiziert werden (Dougan *et al.*, 2002). Für das HscAB-Chaperonsystem konnte gezeigt werden, daß es essentiell für die Assemblierung verschiedener Fe-S-Proteine *in vivo* ist (Silberg *et al.*, 2001; Tokumoto & Takahashi, 2001).

### **Hsp90**

Die Hsp90-Proteine bilden ebenfalls eine Chaperonfamilie. In eukaryotischen Zellen sind diese Chaperone im Besonderen etabliert, lebensnotwendig, und beispielsweise für die Faltung und Reifung wichtiger regulatorischer Proteine verantwortlich (Walter & Buchner, 2002).

Für *E. coli* konnte ein Protein dieser Chaperonfamilie identifiziert werden. Dieses Protein, HtpG, zählt aber zu den am wenigsten untersuchten Faltungsmodulatoren in diesem Organismus. Daher ist auch nur wenig über die Funktion dieses Chaperons in Bakterien bekannt. Für eine *htpG*-Deletionsmutante konnte einzig ein Wuchsdefekt bei einer Temperatur von 44°C festgestellt werden (Bardwell & Craig, 1988). Außerdem scheint das HtpG-Protein Einfluß bei der Sekretion von Zielproteinen zu nehmen (Shirai *et al.*, 1996; Ueguchi & Ito, 1992).

### **Hsp100**

Eine weitere Gruppe von Chaperonen umfaßt die Hsp100-Familie. Diese Proteine werden vor allem nach einem Hitzeschock in großen Mengen produziert (Sauer *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004), sind aber nicht direkt an der Faltung oder Vermeidung von Aggregationen beteiligt (Banyex & Mujacic, 2004; Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Manche dieser Chaperone erkennen

native Substrate und leiten ihre Entfaltung ein, oder können Proteinakkumulationen aktiv auflösen (Sauer *et al.*, 2004). Sie besitzen eine ATPase-Domäne und werden der Superfamilie der AAA+-ATPasen zugeordnet (Ogura & Wilkinson, 2001). Zwei unterschiedliche Hsp100-Klassen können unterschieden werden: a) Klasse I-Proteine besitzen zwei Nukleotidbinde-Domänen (z.B. *E. coli* ClpA oder ClpB), während b) Klasse II-Proteine nur eine Nukleotidbinde-Domäne besitzen (z.B. *E. coli* ClpX oder HslU). Eine weitere Gemeinsamkeit weisen diese Proteine hinsichtlich ihrer Struktur auf. Sie bilden alle homohexamere Ringe aus (Levchenko *et al.*, 1995; Wawrzynow *et al.*, 1995; Wickner *et al.*, 1994) und sind, mit Ausnahme des ClpB-Proteins, in der Lage, mit einer Protease, z.B. ClpP, zu interagieren, was durch ein bestimmtes Aminosäuresequenzmotiv vermittelt wird (Joshi *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2001). Auf diese Weise können solche Chaperone die gebundenen Substrate einer proteolytischen Degradation zuteilen (Lee & Tsai, 2005).

ClpB zählt als einziger Vertreter der Hsp100-Familie zu den klassischen Chaperonen (Parsell *et al.*, 1994). Um streß-geschädigte Proteine aus einem aggregierten Zustand zu befreien, ist eine Kooperation zwischen ClpB und dem Chaperon DnaK nötig (Glover & Lindquist, 1998; Goloubinoff *et al.*, 1999; Mogk *et al.*, 1999).

### **sHsp**

Da die Vertreter der Familie der kleinen Hitzeschockproteine (sHsp – *small heat-shock proteins*) spezifisch ungefaltete Proteine vor Aggregationsprozessen bewahren können (Horwitz, 1992; Jakob & Buchner, 1994), gehören sie ebenfalls zu den molekularen Chaperonen. In *E. coli* zählen u.a. die Proteine IbpA und IbpB, zwei je 16 kDa große Proteine, zu dieser Chaperonfamilie (Allen *et al.*, 1992). Das Besondere bei dieser Chaperongruppe ist, daß sie funktionell, aber auch strukturell bzw. bezogen auf ihre Größe, sehr inhomogen sind (Walter & Buchner, 2002). Als gemeinsames Merkmal besitzen die Vertreter dieser Proteingruppe einen konservierten C-Terminus, in dem eine  $\alpha$ -kristalline-Domäne lokalisiert ist (de Jong *et al.*, 1993; Narberhaus, 2002). Eine weitere Gemeinsamkeit dieser Chaperone ist, daß sie oligomere Komplexe aus 12-42 Untereinheiten bilden können. Aufgrund einer hohen Bindungsaffinität können diese Chaperone mit je einem Zielprotein pro Untereinheit eine große Anzahl von Proteinen komplexieren (Lee *et al.*, 1997). Dabei ist bekannt, daß es hinsichtlich der Bindung mit dem Chaperon keine Limitierung der Größe des Zielproteins gibt (Ehrnsperger *et al.*, 1998). Solche Chaperon-Zielprotein-Komplexe sind sehr stabil (Ehrnsperger *et al.*, 1998; Haslbeck *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1997), können aber später wieder aufgehoben werden. Bei dem Aufkommen großer Mengen nicht-nativen Proteins, z.B. nach einem Hitzeschock oder durch eine heterologe Expression verursacht, binden sHsps an

die Zielproteine. Im Anschluß können die ungefalteten Proteine an geeignete Chaperone weitergegeben werden, die dann die korrekte Faltung des Zielproteins ermöglichen.

## 2.2 Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen

Neben den klassischen molekularen Chaperonen, die dazu nötig sind, die Ausbildung von Proteinakkumulationen zu verhindern oder wieder aufzuheben, bzw. günstige Faltungsbedingungen bereitzustellen, gibt es eine weitere Enzymklasse, die für das Erzielen der korrekten Konformation eines Proteins essentiell sein kann, die Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen (PPIasen). Diese Proteine wurden 1984 erstmals beschrieben (Fischer *et al.*, 1984).

Die normalen Peptidbindungen kommen in der Regel in der *trans*-Konformation vor, die energetisch deutlich günstiger ist, als die *cis*-Bindung (Kim & Baldwin, 1982; Schmid, 1993). Eine Ausnahme stellen jedoch Peptid-Bindungen dar, in denen die Aminosäure Prolin C-terminal enthalten ist. Hier ist die Energiedifferenz zwischen der *cis*- und der *trans*-Konformation relativ gering, so daß 7% der Bindungen als *cis*-Isomere vorkommen können (Stewart *et al.*, 1990). Die energetische Barriere der *cis-trans*-Isomerisierung ist dennoch sehr hoch, so daß diese Umlagerung einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (Schmid, 2001). Die richtige Konformation ist für die Funktionalität eines Enzyms unverzichtbar, so daß die Katalyse der Isomerisierung einer solchen Bindung dazu beiträgt, ein biologisch aktives Protein zu erhalten.

Die PPIasen werden in drei Familien eingeteilt: die Cyclophiline, die FK506-bindende Proteine (FKBP) und die Parvuline (Dolinski & Heitman, 1999; Göthel & Marahiel, 1999; Heitman *et al.*, 1992; Rahfeld *et al.*, 1994; Schmid, 1993). Die Einteilung in diese Familien beruht auf der Tatsache, daß verschiedene Vertreter dieser Enzyme unterschiedliche Substanzen binden können und ihre Aktivität dadurch inaktiviert wird. So führt Cyclosporin A zur Inhibierung der PPIase-Aktivität der Cyclosporine, das FK506 inhibiert die Aktivität der FKBP, und die Parvuline werden weder von Cyclosporin A noch von FK506 inhibiert (Rahfeld *et al.*, 1994; Rudd *et al.*, 1995). Zwischen diesen drei PPIase-Familien besteht keine Sequenzhomologie oder Übereinstimmung hinsichtlich der Substratspezifität. In *E. coli* konnten bisher verschiedene periplasmatische und cytoplasmatische PPIasen identifiziert werden, zu denen beispielsweise der Triggerfaktor (TF), SurA, SlyD, PpiA, PpiB oder PpiD zählen (Baneyx & Mujacic, 2004; Fischer, 1994; Schäfer *et al.*, 1999; Schmid, 2001).

Ein wichtiger Vertreter dieser Enzymgruppe ist der Triggerfaktor. Dieses Enzym bindet nahe am Peptidausgang von Ribosomen und nimmt direkt nach ihrer Bildung Kontakt zu kurzen

Peptidketten auf. Zwar zählt das Protein zu den PPIasen, doch muß ein Substrat nicht zwingend ein Prolin enthalten, um von diesem Enzym gebunden zu werden (Patzelt *et al.*, 2001). Normalerweise interagiert der TF mit kurzen neu-synthetisierten Peptiden, kann aber auch mit großen ( $\geq 60$  kDa) Multidomänen-Proteinen assoziiert sein, die 10-20 % des *E. coli* Proteoms ausmachen (Deuerling *et al.*, 2003). Hier zeigt der Triggerfaktor ein mit dem Chaperon DnaK überlappendes Substratspektrum.

Zusätzlich ist das Protein TF an dem Sec- und SRP-abhängigen Transport von Proteinen ins Periplasma beteiligt. Durch eine Bindung an ein Zielpeptid kann die wachsende Aminosäurekette ungehindert gebildet werden und eine effiziente, nachfolgende Bindung an das Chaperon SecB wird ermöglicht (Buskiewicz *et al.*, 2004).

### 2.3 Dsb-Proteine

Ein bedeutender Unterschied zwischen dem Periplasma und dem Cytoplasma Gram-negativer Bakterien ist die oxidierende Umgebung. Um Oxidationsvorgänge im Cytoplasma zu unterbinden, besitzen *E. coli* Zellen geeignete Systeme, die Proteine in ihrem reduzierten Zustand halten. Dazu zählen das Thioredoxin/ Thioredoxin-Reduktase-System (Carmel-Harel & Storz, 2000; Russel, 1995) und das Glutaredoxin/ Glutaredoxin-Reduktase-System (Åslund *et al.*, 1994; Carmel-Harel & Storz, 2000). Im Gegensatz dazu werden Proteine, die ins Periplasma transportiert wurden oxidiert (Missiakas & Raina, 1997). Es konnte gezeigt werden, daß die Ausbildung von Disulfidbrücken *in vitro* mehrere Stunden bis Tage benötigt (Gilbert, 1997; Sosnick *et al.*, 1994), diese Bindungen werden *in vivo* hingegen in wenigen Sekunden gebildet (Bardwell, 1994). Diese zeitliche Diskrepanz ist mit der Verfügbarkeit von speziellen Enzymen zu erklären, die im Periplasma von *E. coli* die Bildung von Disulfidbrücken katalysieren können, die Dsb-Proteine (**disulfide-bond** Proteine). In *E. coli* konnten bisher sechs Proteine identifiziert und charakterisiert, die an der Bildung und Isomerisierung von Disulfidbrücken beteiligt sind (Andersen *et al.*, 1997).

Bei der Ausbildung von Disulfidbrücken reagiert zunächst das DsbA-Protein mit den Zielproteinen und oxidiert freie Thiole zu einer solchen Bindung (Messens & Collet, 2006). Nach der Übertragung einer Disulfidbrückenbindung auf das Zielprotein wird das DsbA-Protein in einem reduzierten Zustand wieder frei gesetzt. Für das DsbA-Protein konnten ca. 300 putative Substrate in *E. coli* vorhergesagt werden (Hiniker & Bardwell, 2004), was ein breites Substratspektrum dieses Enzyms aufzeigt (Kadokura *et al.*, 2003; Leichert & Jakob, 2004). Um eine neue katalytische Oxidation durchführen zu können, muß es danach wieder reoxidiert werden, was durch das in der inneren Membran integrierte DsbB-Protein erfolgt

(Bader *et al.*, 1999; Bardwell *et al.*, 1993). Letzteres überträgt im Anschluß die Elektronen durch einen Fluß über Ubiquinon und Cytochromoxidasen auf molekularen Sauerstoff, der somit zu Wasser reduziert wird (Bader *et al.*, 1999).

Da DsbA ein unspezifisch wirkendes Enzym ist, können Bindungen in ein Protein eingefügt werden, die nicht zur Ausbildung der nativen Konformation führen. In solchen Fällen ist eine Korrektur der entsprechenden Bindung nötig, was durch die Disulfidisomerasen DsbC bzw. DsbG ermöglicht wird. Für ihre Funktionalität müssen diese beiden Enzyme in einem reduzierten Zustand vorliegen. Dies kann durch das Protein DsbD sichergestellt werden, das unter Verbrauch cytoplasmatischen NADHs Elektronen auf die beiden Disulfidisomerasen übertragen kann (Rietsch *et al.*, 1997).

Der sechste in *E. coli* identifizierte Vertreter der Dsb-Familie ist das Protein CcmG (DsbE). Auch an dieses Protein, das essentiell für die Reifung von Cytochrom C ist, werden Elektronen übertragen (Stirnemann *et al.*, 2005; Thony-Meyer, 2002).

### 3 *Pseudomonas aeruginosa*

Das Gram-negative, fakultativ anaerobe Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (aerugo = lat. Grünspan) wird aufgrund von 16S rRNA-Vergleichen phylogenetisch zu der Klasse der  $\gamma$ -Proteobakterien gezählt (Olson *et al.*, 1994). Dieses ubiquitär vorkommende Bakterium wird nicht nur in Böden und Gewässern gefunden, sondern konnte auch von Pflanzen, oder aus dem Darmtrakt von Menschen und Tieren isoliert werden.

*P. aeruginosa* zeichnet sich durch ein hohes pathogenes Potential gegenüber Pflanzen, Tieren und Menschen aus (Smith & Iglewski, 2003). Infektionen mit diesem opportunistischen Bakterium treten vor allem bei immunsupprimierten Patienten auf, die beispielsweise an Brandwunden, AIDS, Krebs oder der Erbkrankheit cystische Fibrose (CF) leiden (Lyczak *et al.*, 2000). Die Behandlung von *P. aeruginosa* Infektionen wird durch die hohe intrinsische Antibiotikaresistenz dieses Bakteriums sowie die Ausbildung von Biofilmen erschwert (Conway *et al.*, 2003; Høiby, 2002). Das enorme pathogene Potential kann auf die Produktion und Sekretion einer Vielzahl von Virulenzfaktoren zurückgeführt werden. Dazu zählen beispielsweise die folgenden Proteine: das Exopolysaccharid Alginate, Exotoxin A, Exoenzym S, mehrere Proteasen, drei Phospholipasen und zwei Lipasen (Zulianello *et al.*, 2006).

Die metabolische Vielseitigkeit von *P. aeruginosa* und dessen Anpassungsfähigkeit an verschiedene Habitate geht mit einem umfangreichen genetischen Repertoire einher. Seit dem Jahr 2000 ist die vollständige Sequenz des 6,33 Mbp großen Genoms entschlüsselt und veröffentlicht (Stover *et al.*, 2000). *P. aeruginosa* ist ein vielseitiges Bakterium, das sich vor allem durch seine Stoffwechselvielfalt auszeichnet. Es kann bei Temperaturen von 5°C – 42°C wachsen, wobei das Temperaturoptimum 37°C beträgt, es hat geringe Ansprüche hinsichtlich seines Nährstoffbedarfs, so daß Acetat als Kohlenstoffquelle und Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle im Minimalmedium ausreichen (Hof *et al.*, 2000; Madigan *et al.*, 2000; Palleroni, 1993). Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, daß dieses Bakterium mit Hilfe des Enzyms SdsA auch das Molekül Natriumlaurylsulfat (SDS) verstoffwechseln kann (Hagelüken *et al.*, 2006). Weitere Charakteristika von *P. aeruginosa* sind seine lophitriche Begeißelung, die Produktion von fluoreszierenden Farbstoffen wie Pyocyanin und Pyoverdin, sowie die Fähigkeit zur Denitrifikation (Madigan *et al.*, 2000). Aufgrund einer Vielzahl sekretierter Proteine ist dieses Bakterium von besonderem biotechnologischen Interesse (Jaeger *et al.*, 1996a/b; 1997; 1999; Jaeger & Reetz, 2000).

Wie andere Organismen auch, verfügt *P. aeruginosa* über ein komplexes und gut reguliertes Protein-Kontrollsystem. Dadurch kann sichergestellt werden, daß die in diesem Organismus produzierten Proteine ihre native Konformation erzielen und somit ihre biologische Funktion

erfüllen können. Die Besonderheit hierbei ist, daß mit ca. 5.570 vorhergesagten Genprodukten deutlich mehr Proteine kontrolliert und gefaltet werden müssen, als in anderen bakteriellen Organismen (s. *E. coli*: 4.400 Gene vorhergesagt), was eine höhere Anzahl an Faltungsmodulatoren oder Proteine mit breiterem Substratspektrum in *P. aeruginosa* vermuten läßt.

#### **4 Zielsetzung dieser Arbeit**

Mit der voranschreitenden Sequenzierung pro- und eukaryotischer Genome steigt auch die Anzahl der neu zu charakterisierenden Gene und Genprodukte exponentiell an. Um diese eingehend charakterisieren und gegebenenfalls einer biotechnologischen Verwertung zugänglich machen zu können, werden leistungsfähige Expressionssysteme benötigt, die eine schnelle und universelle Produktion verschiedenster Proteine erlauben. Bislang spielt das Gram-negative Bakterium *E. coli* eine bedeutende Rolle. Es ist nicht nur leicht und kostengünstig kultivierbar, sondern ist außerdem biochemisch und genetisch gut untersucht, und kann in Hochzelldichte-Fermentationen eingesetzt werden (Baneyx & Mujacic, 2004; Jana & Deb, 2005). Trotz einer Vielzahl geeigneter Strategien, diverse Proteine heterolog in diesem Organismus zu exprimieren, kommt es bei der Produktion vieler Proteine zu Problemen, so daß nicht die gewünschte Ausbeute biologisch aktiven Proteins erzielt werden kann. Vor allem die Produktion komplexer eukaryotischer Proteine verläuft in diesem Bakterium oftmals erfolglos.

Ein häufig auftretendes Problem bei der Produktion rekombinanter Proteine ist die Aggregation des Zielproteins im Cytoplasma von *E. coli*, die z.B. durch falsche oder unvollständige Faltungsprozesse oder aufgrund zu hoher Expressionsraten des rekombinanten Proteins verursacht wird. In solchen Fällen konnte gezeigt werden, daß die Coexpression von Faltungsmodulatoren die Ausbeute rekombinanter Proteine deutlich verbessern kann, was allerdings ein *trial-and-error* Versuch ist und nicht immer zum Erfolg führt. Gründe dafür sind beispielsweise darin begründet sein, daß der richtige Faltungsmodulator nicht identifiziert oder eingesetzt werden konnte.

Ein genereller und umfassender Ansatz, der zur Verbesserung der Expression heterologer Gene angewandt werden kann, ist bisher nicht verfügbar. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit eine umfangreiche Genexpressionsbank konstruiert werden. Diese ermöglicht eine randomisierte Expression einzelner oder gruppierter Faltungsmodulatorgene mit heterologen Genen in unterschiedlichen Gram-negativen Organismen. Somit kann mehreren möglichen Problemen bei heterologen Expressionen entgegengewirkt werden. Dafür sollten im Rahmen

dieser Arbeit folgende Punkte bearbeitet werden:

- 1 Aufgrund der unterschiedlichen Funktionen im Faltungsprozeß sollten möglichst viele verschiedene Faltungshelfer getestet werden. Dafür sollten zunächst sämtliche Gene identifiziert werden, die für putative Faltungshelfer in dem Bakterium *P. aeruginosa* codieren.
- 2 Die identifizierten Gene, die für Faltungshelfer in diesem Organismus codieren, sollten aus dem Chromosom des Wildtyp-Stammes *P. aeruginosa* PAO1 isoliert und in spezielle Klonierungsplasmide eingebracht werden. Auf diese Weise sollte die enorme Kapazität ausgenutzt werden, die für die Organisation von ca. 5.600 Genprodukten in diesem Bakterium vorhanden ist.
- 3 Anschließend sollte eine Genexpressionsbank erzeugt werden. Darin sollten nicht nur eine Vielzahl einzelner Chaperone und Faltungskatalysatoren vorliegen, sondern vor allem randomisierte Kombinationen von drei Faltungsmodulatorgenen auf je einem *broad-host-range* Expressionsplasmid der Expressionsbank verfügbar gemacht werden.
- 4 Durch Coexpressionsversuche mit verschiedenen Zielproteinen aus Pro- und Eukaryoten sollte schließlich die Effektivität dieser Genexpressionsbank untersucht werden. Dabei war das Ziel, die jeweiligen Faltungsmodulatoren oder Kombinationen dieser Proteine, die zu einer Verbesserung der Ausbeute löslichen, aktiven Zielproteins führen, zu identifizieren.

## B Material & Methoden

### 1 Chemikalien & Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika, Chemikalien und Enzyme wurden in p.A.-Qualität bei folgenden Firmen bezogen:

**Antibiotika:** Gerbu (Geilberg), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen).

**Chemikalien:** Biomol (Hamburg), Fluka (Sternheim), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg).

**Enzyme:** Restriktionsenzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Weitere Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Lysozym von Sigma (Deisenhofen), T4-DNA-Ligase, Ribonuclease A und T4-DNA-Polymerase von MBI Fermentas (St. Leon-Rot), *Pfu*-DNA-Polymerase von Stratagene (Heidelberg), Gateway-Clonase-Enzym-Mixe von Invitrogen (Carlsbad, USA).

**Medienkomponenten:** Difco (Detroit, USA), Gibco BRL (Eggenstein), Oxoid (Wesel).

### 2 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle B-1: Übersicht über verwendete Bakterienstämme.

Stamm	genetische Eigenschaften	Referenz/ Quelle
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dem(ΔIts857 indI Sam7 nin5 lavUV5- T7gene1)</i>	Studier & Moffat, 1986
<i>Escherichia coli</i> DB3.1	F <sup>-</sup> <i>gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm<sup>r</sup>) syl5 Δleu mlt1</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Escherichia coli</i> S17-1	<i>thi pro hsdR<sup>M</sup></i> mit chromosomal integriertem [RP4-2-Tc::Mu:Km <sup>r</sup> ::Tn7, Tra <sup>+</sup> Tri <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> ]	Simon <i>et al.</i> , 1986
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> , <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1, nupG</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Wildtyp	Holloway <i>et al.</i> , 1979
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PABST7.1	Δ( <sup>3</sup> / <sub>4</sub> <i>lipA</i> <sup>1</sup> / <sub>3</sub> <i>lipH</i> ), miniD-180 (Tc <sup>r</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> P <sub>lacUV5</sub> -T7 <i>gene I</i> )	Jaeger <i>et al.</i> , 1997
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAH11	<i>hypersecreting Colicin A</i> Mutante des PAO1	Filloux, unveröffentlicht

Tabelle B-2: Übersicht der verwendeten Vektoren.

Plasmide	genetische Eigenschaften	Referenz/ Quelle
Vektoren für <i>E. coli</i>		
<b>pBSL141</b>	Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , ColE1	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
<b>pDEST<sup>TM</sup> R4-R3</b>	Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , <i>ccdB</i> , <i>attR4</i> , <i>attR3</i> ,	Invitrogen, Karlsruhe
<b>pDONR<sup>TM</sup> P4-P1R</b>	Km <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , <i>ccdB</i> , <i>attP4</i> , <i>attP1R</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>pDONR<sup>TM</sup> P2R-P3</b>	Km <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , <i>ccdB</i> , <i>attP2R</i> , <i>attP3</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>pENTR/SD/D-TOPO</b>	Km <sup>r</sup> , RBS, <i>attL1</i> , <i>attL2</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>pET16b</b>	P <sub>T7</sub> P <sub>lac</sub> Ap <sup>r</sup> ColE1, His-Tag	NOVAGEN, Madison, USA
<b>pET22b (+)</b>	P <sub>T7</sub> P <sub>10</sub> Ap <sup>r</sup> ColE1 <i>pelB lacI<sup>q</sup></i>	NOVAGEN, Madison, USA
<b>pGATRfA</b>	Cm <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup> <i>ccdB attR1 attR2</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>pSUP202</b>	pBR325 Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> <i>mob</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
Vektoren mit breitem Wirtsspektrum		
<b>pBBR1MCS</b>	P <sub>lac</sub> P <sub>T7</sub> Cm <sup>r</sup> <i>mob lacZα</i>	Kovach <i>et al.</i> , 1994
<b>pBBR1MCS-3</b>	P <sub>lac</sub> P <sub>T7</sub> <i>lacZα Tc<sup>r</sup> mob rep</i>	Kovach <i>et al.</i> , 1995
<b>pSWGfp</b>	pTZ110 mit promotorlosem <i>gfp</i>	Wilhelm, unveröffentlicht
<b>pUCPKS</b>	P <sub>lac</sub> P <sub>T7</sub> Apr ColE1-SF <i>lacZα</i>	Watson <i>et al.</i> , 1996
<b>pVLT31</b>	<i>lacI<sup>q</sup></i> , P <sub>lac</sub> , Tc <sup>r</sup> , <i>mob</i> , <i>rep</i>	De Lorenzo <i>et al.</i> , 1993
rekombinante Plasmide		
<b>pBaBIFN1</b>	P <sub>tac</sub> Apr Tc <sup>r</sup> <i>IF2α</i> ColE1	Wacker, München
<b>pBaBIFN1ΔTc<sup>r</sup></b>	P <sub>tac</sub> Apr ΔTc <sup>r</sup> ( <i>SalI/ NheI</i> ) <i>IF2α</i> ColE1	diese Arbeit
<b>pBBL7</b>	pBBR1MCS + <i>XmnI/ SmaI</i> -Fragment, 2,8 kb, <i>lipA/H</i> , P <sub>lac</sub>	Düffel, 1995
<b>pDEST-BBRTc-R4R3</b>	1,7 kb- <i>ccdB</i> -Kassette aus pDEST <sup>TM</sup> R4-R3 in <i>SmaI</i> -site des pBBR1MCS-3	diese Arbeit
<b>pDEST-VLT31</b>	<i>KpnI/ XbaI-ccdB</i> -Kassette aus pGATRfA in pVLT31	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. B-2

<b>pENTR-<i>Chaperon</i></b>	pENTR/SD/D-TOPO mit entspr. Chaperongen	diese Arbeit
<b>pENTR-<i>Chaperon-3'</i></b>	pDONR <sup>TM</sup> P2R-P3 mit Chaperongen; 3'-Position im Multisite-Vektor	diese Arbeit
<b>pENTR-<i>Chaperon-5'</i></b>	pDONR <sup>TM</sup> P4-P1R mit Chaperongen; 5'-Position im Multisite-Vektor	diese Arbeit
<b>pET16b-SMlipA</b>	pET16b-Derivat; <i>S. marcescens lipA</i> -Gen in <i>NcoI</i> - <i>BamHI</i> einkloniert (aus pLipRB)	Becker <i>et al.</i> , 2005
<b>pET22b-CalB</b>	pET22b-Derivat; <i>C. antarctica CALB</i> -Gen einkloniert	Andexer, unveröffentlicht
<b>pET19b <math>\alpha</math>-Dom (His<sub>6</sub>)</b>	EstA N-Terminus in pET19b <i>NdeI</i> / <i>XhoI</i> kloniert (N-His <sub>6</sub> )	Schulz, 2005
<b>pET22b-gfp</b>	pET22b-Derivat; <i>GFP</i> aus pSWgfp in <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> einkloniert	diese Arbeit
<b>pEXP-<i>Chaperon</i></b>	pVLT31 mit einzelner Chaperon/-system	diese Arbeit (s. Tab. C-6)
<b>pEXP-1 ... 42</b>	pBBR1MCS-3 mit drei Chaperongen kombiniert	diese Arbeit (s. Tab. C-7)
<b>pRE-ADH</b>	pKA1-Derivat, <i>re-adh</i> Gen in <i>NdeI</i> / <i>BamHI</i> kloniert	Abokitse, 2004
<b>pRR-ADH</b>	pKA1-Derivat, <i>rr-adh</i> Gen über <i>NdeI</i> / <i>BamHI</i> kloniert	Abokitse, 2004

### 3 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle B-3: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	DNA-Sequenz (in 5' → 3' Richtung)	Merkmal/Modifikation
<b>AttB2-3'-up</b>	GGG GAC AGC TTT CTT GTA CAA AGT GGA ATC CGC GGC CGC CTT GTT T	<i>attB2</i> -Erkennungssequenz
<b>AttB3-3'-dwn</b>	GGG GAC AAC TTT GTA TAA TAA AGT TGT GTC GGC GCG CCC ACC CTT	<i>attB3</i> -Erkennungssequenz
<b>AttB1-5'-dwn</b>	GGG GAC TGC TTT TTT GTA CAA ACT TGT GTC GGC GCG CCC ACC CTT	<i>attB1</i> -Erkennungssequenz
<b>AttB4-5'-up</b>	GGG GAC AAC TTT GTA TAG AAA AGT TGA TTC CGC GGC CGC CTT GTT T	<i>attB4</i> -Erkennungssequenz
<b>ccdBattR3-dwn</b>	CAA CTA TGT ATA ATA AAG TTG AAC	
<b>ccdBattR4-up</b>	CAA CTT TGT ATA GAA AAG TTG A	
<b>dwn-skp</b>	TAT TGT CGA CTC GCG GCG CCA	<i>SalI</i>
<b>M13 forward</b>	TGT AAA ACG ACG GCC AG	
<b>M13 reverse</b>	CAG GAA ACA GCT ATG AC	
<b>PA-Nummer-up</b>	up-Primer zur Amplifizierung der <i>P. aeruginosa</i> Chaperon- und Faltungskatalysatorgene zur Klonierung in den Vektor pENTR/SD/D-TOPO → Sequenzen siehe G-2, Tabelle G-1	CACC-Sequenz am 5'-Ende; nötig für TOPO-Klonierung

## Fortsetzung Tab. B-3

<b>PA-Nummer-dwn</b>	dwn-Primer zur Amplifizierung der <i>P. aeruginosa</i> Chaperon- und Faltungskatalysatorgene zur Klonierung in den Vektor pENTR/SD/D-TOPO → Sequenzen siehe G-2, Tabelle G-1	
<b>RT-lipA-up</b>	CCT CGG GGT CGA CTA CTG GT	für RealTime PCR
<b>RT-lipA-dwn</b>	CAG TTG GAC TAG CCG GTG TC	für RealTime PCR
<b>RT-rpoD-up</b>	GCG CAA CAG CAA TCT CGT CT	für RealTime PCR
<b>RT-rpoD-dwn</b>	ATC CGG GGC TGT CTC GAA TA	für RealTime PCR
<b>RT-dnaK-up</b>	ACC GTT CCG GCC TAC TTC AA	für RealTime PCR
<b>RT-dnaK-dwn</b>	GAT CAC CGA CAC GTC GAA GG	für RealTime PCR
<b>RT-groEL-up</b>	AAG CCA TCG AAG GCC TGA AG	für RealTime PCR
<b>RT-groEL-dwn</b>	TAG TTG CCG GAA CCC TGC TT	für RealTime PCR
<b>RT-ppiA-up</b>	CCG TAC CGG AGT GGT CGA TT	für RealTime PCR
<b>RT-ppiA-dwn</b>	GGA ACC TTG GCG ATC TGG TC	für RealTime PCR
<b>RT-tig-up</b>	GCG TGT GCT CAA CCT GAC CT	für RealTime PCR
<b>RT-tig-dwn</b>	TTT CCT TCA CGC CGA ACA GA	für RealTime PCR
<b>up-skp</b>	TAT TAA GCT TCA ACT CGG TGC GGG	<i>HindIII</i>

## 4 Anzucht von Bakterien

### 4.1 Nährmedien

Luria-Bertani-Medium (LB) (Sambrook *et al.*, 1989):

10 g/l Trypton; 10 g/l NaCl; 5 g/l Hefextrakt

Trypton-Phosphat-Medium (TP) (Moore *et al.*, 1993):

20g/l Pepton, 2g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15g/l Hefeextrakt

Zur Herstellung von Festmedien wurde den Medienkomponenten 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Hitzelabile Chemikalien wurden mit Membranfiltern mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm (Schleicher und Schüll, Dassel) sterilfiltriert und den für 20 min bei 120 °C autoklavierten Medien bei einer Temperatur von ≤ 60°C zugesetzt.

### 4.2 Testmedien

Tributylin-Agar (Kok *et al.*, 1993)

7,5 ml Tributyrin und 0,75g Gummi arabicum ad 15 ml A. dest. mischen, das Tributyrin mit Ultraschall (3 min, 75 W, 100%) emulgieren und zu 500 ml autoklaviertem LB-Agar (60°C) geben. Lipolytische Aktivität zeigt sich durch Bildung klarer Höfe um die Bakterienkolonie.

Skim Milk Agar

5% (w/v) Magermilchpulver (30 min, 105°C) in LB-Agar. Proteaseaktivität zeigt sich durch klare Hofbildung um die Bakterienkolonie.

### 4.3 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Kulturen von *E. coli* und *P. aeruginosa* wurden, soweit nicht anders angegeben, in LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Flüssigkulturen mit einem Volumen von 5 ml wurden in Reagenzgläsern in einem Reagenzglas-Rotator (Neolab, Heidelberg), größere Volumina in Erlenmeyer-Kolben auf einem Inkubationsschüttler (Unitron, Infors HT, Bottmingen, CH) bei 150 Upm inkubiert, wobei das Volumen zwischen Kulturvolumen und Volumen des verwendeten Kolbens 1:5 bis 1:10 entsprach. Bakterienstämme mit plasmid- oder genomcodierten Resistenzmarken wurden unter Selektionsdruck durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums kultiviert.

Als Übernachtkulturen (ÜK) wurden solche Kulturen bezeichnet, die mindestens 16 h bebrütet wurden. Hauptkulturen wurden aus einer ÜK auf eine o.D.  $580_{nm} = 0,05$  beimpft. Zur Induktion einer Überexpression wurden die Kulturen mit 0,4 mM IPTG induziert und, je nach zu synthetisierendem Zielprotein, für 3-42 h bei 37°C bzw. 30°C bis zur Ernte der Zellen weiter inkubiert (s. Tab. B-4).

**Tabelle B-4: Anzuchtbedingungen bei der Überexpression verschiedener Zielprotein im heterologen Wirt *E. coli*.**

Zielprotein	Inkubation nach IPTG-Induktion [h]	Inkubations-temperatur [°C]
<i>Rhodococcus erythropolis</i> ADH	18	30
<i>Rhodococcus ruber</i> ADH	18	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EstA $\alpha$	3	37
<i>Serratia marcescens</i> LipA	3	37
<i>Candida antarctica</i> CALB	3	30
<i>Aquorea victoria</i> GFP	16	37
humanes IF2 $\alpha$ b	42	30

Zur Lagerung von Bakterien wurden diese auf Festmedien ausgestrichen und nach erfolgter Bebrütung bei 4°C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden ÜKs mit 7 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80°C eingefroren.

**Tabelle B-5: Konzentration der zur Selektion eingesetzten Antibiotika.**

	Inkubation nach IPTG-Induktion [h]	Inkubations-temperatur [°C]
Ampicillin (Ap)	100	/
Carbenicillin (Cb)	100	600
Chloramphenicol (Cm)	50	300
Irgasan (Ig)	/	25
Gentamycin (Gm)	10	30
Kanamycin (Km)	50	/
Tetracyclin (Tc)	10	100

## 5 Isolierung von Nukleinsäuren

Chromosomale DNA aus Zellen von *E. coli* sowie *P. aeruginosa* wurde mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits der Firma Qiagen isoliert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *P. aeruginosa* erfolgte nach der von

Birnboim & Doly (1979) beschriebene Methode der alkalischen Lyse oder durch die Verwendung des Minipräp-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg) und des Midipräp-Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben.

Zur Aufreinigung von RNA aus *E. coli* Zellen wurde das RNeasy Mini-Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die Durchführung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration von DNA- und RNA- Präparationen wurde durch analytische Gelelektrophorese bestimmt.

## 6 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA und RNA sowie der gezielten Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989) in 0,6 - 2 %igen (w/v) Agarosegelen.

Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5 × TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM Na<sub>2</sub>-EDTA; pH 8,3) verwendet. Als Größenstandard für die DNA-Gele wurde die „1kb-ladder“ von Invitrogen (Karlsruhe) eingesetzt. Die Geldokumentation wurde auf dem „Gel Print 2000i“-Videodokumentationssystem der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) sowie mittels des „Eagle Eye II“-Videodokumentationssystems der Firma Stratagene (Heidelberg) durchgeführt. Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „Perfectprep® Gel cleanup“-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg) nach Angaben des Herstellers.

## 7 *In vitro*-Rekombination von DNA

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

Weiterhin wurde das pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit der Firma Invitrogen eingesetzt. Die Reaktionen wurde nach Angaben im Manual durchgeführt (Instruction Manual Version C, Dezember 2003).

Zur Konstruktion von Plasmiden mit drei unterschiedlichen, hintereinander angeordneten Genen, wurde das MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit der Firma Invitrogen (Karlsruhe) eingesetzt. Die BP-, LR- oder LR-Plus-Rekombinationen wurden nach Herstellervorgaben durchgeführt (Instruction Manual Version C, November 2004).

## 8 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen sowie die Transformation von Plasmid-DNA wurden nach Hanahan (1983) durchgeführt.

## 9 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation

Mobilisierbare Plasmide wurden in Zellen von *P. aeruginosa* durch di-parentale Konjugation eingebracht. Dabei wurde je 1 ml einer ÜK des Plasmid-haltigen Donorstammes *E. coli* S17-1 mit 1 ml Zellen des jeweiligen Rezipientenstamms von *P. aeruginosa*, die zuvor für 10 min bei 46°C inkubiert wurden, gemischt und durch Zentrifugation (1 min; 10.000 Upm; RT)

sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen für mindestens 4 h bei 37 °C auf einer LB-Agarplatte inkubiert, bevor diese in 0,14 M NaCl suspendiert und in Verdünnungen  $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$  auf Selektivagar ausplattiert wurden. Zur Kontraselektion des Donorstammes enthielt der Selektivagar zusätzlich 25 µg/ml Irgasan (Ciba Geigy, Basel, CH).

## 10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde nach Saiki *et al.* (1988) durchgeführt. Es wurden standardmäßig PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 µl angesetzt, die sich wie folgt zusammensetzten: 1 ng Plasmid- oder 10 ng genomische DNA als Matrizen-DNA, 25 pmol von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U *Pfu*- oder *Pfu*-Turbo-Polymerase im jeweiligen Reaktionspuffer des Herstellers. Die PCR wurde in dem PCR-Automaten „Mastercycler Gradient“ der Firma Eppendorf (Hamburg) mit dem folgenden Programm durchgeführt:  $1 \times (2 \text{ min } 98 \text{ }^\circ\text{C})$ ;  $30 \times (1 \text{ min } 95^\circ\text{C}; 0,5 \text{ min } 55\text{--}65 \text{ }^\circ\text{C}$  je nach Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide;  $0,5\text{--}5 \text{ min } 72^\circ\text{C}$  je nach Länge des zu amplifizierenden Fragmentes);  $1 \times (10 \text{ min } 72 \text{ }^\circ\text{C})$ . Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung des „Perfectprep<sup>®</sup> Gel cleanup“-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg) nach Angaben des Herstellers.

Unerwünschte PCR-bedingte Mutationen wurden durch die Sequenzierung der PCR-Produkte ausgeschlossen.

## 11 Reverse Transkription

Die Synthese von cDNA erfolgte ausgehend von 500 ng Gesamt-RNA, die durch reverse Transkription mit den in Tabelle B-3 angegebenen Oligonukleotiden und reverser Transkriptase (OmniScript<sup>™</sup> Reverse Transcriptase; QIAGEN, Hilden) in cDNA umgeschrieben wurde. Die RNA wurde vor der Synthese 5 min bei 65 °C inkubiert und dann 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der vorbereitete Mastermix aus Reaktionspuffer, Nukleotiden und Enzym zugegeben. Die Synthese erfolgte für 1 h bei 37°C. Die synthetisierte cDNA wurde ohne weitere Aufreinigung als *template* in eine *RealTime* PCR eingesetzt.

## 12 *RealTime* PCR

Die *RealTime* PCR wurde mit dem Mastercycler<sup>®</sup> ep *realplex* (Firma Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Als Reagenzien dienten die Bestandteile des „Quantitect SYBR Green I“-Kit (QIAGEN, Hilden). Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I bindet an doppelsträngige DNA und hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 521 nm. Bei der Messung erfolgte eine Anregung der in Eppendorf<sup>®</sup> twin.tec PCR-Platten vorliegenden Proben bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 530 nm. In Tabelle B-6 ist der Ablauf der *RealTime* PCR sowie der Schmelzkurve aufgelistet.

Die Auswertung der *RealTime* PCR wurde mit Hilfe der Software „realplex 1.0 (2005)“ der Firma Eppendorf durchgeführt.

**Tabelle B-6: Ablauf der *RealTime* PCR.** Nach Vorinkubation erfolgt die Amplifikation in 50 PCR-Zyklen. Das Produkt wird im Anschluß anhand der Schmelzkurve analysiert.

Programm	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	Fluoreszenz-Detektion
<b>Vorinkubation</b>		95 °C	1 min	1	-
<b>Amplifikation</b>	Denaturierung	95 °C	10 s	50	-
	Annealing	Primer-abhängig	20 s		-
	Synthese	72 °C	Produkt [bp]/ 25 s		-
	Messung	72-86 °C	0 s		einfach
<b>Schmelzkurve</b>	Denaturierung	95 °C	0 s	1	-
	Annealing	65 °C	15 s		-
	Aufschmelzen der DNA	95 °C Temperatur-Erhöhung = 0,1 °C/ s	0 s		kontinuierlich
<b>Kühlung</b>		40 °C	30 s		-

### 13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde als Auftragsarbeit von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

### 14 Gewinnung von Kulturüberständen und Gesamtzellextrakten

Zellfreie Kulturüberstände wurden durch Zentrifugation (15 min, 6.000 Upm, 4°C) gewonnen und im Bedarfsfall sterilfiltriert (Schleicher & Schüll, NC45 Membranfilter, 0,45 µm Porendurchmesser).

Das Zellsediment wurde entsprechend einer o.D.  $_{580\text{nm}} = 15$  in 1 ml Zellaufschlußpuffer, Trispuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0) oder Kaliumphosphatpuffer (100 mM Kpi, pH 6,0), aufgenommen und anschließend einer Ultraschallbehandlung unterzogen (Branson-Sonifier W250, 2 min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt). Die so erhaltenen Gesamtzellextrakte (GZE) konnte in Enzymtests eingesetzt (B-16), weiter fraktioniert (B-15) oder bei -20°C gelagert werden.

### 15 Fraktionierung von *E. coli*-Zellen

Die Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation für 2 min bei 3.000 Upm aus dem GZE (B-14) entfernt. Zur weiteren Aufteilung des GZE in lösliche und nicht-lösliche Fraktionen konnte für weitere 30 min bei 14.000 Upm zentrifugiert werden. Die hierbei sedimentierten Proteine (*Inclusion bodies*) wurden direkt in 1 Vol. SDS-Probenpuffer oder Zellaufschlußpuffer aufgenommen, während die im Überstand lokalisierten löslichen Proteine direkt in Enzymtests eingesetzt (B-16) oder mit ½ Vol. SDS-Probenpuffer versetzt und auf Proteingelen überprüft wurden (B-19). Die Lagerung der Proteinproben erfolgte bei -20°C.

## 16 Enzymaktivitätstests

### 16.1 Bestimmung der Aktivität von Alkoholdehydrogenasen

Die Bestimmung der Aktivität der ADHs erfolgte photometrisch. Der Test wurde bei 30°C und pH 6,0 durchgeführt und verlief über die Messung der Extinktionsabnahme von NADH bei 340 nm. Diese beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Die Enzymaktivitäten wurden nach folgender Formel berechnet:

$$U = \frac{\Delta E \cdot V}{d \cdot \varepsilon \cdot v}$$

$\Delta E$	Extinktionsänderung
$V$	Gesamtvolumen des Ansatzes (ml)
$v$	Enzymvolumen (ml)
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) [ $\varepsilon_{\text{NADH}}=6,22$ ]
$d$	Schichtdicke der Küvette (cm)

Standardmäßig wurde die Aktivität der ADHs in einem Reaktionsvolumen von 1 ml bestimmt. Als Substrat diente *p*-Cl-Acetophenon für die Reduktionsreaktion. Nach 2-5 minütiger Vorinkubation bei 30 °C wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe der Enzymlösung gestartet. Pro Reaktion wurden 970  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{Kp}_i$  (pH 6,0) mit 3 mM *p*-Cl-Acetophenon, 20  $\mu\text{l}$  12,5 mM NADH sowie 10  $\mu\text{l}$  Enzymlösung eingesetzt.

### 16.2 Bestimmung der Lipase Aktivität im *p*NPP-Test (Winkler & Stuckmann, 1979)

In basischer Lösung adsorbiert abgespaltenes *p*-Nitrophenol Licht der Wellenlänge  $\lambda = 410$  nm. Die o.D.  $_{410\text{nm}}$  ist somit ein Maß für die Aktivität der Lipase.

Substratemulsion: 207 mg Natriumdesoxycholat, 100 mg Gummi arabicum, 90 ml Sörensen Phosphatpuffer pH 8,0 (Lösung A: 8,9 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Lösung B: 0,68 g/l  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$  [A:B  $\rightarrow$  17:1]); 30 mg *p*NP-Palmitat in 10 ml Isopropanol. Pro Reaktion wurden 2,5 ml Substratemulsion mit 20-100  $\mu\text{l}$  Probe vermischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die o.D.  $_{410\text{nm}}$  der einzelnen Ansätze im Spektralphotometer (Zeiss PMQ II) gemessen. Dabei entspricht die gemessene o.D.  $_{410\text{nm}}=1$  einer Lipasemenge von 0,121 ng bzw. einer Enzymaktivität von 0,161 nkat.

### 16.3 Aktivitätsbestimmung der Esterase EstA

Pro Reaktion wurden 1,5 ml (V) Testlösung [25  $\mu\text{l}$  *p*NPCaproat in 5 lL Ethanol gelöst; plus 100 ml Puffer (100 mM  $\text{KP}_i$  pH 7,2; 10mM  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$ )] mit 5-50  $\mu\text{l}$  (v) Probe vermischt und für 15 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die o.D. $_{410\text{nm}}$  der Ansätze im Spektralphotometer (Zeiss PMQ II) bestimmt. Angegeben werden die Werte als relative Aktivität in U/ ml (Extinktionskoeffizient  $\varepsilon = 10400 \text{ M}^{-1}$ ).

### 16.4 Fluoreszenzmessung des Grün-fluoreszierenden Proteins

Zur Quantifizierung der Fluoreszenzemission des GFP-Proteins wurde ein Fluoreszenzphotometer verwendet. Es wurde jeweils 1 ml GZE (B-14) mit einer Zelldichte, die einer o.D.  $_{580\text{nm}}$  von 1 entsprach, in QS Viertelmikroküvetten (Hellma) bei einer Anregungswellenlänge von 475 nm in einem Emissionsbereich von 490 – 550 nm vermessen.

Die Dokumentation der Spektren erfolgte mit der Fluorescence Data Manager Software von Perkin Elmer, die Auswertung mit Microsoft Excel. Die jeweilige Fluoreszenzintensität als „relative Fluoreszenzemission“ wurde aus der gemessenen Fluoreszenzemission pro Zelldichte, die einer o.D. von 1 entsprach, und pro 1 ml Zelleextrakt oder Zellsuspension berechnet.

## 16.5 Zymogrammgele

GZE (B-14) oder Fraktionsproben, die in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden und z.B. eine Esteraseaktivität aufweisen, können mittels 4-Methylumbelliferyl-butyrat im Gel sichtbar gemacht werden (Riedel *et al.*, 2003). Hierfür inkubiert man das SDS-Gel für 20 min in 10 ml 50 mM Tris-HCl mit 25 % Isopropanol und ÜN in 10 ml 50 mM Tris-HCl. Die Entwicklung der Gele erfolgte mit 0,01 M 4-Methylumbelliferyl-butyrat in DMF. Die Esterase wird dann durch ihre Größe und Substratspezifität gegenüber dem blau-fluoreszierenden Methylumbelliferyl-butyrat, in einem SDS-Polyacrylamidgel mittels UV-Licht visualisiert. Die Dokumentation wurde auf dem „Gel Print 2000i“-Videodokumentationssystem der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) sowie mittels des „Eagle Eye II“-Videodokumentationssystems der Firma Stratagene (Heidelberg) durchgeführt.

## 17 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) im Spektralphotometer "Novaspec" (Pharmacia) bestimmt. Als Referenz diente Rinderserumalbumin (BSA).

## 18 Präzipitation von Proteinen (Peterson, 1977)

Proteinproben wurden mit 0,1 Volumen Natriumdesoxycholat-Lösung (1% w/v) vermischt und mit 0,1 Volumen 70%iger (w/v) Trichloressigsäure versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (30 min, 13000 Upm) wird das Sediment zweimal mit 80%-igem Aceton gewaschen und getrocknet.

## 19 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli (1970), bestehend aus einem 5 %-igen Sammel- und einem 15 %-igen Trenngel. Die Proteinproben wurden in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerol; 2 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,03 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250) aufgenommen und 10 min bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in der Gelapparatur „Mini Protean II Dual Slap Cell“ der Firma Bio-Rad (München) bei einer Spannung von 100 - 200 V. Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg) gefärbt.

## 20 Immunodetektion von Interferon 2 $\alpha$ b

Die Immunodetektion von Proteinen erfolgte nach ihrer Auftrennung in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden mittels einer Transferapparatur der Firma Bio-Rad (Mini Trans-Blot Elektrophoretic Transfer Cell) auf eine PVDF-Membran (Fa. Millipore) übertragen (Wilson & Yunan, 1989). Die Übertragung erfolgte 15 min bei 150 mA und weitere 20 min bei 300 mA konstanter Stromstärke in Dunn-Carbonat-Puffer (10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 20 % (v/v) Methanol) (Dunn, 1986). Anschließend wurde die PVDF-Membran mindestens 30 min in PBS-Puffer [10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,05 % Triton X 100] mit 5 % (w/v) Magermilchpulver blockiert. Das Interferon wurde mit einem indirekten Enzym-Immunoassay nachgewiesen. Der Anti-human-IFN-alpha Antikörper (Pepro Tech EC) wurde in einer Konzentration von 0,1  $\mu$ g/ml, und der Zweitantikörper Ziege-Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (Southern Biotech) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

Der Nachweis durch das ECL-System (Enhanced Chemiluminescence Western Blotting detection system, Amersham Buchler, Braunschweig) erfolgte nach den Angaben im Herstellerprotokoll. Die Dokumentation erfolgte über die Belichtung eines Röntgenfilmes.

## 21 Computerprogramme und Online-Datenbanken

Die Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme „CLONE Manager for Windows 7“ (Scientific and Educational Software), dem „DNA STAR“-Programm (Lasergen). Homologievergleiche wurden mit den BLAST-Algorithmen des NCBI-Servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt (Altschul *et al.*, 1997). DNA-Sequenzinformationen von *P. aeruginosa* wurden von dem „Pseudomonas-Genome Project“ bezogen (<http://www.pseudomonas.com>). Zur Identifizierung von konservierten Proteindomänen wurde die folgende Internetseite genutzt: <http://pfam.wustl.edu/index.html>.

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

## C Ergebnisse

Bei der heterologen Synthese von Proteinen in Bakterien (z. B. *Escherichia coli*) kann es zu verschiedenen Engpässen kommen, welche die Ausbeute gravierend beeinträchtigen. Wichtige Faktoren sind dabei zelluläre Prozesse wie Degradation, Faltung und Stabilität des heterologen Proteins in der Wirtszelle. Aus vorausgegangenen Arbeiten ist bekannt, daß die Coexpression von bakteriellen Faltungshelfern in vielen Fällen zu einer Verbesserung der Proteinausbeute führen kann (Baneyx & Mujacic, 2004; Goloubinoff *et al.*, 1989; Hoffmann & Rinas, 2004). Jedoch muß für jedes Protein neu untersucht werden, ob die Coexpression von Chaperonen grundsätzlich den gewünschten Effekt bewirkt (Hockney, 1994; Walter & Buchner, 2002). Deshalb war das primäre Ziel dieser Arbeit, eine *Toolbox* aus unterschiedlichen Faltungshelfern zusammenzustellen, welche die Coexpression eines Zielgens mit beliebigen Kombinationen verschiedener Faltungsmodulatoren erlaubt. Hierfür sollten Proteine aus dem Gram-negativen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* identifiziert werden, die an generellen Protein-Faltungsprozessen beteiligt sind. Im Unterschied zu vielen anderen Mikroorganismen, die ausschließlich in konstanten Lebensbedingungen vorkommen können, zeichnet sich das Bakterium *P. aeruginosa* durch seine Vielfältigkeit aus. Dies bezieht sich nicht nur auf seine natürlichen Habitate, sondern auch auf die von ihm tolerierten Wuchstemperaturen (Palleroni, 1993; Madigan *et al.*, 2000). Weiter besitzt *P. aeruginosa* ein verhältnismäßig großes Genom (6,33 Mbp), verglichen mit anderen Bakterien (z.B. *E. coli*: 4,64 Mbp). Für die daraus resultierende Anzahl von 5.570 vorhergesagten Genprodukten (für *E. coli* werden 4.400 Gene vorhergesagt), deren Faltung überwacht werden muß, wird ein universelles System aus Chaperonen und Foldasen benötigt. Vergleicht man die Anzahl von cyto- und periplasmatischen Faltungsmodulatoren zwischen den beiden Bakterien *E. coli* und *P. aeruginosa*, weisen sie beide eine ähnliche Zahl an Faltungshelfern auf. Dies deutet darauf hin, daß mit einem vergleichbaren *Set* von Proteinen in *P. aeruginosa* die Faltung einer größeren Anzahl von Genprodukten kontrolliert werden muß als in *E. coli*. Dies könnte durch ein breiteres Substratspektrum der Faltungshelfer gewährleistet sein.

Um die gewünschte Chaperon-Coexpressionsbank konstruieren zu können, mußte zunächst überprüft werden, welche Chaperone und Faltungskatalysatoren tatsächlich in diesem Organismus vorhanden sind. Dazu wurde eine umfassende Datenbankanalyse durchgeführt, um möglichst alle in *P. aeruginosa* vorkommenden Gene zu identifizieren, deren Genprodukte an der Faltung und Stabilität von Proteinen beteiligt sein könnten.

# 1 Identifizierung von Chaperonen und Faltungskatalysatoren in

## *Pseudomonas aeruginosa*

Seit dem Jahr 2000 ist das 6,33 Mbp große Genom des Bakteriums *P. aeruginosa* vollständig sequenziert und die Sequenzdaten unter [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com) verfügbar (Stover *et al.*, 2000). Diese Datenbank umfaßt 5.570 annotierte *orfs* (*open reading frames*) und wurde für die Sequenzanalyse zugrunde gelegt. Dabei wurde die Möglichkeit genutzt, in der *Pseudomonas*-Datenbank Funktionssuchen durchführen zu können. So wurde eine umfassende Datenbankanalyse zur Identifikation von Chaperonen und Hitzeschockproteinen durchgeführt.

**Tabelle C-1: Durch Sequenzvergleiche identifizierte molekulare Chaperone und Hitzeschockproteine in *P. aeruginosa*.** Bei den bereits annotierten *orfs* ist der Genname mit angegeben. Außerdem sind die Größen der identifizierten Gene [bp], sowie die ihrer Genprodukte [kDa] angegeben. Die Homologien gegenüber bekannten Proteinen [%] und der Ursprungsorganismus sind genannt.

<i>orf</i> - Nummer	Genname	Gengröße [bp]	Proteingröße [kDa]	Ähnlichkeit [%]
PA1596	<i>htpG</i>	1.905	71,7	78% zu HtpG aus <i>E. coli</i>
PA1801	<i>clpP</i>	642	23,5	86% zu ClpP aus <i>E. coli</i>
PA1802	<i>clpX</i>	1.281	47,0	85% zu ClpX aus <i>E. coli</i>
PA2614	<i>lolA</i>	627	23,1	51% zu LolA aus <i>E. coli</i>
PA2863	<i>lipH</i>	1.023	37,5	57% zu LipH aus <i>Pseudomonas mendocina</i>
PA3126	<i>ibpA</i>	450	16,6	67% zu IbpA aus <i>E. coli</i>
PA3221	<i>csaA</i>	336	12,1	68% zu CsaA aus <i>B. subtilis</i>
PA3810	<i>hscA</i>	1.860	66,4	87% zu HscA aus <i>E. coli</i>
PA3811	<i>hscB</i>	522	20,2	80% zu HscB aus <i>Azotobacter vinelandii</i>
PA4385	<i>groEL</i>	1.644	57,1	95% zu GroEL aus <i>A. vinelandii</i>
PA4386	<i>groES</i>	294	10,3	96% zu GroES aus <i>A. vinelandii</i>
PA4760	<i>dnaJ</i>	1.134	40,3	78% zu DnaJ aus <i>E. coli</i>
PA4761	<i>dnaK</i>	1.914	68,4	87% zu DnaK aus <i>E. coli</i>
PA4762	<i>grpE</i>	561	20,7	63% zu GrpE aus <i>E. coli</i>
PA5053	<i>hslV</i>	534	18,8	100% zu HslV aus <i>E. coli</i>
PA5054	<i>hslU</i>	1.344	50,1	54% zu HslU aus <i>E. coli</i>
PA5128	<i>secB</i>	489	18,1	71% zu SecB aus <i>E. coli</i>
PA5193	<i>yrfI</i>	894	32,8	62% zu YrfI aus <i>E. coli</i>

Es konnte eine große Anzahl von Genen identifiziert werden, deren Genprodukte hohe Sequenzübereinstimmungen zu bereits beschriebenen Faltungshelfern aus anderen Bakterien aufweisen. Darunter befinden sich neben einigen molekularen Chaperonen auch Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen (PPIasen) und Disulfidbrücken-bildende-Proteine (Dsb-Proteine;

*disulfide bond formation*). Anschließend wurden Sequenzvergleiche mit den von der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz des jeweiligen *P. aeruginosa* Faltungshelfers durchgeführt, um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren.

Zusätzlich zu den molekularen Chaperonen und Hitzeschockproteinen, die bereits in *P. aeruginosa* annotiert sind, konnten in dieser Arbeit weitere Leserahmen gefunden werden, die bisher als putative Faltungshelferproteine in der *Pseudomonas*-Datenbank geführt wurden. Nach einem Homologievergleich mit ihren ermittelten Aminosäuresequenzen konnte mit Hilfe einer Funktion, die die Suche nach Proteindomänen erlaubt, weiter untersucht werden, welche solcher Domänen, die für Chaperone und Hitzeschockproteine charakteristisch sind, diese putativen Proteine enthalten. Die hierbei erhaltenen Daten sind in Tabelle C-2 aufgelistet.

**Tabelle C-2: Putative Chaperone und Hitzeschockproteine aus *P. aeruginosa*.** Über spezifische Domänen in der Proteinsequenz konnten weitere Kandidaten identifiziert werden, die für klassische Chaperone codieren könnten. Neben der Nummer des *orfs* sind Größen des Gens [bp] und des daraus resultierenden Proteins [kDa] angegeben. Die für Chaperone charakteristische Domäne ist ebenfalls angeführt.

<i>orf</i> - Nummer	Gengröße [bp]	Proteingröße [kDa]	identifizierte Proteindomäne	Ähnlichkeit [%]
PA1068	1.911	70,7	Hsp90-ATPase	47% zu HtpG aus <i>E. coli</i>
PA2725	1.884	68,8	AAA-Familie	51% zu Hsp100-Region aus <i>Trypanosoma brucei</i>
PA3365	1.116	42,1	AAA-Familie	99% zu AmiB aus <i>P. aeruginosa</i>
PA3647	507	19,1	OmpH-Domäne	48% zu Skp aus <i>E. coli</i>
PA3842	351	13,2	CesT-Chaperon Domäne	56% zu Chapeon aus <i>Yersinia pestis</i>
PA4873	1.266	46,3	Hsp70-Domäne	50% zu DnaK aus <i>Rhodobacter capsulatus</i>
PA5195	396	14,8	S4-Domäne	67% zu YrfH aus <i>E. coli</i>

Auf diese Weise konnten sieben weitere Gene identifiziert werden, welche in die Chaperon-Coexpressionsbank aufgenommen werden sollten. Bei diesen Kandidaten sind unterschiedliche Proteingruppen der molekularen Chaperone vertreten. So besitzt das putative Protein PA1068 eine Hsp90-ATPase-Domäne (Lindquist & Craig, 1988), die auch im HtpG-Protein aus *E. coli* vorliegt. Zwei weitere *orfs* (PA2725 und PA3365) weisen eine AAA- (= *ATPase associated with various cellular activities*) Domäne in ihrer abgeleiteten Proteinsequenz auf (Confalonieri & Duguet, 1995; Neuwald *et al.*, 1999), die in verschiedenen Hitzeschockproteinen vorkommt. Für den Leserahmen PA3647 konnte gezeigt werden, daß dieser eine OmpH (*outer membrane protein like*)-ähnliche Domäne besitzt. Mit diesem Kandidaten konnte ein homologes Protein zu dem periplasmatischen Chaperon Skp

aus *E. coli* identifiziert werden, das in diesem Organismus als einziges echtes periplasmatisches Chaperon beschrieben ist (Chen & Henning, 1996; Baneyx & Mujacic, 2004). Dort ist dieses Chaperon an der Reifung von Proteinen der äußeren Membran beteiligt (Schafer *et al.*, 1999). Auch das putative Protein PA3842 weist eine Homologie von 56 % zu einem bereits in *Y. pestis* beschriebenen Chaperon auf (Delahay *et al.*, 2002). Mit dem putativen Protein PA4873 konnte ein mögliches Chaperon identifiziert werden, das eine Hsp70-Domäne enthält (Bukau & Horwich, 1998), und eine Ähnlichkeit von 50 % zu dem DnaK-Protein aus *R. capsulatus* besitzt. Damit konnte neben dem in einem Operon codierten DnaK-Protein (*orf PA4761*) ein zweiter Vertreter der Hsp70-Familie in *P. aeruginosa* ermittelt werden. Schließlich konnte mit PA5195 ein putatives homologes Protein zu dem *E. coli* Protein YrfH identifiziert werden.

Eine weitere bedeutende Enzymgruppe, die an der Faltung von Proteinen beteiligt ist, vereinigt die Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen. Auch von diesen Enzymen konnten einige im Genom von *P. aeruginosa* identifiziert werden (Tab. C-3).

**Tabelle C-3: Auflistung der putativen Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen aus *P. aeruginosa*.** Die aufgeführten Gene sind bereits annotiert. Von ihnen sind sowohl die *orf*-Nummer als auch der Gennamen, Größe des Gens [bp] und Proteingröße [kDa] angegeben. Außerdem ist das bereits charakterisierte Protein aufgelistet, zu dem die höchste Sequenzübereinstimmung festgestellt wurde.

<i>orf</i> -Nummer	Gennamen	Gengröße [bp]	Proteingröße [kDa]	Ähnlichkeit [%]
PA0594	<i>surA</i>	1.293	48,5	60% zu SurA aus <i>E. coli</i>
PA0837	<i>slyD</i>	486	17,0	65% zu SlyD aus <i>E. coli</i>
PA1793	<i>ppiB</i>	498	18,1	77% zu CypB aus <i>E. coli</i>
PA1800	<i>tig</i>	1.311	48,6	72% zu TF aus <i>E. coli</i>
PA1805	<i>ppiD</i>	1.866	68,7	51% zu PPIase D aus <i>E. coli</i>
PA1996	<i>ppiC1</i>	279	10,2	68% zu PPIase C aus <i>E. coli</i>
PA3227	<i>ppiA</i>	564	20,1	73% zu PPIase A aus <i>E. coli</i>
PA4176	<i>ppiC2</i>	282	10,0	67% zu PPIase C aus <i>E. coli</i>
PA4572	<i>fklB</i>	618	21,8	67% zu FklB aus <i>E. coli</i>

Für diese Gruppe der Faltungskatalysatoren waren bereits sämtliche cytoplasmatischen und periplasmatischen Modulatoren, die in *E. coli* beschrieben sind, annotiert.

Ferner konnten fünf weitere Leserahmen in *P. aeruginosa* gefunden werden, die für Proteine dieser Enzymgruppe codieren könnten. Diese sind in Tabelle C-4 aufgeführt. In den meisten Fällen konnte eine PPIase-Domäne gefunden werden, die für den FKBP-Typ (**FK506-binding protein**) dieser Enzyme charakteristisch ist (Fischer & Schmid, 1990; Galat, 1993). Hierzu zählen die durch die *orfs PA3262, PA3717, PA4558* und *PA5254* codierten Proteine. Zwei weitere Gene konnten über die Möglichkeit, Proteindomänen zu identifizieren, gefunden

werden, deren Genprodukte eine Rotamase-Domäne aufweisen (Fischer & Schmid, 1990). Dies sind die *orfs* PA0699 und PA3871, die beide Homologien zu bereits beschriebenen und charakterisierten Proteinen aus anderen Organismen aufweisen (s. Tab. C-4).

**Tabelle C-4: Putative Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen aus *P. aeruginosa*.** Über spezifische Domänen in der Proteinsequenz konnten weitere Kandidaten identifiziert werden, die für PPIasen codieren könnten. Neben der Nummer des *orfs* sind die Größe des Gens und des daraus resultierenden Proteins angegeben. Die identifizierte Domäne und ein homologes, bereits charakterisiertes Protein sind ebenfalls erwähnt.

<i>orf</i> -Nummer	Gengröße [bp]	Proteingröße [kDa]	identifizierte Proteindomäne	Ähnlichkeit [%]
PA0699	945	33,7	Rotamase-Domäne	48% zu PPIase-Domäne aus <i>Acinetobacter sp.</i>
PA3262	762	26,8	FKBP-Typ PPIase-Domäne	62 % zu <i>fkpB</i> -Gen aus <i>E. coli</i>
PA3717	342	12,6	FKBP-Typ PPIase-Domäne	66% zu Rotamase aus <i>Neisseria meningitidis</i>
PA3871	819	30,1	Rotamase-Domäne	47% zu NifM aus <i>Azotobacter croococcum</i>
PA4558	441	16,0	FKBP-Typ PPIase-Domäne	63% zu FKBP-Typ PPIase aus <i>E. coli</i>
PA5254	630	23,0	FKBP-Typ PPIase-Domäne	51% zu FklB aus <i>E. coli</i>

Weiter konnten Gene identifiziert werden, welche für Proteine codieren, die zu der Gruppe der Dsb-Proteine zählen. Innerhalb dieser Enzymklasse wurden im Genom von *P. aeruginosa* sieben *orfs* gefunden, die für Dsb-Proteine codieren. Diese sind in Tabelle C-5 aufgeführt.

Hier sind alle für das Dsb-System notwendigen Proteine identifiziert, die für einen funktionierenden Zyklus, wie für *E. coli* (Hiniker & Bardwell, 2003; Kadokura *et al.*, 2003) oder für *P. aeruginosa* beschrieben (Urban *et al.*, 1999), notwendig sind.

**Tabelle C-5: Aufstellung der Dsb-Proteine aus *P. aeruginosa*.** Die Tabelle enthält die identifizierten Dsb-Proteine aus *P. aeruginosa*. Neben den Gennamen, *orf*-Nummern und der Gengröße, sind auch Informationen zur Größe des möglichen Genproduktes angegeben. Zusätzlich sind die Organismen mit den entsprechenden Proteinen angegeben, welche die höchste Ähnlichkeit zu dem *Pseudomonas* Protein besitzen.

<i>orf</i> -Nummer	Gename	Gengröße [bp]	Proteingröße [kDa]	Ähnlichkeit [%]
PA0538	<i>dsbB</i>	510	18,1	51% zu DsbB aus <i>E. coli</i>
PA1481	<i>ccmG</i>	543	20,1	67% zu DsbE aus <i>E. coli</i>
PA2476	<i>dsbG</i>	771	28,1	71% zu DsbG aus <i>E. coli</i>
PA3737	<i>dsbC</i>	729	26,1	58% zu DsbC aus <i>E. coli</i>
PA4845	<i>dsbD</i>	1.776	62,9	94% zu DipZ aus <i>P. aeruginosa</i>
PA5256	<i>dsbH</i>	492	17,8	51% zu DsbH aus <i>Burkholderia cepacia</i>
PA5489	<i>dsbA</i>	636	23,4	82% zu DsbA aus <i>A. vinelandii</i>

Schließlich muß noch eine Enzymgruppe erwähnt werden, deren Mitglieder an der richtigen Faltung und Herstellung von Proteinen beteiligt sind, die zum Bewegungsapparat von *P. aeruginosa* gehören. Zu dieser Gruppe können vier Kandidaten gezählt werden.

Hierbei handelt es sich um die Chaperone CupA2, CupA5 sowie CupB2 und CupB4. Auch für diese Gruppe konnte mit PA0499 zusätzlich ein Leserahmen identifiziert werden, dessen putatives Genprodukt eine für *pili assembly chaperones* charakteristische Domäne enthält (Holmgren & Branden, 1989). Die entsprechenden Gene wurden ebenfalls in die Chaperon-*Toolbox* aufgenommen.

Insgesamt konnten somit 58 unterschiedliche Leserahmen identifiziert werden, deren DNA-Sequenzen im Anhang unter G-1 zu finden sind. Unter den identifizierten Leserahmen befinden sich 53 einzelne Faltungshelfergene sowie 5 Operons.

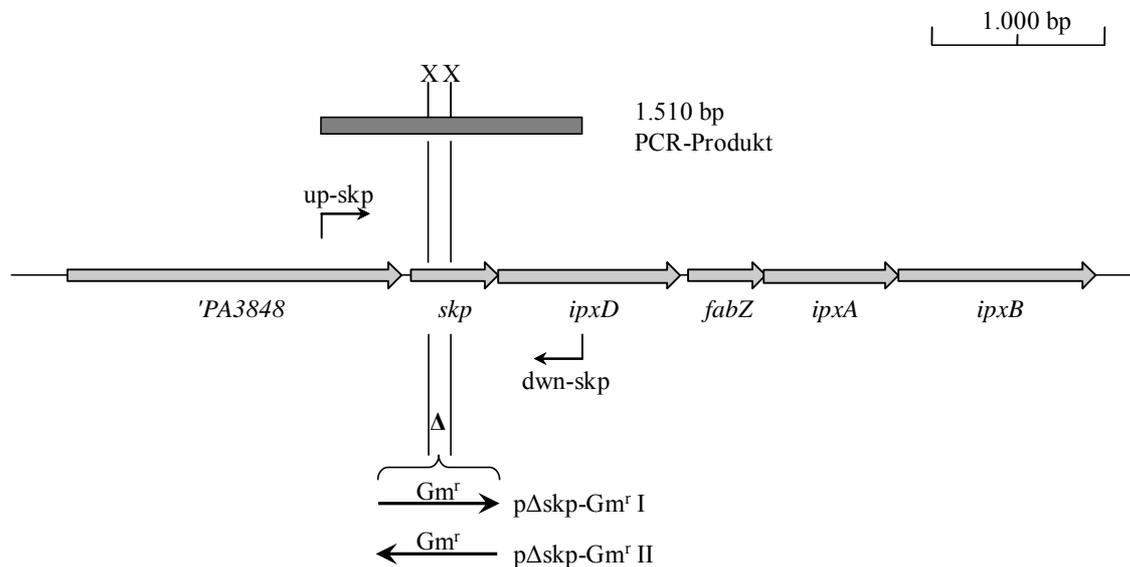
## 2 Erzeugung einer *P. aeruginosa* *skp*-Mutante

Mit Hilfe von Homologievergleichen konnten 15 Leserahmen identifiziert werden, die für mögliche weitere Faltungsmodulatoren in *P. aeruginosa* codieren können. Das putative Genprodukt des *orf* PA3647 weist Homologien zu dem einzigen echten periplasmatischen Chaperon Skp aus *E. coli* auf. Die Sequenzähnlichkeit beider Proteine liegt bei ca. 50 %. Bisher konnte in *P. aeruginosa* kein solches periplasmatisches Chaperon charakterisiert werden. Aufgrund der hohen Anzahl sekretierter bzw. in der äußeren Membran vorliegender Proteine in diesem Bakterium war es von besonderem Interesse zu untersuchen, ob dieses Gen für ein Protein mit Chaperonfunktion codiert. Aus diesem Grund sollte eine *P. aeruginosa* *skp*-Deletionsmutante hergestellt werden.

Auf dem Chromosom von *P. aeruginosa* ist der *orf* PA3647 in einer Genregion lokalisiert (s. Abb. C-1), in der viele Gene zu finden sind, die für Membranproteine (s. Abb. C-1: PA3848) oder Proteine der Zellwandsynthese, der Lipopolysaccharidschichtsynthese (LPS; siehe Abb. C-1: *ipxDAB*) oder für Kapselproteine codieren. Da in Bakterien Gene, die für bestimmte Zellfunktionen benötigt werden häufig in Genregionen geclustert vorliegen, kann diese Beobachtung ebenfalls als Hinweis gewertet werden, daß die Funktion von PA3647 eng mit der Reifung dieser Proteine zusammenhängt.

Für die Herstellung einer *skp*-Mutante in *P. aeruginosa* sollte das Wildtyp-Gen auf dem Chromosom durch ein mittels Interposoninsertion mutiertes Allel ersetzt werden. Um eine solche Mutation in das Wildtyp- (WT) Gen einbringen zu können, wurde ein rekombinantes Plasmid benötigt, welches a) mobilisierbar ist, um nach *P. aeruginosa* übertragen zu werden; b) in *P. aeruginosa* nicht repliziert wird, damit eine Integration in das Genom erfolgen muß;

und c) eine selektionierbare Interposonkassette mit ca. 500 bp großen flankierenden homologen Sequenzen besitzt, damit eine Rekombination ins Chromosom erfolgen kann. Ein Schema der Konstruktion des Mutagenesevektors für die Mutation im *orf PA3647* ist in Abbildung C-1 dargestellt.



**Abb. C-1: Schematische Darstellung der Genregion und der Lage der Interposonmutation zur Erzeugung von *skp*-Mutanten in *P. aeruginosa*.** Diese Abbildung zeigt ein Schema zur Erzeugung einer *P. aeruginosa* *skp*-Mutante. Der Maßstab der Genregion ist in Basenpaaren [bp] angegeben. Oberhalb der chromosomalen *skp*-Genregion ist eine physikalische Karte mit der Position der relevanten *Xho*I-Erkennungsstellen (X) und dem in einer PCR amplifizierten Bereich dargestellt. Die Bindestellen der Primer auf der chromosomalen DNA sind eingezeichnet (up-*skp* bzw. dwn-*skp*). Im unteren Teil der Abbildung ist gezeigt, wie die Interposonkassette einkloniert wurde (*Gm*<sup>r</sup>: Gentamycin-Resistenzkassette). Eine detaillierte Beschreibung der Klonierung erfolgt im Text.

Unter Verwendung der Primer up-*skp* und dwn-*skp* (s. B-3) konnte das 1.510 bp große DNA-Fragment amplifiziert werden. Dieses wurde anschließend in die *Eco*RV-Schnittstelle des Suizidvektors pSUP202 einkloniert. Durch die Hydrolyse mit dem Enzym *Xho*I konnte dann ein ca. 100 bp großes Fragment aus dem putativen *skp*-Gen deletiert und durch eine *Gm*-Resistenzkassette aus dem Vektor pBSL141 ersetzt werden. Dabei konnte das Interposon in zwei Orientierungen in dem mutierten Gen vorliegen. Entweder wird es in derselben Richtung wie das mutierte Gen transkribiert, so daß alleine dieses Gen mutiert ist, mögliche stromabwärts gelegene Gene allerdings transkribiert werden können (apolare Mutation, pΔ*skp*-*Gm*<sup>r</sup>I), oder das Interposon ist so in das zu untersuchende Gen inseriert, daß auch nachgeschaltete Gene eines möglichen Operons nicht mehr transkribiert werden können (polare Mutation, pΔ*skp*-*Gm*<sup>r</sup>II).

Im nächsten Schritt mußten die Mutagenesekonstrukte in den *P. aeruginosa* Wildtypstamm übertragen werden. Zur Selektion von Bakterien, die das Hybridplasmid ins Chromosom

integriert haben, wurden Gm-haltige Agarplatten verwendet. Trotz zahlreicher Wiederholungen der Kreuzungen, konnten keine Exkonjuganten erhalten werden. Daraufhin wurden die Konjugationen erneut durchgeführt, die Zellen dann allerdings auf Cm-haltiges Medium ausgebracht, um Bakterienklone zu selektionieren, die nur das erste Rekombinationsereignis durchgeführt hatten. Anschließend wurde mit einigen erhaltenen Kolonien eine Anreicherung durchgeführt, wodurch das zweite Rekombinationsereignis erzielt werden sollte. Auf diese Weise konnten wenige Kolonien erhalten werden, die das gewünschte Antibiotogramm aufwiesen. Mit diesen wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, die aufzeigte, daß bei allen Kandidaten das Wildtyp-Gen vorlag. Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine *skp*-Mutante erzeugt werden.

### 3 Erstellen einer Chaperon-Genexpressionsbank

Ziel dieser Arbeit war die Erstellung einer Genexpressionsbank (*Toolbox*), in der möglichst viele unterschiedliche Plasmide enthalten waren, die zum einen über einzelne Faltungshelfer oder Chaperonsysteme und zum anderen über möglichst viele randomisierte Kombinationen von jeweils drei Faltungsmodulatoren auf einem Expressionsplasmid verfügten. Diese Plasmidbank sollte anschließend dazu verwendet werden, Coexpressionsversuche mit solchen Zielgenen durchzuführen, die bei klassischen Überexpressionsversuchen nur geringe Ausbeuten ergeben oder bei deren Expression große Mengen Protein in Form von *Inclusion bodies* (unlösliche Proteinaggregate) akkumulierten.

Da die Klonierungsstrategie bei der Konstruktion dieser Genexpressionsbank sehr kompliziert war, soll im Folgenden ein Überblick über die Strategie gegeben werden, bevor die einzelnen Klonierungsschritte in den nachfolgenden Kapiteln näher erläutert werden. In Abbildung C-2 sind die verschiedenen Klonierungsschritte aufgeführt.

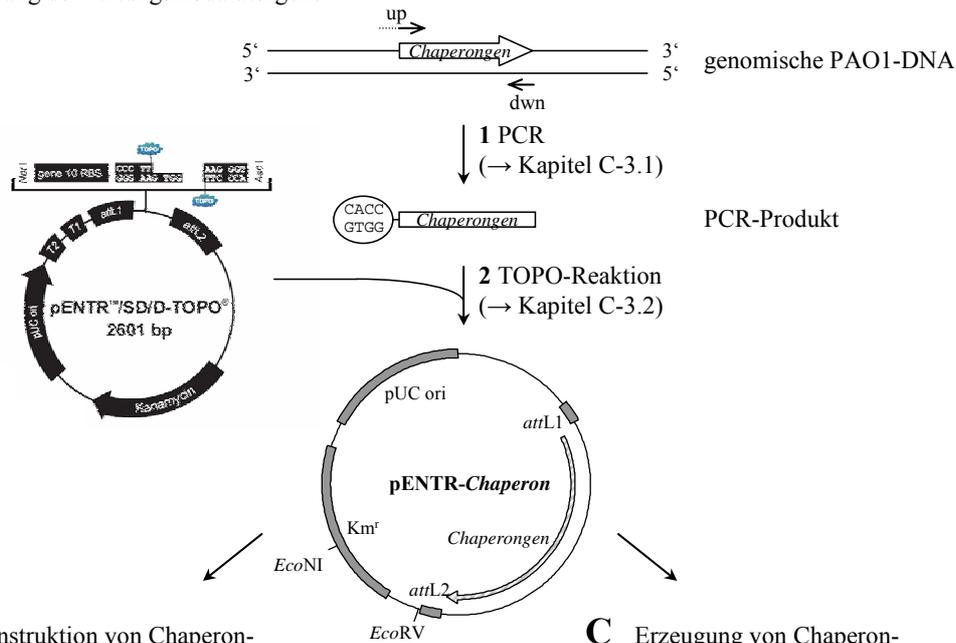
Nach Identifikation von Genen, die für molekulare Chaperone oder Foldasen codieren, mußten diese aus dem Genom von *P. aeruginosa* isoliert (s. Abb. C-2, **A.1**; Details in Kapitel C-3.1) und in den Zielvektor pENTR/SD/D-TOPO eingebracht werden (Abb. C-2, **A.2**; Kapitel C-3.2), was in der Erzeugung der jeweiligen pENTR-*Chaperon*-Vektoren resultierte.

Nachdem die DNA-Sequenzen verifiziert waren, wurden die erzeugten pENTR-*Chaperon*-Plasmide für unterschiedliche weitere Klonierungsschritte verwendet. Zunächst wurden diese Plasmide in eine Rekombinationsreaktion eingesetzt, um so in den Expressionsvektor pVLT31 übertragen zu werden (Abb. C-2, **B**; Kapitel C-3.3). Die so erzeugten Expressionsvektoren, auf denen die Gene der verschiedenen, einzelnen Faltungshelfer lokalisiert waren, konnten in Coexpressionsversuche eingesetzt werden.

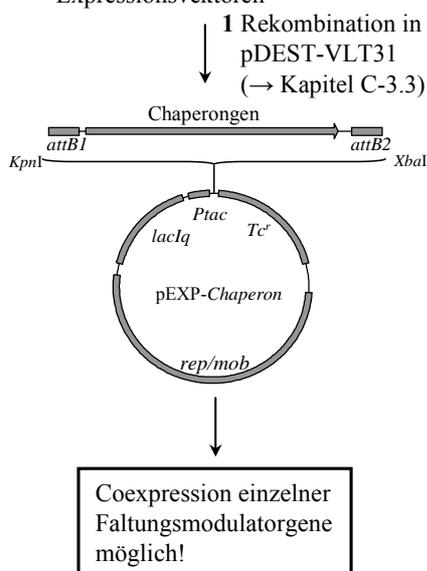
Die konstruierten pENTR-*Chaperon*-Plasmide (s. Abb. C-2, **A**) sollten außerdem dazu verwendet werden, Plasmide mit Kombinationen aus Faltungsmodulatoren herzustellen (Abb. C-2, **C**). Zunächst wurden diese Plasmide daher als Vorlage in Polymerasekettenreaktionen eingesetzt, in denen die jeweiligen Chaperongene mit alternativen *att*-Erkennungsstellen, zur Verwendung in *Multisite*-Rekombinationsreaktionen, erzeugt werden sollten (s. Abb. C-2; **C.1** bzw. Details in Kapitel C-3.4.1).

Danach wurden sie mit Hilfe von BP-Rekombinationsreaktionen (s. Kapitel B-7) in geeignete pDONR-Vektoren eingebracht (s. Abb. C-2, **C.2**). Zusammen mit einem der zu Beginn der Klonierungen erzeugten pENTR-*Chaperon*-Plasmiden wurde je ein pENTR-*Chaperon*-5'- und ein pENTR-*Chaperon*-3'-Plasmid in eine LR-Plus-Rekombinationsreaktion eingesetzt (s. Abb. C-2, **C.3**; Kapitel C-3.4.2).

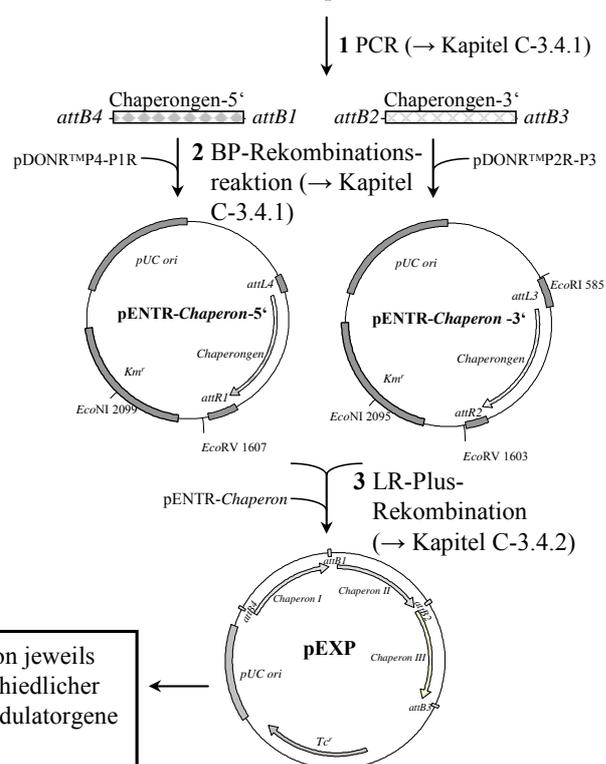
**A** Klonierung der Faltungsmodulatorgene



**B** Konstruktion von Chaperon-Expressionsvektoren



**C** Erzeugung von Chaperon-Multisite-Expressionsvektoren



**Abb. C-2: Übersicht über die Klonierungsstrategie zur Erzeugung einer Chaperon-Genexpressionsbank.** Die Abbildung ist in drei Punkte unterteilt. Unter **A** ist die Amplifikation und Klonierung der Faltungshelfergene dargestellt. **B** beschreibt die Konstruktion von Expressionsvektoren mit einzelnen Chaperon- und Faltungskatalysatorgenen und **C** zeigt die Schritte zur Erzeugung von *Multisite*-Plasmiden, auf denen drei unterschiedliche Faltungsmodulatorgene auf einem Vektor vorliegen. Nähere Beschreibungen der Abbildung erfolgen im Text. Die einzelnen Klonierungsschritte werden in den nachfolgenden Kapiteln detailliert erläutert.

Auf diese Weise wurde ein *Multisite*-Expressionsvektor erzeugt, auf dem drei unterschiedliche Gene, die für Chaperone oder Faltungskatalysatoren codieren, vorlagen. Die erzeugten *Multisite*-Expressionsvektoren wurden ebenfalls in Coexpressionsversuche eingesetzt (s. Abb. C-2; C.4).

### 3.1 Amplifikation der identifizierten Gene

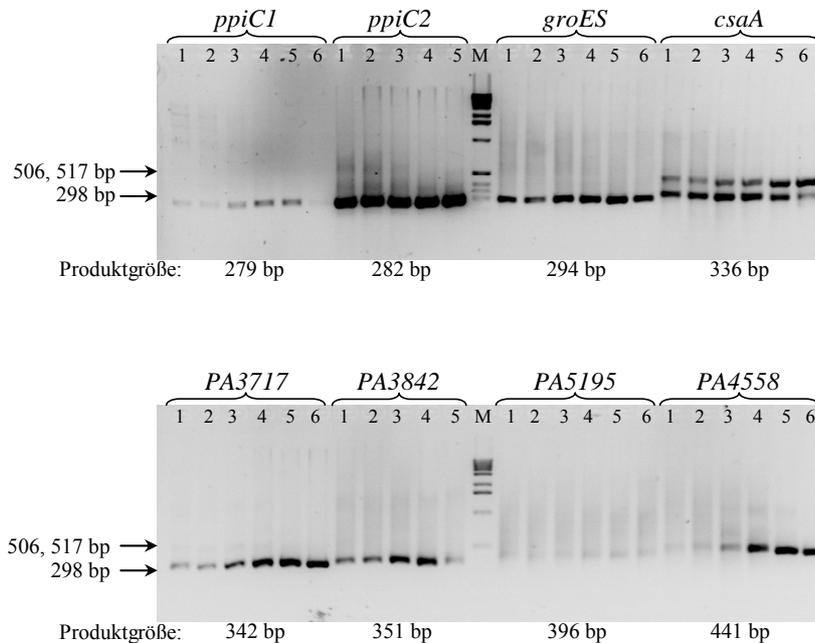
Nach Identifikation der putativen Chaperon- und Faltungskatalysatorgene in *P. aeruginosa* sollten diese aus dem Chromosom des Wildtyp Stammes PAO1 isoliert werden. Dazu wurden diese Gene mittels PCR amplifiziert. Die Oligonukleotide (s. Tab. B-3) zur Amplifikation sämtlicher Gene wurden so gewählt, daß ein DNA-Fragment erzeugt werden konnte, welches ein Gen vom Start- bis zum Stop-Codon enthielt. Außerdem wurde an das 5'-Ende der Primer, die an den stromaufwärts gelegenen DNA-Bereich binden, eine Topoisomerase-Erkennungssequenz aus den vier Basen CACC angefügt, wodurch eine spätere Ein-Schritt-Klonierung mit dem TOPO-Klonierungskit der Firma Invitrogen (Karlsruhe) ermöglicht werden sollte.

Um die unterschiedlichen Gene und die entsprechenden Operons der Chaperonsysteme zu amplifizieren, wurden Polymerasekettenreaktionen, wie unter B-10 beschrieben, durchgeführt. Dazu wurden für jedes notwendige PCR-Produkt zwölf parallele Reaktionen angesetzt. Die jeweiligen Ansätze unterschieden sich nicht im Reaktionsansatz, sondern ausschließlich in der gewählten Primerbindetemperatur. Mit jeder durchgeführten Reaktion sollten acht verschiedene Gene parallel aus dem Chromosom von *P. aeruginosa* amplifiziert werden, die hinsichtlich ihrer Produktgrößen in etwa gleich groß waren.

Im Anschluß an die durchgeführten Reaktionen wurde für jedes PCR-Produkt und jede Reaktionsbedingung ein Aliquot von 5 µl des Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und somit die Größe und DNA-Menge bestimmt. In Abbildung C-3 sind exemplarisch zwei solche Agarosegele gezeigt, auf denen die Proben unterschiedlicher Amplifikationsreaktionen aufgetragen wurden. Bei den aufgeführten Beispielen sollten kleine PCR-Produkte von 280 bp bis 445 bp aufgetrennt werden.

Die Amplifikation der verschiedenen DNA-Fragmente aus der genomischen DNA von *P. aeruginosa* PAO1 verlief unterschiedlich gut. Konnte das gewünschte PCR-Produkt nicht erzeugt werden (s. Abb. C-3: *PA5195*), wurde die Reaktion erneut durchgeführt, wobei unterschiedliche Parameter variiert werden konnten. Dazu zählen unter anderem die Annealingtemperatur, die Elongationszeit oder die Zyklusanzahl. So wurden einige PCR-Produkte mit geringen (s. Abb. C-3: *ppiC1*), moderaten (z.B. *groES* oder *PA3717*) oder mit

hohen Ausbeuten (s. Abb. C-3: *ppiC2*) erzeugt. In anderen Reaktionen entstanden neben dem gewünschten Produkt auch nicht gewünschte Nebenprodukte. Dies ist in Abb. C-3 für das Gen *csaA* gezeigt, in dem neben der richtigen Produktgröße von 336 bp ein weiteres, zu großes PCR-Produkt sichtbar ist.



**Abb. C-3: Überprüfung der durchgeführten Amplifikationsreaktionen auf einem Agarosegel.** Exemplarisch sind die Nachweise für acht Gene dargestellt. Jeweils 5 µl des Reaktionsansatzes wurden auf das Gel aufgetragen. Die *orf*-Nummer bzw. der Gennamen sowie die erwarteten Produktgrößen (bp) sind entsprechend den aufgetragenen Proben angegeben. Die unterschiedlichen Proben unterscheiden sich in der verwendeten Annealingtemperatur. Spur 1 = 50°C, Spur 2 = 51,4°C, Spur 3 = 55,5°C, Spur 4 = 60,8°C, Spur 5 = 66°C, Spur 6 = 69,7°C. Der 1kb-Marker (M) ist als Größenstandard aufgetragen, wobei die Position von 506, 517 bp bzw. 298 bp durch Pfeile angedeutet ist.

Schließlich konnten insgesamt 55 Polymerasekettenreaktionen erfolgreich durchgeführt und die PCR-Produkte in die nachfolgende Klonierungsreaktion eingesetzt werden.

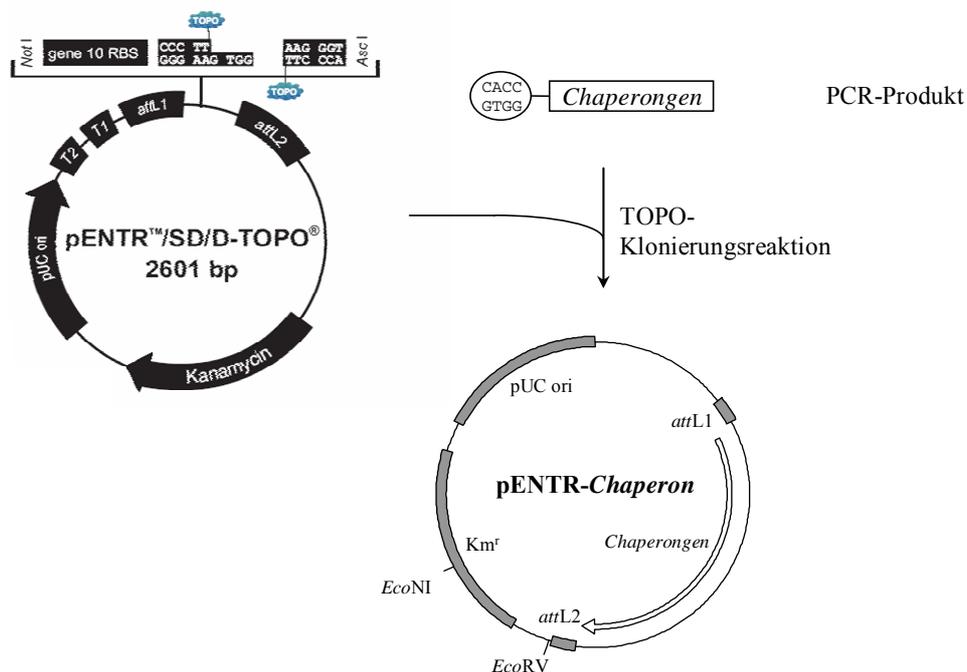
Die Gene der bedeutenden molekularen Chaperone und Chaperonsysteme, z.B. *groELS* oder *dnaKJ* bzw. *grpE-dnaKJ*, die Gene, welche für weitere PPIasen codieren, wie das *tig*-Gen, und die Gene, welche für Vertreter der Dsb-Proteine codieren, lagen schließlich in aufgereinigter Form vor und konnten in einen geeigneten Klonierungsvektor eingebracht werden. In Kapitel C-3.4.1, Tabelle C-6, sind die Ergebnisse der durchgeführten Polymerasekettenreaktionen zusammengefaßt (Tab. C-6: „PCR“). Konnte das PCR-Produkt nicht erzeugt werden, ist das entsprechende Feld frei. War die PCR des jeweiligen DNA-Fragmentes erfolgreich, ist dies durch ein Kreuz (X) hervorgehoben.

### 3.2 Klonierung der Faltungshelfergene

Zum Einbringen der erzeugten PCR-Produkte, welche die Chaperon- und Faltungskatalysatorgene aus *P. aeruginosa* tragen, in einen geeigneten Klonierungsvektor wurde das „pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Der Vorteil an diesem Klonierungssystem ist, daß alle Gene vom Start- bis zum Stopcodon isoliert und auf gleiche Weise kloniert werden konnten, ohne für jedes Zielgen eine geeignete Strategie ausarbeiten zu müssen. Diese Methode basiert auf dem Einsatz des Enzyms Topoisomerase I aus dem Virus *Vaccinia*, das einen der beiden Stränge der doppelsträngigen DNA an spezifischen Stellen öffnen kann (Shuman, 1991). Dabei wird die durch das geöffnete Phosphodiesterückgrat frei werdende Energie durch eine kovalente Bindung an den Rest Tyr-274 der Topoisomerase I konserviert. Durch Hinzufügen eines 5'-Hydroxy-DNA-Endes kann die Bindung zum Enzym wieder aufgehoben und auf das DNA-Fragment übertragen werden (Shuman, 1994). Mit Hilfe dieses Einschritt-Klonierungs-Systems sollten die erhaltenen PCR-Produkte in den Vektor pENTR/SD/D-TOPO eingebracht werden. Dieser Vektor besitzt neben den Rekombinationsstellen *attL1* und *attL2*, die später von Bedeutung sein werden, ein Kanamycin-Resistenzgen, eine für Bakterien geeignete Ribosomenbindestelle (RBS) sowie einen ColE1-Replikationsursprung, welcher eine Replikation mit hoher Kopienzahl in *E. coli* ermöglicht. An dem im Kit mitgelieferten pENTR/SD/D-TOPO-Vektor ist das Enzym Topoisomerase I bereits kovalent an dem spezifischen GTGG-Überhang gebunden. Dadurch wird eine gerichtete Klonierung der PCR-Fragmente in diesen Vektor ermöglicht. Eine schematische Darstellung der durchgeführten Klonierung ist in Abbildung C-4 gezeigt (siehe auch Abb. C-2, A.2). Auf diese Weise sollten alle erzeugten PCR-Produkte in den Zielvektor pENTR/SD/D-TOPO eingebracht werden.

Nach Durchführung der Klonierungsreaktion (s. B-7) und erfolgreicher Transformation von *E. coli* TOP10-Zellen, konnten einige Klone auf den Erhalt des gewünschten Plasmides überprüft werden. Dazu wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit geeigneten Restriktionsendonukleasen überprüft. In der Regel wurden dazu die Enzyme *Eco*NI oder *Eco*RV verwendet. Konnte ein gewünschtes Plasmid auf diese Weise nachgewiesen werden, wurde der rekombinante Vektor anschließend mit den Primern *M13 forward* und *M13 reverse* sequenziert (Sequierserve, Vaterstetten). Dadurch wurde die korrekte Sequenz des jeweiligen Chaperon-Gens verifiziert. Erst dann wurde mit den entsprechenden rekombinanten Plasmiden weiter gearbeitet; alle erzeugten PCR-Produkte konnten so in den Zielvektor pENTR/SD/D-TOPO eingebracht werden. Die hergestellten Plasmide wurden als pENTR- mit dem jeweiligen Namen des einklonierten Faltungshelfergens bezeichnet, zum Beispiel

pENTR-tig. In Tabelle C-6 (Kapitel C-3.4.1) sind unter „pENTR-“, die erfolgreich hergestellten pENTR-Plasmide durch ein Kreuz (X) markiert.



**Abb. C-4: Schematische Darstellung der Klonierung von Chaperon- und Faltungshelfergenen in den Vektor pENTR/SD/D-TOPO.** Nach erfolgreicher Amplifikation der Chaperongene mit der Sequenz CACC am 5'-Ende des jeweiligen Gens, konnten die aufgereinigten PCR-Produkte in die Reaktion mit dem Zielvektor eingesetzt werden. Dabei wurde das jeweilige Gen gerichtet in den Vektor inseriert und das erzeugte Produkt wurde als pENTR- mit dem entsprechenden Namen des inklonierten Gens bezeichnet (Bsp.: pENTR-tig).

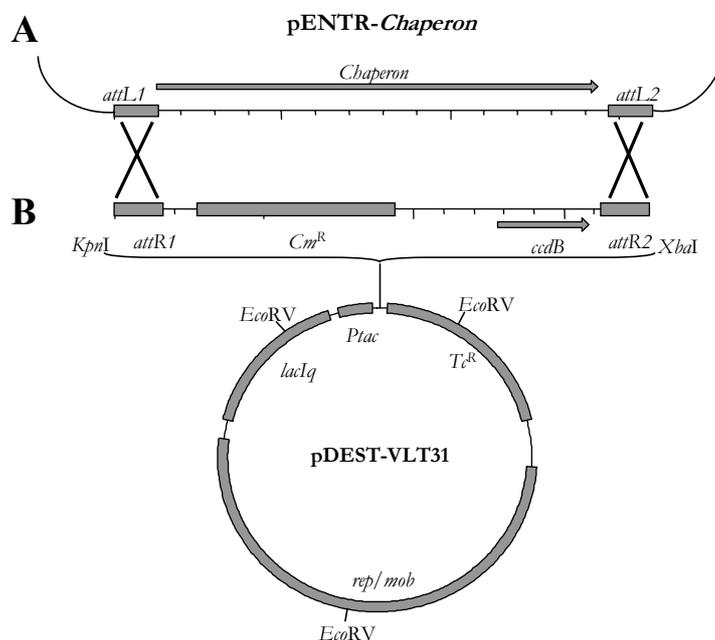
### 3.3 Konstruktion von Expressionsplasmiden

Im Anschluß an die erfolgreiche Klonierung der Faltungshelfergene in den pENTR-Vektor konnten die erzeugten Plasmide dazu verwendet werden Expressionsvektoren herzustellen. Dabei wurde die „Gateway“-Technologie der Firma Invitrogen (Karlsruhe) angewandt. Dieses System beruht auf Mechanismen der homologe Rekombination, die für den Bakteriophagen Lambda sehr gut beschrieben sind (Landy, 1989).

Um diese Klonierungsmethode anwenden zu können, mußte der gewünschte Zielvektor dergestalt verändert werden, daß eine *Destination*-Kassette in diesen Vektor eingebracht wurde. Diese Kassette konnte aus dem Vektor pGATrfA (s. Tab. B-2) isoliert und über die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *XbaI* in den Vektor pVLT31 (s. Tab. B-2) inkloniert werden. Das daraus resultierende Plasmid wird im Folgenden als pDEST-VLT31 bezeichnet.

Der Expressionsvektor pVLT31 wurde für diese Anwendung ausgewählt, da er sowohl einen induzierbaren *tac*-Promotor besitzt, als auch ein Shuttlevektor ist, der in *E. coli* ebenso wie in *P. aeruginosa* und weiteren Gram-negativen Bakterien stabil repliziert werden kann. So kann die Chaperon-*Toolbox* später in einem breiten Spektrum von Expressionsstämmen eingesetzt werden. Durch die eingebrachte *Destination*-Kassette erhält der Vektor zu seiner Tetracyclin-Resistenz ( $Tc^r$ ) eine zusätzliche Chloramphenicol-Resistenz ( $Cm^r$ ) und das Gen *ccdB*. Das *ccdB*-Gen codiert für einen Gyrasehemmer, der in herkömmlichen Klonierungsstämmen, wie dem Stamm *E. coli* TOP10, zu einer Veränderung der DNA-Topologie führt, indem es mit der DNA-Topoisomerase II (Produkt des *ccdA*-Gen) interagiert. Dadurch sind die Zellen nicht lebensfähig (Bernard & Couturier, 1992; Miki *et al.*, 1992). Flankierend besitzt dieses DNA-Fragment die beiden Rekombinationsstellen *attR1* und *attR2*. Für die Konstruktion des pDEST-VLT31-Vektors mußte der *E. coli* Stamm DB3.1 verwendet werden. Dieser kann trotz Expression des *ccdB*-Gens überleben, da durch eine Mutation in dem *ccdA*-Gen, das für die Topoisomerase II codiert, das CcdB-Protein nicht wirken kann.

Nachdem der Zielvektor pDEST-VLT31 erfolgreich hergestellt werden konnte, wurden Rekombinationsreaktionen mit den in Kapitel C-3.2 erzeugten pENTR-Plasmiden durchgeführt. Der Ablauf einer solchen Reaktion ist in Abbildung C-5 schematisch dargestellt.



**Abb. C-5: Reaktionsschema der Rekombination von Zielgenen in den Expressionsvektor pDEST-VLT31.** Im oberen Teil der Abbildung (A) ist ein Ausschnitt des pENTR-Vektors mit dem Gen des Chaperons dargestellt, das von den Erkennungsstellen *attL1* und *attL2* flankiert wird. Darunter (B) ist der Zielvektor pDEST-VLT31 dargestellt, der die Rekombinationsstellen *attR1* und *attR2* besitzt. Durch Zugabe des LR-Enzymmixes (Invitrogen) findet an diesen Stellen eine spezifische Rekombination statt (symbolisiert durch ein schwarzes X), wodurch die *Destination*-Kassette im pDEST-VLT31 durch das Chaperongen ersetzt wird.

Durch Zugabe eines Mixes aus unterschiedlichen Rekombinationsenzymen, wie dem *E. coli* *Integration Host Factor* (IHF) und der  $\lambda$  Integrase, erfolgt an kompatiblen Erkennungsstellen eine Rekombination, wobei es immer zwischen einer *attL*- und einer *attR*-Stelle mit gleicher Ziffer zur Rekombination kommt, und eine *attB*-Erkennungsstelle daraus resultiert. Werden die beiden Vektoren pDEST-VLT31 und pENTR-*Chaperon* zusammen mit dem Enzymmix inkubiert, wird die *Destination*-Kassette durch das Faltungshelfergen ersetzt.

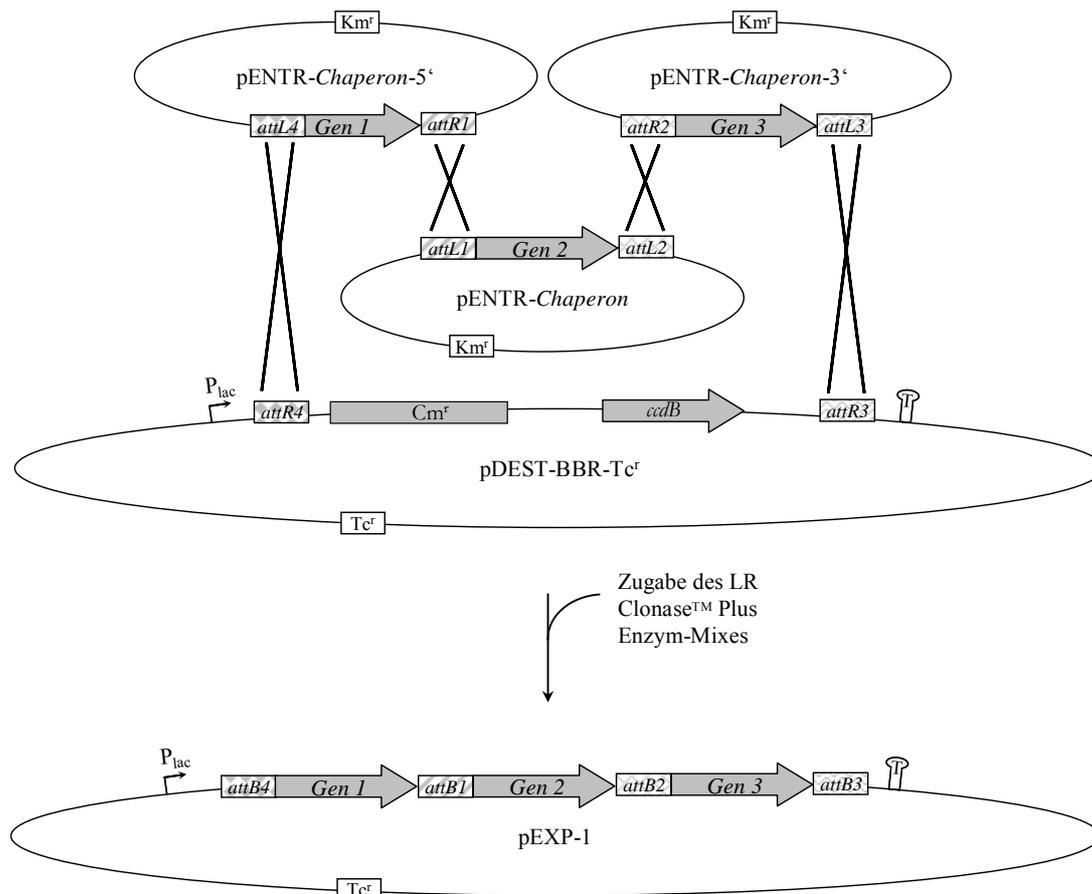
Im Anschluß an die Reaktion wurde ein Aliquot der Ansätze in den Stamm *E. coli* TOP10 transformiert und die erhaltenen Klone weiter untersucht. Da die Expression des *ccdB*-Gens für TOP10-Zellen letal ist, wird eine positive Selektion dieser Rekombination ermöglicht. Um falsch-positive Klone auszuschließen, wurde zusätzlich auf den Verlust der Cm-Resistenz selektiert, bevor die Plasmid-DNA isoliert und in Restriktionsanalysen mit den Enzymen *KpnI* und *XbaI* untersucht wurde.

So konnten 47 Expressionsplasmide konstruiert werden (siehe Tab. C-6; s. „pEXP-einzeln“), die einzelne Gene oder Operons von Faltungshelfern aus *P. aeruginosa* enthielten. Bei acht weiteren Genen konnte bisher noch keine Rekombination nachgewiesen werden.

### 3.4 Herstellung von *Multisite*-Expressionsplasmiden

Am Faltungsprozeß eines Proteins sind in der Regel mehrere unterschiedliche Faltungsmodulatoren beteiligt. Welche dies genau sind und wie oft ein Protein mit einem Chaperon oder Faltungskatalysator in Kontakt kommt bevor die native Konformation erreicht wird, ist nicht vorhersagbar. Daher war das Ziel in dieser Arbeit, eine Chaperon-Genexpressionsbank zu konstruieren, in der möglichst viele verschiedene Faltungsmodulatoren vorliegen. Da Chaperone und Foldasen bei Faltungsprozessen in der Regel sukzessive wirken, sollten insbesondere Plasmide für diese *Toolbox* konstruiert werden, mit deren Hilfe die Gene von mehreren Faltungshelfern gleichzeitig in einer Zelle zusammen mit dem Zielgen coexprimiert werden können.

Dazu sollte das „MultiSite Gateway<sup>TM</sup> Three-Fragment Vector Construction Kit“ der Firma Invitrogen eingesetzt werden, das nach Angaben des Herstellers angeblich eine schnelle und effiziente Klonierung von drei unterschiedlichen DNA-Fragmenten in einen gemeinsamen Vektor ermöglichen soll. Das hierbei zugrunde liegende System beruht ebenfalls auf dem Prinzip der homologen Rekombination, das vom Bakteriophagen Lambda abgeleitet wurde. Mit Hilfe dieses Kits sollte also eine Plasmidbank erzeugt werden, welche die Expression von jeweils drei unterschiedlichen Faltungshelfergenen erlaubt.



**Abb. C-6: Rekombinationsschema zur Erzeugung von Plasmiden mit mehreren hintereinander geschalteten Genen.** Die drei Ausgangsvektoren sind im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Dabei unterscheiden sie sich hinsichtlich der beiden an den Genenden vorliegenden Erkennungsstellen, die zur Rekombination benötigt werden. Das erste Gen der späteren Kombination liegt im Vektor pENTR-Chaperon-5', das letzte Gen im Vektor pENTR-Chaperon-3' vor. Die spätere mittlere Position nimmt das Gen aus dem Vektor pENTR-Chaperon ein. Alle pENTR-Vektoren weisen eine Kanamycin-Resistenz ( $Km^r$ ) auf. Der Zielvektor ist pDEST-BBR-Tc<sup>r</sup>. Dieser besitzt einen induzierbaren *lac*-Promotor, einen Terminator der Transkription (T) und die *Destination*-Kassette aus einem Cm-Resistenzgen und dem *ccdB*-Gen. Der nach Zugabe des Enzym-Mixes aus der Reaktion resultierende Expressionsvektor enthält alle drei hintereinander organisierten Interessengene und wird als pEXP bezeichnet.

In Abbildung C-6 ist eine Übersicht gegeben, auf welche Weise die Kombination von drei unabhängigen Genen in einem einzigen Zielvektor möglich wird, wodurch in dieser Arbeit insgesamt drei unterschiedliche Chaperone oder Faltungskatalysatoren in einen Vektor hintereinander kloniert wurden.

Die auf drei unterschiedlichen pENTR-Vektoren vorliegenden Gene werden von jeweils unterschiedlichen Rekombinationsstellen flankiert (pENTR-5' = *attL4* und *attR1*; pENTR = *attL1* und *attL2*; pENTR-3' = *attR2* und *attL3*). Zusätzlich wird ein vierter Vektor in die Reaktion eingesetzt, der neben der in Kapitel C-3.3 beschriebenen *Destination*-Kassette die beiden Erkennungsstellen *attR4* und *attR3* und einen induzierbaren *lac*-Promotor besitzt.

Werden diese Vektoren zusammen mit dem Enzymmix der Firma Invitrogen inkubiert, kommt es zur Rekombination zwischen kompatiblen *att*-Stellen, wobei es immer zwischen einer *attL*- und einer *attR*-Stelle mit der gleichen Ziffer zur Rekombination kommt (s. Abb. C-6). Schließlich erhält man einen Vektor, in dem die drei Zielgene in der gewünschten Reihenfolgen hintereinander angeordnet und lediglich durch die resultierenden *attB*-Stellen voneinander getrennt sind. Die erzeugten Expressionsvektoren werden als pEXP bezeichnet und erhalten fortlaufende Nummern.

In den folgenden Abschnitten wird die Konstruktion der verschiedenen pEXP-Plasmide im Detail erläutert.

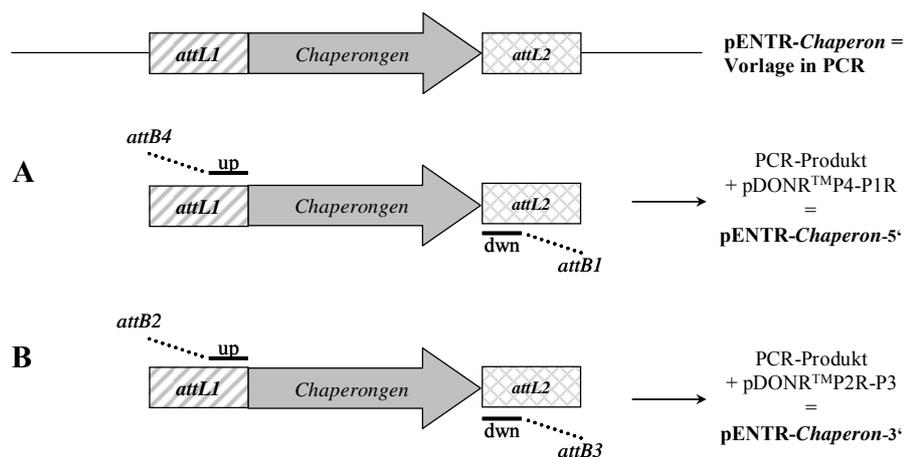
### 3.4.1 Konstruktion der Ausgangsvektoren für *Multisite*-Rekombinationen

Um eine Kombination drei verschiedener Gene in einem Zielplasmid erzeugen zu können, mußten zunächst die notwendigen Ausgangsvektoren konstruiert werden. Dazu mußte a) das Expressionsplasmid pBBR1MCS-3 mit der *attR4R3-Destination*-Kassette versehen werden, welches dann als Zielvektor in die Rekombinationsreaktion eingesetzt werden konnte. Vorteile dieses Plasmides sind, daß es in verschiedenen Gram-negativen Bakterien repliziert werden kann, und, daß Gene so einkloniert werden können, daß ihre Expression durch einen induzierbaren *lac*-Promotor reguliert werden kann. Außerdem mußte b) die 1.704 bp große *Destination*-Kassette aus dem Plasmid pDEST<sup>TM</sup>R4-R3 isoliert werden. Dazu wurden die beiden Primer *ccdBattR4-up* und *ccdBattR3-dwn* (s. Tabelle B-3) verwendet. Nach erfolgreicher Aufreinigung des erhaltenen PCR-Produktes konnte dieses in die *Sma*I-Erkennungsstelle des Shuttlevektors pBBR1MCS-3 kloniert werden. Im Anschluß daran wurde das Konstrukt in *E. coli* TOP10-Zellen eingebracht und positive Klone auf Tc- und Cm-haltigem LB-Medium selektioniert. Dann wurde die Plasmid-DNA aus einigen der erhaltenen Stämme isoliert und durch Hydrolyse mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verifiziert.

Die Klonierung war erfolgreich und es wurde mit dem Plasmid weiter gearbeitet, in das die Zielgene unter die Kontrolle des *lac*-Promotors kloniert werden konnten; dieser Vektor wird im Weiteren pDEST-BBRTc-R4R3 genannt.

Neben dem späteren Zielvektor mußten für die angestrebten Rekombinationsreaktionen die unterschiedlichen pENTR-Vektoren erzeugt werden. Die Vektoren, welche die Gene enthalten, die nachher das mittlere Gen liefern sollten, wurden bereits erfolgreich konstruiert, sie entsprechen den pENTR-*Chaperon*-Konstrukten aus Kapitel C-3.2. Bei diesen Vektoren liegen die klonierten Gene zwischen den *att*-Stellen *L1* und *L2*. Für die Konstruktion der

beiden weiteren pENTR-Vektoren mußten die Zielgene mit anderen Erkennungsstellen reamplifiziert werden. Um die Gene der Chaperone und Faltungskatalysatoren mit den Sequenzen für *attL4* und *attR1* klonieren zu können, mußten sie in den Vektor pDONR<sup>TM</sup>P4-P1R eingebracht werden. Damit die Rekombinationsstellen *attR2* und *attL3* neben den Zielgenen vorlagen, mußten diese in den Vektor pDONR<sup>TM</sup>P2R-P3 kloniert werden. Für beide Klonierungen mußten die Gene mit entsprechenden Erkennungsstellen amplifiziert, aufgereinigt und über eine BP-Rekombinationsreaktion in die beiden pDONR-Vektoren eingebracht werden. Deshalb wurden Primer gewählt, die teilweise homolog zu Bereichen des bereits vorhandenen pENTR-Vektors waren und zusätzlich die für die Rekombinationsreaktion essentiellen *att*-Stellen aufwiesen. Für die Klonierungen der Vektoren pENTR-*Chaperon-5'* mußten die Sequenzen für *attB4* und *attB1* an das PCR-Produkt angefügt werden, um in den Vektor pDONR<sup>TM</sup>P4-P1R eingebracht werden zu können (Abb. C-7, A). Für die Vektoren pENTR-*Chaperon-3'* waren es die *attB2* und *attB3* Erkennungsstellen (Abb. C-7, B; s. auch: Abb. C-2, C.1).



**Abb. C-7: Anfügen von verschiedenen *att*-Stellen an die Gene von Faltungshelfern aus den verfügbaren pENTR-Plasmiden mittels PCR.** Die in pENTR-Vektoren vorliegenden Chaperongene dienen als Vorlage für eine PCR, in der veränderte Erkennungssequenzen stromauf- und stromabwärts der Gene angebracht werden müssen. Die verwendeten Primer enthalten daher am 5'-Ende die Sequenzen für die alternativen *att*-Erkennungsstellen (gestrichelte Linie) und einem zum Vektoranteil homologen Sequenzbereich (durchgehende Linie). Je nach späterer Orientierung im *Multisite*-Vektor müssen die Gene in den Vektor pDONR<sup>TM</sup>P4-P1R (→ pENTR-*Chaperon-5'* (A)) bzw. in den Vektor pDONR<sup>TM</sup>P2R-P3 (→ pENTR-*Chaperon-3'* (B)) inkloniert werden. Die dafür notwendigen *att*-Stellen sind angegeben.

Mit den Primern AttB4-5'-up und AttB1-5'-dwn konnten die PCR-Produkte amplifiziert werden, die in einer anschließenden Reaktion in den Vektor pDONR<sup>TM</sup>P4-P1R eingebracht werden sollten. Die daraus resultierenden Plasmide wurden als pENTR-5' bezeichnet. Das Primerpaar AttB2-3'-up und AttB3-3'-dwn wurde zur Konstruktion von pENTR-3'-

Plasmiden eingesetzt.

**Tabelle C-6: Zusammenfassung der erfolgreich durchgeführten Polymerasekettenreaktionen und Klonierungsschritte zur Erzeugung einer Chaperon-Genexpressionsbank.** Erfolgreich durchgeführte Polymerasekettenreaktionen und Klonierungen sind durch ein X gekennzeichnet.

orf	Name	PCR	pENTR-	pEXP-einzeln	PCR-5'	pENTR-5'	PCR-3'	pENTR-3'
PA0499		X	X	X			X	X
PA0538	<i>dsbB</i>							
PA0594	<i>surA</i>	X	X	X	X	X	X	X
PA0699		X	X	X			X	X
PA0837	<i>slyD</i>	X	X	X	X	X	X	X
PA1068		X	X	X			X	X
PA1481	<i>ccmG</i>	X	X	X			X	X
PA1596	<i>htpG</i>	X	X	X				
PA1793	<i>ppiB</i>	X	X	X	X	X	X	X
PA1800	<i>tig</i>	X	X	X	X	X	X	X
PA1801	<i>clpP</i>							
PA1802	<i>clpX</i>	X	X	X			X	X
PA1801&02	<i>clpPX</i>							
PA1805	<i>ppiD</i>	X	X	X			X	X
PA1996	<i>ppiC1</i>	X	X	X	X	X	X	X
PA2129	<i>cupA2</i>	X	X	X	X	X	X	X
PA2132	<i>cupA5</i>	X	X					
PA2476	<i>dsbG</i>	X	X	X			X	X
PA2614	<i>lolA</i>	X	X	X			X	X
PA2725		X	X	X				
PA2863	<i>lipH</i>	X	X	X				
PA3126	<i>ibpA</i>	X	X	X			X	X
PA3221	<i>csaA</i>	X	X	X	X	X	X	X
PA3227	<i>ppiA</i>	X	X	X	X	X	X	X
PA3262		X	X		X	X	X	X
PA3365		X	X				X	X
PA3647	<i>skp</i>	X	X	X	X	X	X	X
PA3717		X	X	X			X	X
PA3737	<i>dsbC</i>	X	X	X	X	X	X	X
PA3810	<i>hscA</i>	X	X					
PA3811	<i>hscB</i>	X	X	X			X	X
PA3810&11	<i>hscAB</i>	X	X	X				
PA3842		X	X	X			X	X
PA3871		X	X	X			X	X
PA4083	<i>cupB4</i>	X	X		X			
PA4085	<i>cupB2</i>	X	X					
PA4176	<i>ppiC2</i>	X	X	X	X	X	X	X
PA4385	<i>groEL</i>	X	X	X				
PA4386	<i>groES</i>	X	X	X	X	X	X	X
PA4385&86	<i>groELS</i>	X	X	X				
PA4558		X	X	X				
PA4572	<i>flhB</i>	X	X	X	X	X	X	X
PA4651		X	X	X			X	X
PA4760	<i>dnaJ</i>	X	X	X	X	X	X	X
PA4761	<i>dnaK</i>	X	X	X				
PA4760&61	<i>dnaKJ</i>	X	X	X				
PA4762	<i>grpE</i>	X	X	X	X	X	X	X
PA4760-62	<i>grpE-dnaKJ</i>	X	X	X				
PA4845	<i>dipZ</i>							
PA4873		X	X	X	X	X	X	X
PA5053	<i>hslV</i>	X	X	X			X	X
PA5054	<i>hslU</i>	X	X	X			X	X
PA5053&54	<i>hslVU</i>	X	X	X				
PA5128	<i>secB</i>	X	X					
PA5193	<i>yrfI</i>	X	X	X			X	X
PA5195		X	X	X			X	X
PA5254		X	X	X			X	X
PA5256	<i>dsbH</i>	X	X	X			X	X
PA5489	<i>dsbA</i>	X	X		X	X	X	X

Um die notwendigen Rekombinationsstellen zur Verfügung zu haben, mußten diese Primer besondere Bedingungen erfüllen: a) die Sequenzen der neuen *att*-Erkennungsstellen mußten enthalten sein, und b) mußte ein ausreichend großer homologer Bereich vorhanden sein, um an der DNA-Matrize hybridisieren zu können. Daher wiesen die Primer eine Länge von ca. 45 Basen auf, was zu geringen Ausbeuten in den Amplifikationsreaktionen führte. Die durchgeführten PCRs mußten in vielerlei Hinsicht verändert werden, um erfolgreich die gewünschten Produkte zu erhalten. So wurde die Annealingtemperatur variiert, die Zyklenzahl verändert oder eine alternative Polymerase eingesetzt.

Auf diese Weise konnten 19 Gene mit den Erkennungsstellen *attB4* und *attB1* (s. Tab. C-6; „PCR-5“), und 39 Gene mit den Rekombinationsstellen *attB2* und *attB3* amplifiziert werden (s. Tab. C-6; „PCR-3“).

Nach Aufreinigung der PCR-Produkte konnten sie in die entsprechenden Vektoren inkloniert werden. Im Anschluß an die Identifikation von positiven Klonen, die durch Restriktionsanalysen erfolgte, wurde die Sequenz erneut durch eine Sequenzierung auf ihre Korrektheit hin überprüft. Erst dann wurden sie in die Rekombinationsreaktionen zur Erzeugung von Expressionsvektoren eingesetzt (s. Tab. C-6: „pENTR-5“ bzw. „pENTR-3“).

### 3.4.2 Erzeugen von Expressionsvektoren

Mit den erzeugten pENTR-Plasmiden (s. Kapitel 3.4.1) konnten nun verschiedene Rekombinationsreaktionen durchgeführt werden. So wurden beispielsweise die Plasmide pENTR-*tig*-5', pENTR-*dnaKJ* und pENTR-*clpX*-3' in gleichen molaren DNA-Mengen mit dem Vektor pDEST-BBRTc-R4R3 in die Klonierungsreaktion eingesetzt. In dieser Reaktion sollten also die Gene *tig* – *dnaKJ* – *clpX* hintereinander in den Vektor eingebaut werden, der als pEXP-1 bezeichnet wurde. Beim gerichteten Vorgehen konnten aus 100 unterschiedlichen Reaktionsansätzen, die mehrmals mit veränderten Bedingungen (u.a. Variation der Inkubationszeit oder Veränderung der pENTR-Plasmidkonzentrationen) durchgeführt wurden, nur 40 Konstrukte hergestellt werden, die eine Kombination von drei Genen bzw. Operons enthielten (s. Tab. C-7).

Die Rekombinationsreaktionen verliefen sehr ineffizient. Weniger als 10 % der Reaktionen führten zum Erhalt des gewünschten pEXP-Plasmides, was den Angaben des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe) über die hohe Ausbeute dieser Reaktionen widersprach. So verliefen Reaktionen, in denen, neben den gerichtet konstruierten Expressionsplasmiden, auch eine Bank mit zufällig rekombinierten Genen erzeugt werden sollte, erfolglos. Dazu wurde ein

Gemisch aus verschiedenen pENTR-5'- bzw. pENTR-3'-Plasmiden mit einem bekannten Plasmid eingesetzt, dessen Gen die mittlere Position des pEXP-Plasmides einnehmen sollte. Hierbei konnten insgesamt zwei Plasmide erzeugt werden; einmal mit dem Chaperonsystem DnaKJ und einmal mit GroELS in der mittleren Position.

**Tabelle C-7: Auflistung der erzeugten Multisite-Expressionsplasmide.** Die Plasmide wurden mit fortlaufenden Nummern versehen (pEXP-1 – pEXP-40). Der Genname sowie die Position des Gens auf dem pEXP-Plasmid sind angegeben.

	Nr.	5'	Mitte	3'		Nr.	5'	Mitte	3'
pEXP-	1	<i>tig</i>	<i>dnaKJ</i>	<i>clpX</i>	pEXP-	21	<i>tig</i>	<i>hslVU</i>	<i>lolA</i>
pEXP-	2	<i>tig</i>	<i>groELS</i>	<i>clpX</i>	pEXP-	22	<i>csaA</i>	<i>hslVU</i>	<i>lolA</i>
pEXP-	3	<i>tig</i>	<i>dnaKJ</i>	<i>ppiD</i>	pEXP-	23	<i>PA3647</i>	<i>hslVU</i>	<i>yrjI</i>
pEXP-	4	<i>ppiA</i>	<i>grpEchnaKJ</i>	<i>tig</i>	pEXP-	24	<i>PA4873</i>	<i>hslVU</i>	<i>yrjI</i>
pEXP-	5	<i>ppiA</i>	<i>groELS</i>	<i>tig</i>	pEXP-	25	<i>ppiA</i>	<i>hslVU</i>	<i>lolA</i>
pEXP-	6	<i>dnaJ</i>	<i>groELS</i>	<i>tig</i>	pEXP-	26	<i>ppiC1</i>	<i>hslVU</i>	<i>PA3717</i>
pEXP-	7	<i>dnaJ</i>	<i>dnaKJ</i>	<i>tig</i>	pEXP-	27	<i>ppiC2</i>	<i>hslVU</i>	<i>PA5195</i>
pEXP-	8	<i>ppiA</i>	<i>dnaKJ</i>	<i>tig</i>	pEXP-	28	<i>groES</i>	<i>hslVU</i>	<i>dsbG</i>
pEXP-	9	<i>ppiA</i>	<i>dnaKJ</i>	<i>ppiD</i>	pEXP-	29	<i>dnaJ</i>	<i>hslVU</i>	<i>dsbG</i>
pEXP-	10	<i>ppiA</i>	<i>grpEchnaKJ</i>	<i>ppiD</i>	pEXP-	30	<i>surA</i>	<i>hscAB</i>	<i>dsbG</i>
pEXP-	11	<i>ppiA</i>	<i>groELS</i>	<i>ppiD</i>	pEXP-	31	<i>csaA</i>	<i>hscAB</i>	<i>ppiD</i>
pEXP-	12	<i>groES</i>	<i>dnaKJ</i>	<i>PA5195</i>	pEXP-	32	<i>PA3647</i>	<i>hscAB</i>	<i>yrjI</i>
pEXP-	13	<i>csaA</i>	<i>groELS</i>	<i>ppiD</i>	pEXP-	33	<i>PA3262</i>	<i>hscAB</i>	<i>lolA</i>
pEXP-	14	<i>PA3647</i>	<i>groELS</i>	<i>ppiD</i>	pEXP-	34	<i>ppiA</i>	<i>hscAB</i>	<i>lolA</i>
pEXP-	15	<i>PA4873</i>	<i>groELS</i>	<i>yrjI</i>	pEXP-	35	<i>ppiC2</i>	<i>hscAB</i>	<i>PA5195</i>
pEXP-	16	<i>ppiC1</i>	<i>groELS</i>	<i>PA3717</i>	pEXP-	36	<i>groES</i>	<i>hscAB</i>	<i>dsbG</i>
pEXP-	17	<i>ppiC2</i>	<i>groELS</i>	<i>PA3717</i>	pEXP-	37	<i>csaA</i>	<i>dnaKJ</i>	<i>hslU</i>
pEXP-	18	<i>dsbC</i>	<i>groELS</i>	<i>PA5195</i>	pEXP-	38	<i>tig</i>	<i>groELS</i>	<i>dsbG</i>
pEXP-	19	<i>groES</i>	<i>groELS</i>	<i>PA5195</i>	pEXP-	39	<i>flbB</i>	<i>groELS</i>	<i>dsbG</i>
pEXP-	20	<i>dnaJ</i>	<i>groELS</i>	<i>PA5195</i>	pEXP-	40	<i>surA</i>	<i>groELS</i>	<i>hslU</i>

Die Konstruktion der Chaperon-Toolbox verlief sehr erfolgreich. 94 % der identifizierten Faltungshelfergene konnten aus dem Genom von *P. aeruginosa* amplifiziert und in geeignete Vektoren kloniert werden. Bei den erzeugten Konstrukten konnte die DNA-Sequenz durch Sequenzierungen verifiziert werden. Ausgehend von diesen pENTR-Chaperon-Plasmiden wurden 85 % der Gene in den Expressionsvektor pDEST-VLT31 eingebracht, so daß sie in Coexpressionsversuche mit heterologen Zielproteinen eingesetzt werden können. Zusätzlich wurden, erneut basierend auf den pENTR-Chaperon-Plasmiden, 35 % der Gene für die Erzeugung von pENTR-Chaperon-5'- und 71 % der Gene zur Herstellung von pENTR-Chaperon-3'-Vektoren reamplifiziert und kloniert werden.

Durch Einsatz dieser Plasmide konnten 42 Expressionsplasmide mit Kombinationen aus jeweils drei Genen von Chaperonen und Foldasen konstruiert werden; davon wurden 40 Kombinationen gerichtet und zwei zufällig hergestellt. Diese wurden im Folgenden in Coexpressionsversuche eingesetzt.

## 4 Untersuchungen zur Transkription von Chaperongenen aus

### *P. aeruginosa* im heterologen Wirt *E. coli*

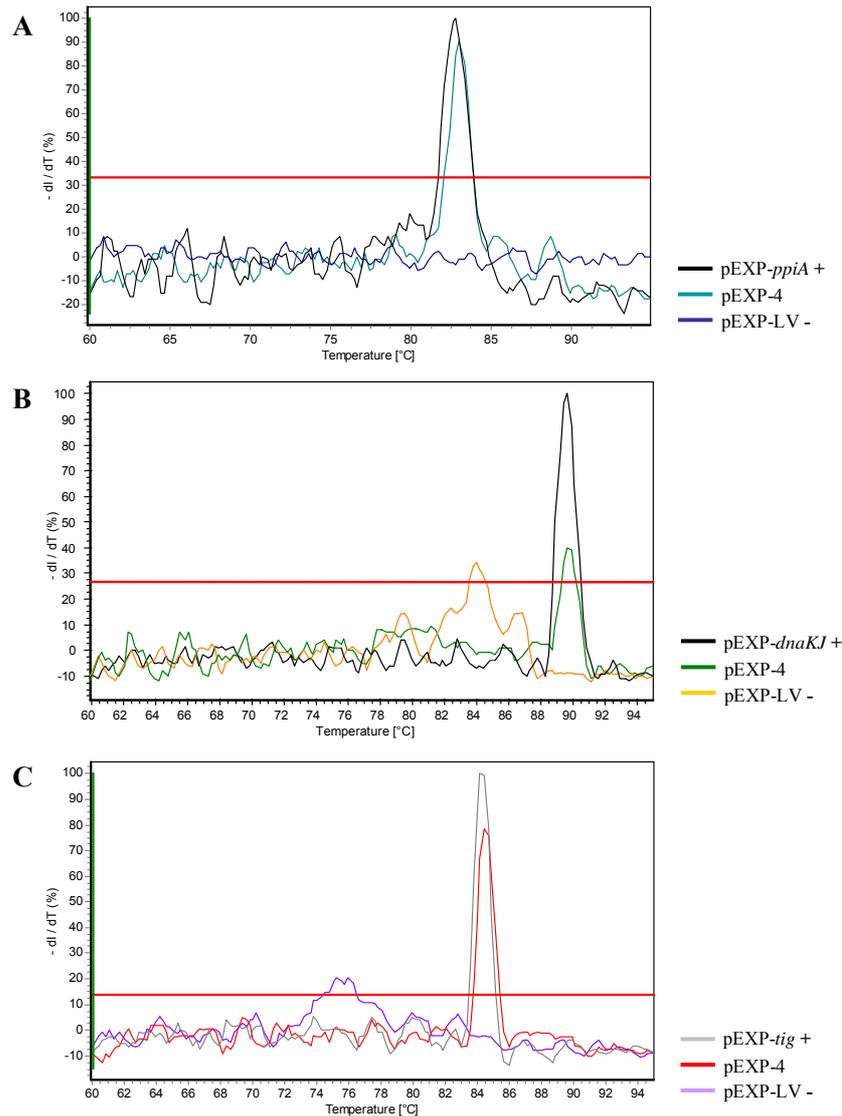
Nach der Konstruktion von Expressionsvektoren mit einzelnen und kombinierten Faltungsmodulatoren wurde zunächst überprüft, ob diese, aus dem Bakterium *P. aeruginosa* stammenden Gene, im heterologen Wirt *E. coli* transkribiert werden können. Dazu sollte das Transkript der Gene verschiedener pEXP-Vektoren durch *RealTime*-PCR nachgewiesen werden (s. B-12).

Um die Transkription der pEXP-codierten Chaperongene grundsätzlich nachzuweisen, wurden *E. coli* BL21(DE3)-Stämme, in die eine Auswahl von pEXP-Plasmiden eingebracht wurde, untersucht. Neben Plasmiden, auf denen einzelne Chaperonsysteme vorlagen (pEXP-*dnaKJ*, -*ppiA*, -*groELS*, -*tig*), wurden auch Expressionsplasmide mit Kombinationen aus Faltungshelfern in die Zellen eingebracht (pEXP-4, -8, -11, -34 und pEXP-38; siehe Tab. C-7). Die erzeugten Stämme wurden bei 37 °C inkubiert und die Transkription der Gene durch Zugabe von IPTG induziert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus diesen Stämmen isoliert (B-5), die jeweilige Chaperon-mRNA unter Verwendung spezifischer Primer (B-3) in cDNA umgeschrieben und in einer *RealTime*-PCR nachgewiesen.

Durch Aufschmelzen der erzeugten PCR-Produkte und Detektion der dadurch frei werdenden SYBR-Green-Fluoreszenz konnte eine Schmelzkurve für jedes erhaltene Produkt aufgenommen werden. Mit Hilfe dieser Schmelzkurven konnte gezeigt werden, daß die in der *RealTime*-PCR erzeugten Produkte tatsächlich die spezifischen Fragmente der Chaperongene waren. Exemplarisch sind die Schmelzkurven der *RealTime*-PCR-Produkte für das Plasmid pEXP-4 (enthaltene Gene: *ppiA*, *grpEdnaKJ* und *tig*) in Abb. C-8 dargestellt.

Als Positivkontrollen wurden pENTR-Plasmide eingesetzt, auf denen das jeweils nachzuweisende Gen vorlag. Ferner wurde der Stamm BL21(DE3) mit dem Leervektor pBBR1MCS-3 als Negativkontrolle verwendet. Mit Hilfe von drei unterschiedlichen Primerpaaren konnten die mRNA-Produkte der Gene *ppiA* (Abb. C-8, A), *dnaK* (Abb. C-8, B) und *tig* (Abb. C-8, C) nachgewiesen werden. In allen drei Fällen wird deutlich, daß das mittels *RealTime*-PCR erzeugte Produkt die gleiche Schmelztemperatur aufweist, wie das jeweilige Kontrollprodukt. Im Falle des Leervektors wurde wie erwartet in keiner der drei Reaktionen ein Produkt nachgewiesen, so daß auch das Signal in der Schmelzkurve fehlt.

Auch für die restlichen überprüften Expressionsplasmide konnte das Transkript der jeweils enthaltenen Gene nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), so daß die Expression für diese Gene in dem heterologen Wirt *E. coli* gezeigt werden konnte.



**Abb. C-8: Nachweis des Transkriptes verschiedener Chaperongene im heterologen Wirt *E. coli*.** Die in einer *RealTime*-PCR nachgewiesenen Produkte konnten mit Hilfe einer Schmelzkurve verifiziert werden. Die Fragmente der drei auf dem Plasmid pEXP-4 vorliegenden Gene, *ppiA* (A), *dnaK* (B) und *tig* (C) wurden amplifiziert und das Produkt anschließend aufgeschmolzen. Durch Übereinstimmung der Schmelztemperaturen der jeweiligen Proben mit der für das erzeugte Produkt berechneten Temperatur konnte in allen drei Fällen gezeigt werden, daß das jeweilige Gen exprimiert wird. (+): Positivkontrolle, (-): Negativkontrolle (Leervektor).

Vier unterschiedliche Primerpaare wurden zum Nachweis des Transkriptes aus Plasmiden mit einzelnen Genen/ Operons (pEXP-*dnaKJ*, -*groELS*, -*tig*, -*ppiA*) und fünf *Multisite*-Plasmiden (pEXP-4, -8, -11, 34, -38) eingesetzt. Für diese Chaperongene konnten Transkripte identifiziert werden. Somit funktioniert die heterologe Expression dieser Faltungsmodulatoren in dem heterologen Wirt *E. coli*!

## 5 Einfluß der Chaperonexpression auf das Wachstum von *E. coli* Zellen

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, daß Streßbedingungen (z.B. Hitze- oder osmotischer Streß) in *E. coli* und anderen Bakterien zu einer erhöhten Expression von molekularen Chaperonen führen können (Walter & Buchner, 2002; Baneyx & Mujacic, 2004). Außerdem können sie für das Wachstum einer Bakterienzelle von großer Bedeutung sein. Beispielsweise führten Mutationen in den *E. coli* Genen *groELS*, die durch gerichtete Evolution eingefügt wurden, zu Wuchsdefiziten (Wang *et al.*, 2002).

Wegen dieses Einflusses der Chaperone und Faltungskatalysatoren auf das Wachstum von Bakterienzellen sollte das Zellwachstum von *E. coli* TOP10-Zellen bei verschiedenen Inkubationstemperaturen bis in die späte stationäre Wuchsphase (48 h) beobachtet werden. Dazu wurden die Zellen mit sämtlichen erzeugten pEXP-*Multisite*-Plasmiden transformiert (s. Tab. C-7) und ihr Wachstum bei 37°C, der Standard Anzuchttemperatur, bzw. 46°C verfolgt. Für die Anzucht bei 46°C sollte untersucht werden, ob die aus *P. aeruginosa* stammenden Proteine zu einem schnelleren oder stabileren Wachstum führen können, da dieser Organismus, im Gegensatz zu *E. coli*, auch bei einer solch hohen Temperatur problemlos wachsen kann (Palleroni, 1993). In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und die Zelldichte bei 580 nm bestimmt.

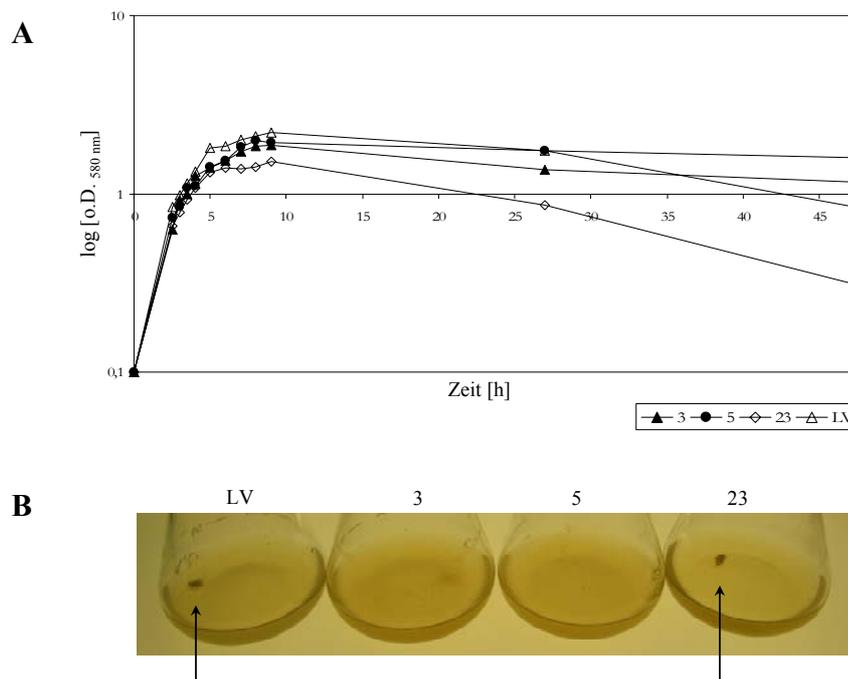
Im Bezug auf das Wachstum der Kulturen bei 37°C konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Stämmen festgestellt werden. Auch hinsichtlich des Wuchsverhaltens in der Stationärphase konnte keine Veränderung durch Coproduktion der Chaperone ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

Auch bei einer Inkubationstemperatur von 46°C wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Teststämmen und dem Kontrollstamm, in dem der Leervektor (LV) ohne Chaperongene vorlag, beobachtet. Die Ausnahme stellte der Stamm dar, in dem das Plasmid pEXP-23 exprimiert wurde. Darauf befinden sich die Gene *PA4873*, *hslVU* sowie *yrfI*. Dieser Stamm zeigte bei 46°C ein deutlich langsames und schlechteres Wachstum als der Vergleichsstamm (LV; s. Abb. C-9).

Nach Eintritt in die Stationärphase konnte im Fall der Kultivierung bei 46°C bei einigen Stämmen eine Abweichung gegenüber dem Kontrollstamm festgestellt werden. In Abb. C-9 sind die Wuchskurven (A) der Stämme mit den Plasmiden pEXP-LV, -3, -5, und pEXP-23, sowie die Flüssigkulturen dieser Stämme (B) abgebildet. Darin wird deutlich, daß die Kulturen eine Zelldichte, die durch die optische Dichte bei 580 nm ermittelt wurde, von ca. 2 erreichen, die danach unterschiedlich schnell abnimmt. Auffallend ist, daß der Kontrollstamm schneller in die Absterbephase eintritt, als einige Kulturen, in denen Faltungsmodulatoren

exprimiert wurden.

Mit Abnahme der Zelldichte in der Stationärphase konnte das Auftreten von Zellverklumpungen in den Kulturen beobachtet werden (siehe Abb. C-9, B: LV und 23). Bei dem Kontrollstamm begann die Bildung kleiner Verklumpungen bereits 24 h nach Start der Inkubation bei 46°C, die nach 48 h als dicke Flocke im Medium noch stärker wurden. Im Gegensatz dazu sind in den Stämmen mit den Plasmiden pEXP-3 bzw. pEXP-5, die länger stabil in der Stationärphase verbleiben (Abb. C-9, A), keine verklumpten Zellen zu erkennen (Abb. C-9, B). Die Expression der Chaperonkombinationen, die auf diesen beiden Plasmiden enthalten sind (s. Tab. C-7), führen also zu einer Stabilisierung der *E. coli* Kulturen.



**Abb. C-9: Wuchsverhalten ausgewählter *E. coli* Stämme während einer Inkubation bei 46 °C.** Neben der Zelldichte (o.D. 580 nm) über einen Zeitraum von 48 h (A) ist ein Bild einiger Kulturen am Ende der Inkubationszeit dargestellt (B). Durch Pfeile sind die verklumpten Zellen in den entsprechenden Kulturen markiert. Die Stämme sind mit den Nummern der Plasmide beschriftet, die in der jeweiligen Kultur exprimiert wurden (LV, pEXP-3, -5, -23; enthaltene Chaperongene sind in Tab. C-7 aufgeführt).

Das Wuchsverhalten des Kontrollstammes und der Chaperon-tragenden Stämme bei einer Inkubationstemperatur von 37°C unterscheidet sich nicht. Auch haben die meisten Chaperonkombinationen keinen Einfluß auf das Wachstum von *E. coli* Zellen bei einer Temperatur von 46°C. In einem Fall wuchs der Teststamm bei 46°C generell schlechter, als der Stamm mit Leervektor. Im Hinblick auf die Stationärphase zeigten die Chaperonkombinationen 3 (*tig*, *dnaKJ* und *ppiD*) bzw. 5 (*ppiA*, *groELS* und *tig*) einen Einfluß auf die Stabilität der Kultur. Ihre Zelldichte blieb länger konstant und es konnten keine Verklumpungen von Zellen beobachtet werden.

## 6 Coexpression von Chaperonkombinationen mit Zielproteinen

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl mikrobieller Expressionssysteme entwickelt (Baneyx, 1999). Dennoch kann eine beträchtliche Anzahl von Proteinen nicht in ausreichender Menge produziert werden. Probleme, die bei der Expression heterologer Gene auftreten können, sind vielseitig und können z.B. in der Transkription, der *Codon usage*, der Sekretion oder der Faltung begründet liegen. In vielen Fällen erhält man zwar eine große Ausbeute des Zielproteins, das aber nicht korrekt gefaltet werden konnte und daher inaktiv in Form von *Inclusion bodies* akkumuliert vorliegt. Bisher wurden einige Beispiele beschrieben, in denen die Coexpression von Chaperonen hilft, die Löslichkeit bzw. den Faltungsprozeß des Proteins zu verbessern (Goloubinoff *et al.*, 1989; Blum *et al.*, 1992; De Marco *et al.*, 2005), jedoch ist dies ein *trial-and-error* Ansatz.

Um die Probleme der Proteinfehlfaltung und Proteinstabilität bei der heterologen Expression systematisch zu verbessern und um zu untersuchen, ob Chaperone aus dem Bakterium *P. aeruginosa* grundsätzlich Einfluß auf die Produktion rekombinanter Proteine im Expressionswirt *E. coli* nehmen können, sollte die im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Chaperon-Genexpressionsbank mit Zielgenen coexprimiert werden. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Zielproteine ist in Tabelle C-8 gegeben. Hier wurden sowohl Proteine prokaryotischer als auch eukaryotischer Herkunft gewählt, die nicht in ausreichender Menge als lösliches, aktives Enzym produziert werden konnten, aber von enormem biotechnologischen Interesse sind. Dazu zählen zwei Alkoholdehydrogenasen aus *Rhodococcus* Spezies, das humane Interferon *2ab*, sowie drei Hydrolasen, wobei eine Esterase und zwei Lipasen untersucht wurden. Das Protein GFP sollte in Coexpressionen mit Faltungsmodulatoren eingesetzt werden, da es in der Wissenschaft häufig als Faltungsreporter verwendet wird (Peters & Sikorski, 1999).

Für die Coexpressionsversuche mußten zunächst *E. coli* Expressionsstämme hergestellt werden, in denen sowohl das Zielprotein (s. Tab. C-8) als auch ein Plasmid der Genexpressionsbank enthalten war. Hierfür wurden die Expressionsstämme jedes Mal frisch erzeugt. Zunächst wurde das Plasmid mit dem entsprechenden Zielgen in den *E. coli* Expressionsstamm eingebracht. Hiervon wurden elektrokompetente Zellen hergestellt, in die sämtliche Plasmide der Chaperon-Expressionsbank in separaten Transformationsansätzen eingebracht wurden.

Anschließend erfolgte die Anzucht der Teststämme, wie unter B-4.3 beschrieben, in 20 ml Kulturen bei 30°C oder 37°C. Die Expressionsstämme wurden bis zum Erreichen einer Zelldichte bei 580 nm von 0,6 bis 0,8 kultiviert und die Expression der Interessen- und

Chaperongene durch Zugabe von IPTG induziert.

**Tabelle C-8: Auflistung der in Co-Überexpressionen mit der Chaperon-Genexpressionsbank untersuchten Zielproteine.** Die Proteine sind in funktionelle Gruppen unterteilt: A) Alkoholdehydrogenasen (ADH), B) Hydrolasen und C) sonstige Proteine. Außerdem sind der Ursprungsorganismus, die Proteingröße [kDa] und die natürliche Lokalisation angegeben. Weiter ist erwähnt, ob das jeweilige Zielgen in dem Expressionssystem mit einer Signalsequenz zum Transport aus dem Cytoplasma versehen wurde oder nicht. Das jeweilige Problem der Expression im heterologen Wirt *E. coli* und die Referenz dazu sind zusätzlich angegeben. IB: *Inclusion bodies*

Zielprotein	Herkunft	Größe [kDa]	natürliche Lokalisation	Signalsequenz	Problem bei heterologer Expression	Referenz
<b>A Alkoholdehydrogenasen</b>						
1 RE-ADH	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	36,2	Cytoplasma	nein	IB-Bildung; kaum lösliches, aktives Protein	Abokitse, 2004
2 RR-ADH	<i>Rhodococcus ruber</i>	35,5	Cytoplasma	nein	IB-Bildung; kaum lösliches, aktives Protein	Abokitse, 2004
<b>B Hydrolasen</b>						
3 Esterase EstA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32,0	äußere Membran	nein	IB-Bildung; kaum lösliches, aktives Protein	Schulz, 2005
4 Lipase LipA	<i>Serratia marcescens</i>	64,8	Kulturüberstand	nein	IB-Bildung; kaum lösliches, aktives Protein	Akatsuka <i>et al.</i> , 1994
5 Lipase CALB	<i>Candida antarctica</i>	33,0	Kulturüberstand	ja	geringe Ausbeute	Blank <i>et al.</i> , 2006
<b>C Sonstige</b>						
6 GFP	<i>Aequorea victoria</i>	28,2	Cytoplasma	nein	Reporter für Faltungsprozesse	Peters & Sikorski, 1999
7 Interferon 2αb	<i>Homo sapiens</i>	18,2	Leukozyten	ja	Produktion in IB, kaum sekretiertes Protein im KÜ	Valente <i>et al.</i> , 2006

Die Ernte der Zellen erfolgte, je nach exprimiertem Zielgen, 3 - 42 h nach Induktion. Im Weiteren wurden Kulturüberstand und Zellen voneinander getrennt und die Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (B-14). Die Gesamtzellextrakte wurden dann in lösliche und nicht-lösliche Proteinfraction unterteilt (B-15). Beide Fraktionen, im Fall des Interferon α auch der Kulturüberstand, wurden in Enzymtests (B-16) bzw. in Western-Blot-Analysen (B-20) und in Proteingelen analysiert, wodurch die produzierte Menge und die Löslichkeit des jeweiligen Proteins bestimmt wurden. Für die unterschiedlichen Proteinnachweise wurden, bezogen auf die Zelldichte, jeweils gleiche Probenmengen eingesetzt.

Die Resultate der Expressionsuntersuchungen der getesteten Proteine sind im Folgenden dargestellt.

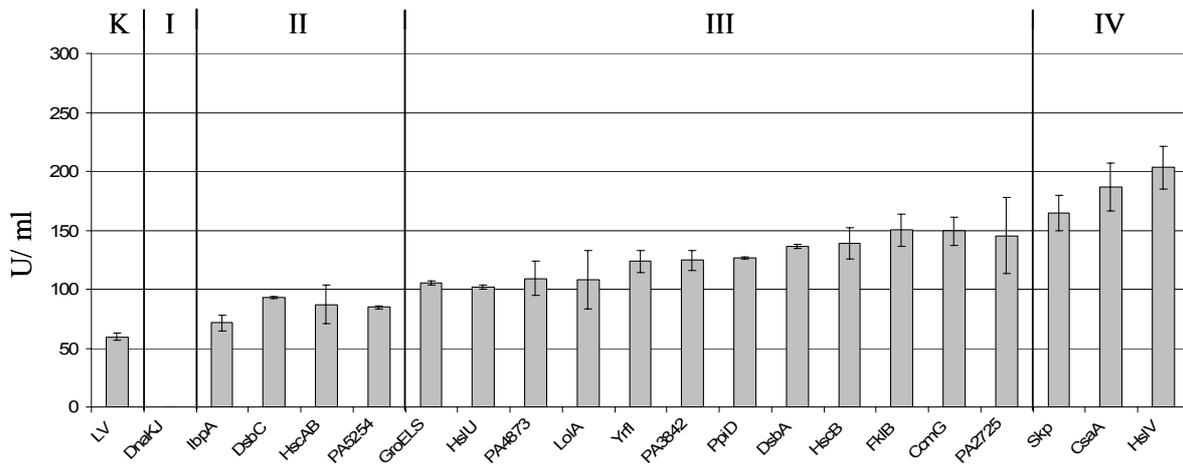
## 6.1 Coexpression von Chaperonen mit Alkoholdehydrogenasen aus *Rhodococcus* Spezies

Alkoholdehydrogenasen (ADH) zählen zu der Enzymklasse der Dehydrogenasen. In der Biotechnologie wird ihnen eine besondere Bedeutung beigemessen, da sie stereospezifische Reduktionen unterschiedlicher prochiraler Ketone und Ketoester zu den korrespondierenden Alkoholen katalysieren. Bei diesen Reaktionen entsteht, je nach verwendetem Enzym, eines der beiden Enantiomere. Chirale, enantiomerenreine Alkohole werden als Vorstufen in der pharmazeutischen, chemischen und landwirtschaftlichen Industrie eingesetzt.

Die beiden ADHs (s. Tab. C-8) aus den Organismen *Rhodococcus ruber* und *Rhodococcus erythropolis* konnten bisher lediglich in geringen Mengen und hauptsächlich in Form von *Inclusion bodies* exprimiert werden (Abokitse, 2004; Krüger, 2005). Beide Enzyme katalysieren als Homotetramer die Umsetzung von zahlreichen Ketoverbindungen zu den korrespondierenden (*S*)-Alkoholen, wobei NADH als Cofaktor und je zwei Zinkionen als Struktur-Stabilisatoren benötigt werden. Im Fall der *R. erythropolis* ADH (RE-ADH) konnte die Menge exprimierten Enzyms durch eine teilweise Anpassung der *Codon usage* verbessert werden (Steigerung von 10 U/ ml auf 50 U/ ml), jedoch lagen weiterhin mehr als 80 % des produzierten Proteins als Aggregate in unlöslicher Form vor. Um die Faltung der beiden Enzyme zu verbessern und somit eine Akkumulation in *Inclusion bodies* zu minimieren, sollten sie mit den verfügbaren Plasmiden der Genexpressionsbank coexprimiert werden.

Zur Normalisierung der Proteinproben wurde eine Bradford-Bestimmung mit den löslichen Proteinproben durchgeführt. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, daß gleiche Mengen Protein in den Enzymtest eingesetzt wurden, die aus gleichen Zellmengen erhalten wurden. Anschließend wurden die Proben in einen Aktivitätstest eingesetzt. Dabei kann die Umsetzung des Substrates *p*-Cl-Acetophenon indirekt über den Verbrauch von NADH photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt werden.

Zunächst wurde der Einfluß einzelner Chaperone und Faltungskatalysatoren aus *P. aeruginosa* auf die Löslichkeit der heterolog in *E. coli* erzeugten RE-ADH untersucht, indem exemplarisch 20 verschiedene Faltungsmodulatoren coexprimiert wurden. Die dabei gemessenen Aktivitäten der löslichen RE-ADH sind in Abbildung C-10 gezeigt und wurden aus drei voneinander unabhängigen Messungen berechnet. Für den Kontrollstamm konnte eine Aktivität von ca. 50 U/ ml des löslichen Proteins ermittelt werden. Im Vergleich dazu können die untersuchten Expressionsstämme in vier Gruppen unterteilt werden, die jeweils vergleichbare Enzymaktivitäten aufweisen.



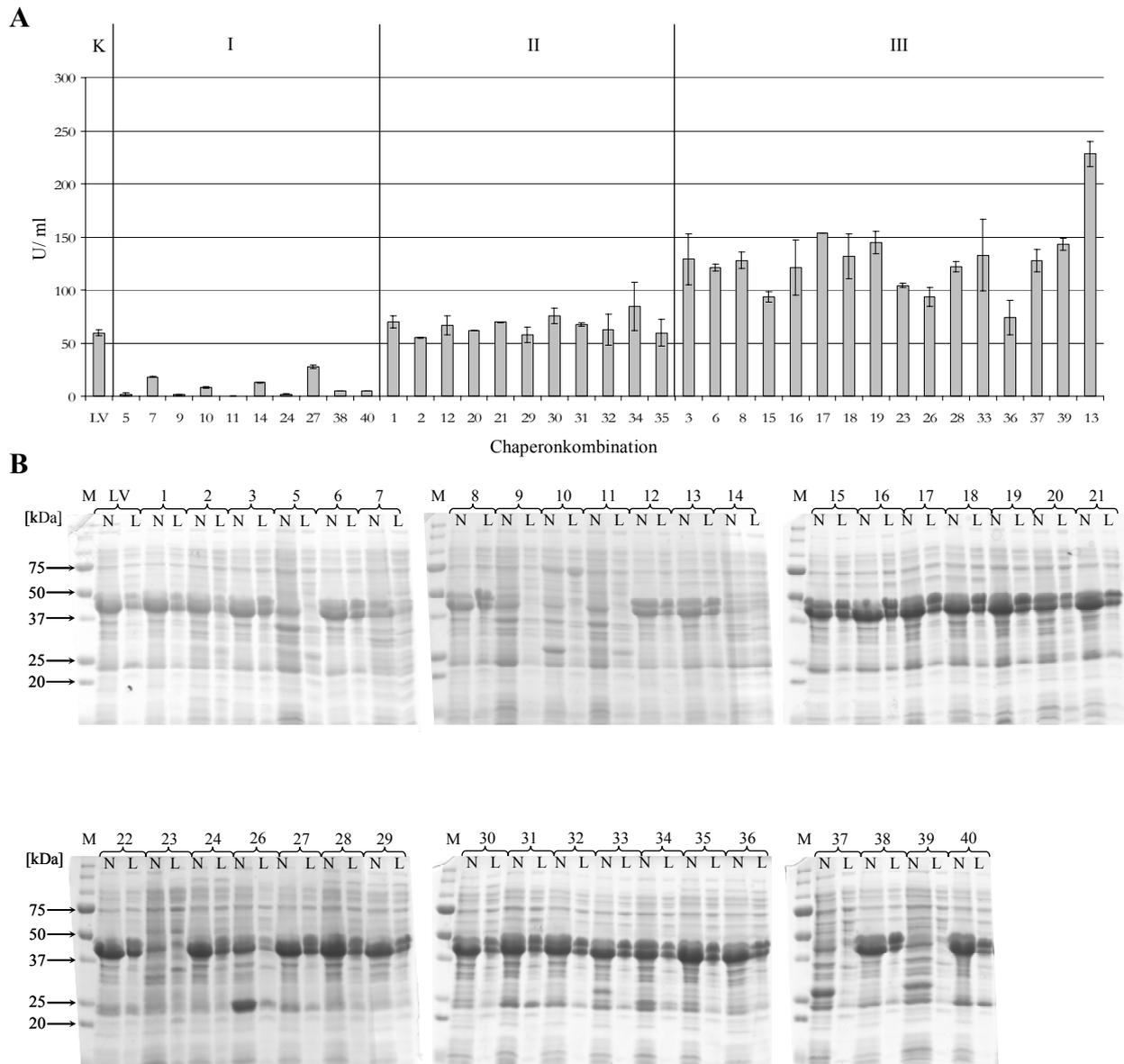
**Abb. C-10: Einfluß einzelner *P. aeruginosa* Faltungshelfer auf die Aktivität der RE-ADH.** Nach Aufschluß und Fraktionierung der Proteinproben konnten jeweils 10 µl der löslichen Fraktionen in den Aktivitätstest eingesetzt werden (B-16.1). Die Aktivität ist in U/ ml angegeben. Die Proben enthalten homogene Mengen Protein aus gleichen Zelldichten. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Messungen, Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken angegeben. Die in den jeweiligen Stämmen enthaltenen Faltungshelfer sind angegeben. Durch die Unterteilung in Ergebnisgruppen (K = Kontrolle, bzw. Gruppe I-IV) werden Stämme zusammengefaßt, die vergleichbare ADH-Aktivitäten aufweisen.

So führte das Chaperonsystem DnaKJ (Abb. C-10; Gruppe I) zu einem kompletten Verlust der Aktivität der Alkoholdehydrogenase. Durch die Coexpression der Chaperone IbpA, DsbC bzw. HscAB konnten RE-ADH-Aktivitäten ermittelt werden, die in etwa der des Kontrollstammes entsprachen (Abb. C-10; Gruppe II). Die meisten der einzeln coexprimierten Faltungshelfer (s. Abb.C-10; Gruppe III) führten zu einer Erhöhung der ADH-Aktivität um 100-200 % im Bezug auf den Stamm mit dem Leervektor (LV). Darunter waren auch die PPIase PpiD und das generelle Chaperonsystem GroELS. Die besten Ergebnisse, die durch die Coexpression singulärer Faltungsmodulatoren erreicht wurden, kamen durch die Expression des HslV-Proteins, der Protease-Domäne einer Clp-ähnlichen ATP-abhängigen Zweikomponenten Protease, und des CsaA-Proteins, einem molekularen Chaperon, zustande (Abb. C-10, Gruppe IV). In beiden Fällen wurde die Aktivität des RE-ADH-Proteins um den Faktor 4 verbessert.

Im Anschluß an die Untersuchung des Einflusses einzelner Faltungshelfer auf die Produktion aktiven ADH-Proteins sollten auch die verfügbaren Chaperon-Kombinationen der Genexpressionsbank diesbezüglich untersucht werden. Die ermittelten Proteinaktivitäten sowie korrespondierende Proteingele sind in Abbildung C-11 A und B dargestellt.

Eine Anzahl von zehn untersuchten Stämmen zeigte im Vergleich mit der Kontrolle (s. Abb. C-11, A: K) eine deutliche Verringerung der Aktivität. Teilweise konnte überhaupt keine

Aktivität detektiert werden (z.B. die Stämme mit den *Multisite*-Kombinationen pEXP-5, -9 oder pEXP-24). In den korrespondierenden Proteingelen (Abb. C-11, **B**) konnte für diese Stämme gezeigt werden, daß eine geringe Menge Protein in der nicht-löslichen Fraktion (N) vorhanden war, was durch eine schwache Proteinbande auf einer Höhe von ca. 37 kDa sichtbar wird.

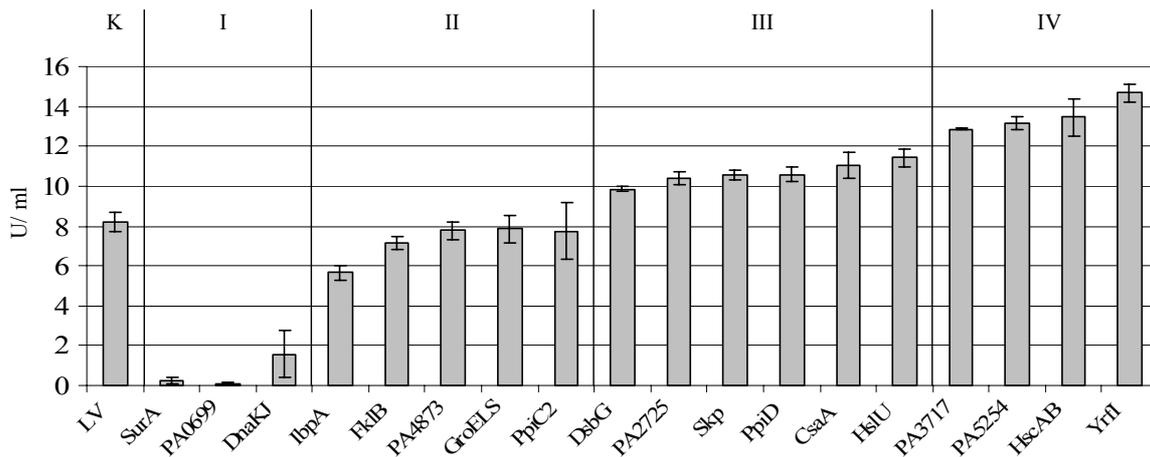


**Abb. C-11: Einfluß von *P. aeruginosa* Faltungshelfern auf die Löslichkeit und Aktivität der *R. erythropolis* ADH in *E. coli*.** Der Nachweis der Enzymaktivität (**A**) erfolgte durch Einsatz von 10 µl Protein der löslichen Proteinfraction, die auf gleiche Zelldichten eingestellt war. Die Aktivität ist in U/ ml angegeben und die Standardabweichung aus drei voneinander unabhängigen Messungen durch Fehlerbalken dargestellt. Zusätzlich konnten Proben gleicher Zelldichte der nicht-löslichen (N) und löslichen (L) Fraktion auf ein Proteingel (**B**) aufgetragen und die ADH-Mengen miteinander verglichen werden. Die RE-ADH befindet sich im SDS-Gel auf einer Höhe von ca. 37 kDa. Die Stämme sind durch die Angabe der *Multisite*-Plasmid-Nummer benannt (s. Tab. C-7). Durch die Unterteilung in Ergebnisgruppen (K = Kontrolle, bzw. Gruppe I-III) werden Stämme zusammengefaßt, die vergleichbare ADH-Aktivitäten aufweisen.

Annähernd kein RE-ADH-Protein konnte hingegen in der löslichen Fraktion (L) detektiert werden, hier fehlt eine Bande auf der Höhe der RE-ADH. Als Gruppe II wurden die Teststämme in Abb. C-11 A zusammengefaßt, die mit 50 U/ ml in etwa die gleiche Proteinaktivität aufwiesen wie der Kontrollstamm LV (s. Abb. C-11: Gruppe II). Bei den 16 verbleibenden Stämmen, in denen Chaperone mit dem Protein RE-ADH erzeugt wurden, konnte eine höhere ADH-Aktivität nachgewiesen werden. Diese war um den Faktor 2 bis 5 höher als bei dem Kontrollstamm. Das beste Ergebnis wurde erzielt, indem mit dem Vektor pEXP-13 die Gene der Faltungsmulatoren CsaA, GroELS und PpiD exprimiert wurden. Das Proteingel zeigt eine intensivere ADH-Bande in der löslichen Fraktion (s. Abb. C-11, B: L), was darauf hindeutet, daß die Coexpression dieser Enzymkombination mehr lösliches Protein in den Zellen ermöglicht. Die Daten der Aktivitätsmessungen (s. Abb. C-10) zeigen, daß das molekulare Chaperon CsaA die deutlichste Verbesserung der Aktivität der RE-ADH herbeigeführt hat. Durch die Kombination dieses Chaperons mit der PPIase PpiD und dem Chaperonsystem GroELS konnte dieser positive Einfluß von CsaA um weitere 100 %, verglichen mit dem Kontrollstamm, gesteigert werden.

Nach erfolgreicher Anwendung der *Toolbox* bei der Expression der RE-ADH sollte nun untersucht werden, ob die aus *R. ruber* stammende ADH (RR-ADH) durch die Coexpression von Chaperonen in größeren Mengen aktiv produziert werden kann.

Der RR-ADH-Expressionsstamm mit dem Leervektor (Kontrollstamm) wies eine Aktivität von ca. 10 U/ ml auf (Abb. C-12). Dessen ADH-Aktivität wurde mit der von Stämmen verglichen, in denen einzelne Faltungsmulatoren coexprimiert wurden. Anhand der ermittelten RR-ADH-Aktivitäten konnten die Stämme in vier Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe faßt die Stämme zusammen, in denen keine RR-ADH-Aktivität gemessen werden konnte. Hier waren die Faltungshelfer SurA, PA0499 sowie DnaKJ in dem RR-ADH-Expressionsstamm enthalten. Enzymaktivitäten, die mit der des Kontrollstammes übereinstimmten, wurden durch die Coexpression der Chaperone IbpA, FklB, PA4873, GroELS und PpiC2 erzielt (Abb. C-12: Gruppe II). Sechs Chaperonsysteme (Abb. C-12: Gruppe III) führten zu einer Steigerung der RR-ADH-Aktivität um 25 %, verglichen mit der Kontrolle. Bei diesen Faltungshelfern handelt es sich um DsbG, PA2725, Skp, PpiD, CsaA sowie HslU. Die deutlichste Verbesserung der RR-ADH-Aktivität um 45 % - 65 %, bezogen auf den Kontrollstamm, konnte durch die Chaperone PA3717, PA5254, HscAB und Yrfl erreicht werden. Hierdurch wird verdeutlicht, daß viele einzelne Faltungsmulatoren dazu in der Lage waren, Einfluß auf die Aktivität oder die Löslichkeit des RR-ADH-Proteins zu nehmen.



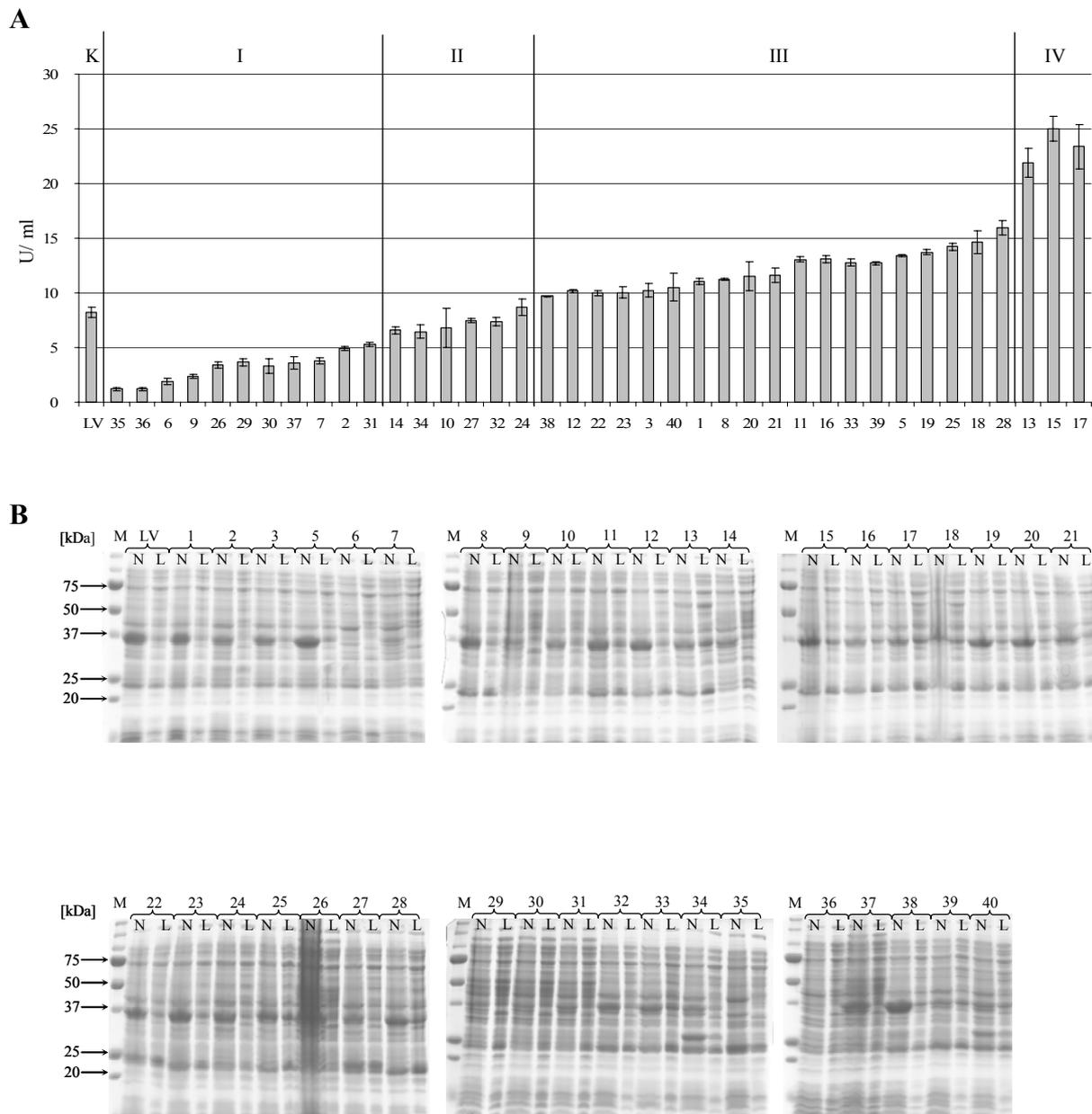
**Abb. C-12: Einfluß von einzelnen *P. aeruginosa* Faltungshelfern auf die Aktivität der *R. ruber* ADH in *E. coli*.** Nach Aufschluß und Fraktionierung der Proteinproben konnten jeweils 10 µl der löslichen Fraktionen in den Aktivitätstest eingesetzt werden (B-16.1). Die Aktivität ist in U/ ml angegeben. Die Proben enthalten homogene Mengen Protein aus gleichen Zelldichten. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Messungen, Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken angegeben. Die in den jeweiligen Stämmen enthaltenen Faltungshelfer sind angegeben. Durch die Unterteilung in Ergebnisgruppen (K = Kontrolle, bzw. Gruppe I-IV) werden Stämme zusammengefaßt, die vergleichbare ADH-Aktivitäten aufweisen.

Im Anschluß wurde untersucht, welchen Einfluß Kombinationen von Chaperonen und Faltungskatalysatoren auf die Produktion löslichen, aktiven RR-ADH-Proteins nehmen können. Die ermittelten Enzymaktivitäten und die korrespondierenden Proteingele sind in Abbildung C-13 dargestellt.

Für den Kontrollstamm, RR-ADH-Expressionsstamm mit Chaperon-Leervektor, konnte eine Aktivität von 9 U/ ml ermittelt werden (Abb. C-13, A). In dem dazugehörigen SDS-Gel, auf dem die nicht-lösliche (N) und die lösliche (L) Fraktion der Proteinproben aufgetragen wurde (Abb. C-13, B: LV) wird deutlich, daß der größte Teil des produzierten Proteins in Form unlöslicher *Inclusion bodies* akkumuliert ist. Elf Chaperonkombinationen (Abb. C-13, A: Gruppe I) führten dazu, daß die ermittelte RR-ADH-Aktivität im Vergleich zum Kontrollstamm geringer war. Hier konnten Enzymaktivitäten von 1-5 U/ ml gemessen werden. In diesen Stämmen lagen folgende Plasmide vor: pEXP-2, -6, -7, -9, -26, -29, -30, -31, -35, -36 und pEXP-37 (s. Tab. C-7). Betrachtet man die SDS-Gele (Abb. C-13, B), auf die Proben sowohl der nicht-löslichen als auch der löslichen Fraktionen aufgetragen wurden, wird deutlich, daß in den Stämmen, die kaum Aktivität aufwiesen, RR-ADH-Protein nur zu geringem Anteil in der löslichen Fraktion vorlag.

Die RR-ADH-Proteinmengen in der nicht-löslichen Fraktion variierten in den verschiedenen Stämmen. So wurde in den meisten Fällen auch nur wenig Protein in der nicht-löslichen

Fraktion sichtbar (Abb. C-13, B).



**Abb. C-13: Einfluß von *P. aeruginosa* Faltungshelfern auf die Löslichkeit und Aktivität der *R. ruber* ADH in *E. coli*.** Der Nachweis der Enzymaktivität (A) erfolgte durch Einsatz von 10 µl Protein der löslichen Proteinfraction, die auf gleiche Zelldichten eingestellt war. Die Aktivität ist in U/ ml angegeben und die Standardabweichung aus drei voneinander unabhängigen Messungen durch Fehlerbalken dargestellt. Zusätzlich konnten Proben gleicher Zelldichten der nicht-löslichen (N) und löslichen (L) Fraktion auf ein Proteingel (B) aufgetragen und die ADH-Mengen miteinander verglichen werden. Die RR-ADH befindet sich im SDS-Gel auf einer Laufhöhe von ca. 36 kDa. Die Stämme sind durch die Angabe der *Multisite*-Plasmid-Nummer benannt (s. Tab. C-7). Durch die Unterteilung in Ergebnisgruppen (K = Kontrolle, bzw. Gruppe I-IV) werden Stämme zusammengefaßt, die vergleichbare ADH-Aktivitäten aufweisen.

Das läßt vermuten, daß die darin vorliegenden Chaperone das RR-ADH-Protein entweder der Degradationsmaschinerie zuführen oder indirekt die Produktion des Zielproteins unterbinden

können. Für den Stamm mit dem Expressionsplasmid pEXP-2 (Tig, GroELS und ClpX) wird hingegen deutlich, daß eine große Menge Protein in nicht-aktiver, nicht-löslicher Form produziert wurde. Das gleiche Ergebnis konnte für die Stämme mit den *Multisite*-Expressionsvektoren pEXP-26 (PpiC1, HslVU und PA3717) und pEXP-37 (CsaA, DnaKJ und HslU) gezeigt werden. Die hier coexprimierten Chaperone und Faltungskatalysatoren führten also dazu, daß die Faltung oder Stabilität des RR-ADH-Proteins schlechter war als im Kontrollstamm.

Die in Gruppe II zusammengefaßten RR-ADH-Expressionsstämme (Abb. C-13, A: II) verhielten sich wie der Kontrollstamm, in dem keine Faltungsmodulatoren exprimiert wurden. Sie wiesen eine Enzymaktivität von ca. 9 U/ ml auf und enthielten den größten Teil des produzierten RR-ADH-Proteins in unlöslicher Form (Abb. C-13, B).

In der Ergebnisgruppe III (Abb. C-13, A) sind solche Stämme vertreten, die zu einer RR-ADH-Aktivität führten, die um bis zu 65 % gegenüber dem Kontrollstamm gesteigert werden konnte. Die korrespondierenden Proteinproben sind in den SDS-Gelen in Abbildung C-13, B dargestellt. In den meisten Fällen wiesen die Teststämme in etwa gleiche Mengen RR-ADH-Proteins in löslicher bzw. unlöslicher Form auf wie der Kontrollstamm. Für die Stämme, in denen die Expressionsplasmide pEXP-39 (FklB, GroELS und DsbG) sowie pEXP-40 (SurA, GroELS und HslU) enthalten waren, war die Gesamtmenge an löslichem RR-ADH-Protein geringer als bei der Kontrolle (s. Abb. C-13, B). Hier konnte aber eine Verdopplung der Enzymaktivität festgestellt werden. Die in diesen Stämmen enthaltenen Chaperonkombinationen führten demnach zu einer optimalen Ausbeute aktiven Proteins.

Die höchsten Aktivitäten wurden in den Stämmen erzielt, die die Plasmide pEXP-13 (CsaA, GroELS und PpiD), pEXP-15 (PA4873, GroELS und YrfI) sowie pEXP-17 (PpiC2, GroELS und PA3717) trugen. Hier wurde die RR-ADH-Aktivität um ca. 170 % gesteigert. Außerdem konnte in den Proteingelen gezeigt werden, daß mehr Protein in löslicher Form vorhanden war als in der Kontrolle. Die Coexpression dieser Kombinationen aus Foldasen und Chaperonen führte demnach zu einer Stabilisierung oder besseren Faltung des RR-ADH-Proteins.

**Die Coexpression von Chaperonen und Faltungskatalysatoren mit Alkoholdehydrogenasen aus *R. erythropolis* und *R. ruber* führte in einigen Fällen zu einer deutlichen Verbesserung der Aktivität löslichen Proteins im Enzymtest. Erst die Kombination von Faltungsmodulatoren konnte aber die maximale Steigerung der jeweiligen Enzymaktivität hervorrufen. Für die RE-ADH konnte somit eine Aktivität gemessen werden, die 5-mal höher war als die des Kontrollstammes. Bei der Expression**

---

der RR-ADH konnte eine Verbesserung der Aktivität löslichen Proteins um den Faktor 3 erzielt werden.

## 6.2 Coexpressionen von Faltungsmodulatoren mit dem katalytisch aktiven Teil der Esterase EstA aus *P. aeruginosa*

Die Esterase EstA aus dem Bakterium *P. aeruginosa* ist ein lipolytisches Enzym, welches bevorzugt kurzkettige Glycerolester von Fettsäuren hydrolysiert (Wilhelm *et al.*, 1997). Damit zählt dieses Protein zu einer Gruppe von Enzymen, die aufgrund ihres biotechnologischen Potentials immer mehr Bedeutung erlangt (Jäger *et al.*, 1997; Jäger & Reetz, 1998).

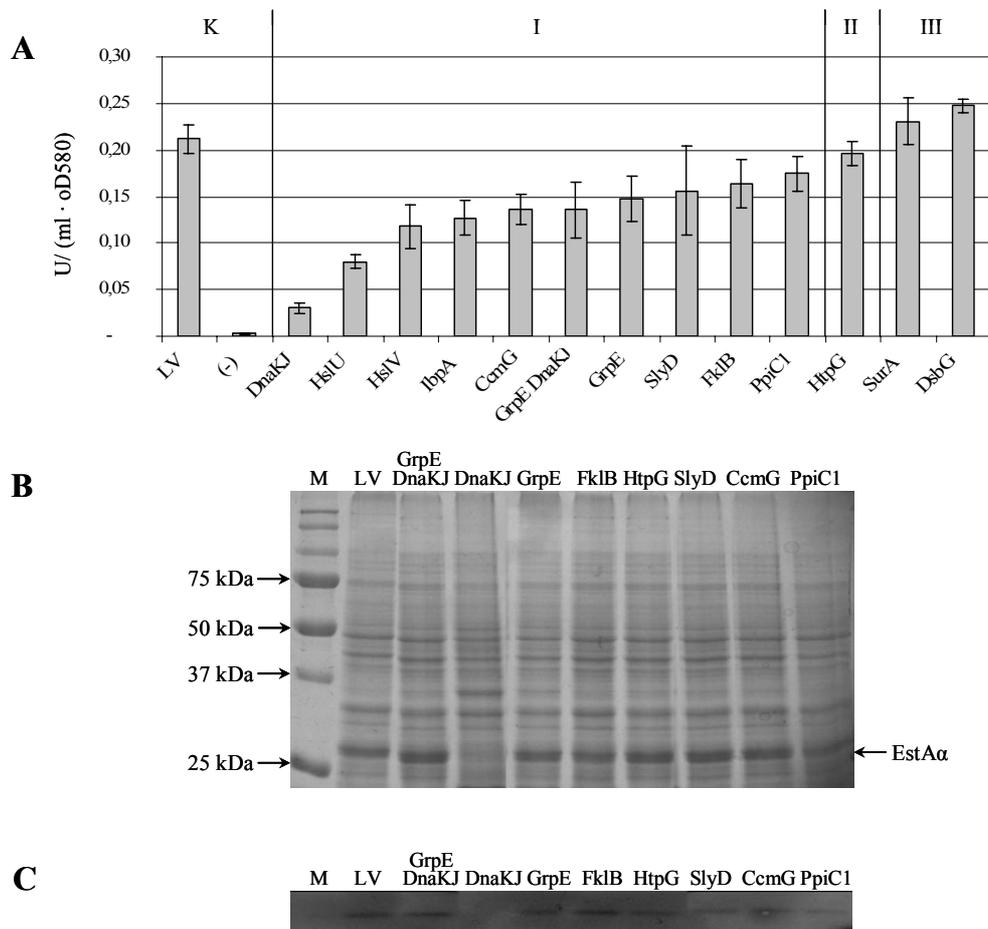
Bei der Überexpression des katalytisch aktiven N-Terminus der Esterase EstA (EstA $\alpha$ ) aus *P. aeruginosa* im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) akkumulierte ein großer Teil des Proteins in Form von *Inclusion bodies* (Schulz, 2005). Deshalb sollte versucht werden, die Faltungsmodulatoren aus *P. aeruginosa* zusammen mit dem EstA $\alpha$ -Fragment zu exprimieren, um möglichst die Löslichkeit des Proteins zu verbessern. Dabei stammen sowohl das Zielprotein als auch die coexprimierten Chaperone und Foldasen aus demselben Organismus, *P. aeruginosa*.

In Abbildung C-14 ist das Ergebnis der Aktivitätsmessungen von Stämmen dargestellt, in denen einzelne Chaperone und Faltungskatalysatoren enthalten sind. Der EstA $\alpha$ -Expressionsstamm, in dem der Chaperonleervektor enthalten war, wurde als Kontrolle eingesetzt. Für diesen Stamm konnte eine Aktivität von 0,2 U/ (ml · o.D.580) ermittelt werden. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle analysiert. Dieser Stamm enthielt sowohl den Chaperon- als auch den Zielgen-Leervektor. Dadurch konnte sichergestellt werden, daß die für den Kontrollstamm, in dem ausschließlich der Chaperonleervektor vorlag, ermittelte Aktivität auf das Vorhandensein der Esterase zurückzuführen ist (Abb. C-14, A; K: LV bzw. (-)). Deutlich reduzierte Aktivität konnte für die Stämme nachgewiesen werden, in denen die Proteine CcmG, HslV oder HslU coexprimiert wurden. Bei Coexpression des Chaperonsystems DnaKJ kam es sogar zum Verlust der Fähigkeit, aktives, lösliches EstA $\alpha$ -Protein zu produzieren (Abb. C-14, A: Gruppe I).

Für die meisten Teststämme wurde eine EstA-Aktivität bestimmt, die im Bereich des Stammes lag, der als Positivkontrolle eingesetzt wurde (Abb. C-14, A: Gruppe II). In diesen Stämmen waren beispielsweise die Chaperone HtpG und IbpA, oder die Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen FklB sowie PpiC1 enthalten.

In zwei der untersuchten Stämme konnte eine leichte Erhöhung der Enzymaktivität um 25 %

nachgewiesen werden. Dabei wurden zum einen die Foldase DsbG, und zum anderen die periplasmatische PPIase SurA exprimiert (Abb. C-14, A: Gruppe III).



**Abb. C-14: Bestimmung der Esteraseaktivität des katalytisch aktiven N-Terminus von EstA aus *P. aeruginosa* nach Coexpression mit Chaperonen oder Foldasen und Nachweis von EstA $\alpha$ -Protein.** Von den löslichen Fraktionen der unterschiedlichen Stämme wurde die Aktivität des EstA $\alpha$  Fragmentes der Esterase bestimmt (A). Die angegebenen Proteine wurden coexprimiert. Als Kontrolle diente der Stamm mit EstA $\alpha$  und Chaperon-Leervektor (LV). Die Werte der Aktivitäten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Die Teststämme wurden abhängig von der ermittelten Aktivität in Gruppen unterteilt (K, I, II und III). Zusätzlich wurde die Menge akkumulierten Proteins in einer SDS-PAGE (B) und die Aktivität in einem durchgeführten Zymogrammgel (C) untersucht. (-): Negativkontrolle, ohne *estA*- und Chaperongen-Expressionsplasmid.

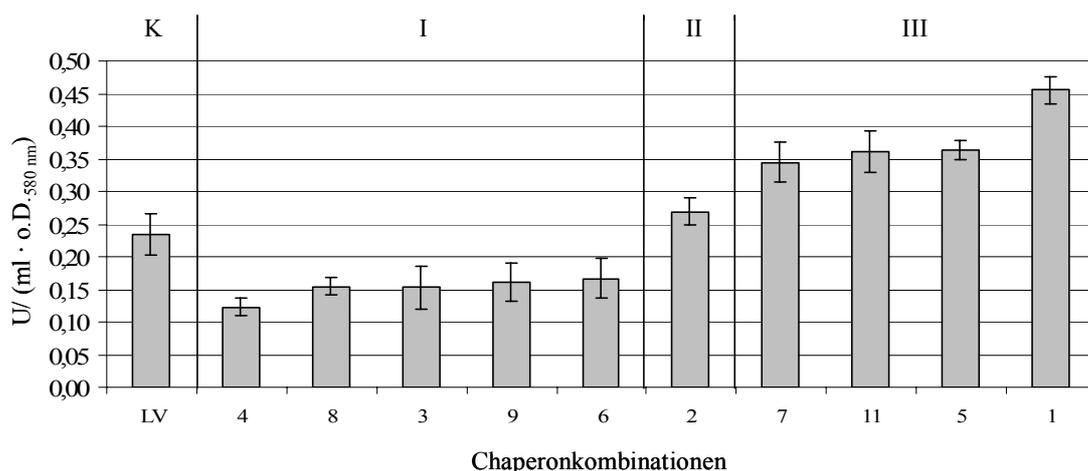
In einer SDS-PAGE wurde überprüft, ob die gemessenen Aktivitäten mit der Menge akkumulierten EstA $\alpha$ -Proteins korrelieren (Abb. C-14, B). Darin konnte gezeigt werden, daß in den Proteinproben der verschiedenen Stämme gleich viel EstA $\alpha$ -Protein akkumuliert war. Ausschließlich der Stamm, in dem die Gene *dnaKJ* zusätzlich exprimiert wurden, wies keine Bande auf der Höhe des EstA $\alpha$ -Proteins auf.

Schließlich wurde untersucht, ob es sich bei der im Proteingel sichtbaren EstA $\alpha$ -Bande

tatsächlich um das gewünschte Enzym handelte. Dazu wurde ein Zymogramm gel durchgeführt (Abb. C-14, C). Dafür mußten die Proteine auf einer SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend renaturiert werden. Durch Zugabe eines geeigneten Substrates, das nach hydrolytischer Spaltung unter UV-Licht fluoresziert, kann auf diese Weise die Gesamtmenge produzierter Esterase nachgewiesen werden. Dabei wurde deutlich, daß auch hier die Menge des aktiven Enzyms in allen untersuchten Stämmen vergleichbar ist. Ausschließlich in dem Stamm, in dem das Chaperonsystem DnaKJ enthalten war, konnte kein aktives EstA $\alpha$ -Protein detektiert werden.

Außerdem sollten verschiedene Kombinationen aus molekularen Chaperonen und Faltungskatalysatoren mit dem katalytisch aktiven N-Terminus der Esterase EstA coexprimiert werden. Die daraus ermittelten EstA-Aktivitäten sind in Abbildung C-15 gezeigt.

Die Aktivität des Kontrollstammes BL21(DE3)-EstA $\alpha$ -LV betrug 0,25 U/ (ml  $\cdot$  o.D.  $_{580\text{ nm}}$ ). Im Vergleich dazu wiesen einige Stämme, in denen zusätzlich die Verfügbarkeit unterschiedlicher Chaperone und Faltungskatalysatoren erhöht wurde, eine leicht bis deutlich verminderte Aktivität der Esterase auf (Abb. C-15: Gruppe I). Am deutlichsten war dieser Effekt in dem Stamm, in dem die Konzentration von PpiA, GrpE-DnaKJ und dem Triggerfaktor gesteigert wurde (Abb. C-15: 4). Hier betrug die Aktivität lediglich 0,1 U/ (ml  $\cdot$  o.D.  $_{580\text{ nm}}$ ). Ausschließlich die Variante 2, bei der die Gene *tig*, *groELS* und *clpX* coexprimiert wurden, schien keine Veränderung der Ausbeute aktiven Proteins, verglichen mit der Kontrolle, zu verursachen (Abb. C-15: Gruppe II).



**Abb. C-15: Bestimmung der Esteraseaktivität der katalytisch aktiven EstA $\alpha$ -Domäne aus *P. aeruginosa* nach Coexpression mit Chaperon- und Foldase-Kombinationen.** Von den löslichen Fraktionen der unterschiedlichen Stämme wurde die Aktivität der EstA $\alpha$ -Domäne der Esterase bestimmt. Als Kontrolle diente der Stamm mit EstA $\alpha$  und Chaperon-Leervektor (LV). Die Werte der Aktivitäten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Abhängig von der ermittelten Aktivität wurden die Stämme in Ergebnisgruppen unterteilt (K; I-III). Die in den Expressionsstämmen enthaltenen *Multisite*-Expressionsplasmide sind als Ziffern angegeben; die darin enthaltenen Faltungsmodulatoren sind in Tab. C-7 aufgeführt.

Im Gegensatz zu der Coexpression einzelner Faltungshelfergene oder -operons, bei denen die Produktion aktiven, löslichen Proteins im Vergleich zum Kontrollstamm nicht signifikant verbessert werden konnte, ist durch verschiedene Kombinationen aus Foldasen und Chaperonen eine Steigerung der Enzymaktivität meßbar (Abb. C-15; Gruppe III). Eine leichte Erhöhung der Esterase-Aktivität konnte durch die Coexpression von drei Chaperonkombinationen erreicht werden. Neben den Plasmiden pEXP-5 (*ppiA – groELS – tig*) sowie pEXP-7 (*dnaJ – dnaKJ – tig*) zeigte auch die Expression des Vektors pEXP-11 (*ppiA – groELS – ppiD*) einen positiven Einfluß auf die Produktion des EstA $\alpha$ -Proteins. Gegenüber dem Vergleichsstamm lag hier eine Erhöhung der Aktivität um den Faktor 1,6 vor. Dies bedeutet eine Aktivität von ca. 0,35-0,4 U/ (ml · o.D. 580 nm).

Am effektivsten war die Produktion der katalytisch aktiven Domäne der Esterase EstA, wenn das Plasmid mit der Faltungshelferkombination 1 (*tig – dnaKJ – clpX*) im Expressionsstamm vorlag. Hier konnte eine Verdopplung der Aktivität im Vergleich zum Kontrollstamm auf ca. 0,5 U/ (ml · o.D. 580 nm) erzielt werden. Durch SDS-Gele und Zymogrammgele konnte gezeigt werden, daß in allen Proben vergleichbare Mengen EstA $\alpha$ -Proteins vorlagen (Daten nicht gezeigt).

### 6.3 Untersuchungen zur Coexpression von Faltungsmodulatoren aus

#### *P. aeruginosa* mit der *Serratia marcescens* Lipase LipA

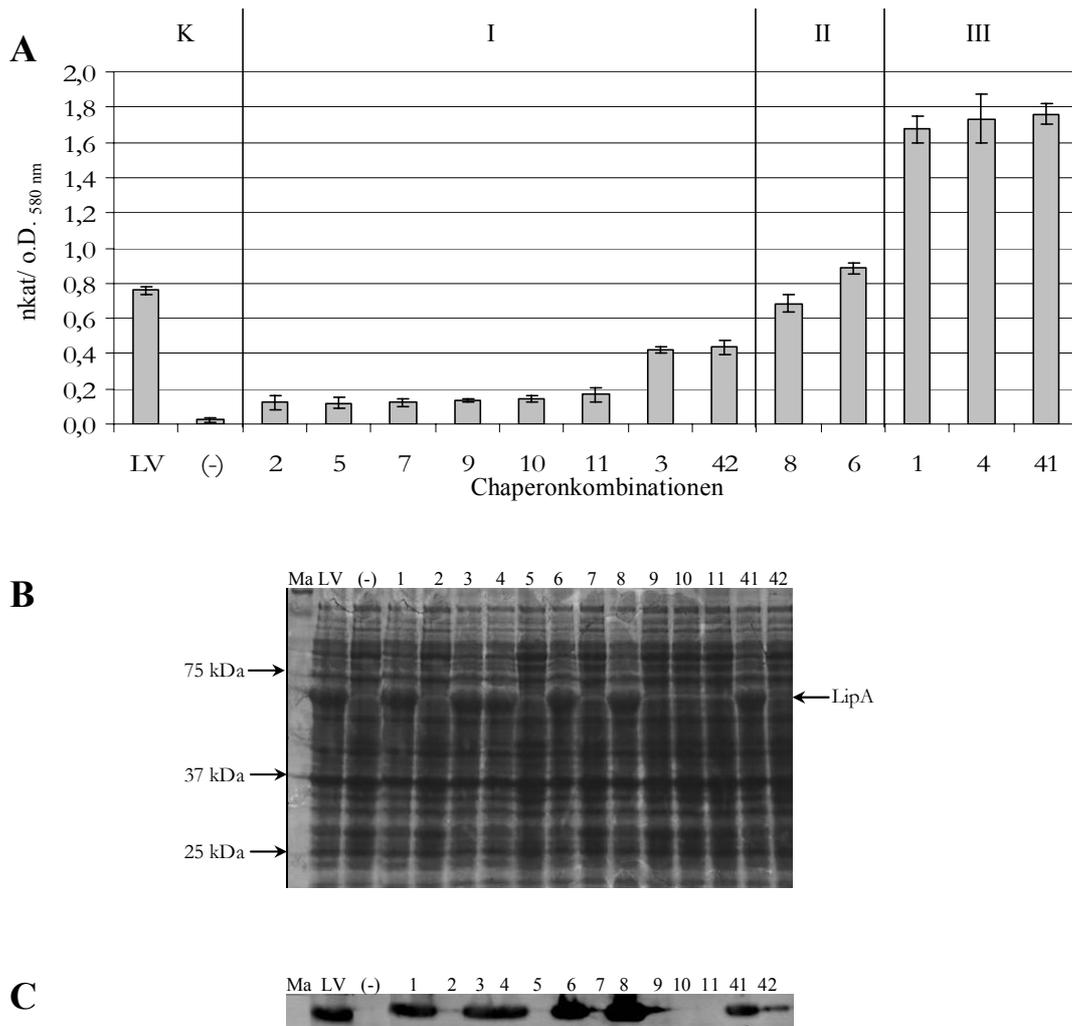
Das Enzym LipA aus dem Bakterium *S. marcescens* besitzt durch seine Zugehörigkeit zu der Enzymklasse der Lipasen eine besondere biotechnologische Bedeutung. Diese Enzyme sind sehr wichtige stereoselektive Biokatalysatoren, die sowohl bei der Veresterung als auch der Spaltung von Lipiden eine entscheidende Rolle spielen. Ferner handelt es sich bei dem Enzym aus *S. marcescens* um eine besondere Lipase, da sie mit einem Molekulargewicht von 60 kDa deutlich größer ist als die meisten Vertreter dieser Enzymgruppe (Li *et al.*, 1995).

Bei dem Versuch, die Lipase LipA aus *S. marcescens* in großen Mengen zu produzieren, akkumulierte der größte Teil des Proteins in Form von *Inclusion bodies* (Akatsuka *et al.*, 1994). Daher sollte untersucht werden, ob sich die Expression von Faltungshelfern auf die Ausbeute löslicher Lipase im heterologen Wirt *E. coli* auswirkt.

Die in Coexpressionsversuchen produzierten Proteinproben wurden in Enzymtests und auf Proteingelen untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung C-16 dargestellt.

Als Positivkontrolle und Referenz gegenüber den Stämmen, in denen Chaperone und Foldasen coexprimiert wurden, diente der als LV bezeichnete Stamm, in welchem neben dem *lipA*-Expressionsplasmid ausschließlich der Chaperon-Leervektor in den Zellen vorlag. Für

diesen Stamm konnte eine Lipase-Aktivität von ca. 0,8 nkat/ o.D. <sub>580 nm</sub> detektiert werden (Abb. C-16, A). Die Negativkontrolle wurde durch den Bakerienstamm repräsentiert, der beide verwendeten Expressionsplasmide als Leervektor enthielt und somit kein LipA-Protein erzeugen kann. Für diesen Stamm konnte keine Umsetzung des Lipase-Substrates *p*NPP im durchgeführten Enzymtest festgestellt werden. Sowohl in den SDS-, als auch in den durchgeführten Zymogrammgele, zeigten die beiden Kontrollstämme das erwartete Ergebnis.



**Abb. C-16: Einfluß der Coexpression von verschiedenen Faltungshelferkombinationen auf die Löslichkeit und Aktivität des LipA Proteins aus *S. marcescens*.** Die Aktivität (A) des löslichen LipA-Proteins ist für alle untersuchten Stämme in nkat/ o.D. <sub>580 nm</sub> angegeben. Die Werte stammen aus drei unabhängigen Messungen, anhand derer die Standardabweichungen berechnet und in Form von Fehlerbalken angegeben wurden. Als Kontrolle dienten der Stamm mit Lipase-Expressionsplasmid und Chaperon-Leervektor (LV) sowie der Stamm BL21(DE3) mit beiden Leervektoren (-). Die Nummer der Plasmide mit Kombinationen aus Chaperonen und Foldasen ist angegeben (s. Tabelle C-7). In einer durchgeführten SDS-PAGE (B) sind 10 µl von GZE-Proben aufgetragen. Deutlicher wird die Menge an LipA-Protein (60 kDa) in einem durchgeführten Zymogramm (C).

Während in der Negativkontrolle weder eine Proteinbande auf der Höhe der Lipase LipA, noch eine Umsetzung des Substrates im Zymogramm gel erfolgte, konnte für die Positivkontrolle in beiden Fällen das gewünschte Signal der 60 kDa großen Lipase nachgewiesen werden (Abb. C-16, **B** und **C**).

Durch Coexpression von Faltungshelfern zusammen mit dem Zielprotein LipA konnten deutliche Unterschiede zu dem Kontrollstamm BL21(DE3)-LV aufgezeigt werden. Ausschließlich durch zwei Kombinationen von Chaperonen und Faltungskatalysatoren, den Kombinationen 6 und 8 (s. Tab. C-7), wurde die Aktivität der Lipase nicht beeinflusst (Abb. C-16, **A**: Gruppe II). Auch hinsichtlich der Proteinakkumulation im SDS-Gel und im Zymogramm gel zeigten diese beiden Stämme das gleiche Ergebnis wie der Kontrollstamm. Bei einer Anzahl von acht Coexpressionsstämmen führte die Expression der jeweiligen Faltungsenzyme zu einer verringerten Produktion aktiven LipA-Proteins (Abb. C-16, **A**: Gruppe I). Darunter befinden sich Stämme, bei denen nahezu kein heterologes Protein in den Zellen nachgewiesen wurde. Die im Enzymtest detektierte, geringe Lipase-Aktivität basiert also darauf, daß kaum LipA-Protein akkumuliert ist (s. Kombinationen 2, 5, 7, 9, 10 und 11). Zwei weitere Stämme, bei denen die Aktivität im *p*NPP-Test deutlich unter der des Kontrollstammes lag, wiesen allerdings vergleichbare Mengen Protein im SDS- und Zymogramm gel auf. Hier scheint mehr erzeugtes Protein in Form von *Inclusion bodies* zu akkumulieren (Gruppe I: Stämme 3 und 42).

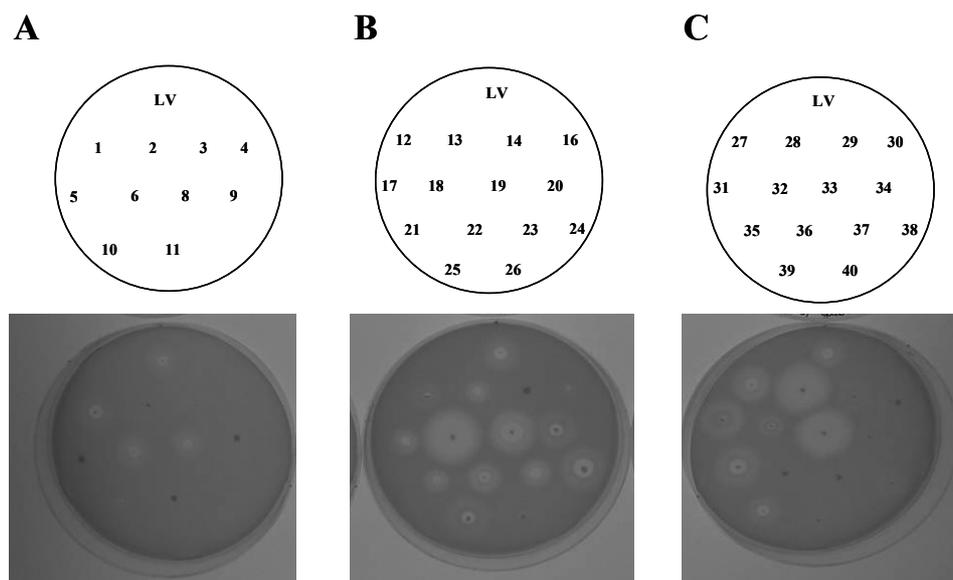
Mit Hilfe von drei Kombinationen von Faltungshelfern aus *P. aeruginosa* konnte eine Verbesserung der Aktivität festgestellt werden. Bei den Expressionsstämmen, in denen die Plasmide pEXP-1, pEXP-4 bzw. pEXP-41 vorlagen, konnte die Aktivität der Lipase LipA im photometrischen Enzymtest um 125 % gesteigert werden (Abb. C-16, **A**: Gruppe III). Im Vergleich zum Kontrollstamm zeigten diese Stämme aber weder im Protein- noch im Zymogramm gel intensivere LipA-Banden auf. Somit konnten die in diesen Stämmen exprimierten Faltungshelfer die Ausbeute aktiven LipA-Proteins verbessern.

#### **6.4 Coexpression von Faltungshelfern aus *P. aeruginosa* mit der Lipase B (CALB) aus der Hefe *Candida antarctica***

In einem weiteren Beispiel sollte untersucht werden, ob die Coexpression von Chaperonen auch die Expression der Lipase CALB aus *Candida antarctica* verbessern kann. Diese Lipase ist biotechnologisch von besonderer Bedeutung, da sie eine hohe Enantioselektivität, vor allem bei der Umsetzung von 1-Methoxy-2-Propanolacetat (MPA), aufweist. Bisher wird diese Lipase in großem Maßstab in der Hefe *Pichia pastoris* produziert (Blank *et al.*, 2006).

Aufgrund des hohen biotechnologischen Potentials dieses Enzyms ist es sehr wichtig, die Expression auch in *E. coli* zu ermöglichen, um beispielsweise ein Hochdurchsatz-Screening durchzuführen. So könnte schnell und effizient auf gewünschte neue Substratspektren oder Temperaturoptima getestet werden. Da die Ausbeute von heterolog in *E. coli* produziertem CALB-Protein bisher sehr gering ist, sollte untersucht werden, ob durch Zugabe von Faltungsmodulatoren die Ausbeute erhöht werden kann.

Durch Fusion des Lipase-Gens hinter eine *pelB*-Signalsequenz kann die Lipase ins Periplasma der *E. coli* Zellen transportiert werden. Auf diese Weise kann in Plattentests untersucht werden, ob die Zellen Lipase produzieren oder nicht. Deshalb wurden einzelne Kolonien der unterschiedlichen Stämme auf Tributyrin-Platten überimpft. Bei Aktivität der Lipase kann dabei das Tributyrin im Medium gespalten werden, wodurch um die Kolonie herum klare Höfe entstehen. In Abbildung C-17 sind drei solcher Tributyrin-Platten gezeigt (A, B und C), auf die unterschiedliche Expressionsstämme aufgebracht wurden.



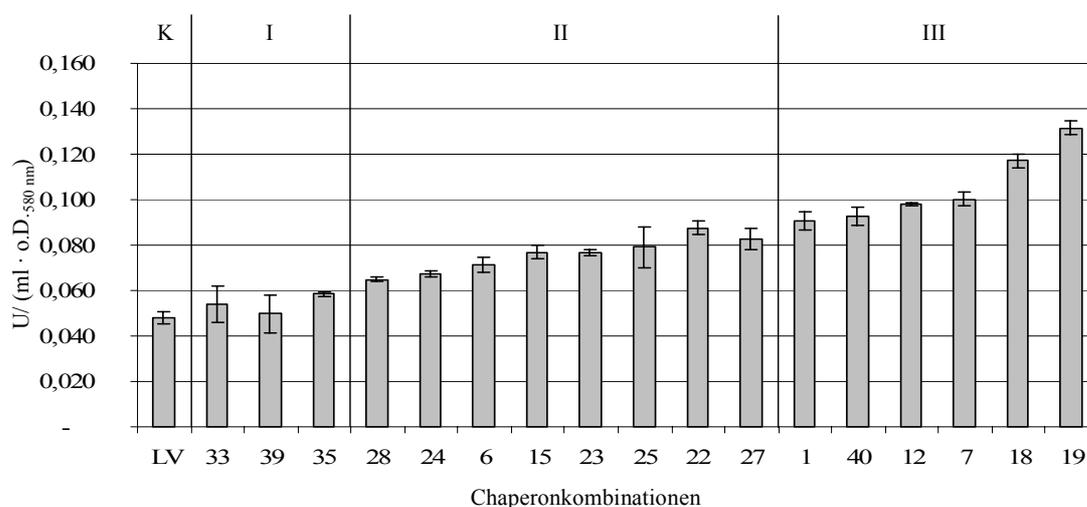
**Abb. C-17: Bestimmung der lipolytischen Aktivität von CALB durch Umsatz des Substrates Tributyrin auf Agarplatten.** Die erzeugten Expressionsstämme wurden auf Tributyrin-haltige Platten gepickt und ÜN bei 30°C inkubiert. Die Aktivität wird durch Bildung eines Hofes um die Kolonie herum detektiert. Die Ergebnisse konnten in zwei unabhängigen Anzuchten verifiziert werden. Im oberen Teil der Abbildung sind die Nummern der Chaperonkombinationen aufgeführt, die in den Stämmen vorlagen, die auf die Tributyrinplatten gepickt wurden (unterer Teil der Abbildung). Die in den Teststämmen enthaltenen Faltungsmodulatoren sind durch die Nummern der Expressionsplasmide angegeben (s. Tab. C-7).

Der Kontrollstamm (LV) wurde zum Vergleich auf alle Platten aufgetragen. Im oberen Bereich der Abb. C-17 ist angegeben, welche Chaperonkombination in dem Expressionsstamm vorlag, der auf die darunter abgebildete Agarplatte übertragen wurde.

Neben einigen Stämmen, in denen keine oder nur eine sehr geringe lipolytische Aktivität festgestellt werden konnte, fallen mehrere Expressionsstämme auf, in denen leicht bis signifikant mehr Lipase-Aktivität, verglichen mit dem Kontrollstamm, detektiert werden konnte. Mit den Plasmiden pEXP-18, -19, -28 und pEXP-33 konnte das beste Ergebnis erzielt werden. Durch die Zugabe dieser unterschiedlichen Faltungsmodulator-Kombinationen konnte die Menge aktiver Lipase deutlich gesteigert werden.

Nach einer ersten Selektion auf Tributyrinplatten konnten Stämmen identifiziert werden, die die Expression der Lipase CALB ermöglichen. Diese wurden daraufhin in eine Überexpression eingesetzt und genauer untersucht.

Nach Erhalt der löslichen Proteinproben wurden diese in einen photometrischen Test mit pNPP als Substrat eingesetzt und die Aktivität in U/ ml bestimmt (Abb. C-18). Für den Kontrollstamm (LV) konnte eine sehr geringe Aktivität von 0,05 U/ ml bestimmt werden. Bei den weiteren zwölf Expressionsstämmen korrelieren die Ergebnisse aus den beiden Aktivitätstests. Dabei können einige Stämme identifiziert werden, die im Enzymtest eine Verbesserung der Aktivität um 60 %, verglichen mit der Kontrolle, aufweisen (Abb. C-18: Gruppe II).



**Abb. C-18: Nachweis der Aktivität löslichen CALB-Proteins nach einer Überexpression in Flüssigmedium.** Die gemessene Aktivität ausgewählter Expressionsstämme ist in U/ ml angegeben. Die in den Stämmen vorliegenden Chaperonkombinationen sind durch die aufgeführten Zahlen unter dem Graphen genannt (s. Tab. C-7). Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt. Je nach Verhältnis der Enzymaktivität der Teststämme zur Kontrolle (K) wurden sie in Ergebnisgruppen zusammengefaßt (I-III).

Bei drei weiteren Stämmen führte die Coexpression von Chaperon-Kombinationen zu einer Steigerung der CALB-Aktivität um 180 %. Dazu zählt unter anderem der Stamm mit dem

Plasmid pEXP-19, in dem die Faltungsmodulatoren GroES - GroELS – PA5195 coexprimiert wurden. In beiden Enzymtests wies er eine signifikante Steigerung der lipolytischen Aktivität auf. Die Coexpression der Chaperone DsbC, GroELS und PA5195 (pEXP-18) führte bei einer Anzucht auf Agarplatten zu der deutlichsten Steigerung. Die Inkubation in Flüssigmedium rief eine Verdreifachung der Aktivität im Vergleich zum Kontrollstamm hervor, was den Umsatz des Substrates Tributyrin im ersten Enzymtest bestätigte.

Überraschenderweise wiesen die drei Stämme mit den *Multisite*-Vektoren pEXP-33, -35 und -39 eine ebenso schwache Lipase-Aktivität auf wie der Kontrollstamm (Abb. C-18: Gruppe I). In dem durchgeführten Tributyrin-*Screening* konnte für diese drei Stämme ein deutlich größerer Hof als bei dem Expressionsstamm mit dem Chaperon-Leervektor festgestellt werden. Auch für den Stamm mit dem Plasmid pEXP-12 konnte das Ergebnis der Tributyrinplatten in diesem Fall nicht verifiziert werden. Während auf den Agarplatten mit Tributyrin als Substrat fast kein Hof um die Kolonie sichtbar wurde, zeigte sich im *pNPP*-Test, der mit Flüssigkulturen durchgeführt wurde, eine Verdopplung der Aktivität.

Mit Hilfe dieser Ergebnisse wird deutlich, daß nach einem ersten *Screening* auf verbesserte CALB-Produktion nicht zwingend auf das Potential des jeweiligen Stammes geschlossen werden kann, aktives Zielprotein zu erzeugen. In den meisten Fällen konnte aber, bei insgesamt niedriger Aktivität, die Tendenz zu einer verbesserten Expression auf den Tributyrinplatten auch nach einer Überexpression in Flüssigkultur und der Umsetzung des Substrates *pNPP* bestätigt werden.

**Die letzten drei untersuchten Enzyme gehörten zu der Familie der Hydrolasen. In allen Fällen konnte durch Coexpression von Chaperonen und Faltungshelfern aus *P. aeruginosa* die Aktivität des Zielproteins gesteigert werden. Die verantwortlichen Faltungshelfer-Kombinationen variierten allerdings bei den verschiedenen Zielproteinen.**

**Die Coexpression von Chaperonen und Faltungskatalysatoren mit dem katalytisch aktiven Teil der Esterase EstA zeigte im Falle der einzelnen Faltungshelfer keinen deutlichen Einfluß auf die Ausbeute von EstA $\alpha$ -Protein. Durch die Zugabe von Chaperon- und Foldase-Kombinationen konnte allerdings eine Verbesserung der Aktivität löslichen EstA $\alpha$ -Proteins um 60 - 100 % (pEXP-1) festgestellt werden.**

**Durch Coexpression von drei der verfügbaren *Multisite*-Kombinationen mit Faltungshelfern aus *P. aeruginosa* konnte eine Steigerung löslichen, aktiven LipA-Proteins um 125 % (z.B. pEXP-1: Tig, DnaKJ und ClpX; oder pEXP-4: PpiA, GrpE DnaKJ und Tig) erzielt werden.**

Die Coexpression unterschiedlicher Kombinationen von Faltungshelfern führte in vielen Fällen zu einer Verbesserung der CALB-Produktion im heterologen Wirt *E. coli*. Mit der Coexpression der Faltungshelfer DsbC, GroELS und PA5195 (pEXP-18) konnte eine deutliche Steigerung der Aktivität auf Tributyrinplatten, und eine Verbesserung um 180 % im *p*NPP-Test nach Anzucht in Flüssigkultur festgestellt werden. Durch die Erhöhung der Konzentration von GroES, GroELS und PA5195 konnte in den beiden unterschiedlichen Lipase-Nachweisen ein vergleichbares Resultat erzielt werden; die Expression aktiven, löslichen CALB-Proteins konnte um 140 % gesteigert werden.

## 6.5 Coexpression von Chaperonen und Faltungskatalysatoren mit dem Grün-fluoreszierende Protein (GFP)

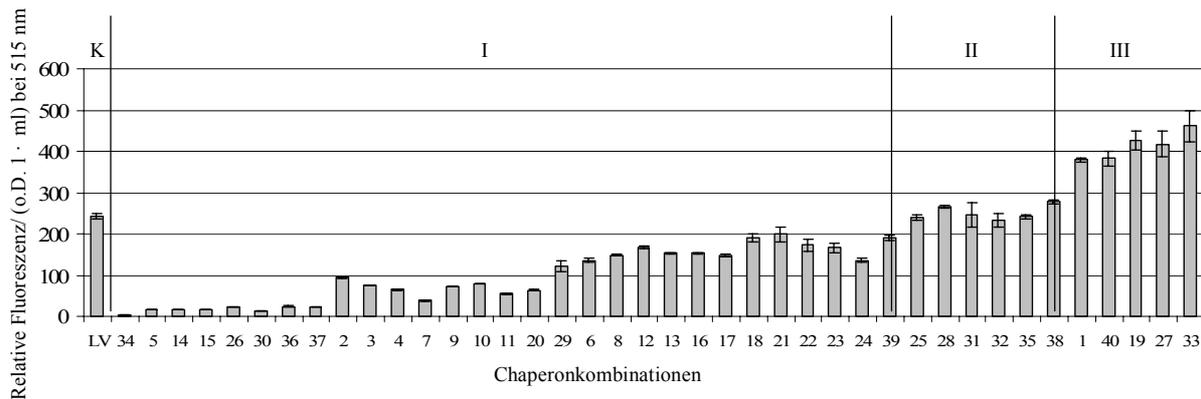
Das Grün-fluoreszierende Protein wird in der Wissenschaft unter anderem als Marker für Faltungsprozesse eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, daß GFP durch direkten Einfluß von Chaperonen seine aktive Konformation erreicht (Pedelacq *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2002).

Zuerst wurden einzelne Chaperone und Foldasen hinsichtlich der Produktion aktiven, löslichen GFP-Proteins untersucht. Dabei konnte kaum eine Veränderung der maximalen relativen Fluoreszenz festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die höchsten Werte konnten in dem Stamm beobachtet werden, in dem das Chaperonsystem GroELS coexprimiert wurde, wobei die Fluoreszenz (515 nm) 1,6-fach erhöht war.

Danach sollte überprüft werden, ob Kombinationen von Chaperonen und Foldasen die Faltung von GFP verbessern konnten. Für den Kontrollstamm wurde eine relative Fluoreszenz von ca. 240 pro ml ermittelt (Abb. C-19: K). Die Proben wurden vorher auf eine Zelldichte, ermittelt durch die o.D. <sub>580 nm</sub>, von 1 eingestellt. Mit 28 Proben führten die meisten Chaperonkombinationen zu einer Reduktion der Menge fluoreszierenden, löslichen Proteins (Abb. C-19: Gruppe I). Durch die Coexpression von sechs *Multisite*-Expressionsplasmiden wurde eine vergleichbare Fluoreszenz zum Kontrollstamm ermittelt (Abb. C-19: Gruppe II). Es konnten aber auch Stämme identifiziert werden, die mehr aktives GFP produzieren konnten als die Kontrolle. Hier führte die Expression von Faltungsmodulatoren zu Werten der relativen Fluoreszenz von 400-500, also einer Steigerung der Menge aktiven Proteins um 100 % in den besten Fällen.

Die effektivsten *Multisite*-Kombinationen hinsichtlich der GFP-Expression waren pEXP-1 (Tig, DnaKJ und ClpX), pEXP-40 (SurA, GroELS und HslU), aber vor allem pEXP-19 (GroES, GroELS und PA5195), pEXP-27 (PpiC2, HslVU und PA5195) und pEXP-33

(PA3262, HscAB und LolA).



**Abb. C-19: Einfluß von *P. aeruginosa* Faltungshelfern auf die relative Fluoreszenz des Faltungsreporters GFP.** Die relative Fluoreszenz des GFP wurde nach Anregung bei 475 nm pro o.D. 1 und ml Probe bei einer Emissionswellenlänge von 515 nm bestimmt. Die Standardabweichungen aus zwei voneinander unabhängigen Messungen sind durch Fehlerbalken angegeben. Die in den Teststämmen enthaltenen pEXP-Plasmide sind durch die Nummern angegeben (s. Tab. C-7).

**Durch einzelne coexprimierte Chaperone oder Faltungskatalysatoren wurde die relative Fluoreszenz bei 515 nm im Vergleich zum Kontrollstamm kaum verändert. Das beste Ergebnis wurde durch das Chaperonsystem GroELS erzielt, das den Maximalwert der Fluoreszenz und den Faktor 1,6 steigern konnte. Die Coexpression von *Multisite*-Expressionsvektoren konnte in einigen Fällen die Produktion aktiven, löslichen GFPs sogar um den Faktor 2 verbessern.**

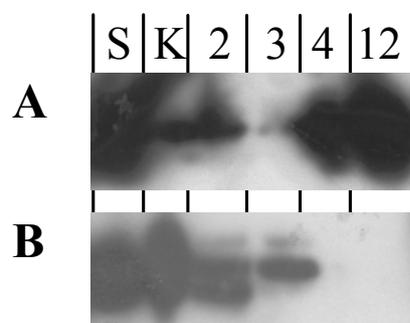
## 6.6 Verbesserung der Produktion von humanem Interferon $\alpha 2b$

Ein weiteres Zielprotein stellt das menschliche Interferon alpha 2b (IFN $\alpha 2b$ ) dar. Dieses Protein wird in der Medizin zur Behandlung von verschiedenen Krankheiten eingesetzt, wie Hepatitis, Krebsarten wie beispielsweise Leukämie oder bei AIDS-vermitteltem Kaposisarkom (Dorr, 1993; Guttermann, 1994; Kaser & Tilg, 2000). Die Produktion einer großen Menge löslichen Proteins hat demnach eine besondere Bedeutung für die pharmazeutische Industrie. Zwar kann das IFN $\alpha 2b$ -Protein heterolog in *E. coli* exprimiert werden, doch werden zum Einen nur geringe Ausbeuten erzielt und zum Anderen akkumuliert der größte Teil in Form von *Inclusion bodies*. Daraus wird dann im Anschluß das IFN $\alpha 2b$ -Protein isoliert, renaturiert und weiter verwendet (Valente *et al.*, 2006). Die Extraktion von Proteinen aus *Inclusion bodies* ist zwar ein gängiger, aber Kosten- und Zeitaufwendiger

Prozeß (Thatcher, 1990). Aus diesem Grund werden in der Industrie alternative Expressionsstrategien zur Produktion dieses Proteins verfolgt. Beispielsweise soll das Protein aus dem Cytoplasma heraus transportiert werden, um in möglichst großer Menge im Kulturüberstand zu akkumulieren. Dieser Prozeß ist derzeit noch sehr ineffektiv und ein großer Teil des produzierten Proteins verbleibt in Form von *Inclusion bodies* im Cytoplasma (Beldarrain *et al.*, 2001).

Die beschriebenen Eigenschaften machen das menschliche Protein Interferon alpha 2b zu einem guten Modellprotein aus einem eukaryotischen Organismus, für das die Chaperon-*Toolbox* getestet werden kann. Deshalb wurden einige der verfügbaren *Multisite*-Expressionsvektoren in IFN $\alpha$ 2b-exprimierende *E. coli* BL21(DE3)-Zellen eingebracht und Coexpressionen durchgeführt. Dabei wurde das IFN $\alpha$ 2b-Protein mit einer N-terminalen Signalsequenz exprimiert, die einen Transport aus dem Cytoplasma heraus ermöglichen sollte.

Als Kontrolle wurde ein BL21(DE3)-Stamm verwendet, der neben dem Interferon-Expressionsplasmid den Chaperon-Leervektor pBBR1MCS-3 enthielt (Abb. C-20: K). Für diesen Stamm konnte gezeigt werden, daß ca. 70 % des erzeugten IFN $\alpha$ 2b-Proteins im GZE vorlag und 30 % im Medium nachgewiesen werden konnte (s. Abb. C-20).



**Abb. C-20: Einfluß von Chaperonen und Faltungskatalysatoren aus *P. aeruginosa* auf die Stabilität des humanen IF2ab-Proteins.** Zur Bestimmung der Lokalisation und Menge des produzierten Zielproteins wurden Proteinproben aus dem Kulturüberstand (A) und aus GZE (B) in einem Western-Blot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers detektiert. Als Kontrolle wurde Standardprotein (0,05 µg; S) bzw. der IFN2ab-Expressionsstamm mit Chaperon-Leervektor (K) aufgetragen. Die coexprimierten Chaperonkombinationen sind durch Nummern gekennzeichnet (s. Tab. C-7).

Von 13 unterschiedlichen Teststämmen führte die Coexpression von drei Chaperon-Kombinationen dazu, daß keine nachweisbare IFN $\alpha$ 2b-Menge, weder im GZE noch im Kulturüberstand, detektiert werden konnte (pEXP-10, -13 und pEXP-14; Daten nicht gezeigt).

In weiteren Stämmen führte die zusätzliche Expression von Faltungsmodulatoren dazu, daß IFN $\alpha$ 2b-Protein nachgewiesen werden konnte. In den meisten Fällen entsprach die Menge und Verteilung des Zielproteins der des Kontrollstammes, beispielsweise der Stamm mit dem *Mutlisite*-Expressionsvektore pEXP-2 (Tig, GroELS, ClpX). Die Coexpression des Plasmides pEXP-3 (Tig, DnaKJ und PpiD) führte dazu, daß nur ein sehr geringer Proteinanteil ins Kulturmedium gelangen konnte und ca. 90 % des produzierten IFN $\alpha$ 2b-Proteins unlöslich in Form von *Inclusion bodies* im Cytoplasma akkumuliert war (Abb. C-20: 3). In zwei weiteren Stämmen mit den Expressionsplasmiden pEXP-4 bzw. pEXP-12 (s. Tab. C-7) war mehr IFN $\alpha$ 2b-Protein nachweisbar als in der Kontrolle. Durch Coexpression beider Vektoren konnte beobachtet werden, daß der größte Anteil des IFN $\alpha$ 2b-Proteins hier im Kulturmedium vorhanden war, während nur eine sehr geringe Menge des Proteins im GZE detektiert werden konnte. Fast das gesamte IFN $\alpha$ 2b-Protein wurde also aus der Bakterienzelle heraus transportiert.

**Für die Expression von IFN $\alpha$ 2b-Protein konnte ein Einfluß von Faltungsmodulatoren auf die Produktmenge festgestellt werden.**

**Durch die Chaperone GroES, DnaKJ und PA5195 wurde die stärkste Produktion des Zielproteins, verglichen mit dem Kontrollstamm, erreicht. Dabei wurde das synthetisierte IFN $\alpha$ 2b-Protein sogar vollständig aus der Zelle ins Kulturmedium transportiert, so daß eine teure nachfolgende Aufreinigung des Proteins aus *Inclusion bodies* überflüssig würde.**

## **6.7 Einfluß von coexprimierten Faltungsmodulatoren in *P. aeruginosa* PAH11**

Bisher wurden die Chaperonvektoren ausschließlich im heterologen Wirt *E. coli* eingesetzt. Dadurch konnte getestet werden, daß sie einen Einfluß auf die Produktion unterschiedlicher Zielproteine haben.

In einem weiteren Versuch sollte nun überprüft werden, ob diese Plasmide auch im homologen Wirt *P. aeruginosa* Einfluß auf die Produktion von Proteinen nehmen können. Von Filloux (Marseille) und Mitarbeitern konnte ein Stamm konstruiert werden (bisher nicht veröffentlicht), der deutlich mehr proteolytisch aktive Enzyme sekretieren kann als der Wildtyp. Dieser hypersekretierende Stamm wird als *P. aeruginosa* PAH11 bezeichnet.

Zu den in großer Menge sekretierten Proteinen zählen unter anderem das Exotoxin A und die Elastase LasB, die beide über den TypII-Sekretionsweg transportiert werden. Im Gegensatz zu der verstärkten Sekretion von Proteasen wie LasB konnte für die Lipase LipA eine

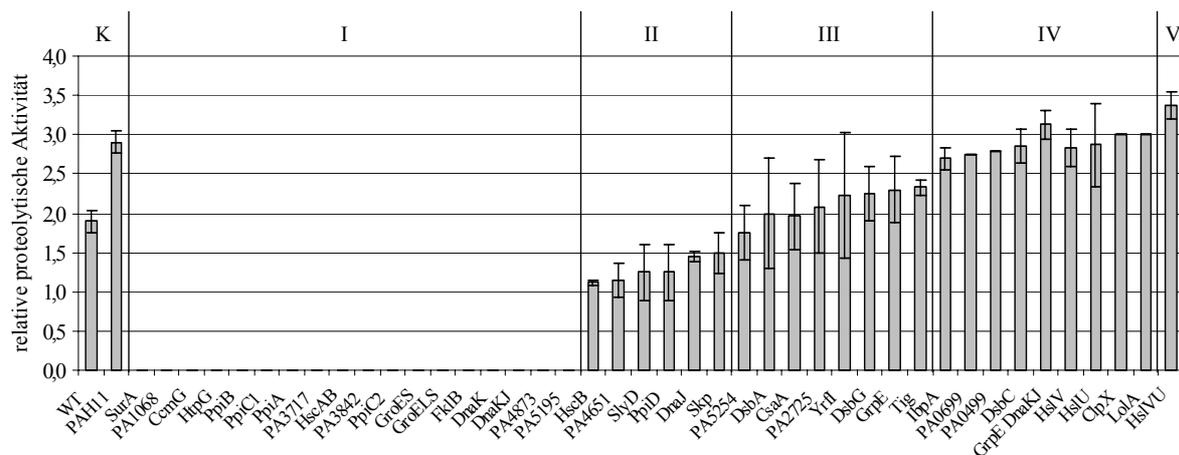
Abnahme der sekretierten Enzymmenge in dem Stamm PAH11 nachgewiesen werden. Die Produktion von Proteasen, zu deren Enzymgruppe auch das Protein LasB zählt, kann mit Hilfe von *Skim-milk*-Indikatorplatten nachgewiesen werden. Das produzierte und sekretierte Enzym kann das Milchpulver im Medium proteolytisch spalten, wodurch ein klarer Hof um die Kolonie entsteht. Je mehr aktives Protein aus der Zelle sekretiert wird, um so größer ist der klare Hof, der die Zelle umgibt.

Um zu analysieren, ob die Produktion der Elastase LasB in dem Stamm PAH11 durch die Coexpression von Chaperonen weiter gesteigert bzw. die Produktion der Lipase LipA wiederhergestellt werden kann, wurde die Chaperoncoexpressionsbank auch in diesem Stamm getestet. Dazu wurden die entsprechenden pEXP-Plasmide in PAH11-Zellen eingebracht und zum Nachweis der Protease-Produktion auf *Skim-milk* Platten, zur Detektion der Lipase LipA auf Tributryrinplatten, ausgebracht und mit dem Kontrollstamm verglichen. Anhand der Hofbildung um die Bakterienkolonien herum konnte auf die Menge produzierten Enzyms geschlossen werden. Dabei konnte festgestellt werden, daß weder in dem Kontrollstamm, der den entsprechenden pEXP-Leervektor enthielt, noch in den Stämmen, in denen Faltungsmotoren coexprimiert wurden, Lipase-Aktivität nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Trotz längerer Inkubation im Kühlschrank blieb die Hofbildung in allen Stämmen aus. Lediglich in der Positivkontrolle, dem Wildtyp, konnte Lipase-Aktivität gezeigt werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich auf den *Skim-milk*-Platten bei vielen getesteten Stämmen eine Hofbildung um die Kolonie herum, was auf die Aktivität sekretierter Elastase LasB hinweist (Abb. C-21).

Hierbei führte die Coexpression einzelner Faltungshelfer im *P. aeruginosa* Stamm PAH11 in fast allen Stämmen zu einer Abnahme der Protease-Aktivität auf den Indikatorplatten (Abb. C-21: Gruppe I - III), die in vielen Fällen vollständig verloren ging (Abb. C-21: Gruppe I). Einige Stämme führten zu vergleichbaren Protease-Aktivitäten wie der Wildtypstamm (Abb. C-21: Gruppe III). Bei neun getesteten Stämmen entsprach die ermittelte Protease-Aktivität der des Kontrollstammes (Abb. C-21: Gruppe IV). Ausschließlich die Zugabe der Zwei-Komponenten-Protease HslVU führte zu einer leichten Steigerung der Protease-Aktivität, verglichen mit dem LV-Stamm. Hier lag die Aktivität bei 116 % im Gegensatz zu 100 % in der Kontrolle (Abb. C-21: Gruppe V).

Im Unterschied dazu führten Kombinationen von Faltungsmotoren in allen getesteten Stämmen dazu, daß Protease-Aktivität detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). In wenigen Stämmen führte das Vorhandensein von Chaperonen zu einer Abnahme der Enzymaktivität, verglichen mit dem Kontrollstamm. Für die meisten Stämme konnte allerdings kein Unterschied zum hypersekretierenden PAH11-Stamm mit Leervektor

nachgewiesen werden.



**Abb. C-21: Einfluß einzelner Faltungsmodulatoren aus *P. aeruginosa* auf die Produktion sekretierter Protease im hypersekretierenden Stamm PAH11.** Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgte auf Indikatorplatten und ist als relative proteolytische Aktivität angegeben. Dazu wurde das Verhältnis der Bakterienkolonie zu der Hofbildung bestimmt. Je nach ermittelter Aktivität können die Stämme in verschiedene Ergebnisgruppen (K; I-V) unterteilt werden. Die Namen der enthaltenen Chaperone sind angegeben.

Es konnten aber einige Stämme identifiziert werden, die eine Zunahme der Protease-Aktivität gegenüber der PAH11-Kontrolle aufwiesen. Dazu zählten vor allem drei Stämme, in denen die folgenden Faltungshelfer vorlagen: a) pEXP-31: CsaA, HscAB und PpiD (300 % Aktivität), b) pEXP-33: PA3262, HscAB und LolA (300 % Aktivität) und außerdem c) pEXP-24: PA4873, HslVU und YrfI (400 % Aktivität; Daten nicht gezeigt).

Vergleicht man die Ergebnisse der LipA- mit denen der Protease-Untersuchungen kann festgestellt werden, daß der Verlust der LipA-Produktion nicht durch Faltungsmodulatoren wiederhergestellt werden kann. Für die Tests zur Protease-Aktivität konnte hingegen nachgewiesen werden, daß Chaperone und/ oder Foldasen Einfluß auf die Menge sekretierter Proteasen nehmen.

**Für die produzierten Proteasen, zu denen auch das Enzym LasB zählt, konnten einige Chaperonkombinationen identifiziert werden, welche zu einer deutlichen Verbesserung der Sekretion dieser Enzyme um den Faktor 3-4 führten.**

## D Diskussion

Die Anzahl rekombinanter Proteine, die zur Charakterisierung in der Wissenschaft oder zum Einsatz in der Industrie exprimiert werden, hat in den letzten Jahren immer weiter zugenommen. Darunter befinden sich mittlerweile auch komplexe Proteine, die heterolog produziert werden können. In dem Bakterium *E. coli* werden diese Proteine jedoch nicht immer in ausreichenden Mengen oder in einer biologisch aktiven Form hergestellt. Probleme, die bei ihrer Produktion auftreten können, sind unter anderem zu hohe Expressionsraten, Fehlfaltungen oder geringe Stabilität des Zielproteins. Diese *Bottlenecks* führen teilweise dazu, daß das erzeugte Produkt direkt nach der Synthese proteolytisch abgebaut wird oder in Form von unlöslichen Aggregaten (*Inclusion bodies*) in der Zelle akkumuliert. In manchen Fällen können diese Proteinaggregate nach dem Zellaufschluß wieder solubilisiert und das rekombinante Protein dann *in vitro* in seine natürliche Konformation überführt werden. Die hierzu nötigen Schritte sind jedoch mit enormen Kosten und zusätzlichem Zeitaufwand verbunden.

Vor allem molekulare Chaperone und Faltungskatalysatoren nehmen Einfluß auf solche zellulären Prozesse wie Proteolyse, Faltung oder Stabilisierung des Proteins. In vielen empirischen Versuchen konnte gezeigt werden, daß die Coexpression von Zielgen und Chaperonen die Ausbeute von rekombinanten Proteinen deutlich erhöhen kann.

Darauf basierend wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Strategie verfolgt, die Expression rekombinanter Proteine in Gram-negativen Bakterien systematisch zu optimieren: a) Es wurde das gesamte *Set* an Faltungshelfergenen aus dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* identifiziert und isoliert, b) in *broad-host-range* Expressionsvektoren eingebracht und schließlich c) auf ihren Einfluß bei der Produktion unterschiedlicher Proteine hin untersucht.

### 1 Strategien zur Expression rekombinanter Proteine

Unter dem Begriff weiße Biotechnologie versteht man die Anwendung von Biokatalysatoren in verschiedenen Industriezweigen, wie der chemischen Industrie, der Nahrungs- und Futtermittelindustrie, der Zellstoff- und Papierproduktion, sowie der Textil- und Waschmittelindustrie (EuropaBio, 2003; Lorenz & Zinke, 2005). Beispielsweise wird in der chemischen Industrie immer häufiger auf biotechnologische Verfahren zurückgegriffen, da hierdurch nicht nur schädliche Nebenprodukte, wie übermäßige CO<sub>2</sub>-Produktion, verhindert werden können, sondern auch eine Reduktion der Produktionskosten um bis zu 90 % möglich ist (Beilen & Li,

2002). Derzeit werden bereits 5 % aller chemischen Produkte unter Verwendung biotechnologischer Schritte erzeugt (Festel *et al.*, 2004) und das jährliche Wachstum an industriell eingesetzten Enzyme wächst, je nach Industriebereich, zwischen 2 % und 25 % (Beilen & Li, 2002). In Tabelle D-1 sind einige Enzyme sowie ihre Anwendung zusammengefaßt, die als Biokatalysatoren Einsatz in der Industrie finden. Dazu zählen verschiedene Enzymklassen wie Alkoholdehydrogenasen oder Penicillinacylasen, die zur Herstellung von Chemikalien verwendet werden, aber auch Enzyme, die in der Lebensmittelindustrie Anwendung finden, wie beispielsweise Aminopeptidasen. Nach einer Studie der Beratungsagentur McKinsey wurde im Jahr 2003 aufgezeigt, daß sogar 60 % aller Feinchemikalien unter Einsatz von Enzymen oder Ganzzellsystemen produziert werden könnten (McKinsey, 2003). Anhand dieser Zahlen wird deutlich, daß das Interesse an Proteinen und Organismen aus der Natur immer weiter steigt.

**Tabelle D-1: Auflistung diverser industriell genutzter Enzyme.**

Enzyme	Quelle/ Typ	Anwendung
Alkoholdehydrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Herstellung optisch aktiver Chemikalien
Aminoacylase	Schweinenieren	Herstellung von chiralen oder racemischen Aminosäuregemischen
Aminopeptidase	<i>Lactobacillus lactis</i>	Nahrungsmittelindustrie
Histidase	<i>Achromobacter liquidum</i>	Kosmetika
Lipasen/ Esterasen	Phospholipasen, Esterasen, Phosphatasen	Waschmittelindustrie, Molkerei, Lederproduktion, Chemikalienproduktion
Penicillinacylase	<i>E. coli</i> , <i>Bacillus megaterium</i>	chemische Synthese
Pepsin	Rinder- oder Schweinemagen	Käseproduktion
Subtilisin	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	Herstellung optisch aktiver Chemikalien oder Pharmazeutika

Durch die Verbesserung molekularbiologischer Methoden und Technologien konnten in den vergangenen Jahren immense Fortschritte hinsichtlich der industriellen Nutzung von Proteinen und Naturstoffen erzielt werden. So sind inzwischen mit Hilfe sogenannter Metagenomansätze Gene, Enzyme und bioaktive Moleküle verfügbar, die aus bisher nicht-kultivierbaren Mikroorganismen isoliert werden konnten (Handelsmann, 2004; Lorenz & Eck, 2005). Da das Vorkommen von Bakterien in bestimmten Habitaten enorm groß ist, scheint das biotechnologische Potential beinahe unerschöpflich. Hierdurch konnte in den letzten Jahren eine große Anzahl von Enzymen identifiziert und charakterisiert werden, die inzwischen in industriellen Prozessen angewendet werden (Cowman *et al.*, 2004; Elend *et al.*, 2006; Streit *et al.*, 2004; Steele & Streit, 2005).

Außerdem sind Methoden wie *Directed evolution* oder *Gene shuffling* etabliert, die eine Selektion funktioneller Gene, sowie deren Mutation hin zu gewünschten Fähigkeiten, ermöglichen. Diese *in vitro* Evolutionsansätze liefern die Möglichkeit, Proteine mit benötigten Eigenschaften zu erzeugen und zu identifizieren (Tao & Cornish, 2002). Die Entwicklung von Hochdurchsatz-Selektions-Technologien erlaubt dabei die Identifizierung einzelner Gene, deren Genprodukte eine gewünschte Reaktion mit hoher Effizienz umsetzen können (Bornscheuer, 2005; Jaeger *et al.*, 2001; Jaeger & Eggert, 2004; Lutz & Patrick, 2004).

Unter natürlichen Bedingungen und im homologen Wirt werden diese Produkte in der Regel nur in geringen Mengen erzeugt. Da große Ausbeuten dieser Proteine erzielt werden müssen, um in industrielle Prozesse oder als pharmazeutische Substanzen eingesetzt werden zu können, mußten geeignete Expressionssysteme und -strategien entwickelt werden.

### 1.1 Vorteile mikrobieller Expressionssysteme

Um Proteine in industrielle Prozesse einbinden zu können, müssen diese in ausreichender Menge und möglichst preisgünstig hergestellt werden. Aus diesem Grund wurden unterschiedlichste Expressionssysteme für pro- und eukaryotische Organismen entwickelt und in vielen Fällen erfolgreich eingesetzt (Schmidt, 2004).

Während das Bakterium *Escherichia coli* oder die Hefe *Pichia pastoris* im Bereich der Grundlagenforschung bevorzugt werden, finden menschliche Zelllinien, CHO- (chinese hamster ovary) oder BHK- (baby hamster kidney) Zellen vermehrt Anwendung in pharmazeutischen oder industriellen Produktionsprozessen (Andersen & Krumme, 2002; Schmidt, 2004). Der Grund dafür liegt hauptsächlich darin begründet, daß bei der Produktion eukaryotischer Proteine bestimmte posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen, Glycosylierungen oder proteolytische Prozessierungen für deren biologische Aktivität essentiell sind. Diese können von Bakterien oder niederen Eukaryoten nicht oder nur bedingt durchgeführt werden (Gervais *et al.*, 2003; Singh & Bhalla, 2006). Außerdem ist die Produktion eukaryotischer Proteine in solchen Expressionssystemen z.T. derzeit noch günstiger als in mikrobiellen Systemen, da z.B. nachfolgende Rückfaltungsprozesse umgangen werden können (Datar *et al.*, 1993; Farid, 2006). Jedoch hat die Nutzung der verfügbaren Zellsysteme höherer Eukaryoten diverse Nachteile. Verglichen mit Hefen oder Bakterien ist ihre Kultivierung sehr aufwendig, kostspielig und die erzielten Produktausbeuten sind in der Regel sehr gering (Schmidt, 2004; Singh & Bhalla, 2006). So konnten die menschlichen Proteine Collagenase IV (300 mg/l), Proapolipoprotein AI (80 mg/l)

l) oder Apolipoprotein AI (80 mg/ l) in Insekten- oder CHO-Zellen nur in kleinen Mengen produziert werden (George *et al.*, 1997; Pyle *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1997). Die homologe Produktion des menschlichen Laminin in HEK-Zellen erbrachte sogar nur 1 mg des gewünschten Proteins pro 1 Zellkultur (Kariya *et al.*, 2002). Auch die Produktion monoklonaler Antikörper ist bisher nicht effektiv. Hohen Dosen wie sie gegen Krebs oder Autoimmunkrankheiten eingesetzt werden müssen, können nur unter Aufwendung hoher Kosten erzeugt werden. Daher zählen monoklonale Antikörper derzeit zu den teuersten Medikamenten weltweit (ca. 35.000 \$ pro Patient und Jahr; Farid, 2006). Ein weiterer Nachteil von Zelllinien ist, daß ihre Produktivität nicht konstant ist und innerhalb kurzer Zeit stark abnehmen kann (Hartman *et al.*, 2006). Zusätzlich sind diese Zellsysteme anfällig gegenüber proteolytischem Abbau. Dadurch wird sowohl die Stabilität der zur Expression verwendeten Zellen als auch das produzierte Protein selber beeinflusst (Ikonomou *et al.*, 2003).

Die meisten biotechnologisch relevanten Proteine pro- oder eukaryotischer Herkunft können ohne posttranslationale Modifikationen ihre biologische Funktion erfüllen. Daher kann zur Expression solcher rekombinanten Proteine auf mikrobielle Systeme zurückgegriffen werden. Diese können nicht nur kostengünstiger und mit weniger Aufwand genutzt werden, sondern auch schneller und stabiler erzeugt und eingesetzt werden (Schmidt, 2004; Graumann & Premstaller, 2006). Vergleicht man mikrobielle Systeme wie die Hefe *P. pastoris* und das Bakterium *E. coli* miteinander, so haben beide Vor- und Nachteile, die man bei der Wahl des Expressionssystems abwägen muß. So ist die Produktion einiger eukaryotischer Proteine in einem Hefesystem oftmals effektiver als die Expression in einem Bakterium. Beispielsweise konnte die Lipase CALB aus der psychrophilen Hefe *Candida antarctica* bisher in dem Organismus *P. pastoris*, aber nicht in *E. coli* produziert werden (Blank *et al.*, 2006; Rotticci-Mulder *et al.*, 2001). Erst nach Anpassung der Signalsequenz für den Transport der Lipase ins bakterielle Periplasma konnten sehr geringe Mengen aktiver Lipase CALB im heterologen Wirt *E. coli* produziert werden (Blank *et al.*, 2006). Dieses Enzym ist von besonderem biotechnologischen Interesse, da es eine große Anzahl unterschiedlicher Substrate umsetzen kann (Blank *et al.*, 2006). Außerdem weist es eine enorme Regio- und Stereoselektivität gegenüber sekundären Alkoholen auf (Magnusson *et al.*, 2005). Weiter sind CALB-Varianten verfügbar, die für lange Zeit bei hohen Temperaturen aktiv bleiben, was den Einsatz in anspruchsvollen industriellen Prozessen erlaubt (Zhang *et al.*, 2003). Aufgrund des hohen biotechnologischen Potentials der Lipase CALB ist es wichtig, die Expression auch in *E. coli* zu ermöglichen, um beispielsweise Hochdurchsatz-Screenings durchzuführen. Auf diese Weise kann das Verfahren von der Identifikation verbesserter CALB-Protein-Varianten bis zu

ihrer Produktion deutlich erleichtert und verkürzt werden (Blank *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2003).

## 1.2 Expression rekombinanter Proteine in *Escherichia coli*

Unter den verfügbaren Expressionssystemen zählt das Bakterium *E. coli* zu den weitaus vielfältigsten Expressionswirten, die man zur Expression rekombinanter Proteine einsetzen kann (Baneyx, 1999; Jana & Deb, 2005; Sørensen & Mortensen, 2005; Swartz, 2001). Kaum ein anderer Organismus wurde genetisch besser untersucht als dieses Bakterium. Es ist in Bezug auf Transkription, Translation und Proteinfaltung am besten verstanden, und die Möglichkeit, sehr gute genetische *Tools* einsetzen zu können, ermöglichen die Expression eines breiten Spektrums an pro- und eukaryotischen sowie einfachen bis komplexen Proteinen (Graumann & Premstaller, 2006). Bei der Wahl eines geeigneten Expressionssystems können in diesem Organismus Proteinausbeuten erzielt werden, die ca. 50 % des Gesamtproteingehaltes darstellen (de Marco *et al.*, 2005; Viitanen *et al.*, 2003). Viele in der Literatur beschriebene Probleme, die bei dem Einsatz von *E. coli* als Expressionswirt auftreten können, scheinen mittlerweile gelöst werden zu können. Dabei unterscheidet man generelle Techniken, die man ausnutzen kann, um die Expression eines Zielgens zu optimieren, und Protein-spezifische Techniken (Weickert *et al.*, 1996).

Für das Bakterium *E. coli* wurden viele unterschiedliche Expressionsstrategien entwickelt. Das am häufigsten verwendete System basiert auf der Nutzung der T7-RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 (Sørensen & Mortensen, 2005). Dieses System ist nicht nur für *E. coli*, sondern auch für eine Vielzahl weiterer Gram-negativer Bakterien beschrieben, wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodobacter capsulatus* oder *Pseudomonas putida* (Brunschwig & Darzins, 1992; Drepper *et al.*, 2005; Herrero *et al.*, 1993). Durch die Verwendung der T7-RNA-Polymerase können große Mengen des rekombinanten Proteins exprimiert werden. Gleichzeitig sind T7-Expressionssysteme strikt regulierbar, da die unter Kontrolle des T7-Promotors stehenden Zielgene nicht von bakteriellen Polymerasen abgelesen werden können (Studier & Moffat, 1986). Zur heterologen Expression von Proteinen in *E. coli* wird in der Regel der Stamm BL21(DE3) verwendet, der das Gen für die T7-RNA-Polymerase mit Hilfe des rekombinanten Bakteriophagen DE3 in das bakterielle Chromosom integriert hat (Studier & Moffat, 1986). Hierzu gibt es, je nach Anspruch des jeweiligen Zielproteins, auch alternative Expressionsstämme. Bei der Expression vieler eukaryotischer Proteine ist die Ausbildung von Disulfidbrücken für die Stabilität des Proteins von Bedeutung. Da Proteine im Cytoplasma von *E. coli* natürlicherweise in ihrem reduzierten Zustand gehalten werden, ist

die Ausbildung solcher Bindungen im Zellinnern des Stammes BL21(DE3) nicht möglich. Die dafür verantwortlichen Enzyme sind das Thioredoxin/ Thioredoxin-Reduktase-System (Russel, 1995; Carmen-Harrel & Storz, 2000) bzw. das Glutaredoxin/ Glutaredoxin-Reduktase-System (Åslund *et al.*, 1994; Carmel-Harel & Storz, 2000). Verwendet man für die Expression von Proteinen, die auf die Ausbildung von Disulfidbrücken angewiesen sind, einen *E. coli* Expressionsstamm, in dem diese Systeme ausgeschaltet sind (z.B. *E. coli* Origami (DE3)), eignet sich dieses Bakterium wiederum als Expressionswirt. In weiteren Derivaten des Stammes BL21(DE3) wird die Produktion von Proteinen, die zur Ausbildung von *Inclusion bodies* neigen (C41 (DE3)), bzw. die Herstellung von Membranproteinen (C43 (DE3)) ermöglicht (Sørensen & Mortensen, 2005).

Mit der Konstruktion von pET-Vektoren (Studier, 1991) wird die Vielseitigkeit der T7-Expression in *E. coli* noch erweitert. So sind mittlerweile mehr als 40 unterschiedliche pET-Vektoren verfügbar, die verschiedene Promotoren, *Multiple cloning sites* (MCS) und unterschiedliche Fusionen (*Tags*) am N- aber auch C-Terminus des Zielproteins ermöglichen. Weiter sind diverse Sequenzen auf den verschiedenen pET-Vektoren enthalten, die für Protease-Erkennungsstellen codieren, um das Zielprotein später vom angebrachten *Tag* trennen zu können. Somit können für unterschiedlichste Expressionszwecke Vektoren eingesetzt werden, die die Expression und ggf. die spätere Aufreinigung eines Zielgens ermöglichen (Sørensen & Mortensen, 2005). Neben der Kopienzahl des Expressionsplasmides sind auch das auf dem Plasmid verwendete Antibiotikaresistenzgen variierbar oder auch unterschiedlich starke Promotoren verfügbar (Weickert *et al.*, 1996).

Die Expression toxischer Produkte stellt ein Problem bei der Erzeugung rekombinanter Proteine dar, da ihre Expression zur Instabilität von Expressionsplasmiden oder zum Absterben der Zellen führen kann. Auch hier konnten Lösungen gefunden werden, wodurch die Produktion solcher Proteine möglich wird. Um eine hohe Proteinausbeute zu erzielen, ist es vor allem wichtig, einen Expressionsvektor zu verwenden, der hohe Kopienzahlen und eine strikte Regulation der Genexpression ermöglicht. Dadurch soll ein schnelles Zellwachstum bis zu einer hohen Zelldichte ermöglicht werden, bevor die Expression des toxischen Genproduktes induziert wird (Jana & Deb, 2005; Sørensen & Mortensen, 2005). Hierfür wurden diverse induzierbare Promotoren wie *tac*-, *lac*-, oder *trc*-Promotoren entwickelt, die durch Zugabe von IPTG induziert werden können. Erst dann kann die Expression des Zielgens stattfinden (Makrides, 1996; Menzella *et al.*, 2003). Auch die Expression der T7-RNA-Polymerase wird durch Zugabe des Induktors Laktose bzw. IPTG ermöglicht, da sie über den Promotor *lacUV5* reguliert wird (Studier *et al.*, 1990). Trotzdem kann es zu einer schwachen basalen Expression dieser Polymerase kommen, so daß toxische Produkte schon

früh in den Zellen akkumulieren und somit die Ausbeute rekombinanten Proteins sehr gering ausfallen kann. Dieser basalen T7-Expression kann entgegengewirkt werden, indem man den natürlichen Inhibitor der T7-RNA-Polymerase coexprimiert, das T7-Lysozym. Dieses ist auf zwei unterschiedlichen Plasmiden verfügbar (pLysS bzw. pLysE), die ebenfalls in den Expressionsstamm eingebracht werden können. Dadurch kann die basale Expression der Polymerase und somit die Expression des Zielproteins unterbunden werden (Studier, 1991).

Eines der häufigsten Probleme bei der Produktion rekombinanter Proteine ist die Bildung von unlöslichen Aggregaten, sogenannten *Inclusion bodies*. Diese können durch viele unterschiedliche Gründe verursacht werden. Dazu zählen beispielsweise zu hohe Konzentrationen des Zielproteins in der Zelle, langsame Faltungsprozesse oder Fehlfaltungen bzw. geringe Stabilität von Proteinen (Baneyx & Mujacic, 2004).

### 1.3 Konstruktion einer Chaperon-Genexpressionsbank

In verschiedenen Studien der letzten Jahre konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von Chaperon- oder Faltungskatalysatorgenen eine offensichtliche Lösung für das Problem der Bildung von *Inclusion bodies* bei der Produktion rekombinanter Proteine darstellt (Schlieker *et al.*, 2002). Hierbei wurden in der Regel solche Faltungshelferproteine gewählt, die aus dem Bakterium *E. coli* stammen und zu den wichtigsten Vertretern dieser Proteingruppe zählen. Bereits im Jahre 1989 gelang es Goloubinoff *et al.* die Löslichkeit des oligomeren Proteins Rubisco in *E. coli* durch Coexpression der *groELS*-Gene zu erhöhen. Doch nicht nur die Löslichkeit von Proteinen kann durch die Konzentrationserhöhung molekularer Chaperone verbessert werden, sondern auch die Gesamtausbeute von Proteinen, was z.B. für die humane Procollagenase gezeigt werden konnte (Lee & Olins, 1992).

Bisher sind Coexpressionen von Zielprotein und Faltungshelfern *trial-and-error* Versuche, da nicht vorhergesagt werden kann, ob die Expression des gewählten Chaperogens die Produktion eines Zielproteins positiv beeinflussen kann. Oftmals führt die Überproduktion von Chaperonen auch dazu, daß das Zielprotein leichter an Proteasen vermittelt und von diesen abgebaut werden kann (Hoffmann & Rinas, 2004), wodurch die Ausbeute gering ausfällt. In anderen Fällen konnte kein Einfluß der coexprimierten Chaperongene auf die Synthese des rekombinanten Proteins festgestellt werden (Thomas *et al.*, 1997). Daher ist es sinnvoll, eine generelle Strategie zu entwickeln, die es erlaubt, möglichst viele Faltungshelfergene auf ihren Einfluß bei der Erzeugung des jeweiligen Proteins zu untersuchen.

Aus diesem Grunde wurde im Rahmen dieser Arbeit eine umfassende Plasmidbank

---

konstruiert, die eine Vielzahl einzelner Faltungshelfer und Chaperonsysteme enthält. Zusätzlich wurden auch Plasmide erzeugt, die randomisierte Kombinationen aus jeweils drei Faltungshelfergenen enthalten. Diese Plasmide sind von besonderer Bedeutung, da Chaperone und Faltungskatalysatoren sukzessive wirken und meistens nicht nur eines dieser Proteine mit einem Faltungsintermediat interagiert. Diese Plasmide erlauben also eine simultane Überproduktion mehrerer Faltungshelfer, die unterschiedliche limitierende Schritte im Faltungsprozeß des Zielproteins beheben können.

Für die Genexpressionsbank wurden Faltungsmodulatorgene aus dem Gram-negativen Bakterium *P. aeruginosa* isoliert. Die Wahl fiel auf diesen Organismus, da es ein äußerst vielseitiges Bakterium ist, das beinahe überall und unter extremen Bedingungen überleben kann. So kann *P. aeruginosa* im Wasser, im Boden, in Pflanzen und in Tieren sowie bei Temperaturen von 5°C bis 43°C wachsen und nahezu unter schlechtesten Nährstoffbedingungen überleben (Hof *et al.*, 2000; Madigan *et al.*, 2000; Palleroni, 1993; Smith & Iglewski, 2003). Diesbezüglich weist *P. aeruginosa* einen bedeutenden Vorteil gegenüber anderen mikrobiellen Organismen auf, die in der Regel ausschließlich unter konstanten Lebensbedingungen existieren können. Hierzu zählt beispielsweise das Enterobakterium *E. coli*, welches natürlicherweise im menschlichen Darm zu finden ist und nur bei moderaten Temperaturen überleben kann. Außerdem besitzt *P. aeruginosa* ein 6,3 Mbp großes Genom mit ca. 5.470 vorhergesagten Genen (Stover *et al.*, 2000), während es in *E. coli* beispielsweise nur ca. 4.400 Gene sind. Diese erlauben dem Bakterium durch komplexe Regulationsmechanismen die schnelle Anpassung an die jeweiligen Lebensbedingungen (Goodman & Lory, 2004). Überraschenderweise konnte in diesem Bakterium eine zu anderen Bakterien, wie *E. coli*, vergleichbare Anzahl von Genen identifiziert werden, deren Genprodukte an der Proteinfaltung beteiligt sind. Da eine deutlich größere Anzahl von Polypeptiden durch dieses Set an Faltungshelfern überwacht werden muß, wird angenommen, daß diese Proteine aus *P. aeruginosa* ein breiteres Substratspektrum aufweisen als beispielsweise Faltungsmodulatoren aus *E. coli*.

Neben den Vorteilen, die zu der Wahl der Chaperone und Faltungskatalysatoren aus dem Bakterium *P. aeruginosa* geführt haben, gibt es einen weiteren Grund, der für die Verwendung von Faltungshelfern aus einem prokaryotischen Organismus sprechen. Neben vielen Spezialisierungen weisen die Netzwerke, die in pro- und eukaryotischen Organismen zur Kontrolle der Proteinfaltung etabliert sind, viele Übereinstimmungen hinsichtlich der vorhandenen Chaperongruppen und Faltungskatalysatoren auf (Bukau *et al.*, 2006; Carrascosa *et al.*, 2001; Martin-Benito *et al.*, 2004). Da die konstruierte Chaperon-*Toolbox* bei Coexpressionsversuchen in Bakterien eingesetzt werden sollte, um sowohl Proteine pro- als

auch Proteine eukaryotischer Herkunft zu synthetisieren, schien es sinnvoll Faltungshelfer aus einem Bakterium zu wählen. Diese sollten in dem jeweiligen Expressionsstamm zum einen besser synthetisiert werden können als Faltungsmodulatoren aus einem eukaryotischen Organismus, und zum anderen für die korrekte Faltung sämtlicher Zielproteine einsetzbar sein. Für einige Faltungshelfergene aus *P. aeruginosa* konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß sie im heterologen Expressionswirt *E. coli* problemlos exprimiert werden können.

Die Gene, die für die Faltungsmodulatoren codieren, wurden unter die Kontrolle eines *tac*- bzw. *lac*-Promotors gestellt, um, ebenso wie das Zielprotein, erst bei Erreichen einer ausreichend hohen Zelldichte die Expression zu induzieren. Dies ist enorm wichtig, da durch die Überexpression von Faltungshelfern möglicherweise der Zellstoffwechsel überlastet wird, was die Inhibierung des Zellwachstums zur Folge haben kann (Ashiuchi *et al.*, 1995; Nishihara *et al.*, 1998). In diesem Fall besteht die Möglichkeit, daß die Kapazität der Produktion des rekombinanten Proteins herabgesetzt wird und die Ausbeute des gewünschten Proteins niedrig ausfällt.

Eine weitere Besonderheit dieser Genexpressionsbank besteht darin, daß sie nicht nur in verschiedenen Expressionsstämmen des Bakteriums *E. coli*, sondern in vielen weiteren Gram-negativen Organismen etabliert werden kann. Dies hat den Vorteil, daß alternative bakterielle Expressionsstämme gewählt werden können, wie beispielsweise *P. putida* oder *R. capsulatus*, die sich möglicherweise besser zur Erzeugung des Zielproteins eignen.

Durch die erfolgreiche Konstruktion der Genexpressionsbank, in der 47 einzelne Chaperonsysteme und 42 Kombinationen aus Faltungshelfern vorliegen (s. Tab. C-6, „pEXP-einzeln“ bzw. Tab. C-7: „Auflistung der erzeugten *Multisite*-Expressionsplasmide“), wird erstmals ermöglicht, ein breites Spektrum von Faltungsmodulatoren systematisch mit verschiedenen Zielproteinen in unterschiedlichen Gram-negativen Expressionswirten zu produzieren. Ferner steht eine große Anzahl weiterer Plasmide zur Verfügung, welche die Erweiterung der *Toolbox* um neue Kombinationen von Faltungsmodulatoren erlaubt. Dazu können sämtliche „pENTR-Plasmide“ (s. Tab. C-6; „pENTR, pENTR-3’, pENTR-5’“) verwendet werden, die ebenfalls in dieser Arbeit konstruiert werden konnten. Mit Hilfe dieser Plasmide können rein rechnerisch mehr als 40.000 weitere Kombinationen erzeugt werden. Dazu müssen Rekombinationsreaktionen unter Anwendung des „MultiSite Gateway<sup>TM</sup> Three-Fragment Vector Construction Kit“ der Firma Invitrogen mit den Plasmiden durchgeführt werden, welche die gewünschten Faltungshelfergene tragen. Dabei muß allerdings bedacht werden, daß die vom Hersteller angegebene hohe Ausbeute bei weitem nicht erzielt wurde. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß trotz der nach Angaben des Herstellers

optimalen Rekombinationsbedingungen (Verhältnis der eingesetzten Plasmide zueinander; Inkubationszeit; Inkubationstemperatur, u.v.m.), weniger als 10 % der Reaktionen erfolgreich waren.

Ein weiterer Vorteil, den die verfügbare Plasmidbank liefert, ist die Anwendung in Hochdurchsatz-Selektions-Verfahren. Dadurch können Faltungshelfer bzw. Kombinationen aus Faltungsmodulatoren identifiziert werden, welche die Produktion löslichen, aktiven Zielproteins verbessern können. Wenn es für das Zielprotein einen geeigneten Nachweis gibt, kann auf diese Weise schnell und einfach untersucht werden, ob die Herstellung dieses Proteins durch die Coexpression von Chaperon- oder Faltungskatalysatorgenen positiv beeinflusst werden kann. Der Expressionsstamm, der daraufhin die höchste Aktivität des Zielproteins aufweist, kann auf den Besitz des vorliegenden Faltungsmodulators bzw. der vorhandenen Kombination aus Chaperonen und Foldasen untersucht werden. So können die molekularen Chaperone und/ oder Faltungskatalysatoren spezifisch coproduziert und die Ausbeute des Zielproteins auch in größerem Maßstab verbessert werden.

Da *P. aeruginosa* ein humanpathogener Organismus ist, wird die Anwendung der bisher in der *Toolbox* vorliegenden Gene nicht in der Produktion pharmazeutischer Substanzen verwendet werden können. Für diesen Fall kann aber die benötigte Kombination aus Chaperongen aus einem nicht-pathogenen Organismus isoliert, kloniert und getestet werden. Führt die Coproduktion auch mit diesen Proteinen zu einer deutlichen Steigerung der Ausbeute, können sie in den industriellen Prozeß eingebunden werden.

## **2 Einfluß einzelner Chaperone und Faltungskatalysatoren auf die Produktion biotechnologisch relevanter Proteine**

Das Überleben von Zellen ist grundsätzlich von einer optimalen Proteinfaltung abhängig. Daher besitzen Organismen sämtlicher Lebensreiche komplexe Netzwerke aus molekularen Chaperonen, welche bei der Faltung von Proteinen assistieren, Proteasen, die fehlgefaltete Peptidstränge abbauen, und Faltungskatalysatoren, welche die Proteinfaltung *in vivo* zusätzlich unterstützen (Horwich *et al.*, 1999; Bukau *et al.*, 2000). Auch die Produktion von biotechnologisch relevanten Proteinen führt in vielen Fällen zu Problemen bei der Proteinfaltung und daher zur Ausbildung von *Inclusion bodies* oder zur Degradation des Zielproteins (Georgiou & Valax, 1996; Hannig & Makrides, 1998). Diese Prozesse werden von unterschiedlichen Faktoren beeinträchtigt, zu denen die Temperatur, die Viskosität, die Faltungsumgebung, die Expressionsrate oder die zelluläre Konzentration von Proteinen bzw.

---

Proteinintermediaten zählen.

## 2.1 *Inclusion bodies* – Probleme und Nutzen in der Biotechnologie

Die Synthese von Proteinen in heterologen Wirten ist oftmals nicht sehr effektiv und die gewünschte Ausbeute aktiven, löslichen Proteins wird nicht erzielt.

In den meisten Fällen akkumulieren die erzeugten Produkte in nicht-nativer Form als dicht gepackte Partikel, sogenannte *Inclusion bodies*. Diese Partikel weisen sehr stabile Strukturen auf, die hauptsächlich durch hydrophobe Interaktionen zwischen Faltungsintermediaten des rekombinanten Proteins vermittelt werden (Carrio *et al.*, 2000). Sie entstehen, wenn es zu einer Störung des Gleichgewichtes zwischen Proteinsynthese, -faltung und -aggregation kommt. Mittlerweile sind unterschiedliche Methoden bekannt, die die Bildung dieser Proteinaggregate reduzieren können (Baneyx, 1999; Baneyx & Mujacic, 2004; Fahnert *et al.*, 2004). Dennoch ist der optimale Prozeß für ein spezifisches Produkt immer noch nicht vorhersagbar, da die Synthese und Faltung des Zielproteins durch eine große Anzahl verschiedener zellulärer und umweltbedingter Faktoren beeinflusst wird. Zusätzlich nimmt die Optimierung der Produktion eines Zielproteins häufig viel Zeit in Anspruch, liefert dann aber oftmals nicht die benötigte hohe Ausbeute. Ein systematischer Vergleich unterschiedlicher Expressionsmethoden oder -bedingungen bleibt daher unerlässlich (de Marco *et al.*, 2005).

In vielen Fällen wird die Bildung von *Inclusion bodies* in der Wissenschaft oder Industrie dazu genutzt, große Mengen eines bestimmten Proteins zu erzielen. Obwohl Proteinaggregate solubilisiert und renaturiert werden müssen, liegen in der Produktion von Proteinen in Form von *Inclusion bodies* einige Vorteile: a) hohe Expressionsausbeuten sind möglich, b) das Zielprotein ist vor proteolytischem Abbau geschützt, c) das Produkt kann in einem sehr reinen Zustand vorliegen und d) es ist durch Zellaufschluß und Zentrifugationsschritte leicht zu isolieren (Carrio & Villaverde, 2002; Fahnert *et al.*, 2004; Graumann & Premstaller, 2006). Wenn nachfolgende Prozesse verfügbar sind, die eine Solubilisierung und Renaturierung des gewünschten Proteins erlauben, werden die oft sehr zeit- und kostenaufwendigen Prozesse in Kauf genommen, um ausreichende Proteinausbeuten zu erhalten. In der Industrie kann so eine Vielzahl humaner therapeutischer Proteine produziert und für die Herstellung wichtiger Pharmazeutika verwendet werden (Schmidt, 2004; Graumann & Premstaller, 2006). Darunter befinden sich beispielsweise die folgenden industriell genutzten Produkte: das humane Parathyroid Hormon (Suzuki *et al.*, 1998), das HGH (**h**uman **g**rowth **h**ormone; Panda, 2003) oder das Interferon  $\alpha 2b$  (Valente *et al.*, 2006). In der Regel sind notwendige Renaturierungsprozesse mit hohen Verlusten des erzeugten Produktes verbunden. Dabei

zählen Ausbeuten, die im Bereich zwischen 40-50 % liegen, zu den erfolgreichen Prozessen (Fahnert *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2005).

Wenn es daher die Möglichkeit gibt, die Produktion von *Inclusion bodies* zu reduzieren oder ganz zu unterbinden und dennoch ausreichende Produktmengen zu erhalten, bedeutet dies einen immensen Kosten- und Zeitgewinn. Außerdem ist die Erhöhung löslicher Proteinausbeute besonders bei solchen Enzymen wichtig, die durch Denaturierungs- und Renaturierungsschritte ihre biologisch aktive Konformation nicht wiedererlangen können (Georgiou & Valax, 1996). Daher ist es von besonderem Interesse, Strategien zu entwickeln, mit deren Hilfe die Ausbildung von Proteinaggregaten umgangen und das gewünschte Produkt in löslicher und aktiver Form hergestellt werden kann.

## 2.2 Einfluß molekularer Chaperone auf die Bildung von *Inclusion bodies*

Durch die Synthese eines rekombinanten Proteins, das dazu neigt, zu akkumulieren, wird eine Zellantwort induziert, die beispielsweise auch nach einem Hitzeschock beobachtet werden kann. Dabei stellt das vermehrte Vorkommen nicht-nativer Proteine ein entsprechendes Signal für die Zelle dar. Daraufhin werden Proteine bereitgestellt, die der Bildung nicht funktioneller Proteine entgegenwirken. Unter Hitzeschock verstärkt synthetisierte Proteine sind vor allem molekulare Chaperone, deren Gene unter der Kontrolle des Sigmafaktors  $\sigma^{32}$  stehen (Bukau & Horwich, 1998). Vorübergehend und sehr schnell kann so die Konzentration von Hsp70-Proteinen (DnaKJ und GrpE) und Hsp60-Proteinen (GroELS), aber auch von Proteasen, wie Lon oder ClpP, erhöht werden. Letztere können zur Degradation eines Proteins führen, weshalb bei der Expression heterologer Gene hauptsächlich mit Protease-defizienten Stämmen gearbeitet wird. Unter natürlichen Bedingungen stellen ca. 10-20 % aller Proteine einer Zelle Substrate von den Chaperonsystemen DnaKJ oder GroELS dar. Diese Zahl steigt nach einem Hitzeschock auf ca. 30 % an (Deuerling *et al.*, 1999).

Bei der Aufreinigung von *Inclusion bodies* aus Bakterienzellen konnten zusätzlich solche molekularen Chaperone isoliert werden, die an diesen Proteinpartikeln assoziiert waren. Dazu zählen vor allem die Proteine IbpA/B, ClpB, aber auch die generellen Chaperone DnaK oder GroEL (Carrio & Villaverde, 2002; Georgiou & Valax, 1996; Tomoyasu *et al.*, 2001).

Die Gene, die für diese Proteine codieren, werden also unter Streßbedingungen verstärkt exprimiert, so daß ihre Konzentration z.B. nach einem Hitzeschock deutlich zunimmt. Induziert man diese Gene in einer Überexpressionskultur durch kurzzeitige Inkubation bei hohen Temperaturen (ca. 42°C), führt dies allerdings nicht zwingend zu einer Verbesserung der Proteinausbeute. Grund dafür ist, daß sich Hitzeschocktemperaturen möglicherweise

verstärkt in einem negativen Effekt, bezogen auf die Stabilität und Faltung des rekombinanten Proteins, auswirken (Gur *et al.*, 2002; de Marco *et al.*, 2005). Daher stellt die Coexpression von Faltungsmodulatorgenen, die auf Plasmiden vorliegen, die bessere Alternative dar. Dazu wurden in den unterschiedlichen Anwendungen vor allem Gene gut untersuchter Chaperonsysteme aus *E. coli* verwendet. Diese wurden mit verschiedenen Zielproteinen coproduziert, deren Synthese problematisch war. Durch die Coexpression von *groELS*-Genen konnte unter anderem ein 160 kDa großes neuronales Protein aus der Ratte (nNOS; **n**euronal **n**itric **o**xide **s**ynthase) heterolog in *E. coli* erzeugt werden. Die Ausbeute an aktivem Protein lag in dem gewählten *E. coli* Expressionsstamm bei ca. 20 mg/l, wohingegen die Expression in humanen Zellen zu einer Ausbeute von weniger als 1 mg/l führte (Roman *et al.*, 1995). Auch die Erhöhung der Konzentration des Chaperonsystems DnaKJ in Überexpressionskulturen konnte in vielen Fällen zu einer Verbesserung der Produktion eines Zielproteins führen (Hoffmann & Rinas, 2004).

Ein wichtiger Aspekt bei der Bildung von *Inclusion bodies* sind auch Reaktionsschritte, die Geschwindigkeit bestimmend sind. Solche Faltungsvorgänge sind beispielsweise die Oxidation von Cysteinen, was durch Dsb-Proteine vermittelt wird, aber auch durch PPIasen katalysierte Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerisierungen (Jaenicke, 1998). Diese Proteine wurden im Bezug auf Coexpressionsversuche bisher selten in Betracht gezogen.

Zu dieser Enzymgruppe zählt auch das Protein Triggerfaktor (Tig). Dieser Faltungskatalysator ist natürlicherweise dafür verantwortlich, direkt nach Bildung eines Polypeptidstranges am Ribosom mit diesem zu interagieren, und ihn so vor proteolytischem Abbau oder vor Aggregationsprozessen zu schützen (Baneyx & Mujacic, 2004; Deuring *et al.*, 2003). Durch die Coexpression des *tig*-Gens konnte beispielsweise das aus der Maus stammende Protein Endostatin davor bewahrt werden, in Form von *Inclusion bodies* zu akkumulieren (Nishihara *et al.*, 2000).

### **2.3 Einsatz einzelner Faltungsmodulatoren aus *P. aeruginosa* bei der Produktion rekombinanter Proteine**

In vorausgegangenen Untersuchungen konnte durch die Coexpression gängiger molekularer Chaperone oftmals eine Verbesserung der Produktivität bei der Synthese rekombinanter Proteine erzielt werden. Dennoch konnte nicht immer ein positiver Einfluß solcher Proteine auf die Ausbeute von Zielproteinen festgestellt werden. Der Einfluß eines molekularen Chaperons auf ein Zielprotein ist bislang nicht vorhersagbar und muß daher für jedes Zielprotein neu empirisch getestet werden (Nishihara *et al.*, 2000). Daher wurde im Rahmen

dieser Arbeit eine Coexpressionsbank erzeugt, in der 47 Plasmide mit Genen einzelner Faltungsmodulatoren aus dem Bakterium *P. aeruginosa* vorliegen. Darunter befinden sich sowohl sämtliche wichtigen Chaperonsysteme, aber auch weniger gut charakterisierte molekulare Chaperone. Weiter sind in dieser Protein-Faltungs-*Toolbox* Faltungskatalysatoren enthalten, die zu den Dsb-Proteinen oder den PPIasen zählen. Diese Faltungshelfer konnten in Coexpressionsversuchen mit verschiedenen Proteinen biotechnologischer Relevanz untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten einige Chaperone und Faltungskatalysatoren die Ausbeute löslichen Proteins erhöhen, was sowohl bei den untersuchten Hydrolasen, als auch bei dem Faltungsreporter GFP zu moderaten Verbesserungen geführt hat. Anders als erwartet, führte die Erhöhung der Konzentration des Chaperonsystems DnaKJ bei allen Untersuchungen dazu, daß keine Proteinaktivität gemessen und kein Zielprotein detektiert werden konnte.

Daher wurde zunächst vermutet, daß durch die Expression der *P. aeruginosa*-Gene im heterologen Organismus *E. coli* Chaperonkomplexe aus heteromeren Untereinheiten gebildet wurden. Diese könnten möglicherweise nicht die eigentliche Funktion erfüllen, so daß sie indirekt die Produktion des Zielproteins unterbinden können. Da dieser negative Effekt allerdings auch im homologen hypersekretierenden *P. aeruginosa* Stamm PAH11 beobachtet werden konnte, scheint dieser Einfluß nicht aus dem Vorhandensein funktionsloser DnaKJ-Heteromere zu resultieren.

In anderen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, daß die Steigerung der Konzentration von DnaK- und/ oder DnaJ-Protein dazu führte, daß die Zellteilung gestört war und Plasmide nicht mehr stabil in der Wirtszelle etabliert werden konnten (Blum *et al.*, 1992). Weiterhin wurde gezeigt, daß diese Proteine auch das Überleben der Wirtszellen generell stören können und den Stoffwechsel dieser Zellen überlasten (Al-Herran & Ashraf, 1998). Auf diese Weise scheint die Coexpression der Gene *dnaK* und *dnaJ* auch auf die verwendeten Expressionsstämme und somit auf die Ausbeute der jeweiligen Zielproteine gewirkt zu haben. Damit dieses Chaperonsystem seine vorbestimmte Funktion korrekt ausüben kann, ist anscheinend ein definiertes Gleichgewicht der Proteine nötig. Wird dieses gestört oder liegen die Proteine DnaK und DnaJ in der Zelle in einer zu hohen Konzentration vor, können sie die Synthese der natürlichen Substrate oder die Produktion eines rekombinanten Gens nicht mehr unterstützen. Die Konsequenz in den durchgeführten Coexpressionsversuchen war also, daß kein Zielprotein erzeugt werden konnte. Entweder, weil das entsprechende Expressionsplasmid nicht mehr in dem *E. coli* Stamm repliziert, oder, weil der Zellstoffwechsel durch ungünstige Mengen DnaKJ-Proteins stark eingeschränkt wurde. Zusätzlich konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, daß die Erhöhung der

Konzentration von Chaperonen bei Überexpressionen dazu führen kann, daß das Zielprotein leichter der Degradationsmaschinerie zugeführt wird (Hoffmann & Rinas, 2004; Thomas *et al.*, 1997). Möglicherweise führte die Coexpression des Chaperonsystems DnaKJ also dazu, daß die verschiedenen Zielproteine direkt an Proteasen weitergeleitet und von diesen abgebaut wurden.

Ein weiteres interessantes Phänomen bei der Anwendung der Faltungs-*Toolbox*, die einzelne Faltungshelfersysteme enthielt, war, daß sie die Produktion des Zielproteins abhängig vom rekombinanten Protein unterschiedlich stark beeinflussen konnten. So konnten bei der Synthese der Alkoholdehydrogenasen aus den Stämmen *Rhodococcus erythropolis* und *Rhodococcus ruber* deutlich mehr unterschiedliche Chaperone Einfluß auf die Produktion aktiven Proteins nehmen, als z.B. bei den getesteten Hydrolasen. Für ein eukaryotisches ADH-Protein konnte kürzlich *in vitro* gezeigt werden, daß es durch die Zugabe von Chaperonen stabilisiert werden konnte. So blieb die Aktivität des ADH-Proteins bei hohen aber auch niedrigen Temperaturen über einen längeren Zeitraum deutlich höher, als wenn kein Chaperon vorhanden war (Kohda *et al.*, 2006). Bei der Untersuchung der Produktion der beiden ADH-Proteine konnten in dieser Arbeit verschiedene Chaperone identifiziert werden, die zu einer deutlichen Verbesserung der Akkumulation aktiven ADH-Proteins geführt haben (u.a. HslU oder YrfI). Zusätzlich konnte für beide ADH-Proteine eine signifikante Steigerung der Enzymaktivität detektiert werden, wenn das molekulare Chaperon CsaA in den Zellen vorlag.

Das in *P. aeruginosa* identifizierte CsaA-Protein weist Ähnlichkeit zu dem molekularen Chaperon CsaA aus dem Gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* auf. Auch in dem Organismus *Thermus thermophilus* konnte ein vergleichbares Protein beschrieben werden, das als Homodimer aktiv ist und dessen Struktur gelöst werden konnte (Kawaguchi *et al.*, 2001). Dennoch ist noch wenig über dieses molekulare Chaperon bekannt. Die meisten Untersuchungen zur Charakterisierung des CsaA-Proteins wurden in *B. subtilis* durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, daß dieses Protein daran beteiligt ist, andere Proteine in einem translokationsfähigen Zustand zu halten (Linde *et al.*, 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Expression des *csaA*-Gens in verschiedenen *E. coli* Chaperonmutanten, beispielsweise mit Mutationen in den Genen *dnaK*, *groEL* oder *grpE*, Wuchsdefizite wiederherstellen und außerdem *in vitro* Hitze-denaturierte Luciferase aus Glühwürmchen reaktivieren konnte (Müller *et al.*, 2000). Weiter konnte festgestellt werden, daß das CsaA-Protein in der Lage ist, die Akkumulation der Luciferase *in vivo* zu unterbinden (Müller *et al.*, 2000), was die Funktion des CsaA-Proteins als molekulares Chaperon zusätzlich bestätigt hat. Um Proteine in einem translokationskompetenten Zustand zu halten, müssen die Zielproteine

von dem jeweiligen molekularen Chaperon gebunden werden. Dadurch werden die Zielproteine vor Akkumulationsprozessen oder proteolytischem Abbau geschützt. Wahrscheinlich ist auch die Erhöhung der Synthese aktiven ADH-Proteins auf einen solchen Mechanismus zurückzuführen. Für beide Alkoholdehydrogenasen aus den *Rhodoccus* Stämmen ist bekannt, daß sie als Homotetramer aktiv sind und so die Umsetzung zahlreicher Ketoverbindungen katalysieren können (Abokitse & Hummel, 2003; Goldberg *et al.*, 2006). Daher ist es denkbar, daß das molekulare Chaperon CsaA durch direkten Einfluß zur Stabilisierung des ADH-Proteins beiträgt und die Ausbildung aktiver ADH-Komplexe auf diese Weise verbessert.

Die erhaltenen Ergebnisse machen deutlich, daß die Coexpression von Faltungshelfergenen nicht immer gleich gut auf die Produktion eines Zielproteins wirkt. Zusätzlich zeigen die im Rahmen dieses Projektes erhaltenen Ergebnisse, daß es sich auch lohnt, solche Chaperone auf ihren Einfluß bei der Herstellung eines Proteins zu untersuchen, die nicht zu den am besten untersuchten gehören. Deshalb ist es wichtig, neben den essentiellen Chaperonsystemen wie DnaKJ oder GroELS auch solche Chaperone auf ihren Einfluß auf das Zielprotein hin zu testen, die bisher kaum charakterisiert sind. Dazu zählt beispielsweise das molekulare Chaperon CsaA, das bei der Produktion von ADH-Proteinen aus verschiedenen *Rhodococcus* Spezies die deutlichste Steigerung aktiven Proteins ermöglichte.

### **3 Kombinationen von Faltungsmodulatoren verbessern die Ausbeute aktiven Proteins in Überexpressionsversuchen**

Aus Untersuchungen der Faltungsprozesse von Proteinen ist bekannt, daß Chaperone und Faltungskatalysatoren sukzessive wirken können. Proteine, die sich in einer nicht-nativen Konformation befinden, müssen demnach zum Teil von einem Chaperonsystem an ein anderes weitergeleitet werden, bevor das Protein in der endgültigen Konformation vorliegt (Fahnert *et al.*, 2004). Daher ist der Einfluß von einem einzelnen Chaperonsystem oftmals nicht ausreichend, um den gewünschten Effekt zu erzielen und die Ausbeute aktiven, löslichen Proteins zu verbessern.

#### **3.1 Einsatz von Chaperonkombinationen in Überexpressionsansätzen**

Immer wieder wurden einzelne Plasmide erzeugt, auf denen Gene enthalten waren, die mehrere molekulare Chaperongene oder Faltungskatalysatorgene enthielten. Das

umfassendste *Set* mit Plasmiden wird von der Firma TaKaRa aus Japan vertrieben. Darin wird eine Coexpression der Gene *grpEdnaKJ*, *groELS* bzw. *tig* ermöglicht ([www.takara-bio.co.jp](http://www.takara-bio.co.jp)). Zusätzlich können Kombinationen aus den beiden Chaperonsystemen DnaKJ und GroELS bzw. aus GroELS und dem Triggerfaktor verwendet werden. Darin sind erneut nur die gängigen und essentiellen Chaperonsysteme enthalten. In vielen Versuchen brachte die Expression dieser Proteine bei der Synthese problematischer Zielproteine aber nicht den gewünschten Erfolg.

Kürzlich wurde die Arbeit einer Forschergruppe veröffentlicht, die vier unterschiedliche Gene auf einem Plasmid zusammengestellt haben, die für zwei Dsb-Proteine, DsbC und DsbD, und zwei PPIasen, FkpA und SurA, codieren (Schlapschy *et al.*, 2006). Der positive Einfluß dieser Faltungskatalysatorkombinationen wurde in Bezug auf die Löslichkeit der beiden menschlichen Proteine *human plasma retinol-binding protein* und *dendritic cell membrane receptor* im heterologen Expressionswirt *E. coli* untersucht. Dieser Ansatz zeigte zum ersten Mal den erfolgreichen Einsatz von kombinierten Faltungskatalysatoren bei der Produktion sekretierter Proteine in dem Bakterium *E. coli*. Doch nicht alle Zielproteine können mit Hilfe dieses einzelnen Plasmides erfolgreich in dem Bakterium *E. coli* hergestellt werden.

Trotz zahlreicher intensiver Untersuchungen in den letzten Jahren konnte bisher nicht aufgeklärt werden, welcher Mechanismus die oftmals günstigen Auswirkungen durch coproduzierte Chaperone oder Foldasen bei der Synthese rekombinanter Proteine verursacht (Bukau & Horwich, 1998; De Marco & De Marco, 2004; Houry *et al.*, 1999). Daher muß für jedes Zielprotein neu untersucht werden, ob Chaperone und Faltungskatalysatoren alleine oder in Kombination mit anderen Faltungsmodulatoren Einfluß auf die Produktion nehmen können.

### **3.2 Screening der Genexpressionsbank mit kombinierten Genen von Faltungshelfern aus *P. aeruginosa***

Erstmalig konnte in dieser Arbeit eine komplexe Genexpressionsbank hergestellt werden, in der nicht nur einzelne Chaperonsysteme und Faltungskatalysatoren enthalten waren, sondern auch randomisierte Kombinationen aus jeweils drei unterschiedlichen Vertretern dieser Proteinklassen. Insgesamt wurden 42 Plasmide in diese *Toolbox* aufgenommen, die jeweils drei miteinander kombinierte Gene oder Transkriptionseinheiten aus dem vielseitigen Gram-negativen Bakterium *P. aeruginosa* beinhalten. Durch ihre Anwendung in Coexpressionsversuchen konnte analysiert werden, ob die Synthese unterschiedlicher Zielproteine durch

diese Proteine beeinflusst werden kann. Vor allem konnte aber erstmalig untersucht werden, ob anhand der erzeugten Ergebnisse solche Plasmide identifiziert werden können, die generell die Produktion eines rekombinanten Proteins verbessern können, um möglicherweise darüber den generellen Mechanismus der Faltung heterologer Proteine besser verstehen zu können.

Zunächst mußte bei dem Einsatz der Genexpressionsbank bedacht werden, daß in den Expressionsstämmen zwei unterschiedliche Plasmide parallel etabliert werden mußten. Die meisten Vektoren, die zur Expression von Zielgenen eingesetzt werden, besitzen ColE1- oder p15A-Replikationsursprünge. Daher wurden für die Coexpressionsbank solche Vektoren verwendet (pVLT31 bzw. pBBR1MCS), die der Gruppe der bhr-Vektoren zugeordnet werden können und zu den Replikationsursprüngen der gängigen Expressionsvektoren (wie pET-Vektoren) kompatibel sind (Kovach *et al.*, 1994). Die Etablierung von zwei unterschiedlichen Plasmiden in einer Wirtszelle kann dazu führen, daß die Kopienzahl beider Plasmide herabgesetzt wird. Daher wurde für jeden Coexpressionsversuch eine Kontrolle verwendet, in der das Zielgen zusammen mit dem Chaperonleervektor exprimiert wurde. Da durch die Herabsetzung der Expressionsrate die Ausbeute an Zielprotein gesteigert werden kann (Jana & Deb, 2005; Makrides, 1996; Sørensen & Mortensen, 2005), wurde auf diese Weise überprüft, ob die Coexpression beider Expressionsplasmide schon eine Verbesserung der Proteinsynthese ermöglicht. Für alle untersuchten Zielproteine konnte so ausgeschlossen werden, daß die veränderte Ausbeute an Zielprotein aus einer reduzierten Kopienzahl des Expressionsvektors resultiert, da die Etablierung des Chaperonleervektors parallel zum Expressionsvektor des Zielgens keine veränderte Proteinausbeute verursachte. Sämtliche identifizierten Effekte resultierten also direkt oder indirekt aus den Produkten der coexprimierten Chaperongene.

Erst die kombinierte Coexpression von *P. aeruginosa* Chaperongenomen ermöglichte die deutlichsten Verbesserungen der Proteinsynthesen. Für die *R. erythropolis* ADHs konnte schon alleine durch die Expression des *csaA*-Gens, das für ein molekulares Chaperon codiert, eine deutliche Erhöhung der Enzymaktivität gemessen werden. Diese konnte durch die Kombination dieses Chaperons mit weiteren Faltungshelfern um weitere 100 % gesteigert werden. In einem industriellen Prozeß würde das zu einer enormen Kosteneinsparung führen. Eine vergleichbare Erhöhung der Aktivität des *R. ruber* ADH-Proteins konnte durch den Einsatz von drei verschiedenen Expressionsplasmiden erreicht werden. Diese enthielten allesamt das molekulare Chaperonsystem GroELS mit jeweils zwei weiteren Faltungshelfern. Während der GroELS-Komplex alleine zu einer moderaten Verbesserung der Synthese aktiven RR-ADH-Proteins führte, konnte durch die beiden weiteren Proteine dieser Effekt noch gesteigert werden. Eine weitere Übereinstimmung neben dem GroELS-System konnte

---

unter den identifizierten Faltungshelferkombinationen nicht nachgewiesen werden. Zweimal wurde ein Vertreter der PPIasen, PpiD bzw. PpiC2 und PA3717 identifiziert.

Die anderen hinzugefügten Proteine zählten zu den molekularen Chaperonen. Möglicherweise können diese Proteine die zellulären Bedingungen oder den Faltungsprozeß des ADH-Proteins selber so beeinflussen, daß mehr aktives Protein löslich in der Zelle vorkommen konnte.

Auch die Produktion der Lipase CALB aus der Hefe *C. antarctica* konnte durch Kombinationen von Chaperonen und Faltungskatalysatoren deutlich verbessert werden. Während es bis vor kurzem überhaupt nicht möglich war, dieses Enzym heterolog in dem Bakterium *E. coli* zu synthetisieren (Blank *et al.*, 2006), konnte durch die Erhöhung der Konzentration unterschiedlicher Kombinationen von Faltungskatalysatoren die Ausbeute aktiver Lipase deutlich gesteigert werden. Die Plasmide, die für die besten Resultate mit dem CALB-Gen coexprimiert wurden, enthielten zweimal das Chaperonsystem GroELS und zweimal die ATP-abhängige Zwei-Komponenten-Protease HslVU. Die weiteren Proteine, die zusätzlich in erhöhten Mengen in den Zellen vorhanden waren, entstammen erneut den verschiedenen Gruppen der Faltungshelfer. Deshalb konnte auch aus diesen Ergebnissen kein genereller Mechanismus abgeleitet werden, wie diese Proteine die Synthese von CALB unterstützen konnten.

Das zur Therapie verschiedener humaner Krankheiten eingesetzte Protein Interferon 2 $\alpha$ b wird derzeit in *E. coli* in Form von *Inclusion bodies* produziert, aus denen es in aufwendigen nachfolgenden Schritten isoliert und renaturiert werden muß (Valente *et al.*, 2006). Trotz vieler Optimierungen bei den notwendigen Renaturierungsschritten verlaufen diese Prozesse mit enormen Verlusten des produzierten Proteins. In den besten Fällen beträgt die Ausbeute nach diesen Arbeitsschritten weniger als 60 % des Ausgangsmaterials, das in Form von Proteinaggregaten gewonnen wurde (Srivastava *et al.*, 2005). Durch die periplasmatische Produktion des korrespondierenden Gens ist es möglich, geringe Mengen des Proteins in nativer Konformation aus der Zelle ins Periplasma zu transportieren (Beldarrain *et al.*, 2001). Mehr als 70 % der Gesamtausbeute verbleiben aber unlöslich im Cytoplasma. Der Einsatz von zwei *Multisite*-Expressionsvektoren der Genexpressionsbank führte dazu, daß fast das gesamte Zielprotein aus der Zelle herausgebracht werden konnte und annähernd kein Interferon 2 $\alpha$ b-Protein mehr im GZE nachgewiesen wurde. Die Kombination aus den Proteinen GroES, DnaKJ und PA5195, das Homologien zu einem molekularen Chaperon aus *E. coli* aufweist, erzeugte die größte Menge des humanen Proteins, welches fast vollständig aus der Zelle gelangen konnte. Für das Chaperonsystem DnaKJ ist bekannt, daß es an der Stabilisierung von Peptidsträngen beteiligt ist, die in einem Translokations-kompetenten

---

Zustand gehalten werden müssen, bevor sie über die Sec-Maschinerie ins Periplasma transportiert werden können (Wild *et al.*, 1992). Auch das Hsp60-System, zu dem das Protein GroES zählt, ist daran beteiligt, Proteine an den Sec-Apparat weiterzuleiten, damit sie aus der Zelle herausgebracht werden können (Müller *et al.*, 2000). Daher ist es sehr wahrscheinlich, daß der detektierte positive Effekt der Chaperonkombination bei der Synthese und dem Transport des Interferon 2 $\alpha$ B-Proteins auf einer direkten Interaktion dieser Chaperone beruht. Diese können mit dem neu synthetisierten Protein interagieren, es in einem transportfähigen Zustand halten oder zunächst aus der Umgebung von Proteasen oder weiteren Molekülen entfernt halten, mit denen sie akkumulieren könnten. Zum geeigneten Zeitpunkt würde das Zielprotein dann über den Sec-Weg transportiert werden können. Auch ein indirekter Einfluß dieser Proteine ist denkbar. In diesem Fall könnte der Zellstoffwechsel entlastet werden, indem Proteine des Translokationsapparates stabilisiert werden. Dadurch bleibt der Weg über die innere Zellmembran zugänglich und eine größere Menge des produzierten Proteins kann so aus der Zelle heraus gelangen.

Insgesamt kann festgehalten werden, daß die Konzentrationserhöhung fast jeder Proteinkombination die Synthese von Zielproteinen auf positive oder negative Weise beeinflußt hat. Ferner konnte für jedes Protein mindestens eine Kombination aus Faltungsmodulatoren identifiziert werden, die zu einem Verlust der Fähigkeit geführt hat, aktives, lösliches Protein zu produzieren. Wesentlich interessanter war allerdings, daß die Ausbeute aktiven Proteins in allen untersuchten Fällen biotechnologisch relevanter Zielproteine deutlich erhöht werden konnte. Ob diese Effekte durch direkte Einwirkung der Chaperone und Foldasen auf das Zielprotein zurückzuführen ist, oder ob andere Proteine in der Zelle beispielsweise stabilisiert werden konnten, die wiederum eine bessere Synthese des Zielproteins bzw. dessen Sekretion ermöglichten, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

In Tabelle D-2 sind die im Laufe dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zusammengefaßt, die mit Hilfe der Coexpression der jeweiligen *Multisite*-Expressionsplasmide erzielt wurden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob man Voraussagen darüber treffen kann, welches Chaperon oder welche Kombination aus Faltungshelfern notwendig ist, um die Produktion des rekombinanten Proteins zu verbessern.

In Bezug auf den Einfluß der verschiedenen Chaperonkombinationen auf die Synthese rekombinanter Proteine können die untersuchten *Multisite*-Expressionsplasmide in vier unterschiedliche Klassen unterteilt werden. Solche Kombinationen aus Faltungshelfern, die tendenziell zu einer Verringerung der Ausbeute aktiven, löslichen Proteins geführt haben, werden als Klasse I zusammengefaßt. Die Erhöhung der Konzentration der drei Proteine

PpiA, DnaKJ und PpiD (pEXP-9) wies in allen Untersuchungen ein eindeutiges Resultat auf: bei allen untersuchten Zielproteinen führte diese Kombination aus Faltungskatalysatoren und Chaperonsystem zu einer deutlichen Verschlechterung der Synthese des rekombinanten Proteins. Auch die Expression der Gene der *Multisite*-Expressionsvektoren pEXP-10, -14, -29 oder pEXP-30 führte eher zu negativen Effekten bei der Produktion der Zielproteine, hatte aber in keinem Fall einen positiven Einfluß. Während die Coexpression der Gene *dnaKJ* alleine stets dazu beitrug, daß kein rekombinantes Zielprotein detektiert werden konnte, wurde diese Konstanz bei der Expression mehrerer Faltungshelfergene nicht beobachtet. Ausschließlich in einem der *Multisite*-Expressionsvektoren (pEXP-9), die meist negative Ergebnisse verursacht haben, waren die Gene *dnaKJ* enthalten. Bei den anderen Kombinationen aus Faltungshelfern, die zu einer Abnahme der Ausbeute aktiven Zielproteins geführt haben, lag das Operon *dnaKJ* nicht auf dem Vektor vor.

Das Expressionsplasmid pEXP-32 (PA3647, HscAB und YrfI) zeigte in keinem der Versuche einen Einfluß auf die Synthese des Zielproteins (Klasse II). Bei der Produktion aller Zielproteine konnte die gleiche Menge aktiven, löslichen Proteins nachgewiesen werden, wie in dem entsprechenden Kontrollstamm. Durch die Expression dieser Gene wurde also weder der Stoffwechsel überlastet oder die benötigte Faltungsmaschinerie gestört, was zu einer Verschlechterung des Produktionsprozesses geführt hätte, noch konnte ein positiver Einfluß auf die Proteinsynthese vermittelt werden.

Die meisten *Multisite*-Expressionsplasmide können in Klasse III zusammengefaßt werden. Bei der Coexpression der darauf enthaltenen Gene konnten verschiedene Effekte auf die Produktion der unterschiedlichen Zielproteine beobachtet werden. Während das Chaperonsystem DnaKJ zusammen mit den PPIasen PpiA und Tig (pEXP-8) zu einer Verbesserung der Synthese aktiver ADH-Proteine geführt haben, zeigten sie keinen Einfluß auf die Produktion der beiden Hydrolasen LipA und CALB, sowie des humanen IF2 $\alpha$ -Proteins. Schließlich konnten diese Faltungshelferproteine auch zu einem Rückgang der Ausbeute aktiven Proteins führen. So wurde ein negativer Effekt bei der Synthese der Proteine EstA $\alpha$  und GFP nachgewiesen. Da beispielsweise die Inkubationsbedingungen der Expressionskulturen zur Synthese der Proteine EstA $\alpha$  aus *P. aeruginosa* und LipA aus *S. marcescens* identisch waren, resultieren die unterschiedlichen Effekte möglicherweise aus einem direkten Einfluß dieser Faltungshelfer auf die Faltung des Zielproteins. Es ist aber auch denkbar, daß sie solche Proteine, die für die optimale Synthese des EstA $\alpha$ -Proteins benötigt werden schlechter falten oder destabilisieren.

**Tabelle D-2: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Chaperon-Coexpressionsversuchen mit verschiedenen biotechnologisch relevanten Proteinen.** Die coexprimierten Plasmide der *Toolbox* und die darin enthaltenen Faltungshelfer sind angegeben. Der jeweilige Einfluß der Chaperonkombination auf die Herstellung der verschiedenen Zielproteine (RE- bzw. RR-ADH, EstA $\alpha$ , LipA, CALB oder GFP) ist gezeigt: > Steigerung, < Abnahme (die Anzahl der Symbole gibt den Grad der Steigerung bzw. Abnahme an), = kein Einfluß, n.b.= nicht bestimmt.

Plasmid	1. Protein	2. Protein	3. Protein	RE-ADH	RR-ADH	EstA $\alpha$	LipA	CALB	GFP	IF2 $\alpha$ b
pEXP-1	Tig	DnaKJ	ClpX	=	>	>>	>>	>	>	>
pEXP-2	Tig	GroELS	ClpX	=	<	=	<	<	<	>
pEXP-3	Tig	GroELS	PpiD	>>	>	<	<	<	<	<
pEXP-4	PpiA	GrpE DnaKJ	Tig	n.b.	n.b.	<	>>	<	<	>>
pEXP-5	PpiA	GroELS	Tig	<	>	>	<	<	<	n.b.
pEXP-6	DnaJ	GroELS	Tig	>>	<	<	=	=	<	n.b.
pEXP-7	DnaJ	DnaKJ	Tig	<	<	>	<	n.b.	<	<
pEXP-8	PpiA	DnaKJ	Tig	>>	>	<	=	=	<	=
pEXP-9	PpiA	DnaKJ	PpiD	<	<	<	<	<	<	n.b.
pEXP-10	PpiA	GrpE DnaKJ	PpiD	<	=	n.b.	<	=	<	<<
pEXP-11	PpiA	GroELS	PpiD	<	>	>	<	<	<	n.b.
pEXP-12	GroES	DnaKJ	PA5195	=	>	n.b.	n.b.	=	<	>>
pEXP-13	CsaA	GroELS	PpiD	>>>	>>>	n.b.	>	=	<	<<
pEXP-14	PA3647	GroELS	PpiD	<	=	n.b.	=	<	<	<<
pEXP-15	PA4873	GroELS	Yrfl	>>	>>>	n.b.	=	n.b.	<	n.b.
pEXP-16	PpiC1	GroELS	PA3717	>>	>	n.b.	=	<	<	n.b.
pEXP-17	PpiC2	GroELS	PA3717	>>	>>>	n.b.	n.b.	=	<	n.b.
pEXP-18	DsbC	GroELS	PA5195	>>	>	n.b.	=	>>	<	n.b.
pEXP-19	GroES	GroELS	PA5195	>>	>	n.b.	=	>>	>	n.b.
pEXP-20	DnaJ	GroELS	PA5195	=	>	n.b.	=	=	<	n.b.
pEXP-21	Tig	HslVU	LolA	=	>	n.b.	=	=	<	=
pEXP-22	CsaA	HslVU	LolA	n.b.	>	n.b.	>	>	<	n.b.
pEXP-23	PA3647	HslVU	Yrfl	>>	>	n.b.	=	>	<	n.b.
pEXP-24	PA4873	HslVU	Yrfl	<	=	n.b.	n.b.	>>	<	n.b.
pEXP-25	PpiA	HslVU	LolA	n.b.	>	n.b.	=	>	=	n.b.
pEXP-26	PpiC1	HslVU	PA3717	>>	<	n.b.	=	<	<	n.b.
pEXP-27	PpiC2	HslVU	PA5195	<	=	n.b.	=	>	>	n.b.
pEXP-28	GroES	HslVU	DsbG	>>	>>	n.b.	=	>>	=	n.b.
pEXP-29	DnaJ	HslVU	DsbG	=	<	n.b.	=	<	<	n.b.
pEXP-30	SurA	HscAB	DsbG	=	<	n.b.	=	<	<	n.b.
pEXP-31	CsaA	HscAB	PpiD	=	<	n.b.	=	=	=	n.b.
pEXP-32	PA3647	HscAB	Yrfl	=	=	n.b.	=	=	=	n.b.
pEXP-33	PA3262	HscAB	LolA	>>	>	n.b.	=	>	>	n.b.
pEXP-34	PpiA	HscAB	LolA	=	=	n.b.	=	<	<	n.b.
pEXP-35	PpiC2	HscAB	PA5195	=	<	n.b.	>	>	=	n.b.
pEXP-36	GroES	HscAB	DsbG	>	<	n.b.	=	<	<	n.b.
pEXP-37	CsaA	DnaKJ	HslU	>>	<	n.b.	=	<	<	n.b.
pEXP-38	Tig	GroELS	DsbG	<	>	n.b.	=	<	=	>
pEXP-39	FklB	GroELS	DsbG	>>	>	n.b.	=	=	<	n.b.
pEXP-40	SurA	GroELS	HslU	<	>	n.b.	>	=	>	=

Die Klasse IV schließt solche Kombinationen an Faltungshelfern ein, die sich fast immer positiv, aber niemals negativ auf die Produktion eines Zielproteins ausgewirkt haben (pEXP-1, -19, -28 und pEXP-33). Die Proteine Tig, DnaKJ und ClpX (pEXP-1) führten in fast allen Untersuchungen zu einer leichten bis deutlichen Verbesserung der Herstellung des Zielproteins. Durch diese Faltungsproteine wurde aber nie eine Verschlechterung des Produktionsprozesses verursacht. Diese Proteinkombination führte in einem von sieben Coexpressionsversuchen sogar zu dem besten Ergebnis, bezogen auf die Synthese löslichen, aktiven Proteins. Sowohl der Triggerfaktor als auch das Chaperonsystem DnaKJ können direkt nach Bildung des Peptidstranges am Ribosom mit diesem eine Bindung eingehen, um ihn dann an weitere Chaperonsysteme weiterzuleiten, oder, wenn das gesamte Peptid vom

---

Ribosom freigelassen wird, die spontane Faltung des gesamten Zielproteins zu ermöglichen (Deuerling *et al.*, 2003; Geneveaux *et al.*, 2004; Schaffitzel *et al.*, 2001).

Auch hinsichtlich des Einflusses von Faltungshelfern auf unterschiedliche Zielproteine können Unterschiede aus den Ergebnissen dieser Arbeit festgestellt werden. Anhand der Tabelle D-2 wird offensichtlich, daß verschiedene Proteine unterschiedlich gut durch Chaperone und Faltungskatalysatoren beeinflusst werden können. Während die Coexpression von Faltungshelferkombinationen mit dem als Faltungsreporter verwendeten GFP in den meisten Fällen zu einer deutliche Abnahme der relativen Fluoreszenz geführt hat, zeigten viele Kombinationen eine Verbesserung der Aktivität löslichen, aktiven RE- oder RR-ADH-Proteins. So konnten z.B. für die Synthese des RE-ADH-Proteins 15 Chaperonkombinationen identifiziert werden, die einen leichten bis deutlichen positiven Effekt hervorriefen. Im Unterschied dazu konnten nur zwei Kombinationen die Produktion der Lipase LipA aus *S. marcescens* verbessern.

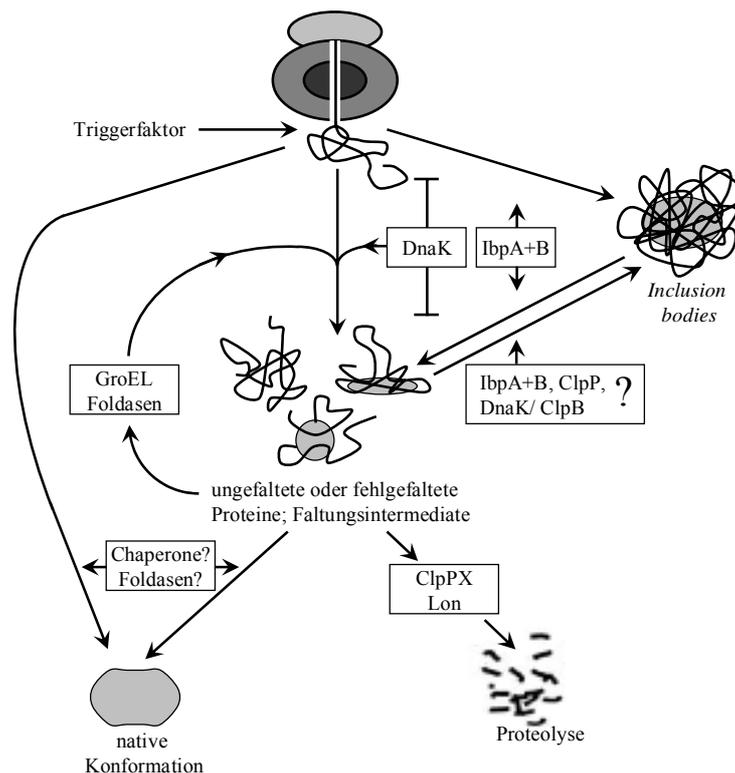
Die erhaltenen Ergebnisse zeigen also deutlich, daß man keine Aussage darüber treffen kann, welchen Einfluß bestimmte Chaperonkombinationen auf ein bestimmtes Zielprotein ausüben. Die Überexpressionen und Faltungsprozesse von Zielproteinen werden von zu vielen Faktoren beeinflusst, so daß man nicht vorhersagen kann, welche Proteine die gesamten Faltungsbedingungen der Zielproteine am besten positiv beeinflussen können.

#### **4 Ausblick**

Die Synthese funktioneller löslicher Proteine ist nicht nur für die wissenschaftliche Charakterisierung von enormer Bedeutung, sondern auch für industrielle Produktionsprozesse. Dabei stellen Prozesse wie Proteinfaltung, Proteinstabilität oder proteolytische Degradation von Proteinen eine Schwachstelle bei der Produktion rekombinanter Proteine dar. Deshalb ist eine generelle Strategie von besonderem Interesse, die an dieser Stelle in die Herstellung von Proteinen eingreift. An allen drei beschriebenen zellulären Prozessen kann der Einfluß molekularer Chaperone und Faltungskatalysatoren nachgewiesen werden. In Abb. D-1 ist die Komplexität dargestellt, der die Faltung eines Proteins unterliegt und die unter Produktionsbedingungen noch weiter kompliziert wird.

Nach Synthese des Polypeptidstranges am Ribosom muß das rekombinante Protein schnell seine native Konformation einnehmen, um nicht durch Proteasen abgebaut zu werden oder in Form von nicht-löslichen Aggregaten zu akkumulieren, wozu häufig molekulare Chaperone oder Foldasen benötigt werden. Um Proteinaggregate auflösen zu können, werden ebenfalls molekulare Chaperone wie die Proteine IbpAB oder DnaK bzw. GroEL benötigt. Ist die

Expressionsrate eines Zielgens durch die Wahl eines geeigneten Expressionsvektors so stark erhöht, daß fast 50 % des Gesamtproteins in Form des Zielproteins vorliegen, wird die natürliche Faltungskapazität einer Wirtszelle schnell ausgeschöpft und große Mengen des Proteins liegen fehlgefaltet oder in Form von Faltungsintermediaten vor. Kann in diesem Fall nicht die adäquate Menge an Faltungshelfern oder der Faltungsmodulator zur Verfügung gestellt werden, die dazu nötig ist, die Faltung positiv zu beeinflussen, fällt die Ausbeute des aktiven Proteins oft gering aus.



**Abb. D-1: Übersicht über mögliche Prozesse bei der Faltung rekombinanter Proteine.** Je nach Verlauf der Faltung können Proteine mit Hilfe von molekularen Chaperonen (s. beschriftete Kästen) die natürlich Konformation erreichen. In einigen Fällen kann die Faltung nicht vollständig abgeschlossen werden und ungefaltete, fehlgefaltete Proteine oder Faltungsintermediate akkumulieren in der Zelle. Diese können zu *Inclusion bodies* akkumulieren. Durch Unterstützung von geeigneten Chaperonen können diese Proteinaggregate wieder aufgehoben und entweder durch Proteasen degradiert oder mit Hilfe von molekularen Chaperonen und Faltungskatalysatoren in ihre natürlich Konformation überführt werden. Durch die Pfeile ist der Verlauf der möglichen Faltungsprozesse angezeigt. Die Faltungshelferproteine, die an diesen Schritten beteiligt sein können sind erwähnt. In den meisten Fällen ist allerdings nicht genau bekannt, welche dieser Proteine in welcher Konzentration für welches Zielprotein notwendig sind (nach Fahnert *et al.*, 2004).

Die Coexpression von Chaperonen und Faltungskatalysatoren stellt daher eine geeignete Methode dar, um diesen Engpässen entgegen zu wirken. Welche dieser Faltungsmodulatoren jedoch für die besten Produktionsbedingungen eines Zielproteins benötigt werden, ist nicht vorhersagbar.

Daher kann mit Hilfe der erzeugten Chaperongenexpressionsbank der Einfluß einer großen Anzahl einzelner und kombinierter Faltungshelfer für das jeweilige Zielprotein getestet werden, um zu untersuchen, ob mit Hilfe dieser Proteine die Synthese aktiven, löslichen Proteins erhöht werden kann. Diese Möglichkeit stellt eine äußerst geeignete Neuerung für die Herstellung biotechnologisch relevanter Proteine dar, da neben den generellen und bisher in Coexpressionsversuchen genutzten Faltungshelfern, deutlich mehr und eine wesentlich größere Vielfalt dieser Proteine getestet werden können. Zusätzlich konnten hier auch solche Faltungshelfer verfügbar gemacht werden, deren tatsächliche Funktionen noch nicht oder nur teilweise aufgeklärt sind. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Expression pro- aber auch eukaryotischer Gene in dem Bakterium *E. coli* durch die Coexpression solcher Faltungshelfergene verbessert werden konnte. In den meisten Fällen führten solche Chaperone und Foldasen, bzw. ihre Kombinationen, zu der erfolgreichsten Synthese des Zielproteins, die bisher in keiner Studie in dieser Zusammenstellung untersucht worden sind. Mit Hilfe dieser Chaperon-*Toolbox*, die in verschiedenen Gram-negativen Bakterien eingesetzt werden kann, wird es in Zukunft möglich sein, ein breites Spektrum interessanter Gene mit den verfügbaren Expressionsplasmiden zu coexprimieren. Auf diese Weise kann ohne großen Aufwand schnell und kostengünstig untersucht werden, ob die Synthese des problematisch herzustellenden Proteins mit Hilfe von Faltungshelfern verbessert werden kann. Wenn dies möglich ist, können die Proteine, die den besten Einfluß bei der Produktion hatten, identifiziert und speziell in den Syntheseprozess eingesetzt werden.

## E Zusammenfassung

Die Synthese rekombinanter Proteine wurde für wissenschaftliche und industrielle Anwendungen in den letzten Jahren immer bedeutsamer. Hierfür konnte eine Vielzahl unterschiedlicher Expressionssysteme erzeugt und optimiert werden, was bereits heute die Bereitstellung eines breiten Spektrums an Zielproteinen ermöglicht. Häufig findet das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* als Wirtsorganismus Verwendung, um unterschiedliche Zielgene heterolog zu exprimieren, da es einfach kultiviert und leicht genetisch manipuliert werden kann. Ferner können mit Hilfe dieses Organismus deutlich höhere Ausbeuten erlangt werden als mit eukaryotischen Expressionswirten.

Dennoch kommt es bei der heterologen Synthese von Proteinen häufig zu Engpässen, so daß die Ausbeute aktiven Proteins sehr gering ausfällt. Zudem führen Probleme wie zu hohe Expressionsraten, Fehlfaltung oder Instabilität des Zielproteins dazu, daß das Produkt in Form von unlöslichen Proteinaggregaten (*Inclusion bodies*) akkumuliert.

In vielen Fällen konnte gezeigt werden, daß die Coexpression von Chaperon- oder Faltungskatalysatorgenen die Ausbeute aktiven Proteins verbessern kann. Dabei handelt es sich jedoch um einen *trial-and-error* Ansatz, da bislang nicht vorhersagbar ist, welcher Faltungshelfer bzw. welche Kombination aus Faltungskatalysatoren und Chaperonen benötigt wird, um die Synthese des Zielproteins zu optimieren.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine umfangreiche Chaperon-Genexpressionsbank (*Toolbox*) erzeugt. Dazu wurden alle Gene, die für mögliche Faltungsmodulatoren codieren, aus dem vielseitigen, Gram-negativen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* identifiziert und kloniert. Zusätzlich wurden durch homologe Rekombinationsreaktionen Plasmide hergestellt, die jeweils drei Gene für Faltungskatalysatoren und molekulare Chaperone in randomisierten Kombinationen besitzen. Auf diese Weise konnte erstmalig eine große Anzahl verschiedener einzelner aber auch kombinierter Faltungshelfer in Expressionswirte eingebracht werden, die zur Herstellung von verschiedenen Proteinen mit Fehlfaltungspotential genutzt wurden. Mit Hilfe der erzeugten Chaperon-*Toolbox* konnte somit der Einfluß einzelner und kombinierter Faltungsmodulatoren auf die Synthese und Aktivität heterologer Proteine untersucht werden. Für jedes dieser Zielproteine, zu denen Alkoholdehydrogenasen, Hydrolasen und das humane Interferon 2 $\alpha$ b-Protein zählen, konnte in Überexpressionsversuchen und anschließenden Enzymnachweisen zum ersten Mal systematisch eine Kombination aus molekularen Chaperonen und Foldasen identifiziert werden, welche die Produktion katalytisch aktiver Moleküle deutlich erhöhte.

## Summary

Syntheses of recombinant proteins for applications in science or in industrial production processes have become more meaningful over the past few years. A wide variety of different expression systems have been constructed and optimized to allow the retrieval of a broad spectrum of target proteins. Usually, the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* is most commonly used for heterologous expression of different target genes, as this bacterium is simple to handle and easy to manipulate genetically. Supported by this organism an explicit higher yield of proteins can be achieved compared to eukaryotic expression hosts.

Nevertheless, several bottlenecks may appear during the heterologous synthesis of proteins, which can result in very small yields of the active protein. In addition, other factors like too high rates of expression, misfolding or instability of the target protein may lead to the formation of insoluble aggregates, so-called *inclusion bodies*.

In several cases co-expression of genes of molecular chaperones or folding catalysts showed a yield improvement of the active protein. This process still is a trial-and-error approach as it is not predictable which modulator of the folding process or which combination of folding catalysts and molecular chaperones is required to optimize the synthesis of the recombinant protein.

On this account an extensive chaperone gene expression library (*toolbox*) has been created during this thesis. Every gene that encodes a putative folding modulator of the versatile, Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* has been identified and cloned. Additionally, plasmids have been constructed by homologous recombination attempts containing three genes in randomized combinations of folding catalysts and molecular chaperones, respectively. Along the way and for the first time a vast number of different single and combined folding modulators were introduced into the bacterial hosts used for the production of problematically target proteins. By means of the generated chaperone-toolbox, the influence of single or combined folding modulators on the synthesis and activity of problematical target proteins has been investigated. By over-expression experiments and specific activity essays the protein yield and enzyme activity for proteins as alcohol dehydrogenases, hydrolases and the human Interferon 2 $\alpha$ b protein has been determined. For each of these target proteins a combination of molecular chaperones and folding catalysts, which improved the production of catalytic active molecules significantly, has been identified systematically.

## F Literatur

- Abokitse, K. (2004).** Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung von Alkoholdehydrogenasen und einer Oxygenase aus *Rhodococcus* Spezies. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- Abokitse, A., and Hummel, W. (2003).** Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the gene encoding a (S)-specific alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 43297. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**: 380-386
- Akatsuka, H., Binet, R., Kawai, E., Wandersman, C., and Omori, K. (1994).** Lipase secretion by bacterial hybrid ATP-binding cassette exporters: molecular recognition of the LipBCD, PrtDEF, and HasDEF exporters. *J Bacteriol* **179**: 4754-4760
- Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N., and Croughan, T. P. (1995).** Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**: 63-67
- Al-Herran, S., and Ashraf, W. (1998).** Physiological consequences of the over-production of *E. coli* truncated molecular chaperone DnaJ. *FEMS Microbiol Lett* **162**: 117-122
- Alldread, R.M., Nicholls, D.J., Sundaram, T.K., Scawen, M.D., and Atkinson, T. (1992).** Overexpression of the *Thermus aquaticus* B malate dehydrogenase-encoding gene in *Escherichia coli*. *Gene* **114**: 139-143
- Allen, S.P., Polazzi, J.O., Gierse, J.K., and Easton, A.M. (1992).** Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**: 6938-6947
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402
- Andersen, C.L., Matthey-Dubraz, A., Missiakas, D., and Raina, S. (1997).** A new *Escherichia coli* gene, *dsbG*, encodes a periplasmic protein involved in disulphide bond formation, required for recycling DsbA/DsbB and DsbC redox proteins. *Mol Microbiol* **26**: 121-132
- Andersen, D.C., and Krumme L. (2002).** Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 117-123
- Andersson, L., Yang, S., Neubauer, P., and Enfors S.O. (1996).** Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **46**: 255-263
- Anfinsen, C.B. (1973).** Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**: 223-230
- Anné, J., and van Mellaert, L. (1993).** *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production. *FEMS Microbiol Lett* **114**: 121-128
- Arechaga, I., Miroux, B., Runswick, M.J, and Walker, J.E. (2003).** Overexpression of *Escherichia coli* F1F(o)-ATPase subunit a is inhibited by instability of the *uncsB* gene transcript. *FEBS Lett* **547**: 97-100
- Åslund, F., Ehn, B., Viranda-Vizuete, A., Pueyo, C., and Holmgren, A. (1994).** Two additional glutaredoxins exist in *Escherichia coli*: glutaredoxin 3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9813-9817
- Ashiuchi, M., Yoshimura, T., Kitamura, T., Kawata, Y., Nagai, J., Gorlatov, S., Esaki, N., and Soda, K. (1995).** In vivo effect of GroESL on the folding of glutamate racemase of *Escherichia coli*. *J Biochem* **117**: 495-498
- Baca, A., and Hol, W.G. (2000).** Overcoming codon bias: a method for high-level overexpression of *Plasmodium* and other AT-rich parasite genes in *Escherichia coli*. *Int J Parasitol* **30**: 113-118
- Bader, M., Muse, W., Ballou, D.P., Gassner, C. and Bardwell, J.C. (1999).** Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell* **98**: 217-227
- Baneyx, F. (1999).** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **10**: 411-421
- Baneyx, F., and Mujacic, M. (2004).** Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **22**: 1399-1408
- Bardwell, J.C. (1994).** Building bridges: disulphide bond formation in the cell. *Mol Microbiol* **14**: 199-205
- Bardwell, J.C., Lee, J.O., Jander, G., Martin, N., Belin, D., and Beckwith, J. (1993).** A pathway for

disulfide bond formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1038-1042

**Bardwell, J.C., and Craig, E.A. (1988).** Ancient heat shock gene is dispensable. *J Bacteriol* **170**: 2977-2983

**Becker, S., Theile, S., Heppeler, N., Michaelczyk, A., Wentzel, A., Wilhelm, S., Jaeger, K.E., Kolmar, H. (2005).** A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. *FEBS Lett* **579**: 1177-1182

**Beilen, J.B., and Li, Z. (2002).** Enzyme technology: an overview. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 338-344

**Beldarrain, A., Cruz, Y., Cruz, O., Navarro, M., and Gil, M. (2001).** Purification and conformational properties of a human interferon  $\alpha 2b$  produced in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem* **33**: 173-182

**Ben-Zvi, A.P., and Goloubinoff, P. (2001).** Review: Mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J Struct Biol* **135**: 84-93

**Bernard, P., and Couturier, M. (1992).** Cell Killing by the F Plasmid CcdB Protein Involves Poisoning of DNA-Topoisomerase II Complexes. *J Mol Biol* **226**: 735-745

**Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J., and Georgiou, G. (1999).** Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 13703-13708

**Binnie, C, Cossar, J.D., and Stewart, D.I.H. (1997).** Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. *Tibtech* **15**: 315-320

**Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523

**Blank, K., Mofill, J., Gump, H, and Gaub, H.E. (2006).** Functional expression *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* epub ahead of print

**Blight, M.A., Chervaux, C., and Holland, I.B. (1994).** Protein secretion pathway in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **5**: 468-474

**Blum, P., Ory, J., Bauernfeind, J., and Krska, J. (1992).** Physiological consequences of DnaK and DnaJ Overproduction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**: 7436-7444

**Bornscheuer, U.T. (2005).** Trends and challenges

in enzyme technology. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **100**: 181-203.

**Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254

**Braig, K., Otwinowski, Z., Hedge, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L., and Sigler, P.B. (1994).** The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371**: 578-586

**Breiteneder, H., Krebitz, M., Wiedermann, U., Wagner, B., Essl, D., Steinkellner, H., Rupen, T.H., Ebner, C., Buck, D., Niggemann, B., and Scheiner, O. (2001).** Rapid production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana* and their impact on diagnosis and therapy. *Int Arch Allergy Immunol* **125**: 48-50

**Brockmeier, U., Wendorff, M., and Eggert, T. (2006).** Versatile expression and secretion vectors for *Bacillus subtilis*. *Current Microbiology* **52**: 143-148

**Brunschwig, E., and Darzins, A. (1992).** A two-component T7 system for the overexpression of genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **111**: 35-41

**Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., and Craig, E.A. (2000).** Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101**: 119-122

**Bukau, B., and Horwich, A. L. (1998).** The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell* **92**: 351-366

**Bukau, B., Weissman, J., and Horwich, A. (2006).** Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* **125**: 443-451

**Buskiewicz, I., Deuerling, E., Gu, S.Q., Jockel, J., Rodnina, M.V., Bukau, B., and Wintermeyer, W. (2004).** Trigger factor binds to ribosome-signal-recognition particle (SRP) complexes and is excluded by binding of the SRP receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 7902-7906

**Calderone, T.L., Stevens, R.D. and Oas, T.G. (1996).** High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **262**: 407-412

**Carbone, A., Zinovyev, A., and Kepes, F. (2003).** Codon adaptation index as a measure for dominating codon bias. *Bioinformatics* **19**: 2005-2015

**Carmel-Harel, O., and Storz, G. (2000).** Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces*

- cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol* **54**: 439-461
- Carrascosa, J.L., Llorca, O., and Valpuesta, J.M. (2001).** Structural comparison of prokaryotic and eukaryotic chaperonins. *Micron* **32**: 43-50
- Carrio, M.M., Cubarsi, R., and Villaverde, A. (2000).** Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *FEBS Lett* **471**: 7-11
- Carrio, M.M., and Villaverde, A. (2002).** Consruciton and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol* **96**: 3-12
- Chen, R., and Henning, U. (1996).** A periplasmic protein (Skp) of *Escherichia coli* selectively binds a class of outer membrane proteins. *Mol Microbiol* **19**: 1287-1294
- Confalonieri, F., and Duguet, M. (1995).** A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *Bioessays* **17**: 639-650
- Conway, S.P., Brownlee, K.G., Denton, M., and Peckham, D.G. (2003).** Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in cystic fibrosis. *Am J Respir Med* **2**: 321-332
- Cowman, D.A., Arslanoglu, A., Burton, S.G., Baker, G.C., Cameron, R.A., Smith, J.J., and Meyer, Q. (2004).** Metagenomics, gene discovery and the ideal biocatalysts. *Biochem Soc Trans* **32**: 298-302
- Craig, E., Yan, W., and James, P. (1999)** in *Molecular chaperones and folding catalysts* (Ed: Bukau, B.), Harwood, Amsterdam: 139-162
- Datar, R.V., Cartwright, T., and Rosen, C. (1993).** Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plaminogen activator. *Bio Technology* **11**: 349-357
- de Jong, W.W., Leunissen, J.A., and Voorter, C.E. (1993).** Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. *Mol Biol Evol* **10**: 103-126
- Delahay, R. M., Shaw, R. K., Elliott, S. J., Kaper, J. B., Knutton, S., and Frankel, G. (2002).** Functional analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system chaperone CesT identifies domains that mediate substrate interactions. *Mol Microbiol* **43**: 61-73
- De Lorenzo, V., Eltis, L., Kefler, B., and Timmis, K. N. (1993).** Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacI<sup>q</sup>* *P<sub>trp</sub>-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**: 17-24
- De Marco, A., and De Marco V. (2004).** Bacteria co-transformed with recombinant proteins and chaperones cloned in independent plasmids are suitable for expression tuning. *J Biotechnol* **109**: 45-52
- De Marco, A., Vigh, L., Diamant, S., and Goloubinoff, P. (2005).** Native folding of aggregaton-prone recombinant proteins in *Escherichia coli* by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones. *Cell Stress Chaperones* **10**: 329-339
- Deuerling, E., Schulze-Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk, A., and Bukau, B. (1999).** Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* **400**: 693-696
- Deuerling, E., Patzelt, H., Vorderwulbecke, S., Rauch, T., Kramer, G., Schaffitzel, E., Mogk, A., Schulze-Specking, A., Langen, H., and Bukau, B. (2003).** Trigger factor and DnaK posses overlapping substrate pools and binding specificities. *Mol Microbiol* **47**: 1317-1328
- Dieci, G., Bottarelli, L., Ballabeni, A., and Ottonello, S. (2000).** tRNA-assisted overproduction of eukaryotic ribosomal proteins. *Protein Expr Purif* **18**: 346-354
- Dilsen, S., Paul, W., Sandgathe, A., Tippe, D., Freudl R., Thömmes, J., Kula, M.R., Takors, R., Wandrey, C., Weuster-Botz, D. (2000).** Fedbatch production of recombinant human calcitonin precursor fusion protein using *Staphylococcus carnosus* as an expression-secretion system. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**: 361-369
- Dobson, C.M., and Karplus, M. (1999).** The fundamental of protein folding: bringing together theory and expereriment. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 92-101
- Dolinski, K.J., and Heitman, J. (1999).** Hmo1p, a high mobility group ½ homolog, genetically and physically interacts with the yeast FKBP12 prolyl isomerase. *Genetics* **151**: 935-944
- Dong, H., Nilsson, L., and Kurland C.G. (1995).** Grauitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J Bacteriol* **177**: 1497-1504
- Dorr, R.T. (1993).** Interferon-alpha in malignant and viral diseases: a review. *Drugs* **45**: 177-211
- Dougan, D.A., Mogk, A., and Bukau, B. (2002).** Protein folding and degradation in bacteria. *Cell Mol Life Sci* **59**: 1607-1616
- Drepper, T., Arvani, S., Rosenau, F., Wilhelm, S., and Jaeger, K.E. (2005).** High-level

- transcription of large gene regions: a novel T(7) RNA-polymerase-based system for expression of functional hydrogenases in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem Soc Trans* **33**: 56-58
- Dubendorff, J.W., and Studier, F.W. (1991).** Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with *lac* repressor. *J Mol Biol* **219**: 45-59
- Düfel, H. (1995).** Ortsgerichtete Mutagenese des Gens *lipA* aus *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomarbeit, Ruhruniversität Bochum
- Dunn, S. D. (1986).** Effect of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal Biochem* **157**: 144-153
- Ebisu, S., Takagi, H., Kadowaki, K., Yamagata, H., and Udaka, S. (1995).** Production of human epidermal growth factor by *Bacillus brevis* increased with use of stable plasmid from *B. brevis* 481. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**: 812-813
- Ehrnsperger, M., Hergersberg, C., Wienhues, U., Nichtl, A., and Buchner, J. (1998).** Stabilization of proteins and peptides in diagnostic immunological assays by the molecular chaperone Hsp25. *Anal Biochem* **259**: 218-225
- Elend, C., Schmeisser, C., Leggewie, C., Babiak, P., Carballeira, J.D., Steele, H.L., Reymond, J.L., Jaeger, K.E., and Streit, W.R. (2006).** Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3637-3645
- Ellis, R.J. (2001).** Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 114-119
- Erbse, A., Dougan, D.A., and Bukau, B. (2003).** A folding machine for many but a master of none. *Nat Struct Biol* **10**: 84-86
- Ernst & Young (2005).** Kräfte der Evolution – Deutscher Biotechnologie-Report 2005.
- EuropaBio (2003).** White biotechnology: Gateway to a more sustainable future. In Europabio. Lyon, France
- Fahnert, B., Lilie, H., and Neubauer, P. (2004).** Inclusion bodies: formation and utilization. *Adv Biochem Engin Biotechnol* **89**: 93-142
- Farid, S.S. (2006).** Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*; Epub ahead of print
- Fayet, O., Ziegelhoffer, T., and Georgopoulos, C. (1989).** The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol* **171**: 1379-1385.
- Fernandez, J.M., and Hoeffler, J.P. (1999).** Gene expression systems. Using nature for the art of expression. Academic Press, San Diego
- Festel, G., Knöll, J., Götz, H., and Zinke, H. (2004).** Der Einfluß der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der Chemieindustrie. *Ing Tech* **76**: 307-312
- Fiedler, S., and Wirth, R. (1988).** Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal Biochem* **170**: 38-44
- Filloux, A.:** Centre National de la Recherche Scientifique, Batiment IBSM, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France
- Fischer, G., Bang, H., and Mech, C. (1984).** Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed Biochim Acta* **43**: 1101-1111
- Fischer, G. (1994).** About PPIases and their inhibitors. *Angew Chem Int Ed Eng* **33**: 1415-1436
- Fischer, G., and Schmid, F. X. (1990).** The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry* **29**: 2205-2212
- Flynn, G.C., Pohl, J., Flocco, M.T., and Rothman, J.E. (1991).** Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BIP. *Nature* **353**: 726-730
- Forman, M.D., Stack, R.F., Masters, P.S., Hauer, C.R., and Baxter, S.M. (1998).** High level, context dependent misincorporation of lysine for arginine in *Saccharomyces cerevisiae* alpha1 homeodomain expressed in *Escherichia coli*. *Protein Sci* **7**: 500-503
- Frydman, J. (2001).** Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* **70**: 603-647
- Frydman, J., Nimmegern, E., Ohtsuka, K., and Hartl, F.U. (1994).** Folding of nascent polypeptide chains in high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* **370**: 111-117
- Galat, A. (1993).** Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem* **216**:

689-707

**Genevaux, P., Keppel, F., Schwager, F., Langendijk-Genevaux, P.S., Hartl, F.U., and Georgopoulos, C. (2004).** In vivo analysis of the overlapping functions of DnaK and trigger factor. *EMBO Rep* **5**: 195-200

**George, H.J., Marchand, P., Murphy, K., Wiwall, B.H., Dowling, R., Giannara, J., Hollis, G.F., Trzaskos, J.M., and Copeland, R.A. (1997).** Recombinant human 92-kDa type IV collagenase/gelatinase from baculovirus-infected insect cells: expression, purification, and characterization. *Protein Expr Purif* **10**: 154-161

**Georgiou, G., and Valax, P. (1996).** Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **7**: 190-197

**Gerngross, T.U. (2004).** Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat Biotechnol* **22**: 1409-1414

**Gervais, A., Hammel, Y.A., Pelloux, S., Lepage, P., Baer, G., Carte, N., Sorokine, O., Strub, J.M., Koerner, R., Leize, E., and van Dorselaer, A. (2003).** Glycosylation of human recombinant gonadotrophins: characterization and batch-to-batch consistency. *Glycobiology* **13**: 179-189

**Gething, M.J., and Sambrook, J. (1992).** Protein folding in the cell. *Nature* **355**: 33-45

**Gilbert, H.F. (1997).** Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. *J Biol Chem* **272**: 29399-29492

**Gilbert, M., Morosoli, R., Shareck, F., and Kluepfel, D. (1995).** Production and secretion of proteins by streptomycetes. *Crit Rev Biotechnol* **15**: 13-39

**Glover, J.R., and Lindquist, S. (1998).** Hsp104, Hsp70 and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**: 73-82

**Göthel, S.F., and Marahiel, M.A. (1999).** Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci* **55**: 423-436

**Goldberg, K., Edegger, K., Kroutil, W., and Liese, A. (2006).** Overcoming the thermodynamic limitation in asymmetric hydrogen transfer reactions catalyzed by whole cells. *Biotechnol Bioeng*, Epub ahead of print

**Goloubinoff, P., Gatenby, A. A., and Lorimer, G. H. (1989).** GroE heat-shock proteins promote

assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature* **337**: 44-47

**Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T., and Bukau, B. (1999).** Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 13732-13737

**Goodman, A.L., and Lory, S. (2004).** Analysis of regulatory networks in *Pseudomonas aeruginosa* by genomewide transcriptional profiling. *Curr Opin Microbiol* **7**: 39-44

**Goodrick, J.C., Xu, M., Finnegan, R., Schilling, B.M., Schiavi, S., Hoppe, H., and Wan, N.C. (2001).** High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. *Biotechnol Bioeng* **74**: 492-497

**Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R., and Hanahan, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4645-4649

**Graumann, K., and Premstaller, A. (2006).** Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol J* **1**: 164-186

**Gur, E., Biran, D., Gazit, E., and Ron, E.Z. (2002).** In vivo aggregation of a single enzyme limits growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Mol Microbiol* **46**: 1391-1397

**Gutman, G.A., and Hatfield, G.W. (1989).** Nonrandom utilization of codon pairs in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 3699-3703

**Gutterman, J.U. (1994).** Cytokine therapeutics lessons from interferon- $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1198-1205

**Hagelüken, G., Adams, T.M., Wielmann, L., Widow, U., Kolmar, H., Tummeler, B., Heinz, D.W., and Schubert, W.D. (2006).** The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 7631-7636

**Hamilton, S.R., Bobrowicz, P., Bobrowicz, B., Davidson, R.C., Li, H., Mitchell, T., Nett, J.H., Rausch, S., Stadheim, T.A., Wischniewski, H., Wildt, S., and Gerngross, T.U. (2003).** Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science* **301**: 1244-1246

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

557-580

- Handelsman, J. (2004).** Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 669-685
- Hannig, G., and Makrides, S.C. (1998).** Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* **16**: 54-60
- Harrison, C.J., Hayer-Hartl, M., Di Liberto, M., Hartl, F., and Kuriyan, J. (1997).** Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science* **276**: 431-435
- Hartl, F.U. (1996).** Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**: 571-579
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2002).** Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**: 1852-1858
- Hartman, T.E., Sar, N., Genereux, K., Barrit, D.S., He, Y., Burky, J.E., Wesson, M.C., Tso, J.Y., Tsurushita, N., Zhou, W., and Sauer P.W. (2006).** Derivation and characterization of cholesterol-independent non-GS NS0 cell lines for production of recombinant antibodies. *Biotechnol Bioeng*; Epub ahead of print
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White H.E., Chen, S., Saibil, H.R., and Buchner, J. (1999).** Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J* **18**: 6744-6751
- Hayashi, M.N., and Hayashi, M. (1985).** Cloned DNA sequences that determine mRNA stability of bacteriophage  $\phi$ X174 *in vivo* are functional. *Nucleic Acids Res* **13**: 5937-5948
- Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1992).** Proline isomerases at the crossroads of protein folding, signal transduction, and immunosuppression. *New Biol* **4**: 448-460
- Herrero, M., de Lorenzo, V., Ensley, B., and Timmis, K.N. (1993).** A T7 RNA polymerase-based system for the construction of *Pseudomonas* strains with phenotypes dependent on TOL-meta pathways effectors. *Gene* **134**: 103-106
- Hiniker, A., and Bardwell, J. C. A. (2003).** Disulfide bond isomerization in prokaryotes. *Biochemistry* **42**: 1179-1185
- Hiniker, A., and Bardwell, J.C.A. (2004).** In vivo substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem* **279**: 12967-12973
- Hockney, R. C. (1994).** Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* **12**: 456-463
- Hof, H., Müller, R.L., Dörries, R. (2002).** Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Hoffmann, F., and Rinas, U. (2001).** On-line estimation of the metabolic burden resulting from the synthesis of plasmid-encoded and heat-shock proteins by monitoring respiratory energy generation. *Biotechnol Bioeng* **76**: 333-340
- Hoffmann, F., and Rinas, U. (2004).** Roles of Heat-Shock Chaperones in the Production of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Adv Biochem Engin/ Biotechnol* **89**: 143-161
- Høiby, N. (2002).** Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies. *J Cyst Fibros* **1**: 249-254
- Holloway, B. W., Krishnapillai, V., and Morgan, A. F. (1979).** Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev* **43**: 73-102
- Holmgren, A., and Branden, C. I. (1989).** Crystal structure of chaperone protein PapD reveals an immunoglobulin fold. *Nature* **342**: 248-251
- Horwich, A.L., Weber-Ban, E.U., and Finley, D. (1999).** Chaperone rings in protein folding and degradation. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 11033-11040
- Horwitz, J. (1992).** Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10449-10453
- Houry, W.A., Frishman, D., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., and Hartl, F.U. (1999).** Iof in vivo substrates of the chaperonin GroEL. *Nature* **402**: 147-154
- Ikonomou, L., Schneider, Y.J., and Agathos, S.N. (2003).** Insect culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**: 1-20
- Ikura, K., Kokubu, T., Natsuka, S., Ichikawa, A., Adachi, M., Nishihara, K., Yanagi, H., and Utsumi, S. (2002).** Co-overexpression of folding modulators improves the solubility of recombinant guinea pig liver transglutaminase expressed in *Escherichia coli*. *Prep Biochem Biotechnol* **32**: 189-205
- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. (1999).** Bacterial biocatalysts: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* **53**: 315-351

- Jaeger, K.E., and Eggert, T. (2004).** Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 305-313
- Jaeger, K.E., Eggert, T., Eipper, A., and Reetz, M.T. (2001).** Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**: 519-530
- Jaeger, K.E., Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Reetz, M.T. (1996a).** Biotechnological application of *Pseudomonas aeruginosa* lipase: efficient kinetic resurrtion of amines and alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol* **46**: 99-105
- Jaeger, K.E., Schneidinger, B., Liebeton, K., Haas, D., Reetz, M.T., Phillipou, S., Gerritse, G., Ransac, S., and Dijkstra, B.W. (1996b).** Lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: Molecular biology and biotechnical application, In: Nakazawa *et al.* (eds): Molecular biology of *Pseudomonads*. American Society for Microbiology, Washington D.C., pp. 319-330
- Jaeger, K. E., Schneidinger, B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., Dijkstra, B. W., Schimossek, K., Zonta, A., and Reetz, M. T. (1997).** Bacterial lipases for biotechnological applications. *J Mol Catal, B Enzym* **3**: 3-12
- Jaeger, K.-E., and Reetz, M.T. (1998).** Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* **16**: 396-403
- Jaeger, K.E., and Reetz, M.T. (2000).** Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. *Curr Opin Chem Biol* **4**: 68-73
- Jaenicke, R. (1998).** What ultrastable globular proteins teach us about protein stabilization. *Biochemistry* **63**: 312-321
- Jakob, U., and Buchner, J. (1994).** Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem Sci* **19**: 205-211
- Jana, S., and Deb, J.K. (2005).** Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**: 289-298
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P.A., and Stahl, S. (2002).** Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem* **35**: 91-105
- Joshi, S.A., Hersch, G.L., Baker, T.A., and Sauer, R.T. (2004).** Communication between ClpX and ClpP during substrate processing and degradation. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 404-411
- Kadokura, H., Katzen, F., and Beckwith, J. (2003).** Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* **72**: 111-135
- Kane, J.F. (1995).** Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **6**: 494-500
- Kane, J.F., Violand, B.N., Curran, D.F., Staten, N.R., Duffin, K.L., and Bogosian, G. (1992).** Novel in-frame two codon translational hop during synthesis of bovine placental lactogen in a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **20**: 6707-6712
- Karyia, Y., Ishida, K., Tsubota, Y., Nakashima, Y., Hirosaki, T., Ogawa, T., and Miyazaki, K. (2002).** Efficient expression system of human recombinant lamini-5. *J Biochem* **132**: 607-612
- Kaser, A., and Tilg, H. (2000).** Interferon-alpha in inflammation and immunity. *Cell Mol Biol* **47**: 609-617
- Kawaguchi, S., Müller, J., Linde, D., Kuramitsu, S., Shibata, T., Inoue, Y., Vassilyev, D.G., and Yokoyama, S. (2001).** The crystal structure of the ttCsaA protein: an export-related chaperone from *Thermus thermophilus*. *EMBO J* **20**: 562-569
- Kim, P.S., and Baldwin, R.L. (1982).** Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annu Rev Biochem* **51**: 459-489
- Kim, R., Sandler, S.J., Goldman, S., Yokota, H., Clark, A.J., and Kim, S.H. (1998).** Overexpression of archaeal proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* **20**: 207-210
- Kim, Y.I., Levchenko, I., Fraczkowska, K., Woodruff, R.V., Sauer, R.T., and Baker, T.A. (2001).** Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nat Struct Biol* **8**: 230-233
- Kircher, M. (2006).** White Biotechnology: Ready to partner and invest in. *Biotechnol J* **1**: 787-794
- Kjeldsen, T., Ludvigsen, S., Diers, I., Balschmidt, P., Sorensen, A.R., and Kaarsholm, N.C. (2002).** Engineering-enhanced protein secretory expression in yeast with application to insulin. *J Biol Chem* **277**: 18245-18248
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop II, R. M., and Peterson, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-

resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176

**Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop II, R. M., and Peterson, K. M. (1994).** pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *BioTechniques* **16**: 800-802

**Kok, R. G., Christoffels, V. M., Vosman, B., and Hellingwerf, K. J. (1993).** Growth-phase-dependent expression of the lipolytic system of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: Cloning of a gene, encoding one of the esterases. *J Gen Microbiol* **139**: 2329-2342

**Kohda, J., Kawanishi, H., Suehara, K., Nakano, Y., and Yano, T. (2006).** Stabilization of free and immobilized enzymes using hyperthermophilic chaperonin. *J Biosci Bioeng* **101**: 131-136

**Kurland, C., and Gallant, J. (1996).** Errors of heterologous protein expression. *Curr Opin Biotechnol* **7**: 489-493

**Krüger, L. (2005).** Herstellung rekombinanter (S)-spezifischer Alkohol-Dehydrogenasen in *Escherichia coli*: Untersuchungen zur Verbesserung der Löslichkeit. Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

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

**Landy, A. (1989).** Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Ann Rev Biochem* **58**: 913-949

**Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M.K., and Hartl, F.U. (1992).** Successive action of DnaK, DnaJ and GrpE along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **356**: 683-689

**Lee, G.J., Roeseman, A.M., Saibil, H.R., and Vierling, E. (1997).** A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J* **16**: 659-671

**Lee, S., Sowa, M.E., Choi, J.M., and Tsai, F.T. (2004).** The ClpB/Hsp104 molecular chaperone-a protein disaggregating machine. *J Struct Biol* **146**: 99-105

**Lee, S., and Tsai, F.T.F. (2005).** Molecular chaperones in protein quality control. *J Biochem Mol Biol* **38**: 259-265

**Lee, S.C., and Olins, P.O. (1992).** Effect of overproduction of heat shock chaperones GroESL and DnaK on human procollagenase production in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**: 2849-2852

**Lehmann, K., Hoffmann, S., Neudecker, P., Suhr, M., Bekcer, W.M., and Rosch, P. (2003).** High-yield expression in *Escherichia coli*, purification and characterization of properly folded major peanut allergen Ara h 2. *Protein Expr Purif* **31**: 250-259

**Leichert, L.I., and Jakob, U. (2004).** Protein thiol modifications visualized in vivo. *PLoS Biol* **2**: 333-348

**Levchenko, I., Luo, L., and Bakter, T.A. (1995).** Disassembly of the Mu transposase tetramer by the ClpX chaperone. *Genes Dev* **9**: 2399-2408

**Li, X., Tetling, S., Winkler, U.K., Jaeger, K.E., and Benedik, M.J. (1995).** Gene cloning, sequence analysis, purification, and secretion by *Escherichia coli* of an extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2674-2680

**Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C., and Zylicz, M. (1991).** *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2874-2878

**Lindquist, S., and Craig, E. A. (1988).** The Heat-Shock Proteins. *Annu Rev Genet* **22**: 631-677

**Lin Cereghino, J.L., and Cregg, J.M. (2000).** Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 45-66

**Lin Cereghino, G.P., Lin Cereghino, J., Ilgen, C., and Cregg, J.M. (2002).** Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 329-332

**Linde, D., Vokmer-Engert, R., Schreiber, S., and Müller, J.P. (2003).** Interaction of the *Bacillus subtilis* chaperone CsaA with the secretory protein YvaY. *FEMS Microbiol Lett* **226**: 93-100

**Lorenz, P., and Eck, J. (2005).** Metagenomics and industrial applications. *Nat Rev Microbiol* **3**: 510-516

**Lorenz, P., and Zinke, H. (2005).** White biotechnology: differences in US and EU approaches? *Trends Biotechnol* **23**: 570-574

**Lutz, S., and Patrick, W.M. (2004).** Novel methods for directed evolution of enzymes: quality, not quantity. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 291-297

**Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2000).** Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist.

*Microbes Infect* **2**: 1051-1060

**Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., BeNeil, B., and Harvey, L.M. (2005).** Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* **22**: 249-270

**Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. (2000).** Biology of microorganisms. 9<sup>th</sup> edition. Prentice Hall, New Jersey

**Magnusson, A.O., Rotticci-Mulder, J.C., Santagostino, A., and Hult, K (2005).** Creating space for large secondary alcohols by rational redesign of *Candida Antarctica* lipase B. *Chembiochem* **6**: 1051-1056

**Makrides, S.C. (1996).** Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **60**: 512-538

**Manting, E.H., and Driessen, A.J. (2000).** *Escherichia coli* translocase: the unravelling of a molecular machine. *Mol Microbiol* **37**: 226-238

**Martin-Benito, J., Bertrand, S., Hu, T., Ludtke, P.J., McLaughlin, J.N., Willardson, B.M., Carrascosa, J.L., and Valpuesta, J.M. (2004).** Structure of the complex between the cytosolic chaperonin CCT and phosphocin-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 17410-17415

**Mayer, A.F., Hellmuth, K., Schlieker, H., Lopez-Ulibarri, R., Oertel, S., Dahlems, U., Strasser, A.W.M., and van Loon, A.P.G.M. (1999).** An expression system matures: a highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol Bioeng* **63**: 373-381.

**Mayhew, M., da Silva, A.C.R., Martin, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Hartl, F.U. (1996).** Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin-complex. *Nature* **379**: 420-426

**McCarroll, L., and King, L.A. (1997).** Stable insect cultures for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol* **8**: 590-594

**McKinsey. (2003).** Industrial Biotechnology. Internet: [www.mckinsey.com](http://www.mckinsey.com).

**McNulty, D.E., Claffee, B.A., Huddleston, M.J., and Kane, J.F. (2003).** Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **27**: 365-374

**Medina, M.G., Carbonell, X., and Villaverde, A. (2002).** Connection between gene dosage and protein stability revealed by a high-yield production of recombinant proteins in *E. coli* LexA1(Ind-)

background. *Biotechnol Bioeng* **78**: 722-730

**Menzella, H.G., Ceccarelli, E.A., and Grmajo, H.C. (2003).** Novel *Escherichia coli* strain allows efficient recombinant protein production using lactose as inducer. *Biotechnol Bioeng* **82**: 809-817

**Messens, J., and Collet, J.F. (2006).** Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *J Biochem Cell Biol* **38**: 1050-1062

**Middelberg, A. (2002).** Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol* **20**: 437

**Miki, T., Park, J. A., Nagao, K., Murayama, N., and Horiuchi, T. (1992).** Control of segregation of chromosomal DNA by sec factor F in *Escherichia coli*. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress *letD (ccdB)* product growth inhibition. *J Mol Biol* **225**: 39-52

**Miroux, B., and Walker, J.E. (1996).** Overproduction of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membran proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**: 289-298

**Missiakas, D., and Raina, S. (1997).** Protein folding in the bacterial periplasm. *J Bacteriol* **179**: 2465-2471

**Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rudiger, S., Roder, D., Langen, H., and Bukau, B. (1999).** Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J* **18**: 6934-6949

**Moore, J. T., Lippal, A., Maley, F., and Maley, G. F. (1993).** Overcoming inclusion body formation in a high-level expression system. *Protein Expr Purif* **4**: 160-163

**Müller, J.P., Bron, S., Venema, G., and van Dijl, J.M. (2000).** Chaperone-like activities of the CsaA protein of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **146**: 77-88

**Mujacic, M., Cooper, K.W., and Baneyx, F. (1999).** Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli*: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. *Gene* **238**: 325-332

**Narberhaus, F. (2002).** Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 64-93

**Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., and Koonin, E. V. (1999).** AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the

assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* **9**: 27-43

**Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H., and Yura, T. (1998).** Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic role of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1694-1699

**Nishihara, K., Kanemori, M., Yanagi, H., and Yura, T. (2000).** Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 884-889

**Ogura, T., and Wilkinson, A.J. (2001).** AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Gene Cells* **6**: 575-597

**Okabayashi, K., Nakagawa, Y., Hayasuke, N., Ohi, H., Miura, M., Ishida, Y., Shimizu, M., Murakami, K., Hirabayashi, K., and Minamino, H. (1991).** Secretory expression of the human serum albumin gene in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem* **110**: 103-110.

**Olson, G.J., Woese, C.R. and Overbeck, R. (1994).** The wind of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J Bacteriol* **176**: 1-6

**Palleroni, N. J. (1993).** *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**: 231-251

**Panda, A.K. (2003).** Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **85**: 43-93

**Park, E.H., Shin, Y.M., Lim, Y.Y., Kwon, T.H., Kim, D.H., and Yang, M.S. (2000).** Expression of glucose oxidase by using recombinant yeast. *J Biotechnol* **81**: 35-44.

**Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A., and Lindquist, S. (1994).** Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**: 475-478

**Patzelt, H., Rudiger, S., Brehmer, D., Kramer, G., Vorderwulbecke, S., Schaffitzel, E., Waitz, A., Hestekamp, T., Dong, L., Schneider-Mergener, J., Bukau, B., and Deuerling, E. (2001).** Binding specificity of *Escherichia coli* trigger factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14244-14249

**Pedelacq, J.D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T.C., and Waldo, G.S. (2006).**

Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **24**: 79-88

**Pellecchia, M., Montgomery, D.L., Stevens, S.Y., Vander Kooi, C.W., Feng, H.P., Gierasch, L.M., and Zuiderweg, E.R. (2000).** Structural insights into substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Nat Struct Biol* **7**: 298-303

**Peters, R., and Sikorski, R. (1999).** Protein expression. Folding to green. *Science* **285**: 1229

**Peterson, G. L. (1977).** A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more general applicable. *Anal Biochem* **83**: 346-356

**Pierce, J.J., Robinson, S.C., Ward, J.M., Keshavarz-Moore, E., and Dunnill, P. (2002).** A comparison of the process issues in expressing the same recombinant enzyme periplasmatically in *Escherichia coli* and extracellularly in *Streptomyces lividans*. *J Biotechnol* **92**: 205-215.

**Premkumar, L., Bageshwar, U.K., Gokhman, I., Zamir, A., and Sussman, J.L. (2003).** An unusual halotolerant alpha-type carbonic anhydrase from the alga *Dunaliella salina* functionally expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **28**: 151-157

**Punt, P.J., van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J., and van den Hondel, C. (2002).** Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol* **20**: 200-206

**Pyle, L.E., Barton, P., Fujiwara, Y., Mitchell, A., and Fidge, N. (1995).** Secretion of biologically active human proapolipoprotein A-I in a baculovirus-insect cell system: protection from degradation by protease inhibitors. *J Lipid Res* **36**: 2355-2361

**Qiu, J., Swartz, J.R., and Georgiou, G. (1998).** Expression of active human tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4891-4896

**Radford, S.E. (2000).** Protein folding: Progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci* **25**: 611-618

**Rahfeld, J.U., Schierhorn, A., Mann, K., and Fischer, G. (1994).** A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **343**: 65-69

**Reiter, M., and Blüml, G. (1994).** Large-scale mammalian cell culture. *Curr Opin Biotechnol* **5**: 175-179

**Richardson, J.P. (1993).** Transcription termination. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **28**: 423-450

- Riedel, K., Talker-Huiber, D., Givskov, M., Schwab, H., and Eberl, L. (2003). Identification and Characterization of GDSL Esterase Gene located proximal to the *swr* Quorum-sensing system. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3901-3910.
- Rietsch, A. and Beckwith, J. (1998). The genetics of disulfide bond metabolism. *Annu Rev Genet* **32**: 163-184
- Rietsch, A., Bessette, P., Georgiou, G. and Beckwith, J. (1997). Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J Bacteriol* **179**: 6602-6608
- Ringquist, S., Shinedling, S., Barrick, D., Green, L., Binkley, J., Stormo, G.D., and Gold, L. (1992). Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site. *Mol Microbiol* **6**: 1219-1229
- Roman, L.J., Sheta, E.A., Martasek, P., Groß, S.S., Liu, Q., and Silver-Masters, B.S. (1995). High level expression of functional neuronal nitric oxide synthase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8428-8432
- Romanos, M.A., Makoff, A.J., Fairweather, N.F., Beesley, K.M., Slater, D.E., Rayment, F.B., Payne, M.M., and Clare, J.J. (1991). Expression of tetanus toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA. *Nucleic Acids Res* **19**: 1461-1467.
- Roseman, A.M., Chen, S., White, H, Braig, K., Saibil, H.R. (1996). The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL. *Cell* **87**: 241-251
- Ross, J. (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* **59**: 423-450
- Rotticci-Mulder, J.C., Gustavsson, M., Holmquist, M., Hult, K., and Martinele, M. (2001). Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* lipase B and lipase B fused to a cellulose-binding domain. *Prot Expr Purif* **21**: 386-392
- Rudd, K.E., Sofia, H.J., Koonin, E.V., Plunkett, G. 3<sup>rd</sup>, Lazar, S., and Rouviere, P.E. (1995). A new family of peptidyl-prolyl isomerases. *Trends Biochem Sci* **20**: 12-14
- Russel, M. (1995). Thioredoxin genetics. *Methods Enzymol* **252**: 264-274
- Rygus, T., and Hillen, W. (1991). Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of xylose-utilization operon. *Appl Microbiol Biotechnol* **35**: 594-599
- Saiki, R. K., Gelfand, H. D., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Hortn, G. T., Mullis, K. B., and Ehrlich H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Sakikawa, C., Taguchi, H., Makimo, Y., and Yoshida, M. (1999). On the maximum size of proteins to stay and fold in the cavity of GroEL underneath GroES. *J Biol Chem* **274**: 21251-21256
- Sambrook, J., Fritsch E. F., and Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sauer, R.T., Bolon, D.N., Burton, B.M., Burton, R.E., Flynn, J.M., Grant, R.A., Hersch, G.L., Joshi, S.A., Kenniston, J.A., Levchenko, I., Neher, S.B., Oakes, E.S.C., Siddiqui, S.M., Wah, D.A., and Baker, T.A. (2004). Sculpting the proteome with AAA+ proteases and disassembly machines. *Cell* **119**: 9-18
- Schäfer, U., Beck, K., and Muller, M. (1999). Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins. *J Biol Chem* **274**: 24567-24574
- Schaffitzel, E., Rudiger, S., Bukau, B., and Deuerling, E. (2001). Functional dissection of trigger factor and DnaK: interactions with nascent polypeptides and thermally denatured proteins. *Biol Chem* **382**: 1235-1243
- Schlapschy, M., Grimm, S., and Skerra, A. (2006). A system for concomitant overexpression of four periplasmic folding catalysts to improve secretory protein production in *Escherichia coli*. *Protein Eng Des Sel* **19**: 385-390
- Schlieker, C., Bukau, B., and Mogk, A. (2002). Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J Biotechnol* **96**: 13-31
- Schmid, F.X. (1993). Prolyl isomerases: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **22**: 123-142
- Schmid, F.X. (2001). Prolyl Isomerases. Advances in Protein Chemistry, Protein Folding in the Cell **59**: 243-282
- Schmidt, F.R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl*

*Microbiol Biotechnol* **65**: 363-372

**Schmidt, H.H.J., Genschel, J., Haas, R., Büttner, C., and Manns, M.P. (1997).** Expression and purification of recombinant human apolipoprotein A-I in chinese hamster ovary cells. *Protein Expr Purif* **10**: 226-236

**Schönfeld, H.J., Schmidt, D., Schröder, H., and Bukau, B. (1995).** The DnaK chaperone system of *Escherichia coli*: quaternary structure and interactions of the DnaK and GrpE components. *J Biol Chem* **270**: 2183-2189

**Schröder, H., Langer, T., Hartl, F.U., and Bukau, B. (1993).** DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J* **12**: 4137-4144

**Schulz, A. (2005).** Oberflächendisplay und *in-vitro* Evolution der Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

**Schuster, M., Nechansky, A., and Kircheis, R. (2006).** Cancer immunotherapy. *Biotechnol J* **1**: 138-147

**Shatzman, A.R. (1995).** Expression systems. *Curr Opin Biotechnol* **6**: 491-493

**Shirai, Y., Akiyama, Y., and Ito, K. (1996).** Suppression of *ftsH* mutant phenotypes by overproduction of molecular chaperones. *J Bacteriol* **178**: 1141-1145

**Shuman, S. (1994).** Novel Approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using *Vaccinia* DNA Topoisomerase. *J Biol Chem* **269**: 32678-32684

**Shuman, S. (1991).** Recombination mediated by *Vaccinia* virus DNA Topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10104-10108

**Siegers, K., Waldmann, T., Leroux, M.R., Grein, K., Shevchenko, A., Schiebel, E., and Hartl, F.U. (1999).** Compartmentation of protein folding in vivo: sequestration of non-native polypeptide by the chaperonin-GimC system. *EMBO J* **18**: 75-84

**Silberg, J.J., Hoff, K.G., Tapley T.L., and Vickery, L.E. (2001).** The Fe/S assembly protein IscU behaves as a substrate for the molecular chaperone Hsc66 from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**: 1696-1700

**Simon, R., Prierer, U., and Pühler, A. (1983).** A broad host range mobilization for *in vitro* genetic engineering: transposon mutagenesis in

gramnegative bacteria. *Biotechnology* **1**: 784-791

**Simon, R., O'Connell, M., Labes, M., and Pühler, A. (1986).** Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of *Rhizobia* and other gram-negative bacteria. *Meth Enzymol* **118**: 640-659

**Sing, M.B., and Bhalla, P.L. (2006).** Recombinant expression systems for allergen vaccines. *Inflamm Allergy Drug Targets* **5**: 53-59

**Sleep, D., Belfield, G.P., Ballance, D.J., Steven, J., Jones, S., Evans, L.R., Moir, P.D., and Goodey, A.R. (1991).** *Saccharomyces cerevisiae* strains that overexpress heterologous proteins. *Biotechnology* **9**: 183-187.

**Smith, D.W.E. (1996).** Problems of translating heterologous genes in expression systems: the role of tRNA. *Biotechnol Prog* **12**: 417-422

**Smith, R.S., and Iglewski, B.H. (2003).** *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* **6**: 56-60.

**Smith, V.R. and Walker, J.E. (2003).** Purification and folding of recombinant bovine oxoglutarate/malate carrier by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif* **29**: 209-216

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

**Sørensen, H.P., Sperling-Petersen, H.U., and Mortensen, K.K. (2003a).** Dialysis strategies for protein refolding. Preparative streptavidin production. *Protein Expr Purif* **32**: 252-259.

**Sørensen, H.P., Sperling-Petersen, H.U., and Mortensen, K.K. (2003b).** Production of recombinant thermostable proteins expressed in *Escherichia coli*: completion of protein synthesis is the bottleneck. *J Chromatogr B* **786**: 207-214

**Sosnick, T.R., Mayne, L., Hiller, R., and Englander, S.W. (1994).** The barriers in protein folding. *Nat Struct Biol* **1**: 149-156

**Srivastava, P., Bhattacharaya, P., Pandey, G., and Mukherjee, K.J. (2005).** Overexpression and purification of recombinant human interferon alpha2b in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **41**: 313-322

**Steele, H.L., and Streit, W. (2005).** Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. *FEMS Microbiol Lett* **247**: 105-111

**Stewart, D.E., Sarkar, A., and Wampler, J.E.**

- (1990). Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures. *J Mol Biol* **214**: 253-260
- Stirnemann, C.U., Rozhkova, A., Grauschopf, U., Grutter M.G., Glockshuber, R., and Capitani, G. (2005).** Structural basis and kinetics of DsbD-dependent cytochrome c maturation. *Structure (Cambridge)* **13**: 985-993
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Binkmann, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, K., Spencer, D.L., Wong, G.K.-S., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E.W., Lory, S., and Olsen, M.V. (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964
- Streit, W.R., Daniel, R., and Jaeger, K.E. (2004).** Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 285-290.
- Studier, F. W., and Moffatt, B. A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990).** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60-89
- Studier, F.W. (1991).** Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* **219**: 37-44
- Suzuki, Y., Yabuta, M., and Ohsuye, K. (1998).** High level production of recombinant human parathyroid hormone 1-34. *Appl Environ Microbiol* **64**: 526-529
- Swartz, J.R. (2001).** Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* **12**: 195-201
- Tao, H., and Cornish, V.W. (2002).** Milestones in directed enzyme evolution. *Curr Opin Chem Biol* **6**: 858-864
- Thatcher, D.R. (1990).** Recovery of therapeutic proteins from inclusion bodies: problems and process strategies. *Biochem Soc Trans* **18**: 234-235
- Thirumalai, D., and Lorimer, G.H. (2001).** Chaperonin-mediated protein folding. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **30**: 245-269
- Thomas, J.G., Ayling, A., and Baneyx, F. (1997).** Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Appl Biochem Biotechnol* **66**: 197-238
- Thony-Meyer, L. (2002).** Cytochrome c maturation: A complex pathway for a simple task? *Biochem Soc Trans* **30**: 633-638
- Tokumoto, U., and Takahashi, Y. (2001).** Genetic analysis of the *isc* operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *J Biochem* **130**: 63-71
- Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P., and Bukau, B. (2001).** Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol Microbiol* **40**: 397-413
- Ueguchi, C., and Ito, K. (1992).** Multicopy suppression: an approach to understanding intracellular functioning of the protein export system. *J Bacteriol* **174**: 1454-1461
- Urban, A., Leipelt, M., Eggert, T., and Jaeger, K.E. (1999).** DsbA and DsbC affect extracellular enzyme formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**: 587-596
- Valente, C.A., Monteiro, G.A., Cabral, J.M.S., Fevereiro, M., and Prazeres, D.M.F. (2006).** Optimization of the primary recovery of human interferon  $\alpha 2b$  from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expr Purif* **45**: 226-234
- Van Ooyen, A.J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M.M., Jacobs, D.I., Colussi, P.A., and Taron, C.H. (2006).** Heterologous protein production in yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* **6**: 381-392
- Villaverde, A., and Carrio, M.M. (2003).** Protein aggregation in recombinant bacterio: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett* **25**: 1385-1395
- Viitanen, M.I., Vasala, A., Neubauer, P., and Alatossava, T. (2003).** Cheese whey-induced high-cell-density production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **2**: 2-12
- Walter, S. (2002).** Structure and function of the GroE chaperone. *Cell Mol Life Sci* **59**: 1589-1598
- Walter, S., and Buchner, J. (2002).** Molecular Chaperones – Cellular Machines for Protein Folding. *Angew Chem Int Ed* **41**: 1098-1113
- Wang, J. D., Herman, C., Tipton, K. A., Groß, C. A., and Weissman, J. S. (2002).** Directed evolution of substrate-optimized GroEL/S

chaperonins. *Cell* **111**: 1027-1039

**Watson, A. A., Alm, R. A., and Mattick, J. S. (1996).** Construction of improved vectors for Protein production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **172**: 163-164

**Wawrzynow, A., Wojtkowiak, D., Marszalek, J., Bnecki, B., Jonsen, M., and Graves, B. (1995).** The ClpX heat shock protein of *Escherichia coli*, the ATP-dependent substrate specificity component of the ClpP-ClpX protease, is a novel molecular chaperone. *EMBO J* **14**: 1867-1877

**Weickert, M.J., Doherty, D.H., Best, E.A., and Olins, P.O. (1996).** Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **7**: 494-499

**Weissman, J.S., Hohl, C.M., Kovalenko, O., Kashi, Y., Chen, S., Braig, K., Saibil, H.R., Fenton, W.A., and Horwich, A.L. (1995).** Mechanism of GroEL action: productive release of polypeptide from a sequestered position under GroES. *Cell* **83**: 577-587

**Wenzel, S.C., and Müller, R. (2005).** Recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathways. *Curr Opin Biotechnol* **16**: 594-606

**Weydemann, K., Keup, P., Pionetk, M., Strasser, A.W., Schweden, J., Gellissen, G., and Janowicz, Z.A. (1995).** High-level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha* – authentic processing of three different preprohirudins. *Appl Microbiol Biotechnol* **44**: 377-385.

**Wickner, S., Gottesman, S., Skowrya, D., Hoskins, J., McKenney, K., and Maurizi, M.R. (1994).** A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proc Natl Acad* **91**: 12218-12222

**Wild, J., Altman, E., Yura, T., and Gross, C.A. (1992).** DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **6**: 1165-1172

**Wildt, S., and Gerngross, T.U. (2005).** The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nat Rev Microbiol* **3**: 119-128

**Wilhelm, S., Tommassen, J., and Jaeger, K.-E. (1999).** A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 6977-6986

**Wilson, K. J., and Yuan, P. M. (1989).** Protein and peptide purification. In: Protein sequencing, a practical approach. Findley, J B C & Geisow, M J (eds). IRL Press Oxford

**Winkler, U. K., and Stuckmann, M. (1979).** Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **138**: 663-670

**Wu, X.C., Lee, W., Tran, L., and Wong S.L. (1991).** Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion System with a strain deficient in six extracellular proteases. *J Bacteriol* **173**: 4952-4958

**Yamagata, H., Nakahama, K., Suzuki, Y., Kakinuma, A., Tsukagoshi, N., and Udaka, S. (1989).** Use of *Bacillus brevis* for efficient synthesis and secretion of human epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 3589-3593

**Yansura, D.G., and Henner, D.J. (1984).** Use of the *Escherichia coli lac* repressor and operator to control gene expression in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 439-443

**Xu, Z., Horwich, A.L., and Sigler, P.B. (1997).** The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)<sub>7</sub> chaperonin complex. *Nature* **388**: 741-750

**Zahn, K. (1996).** Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. *J Bacteriol* **178**: 2926-2933

**Zhang, N., Suen, W.C., Windsor, W., Xiao, L., Madison, V., and Zaks, A. (2003).** Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution. *Prot Eng* **16**: 599-605

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

**Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Ogata, C.M., Gottesman, M.E., and Hendrickson, W.A. (1996).** Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* **272**: 1606-1614

**Zulianelli, L., Canard, C., Kohler, T., Caille, D., Lacroix, J.S., and Meda, P. (2006).** Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **74**: 3134-3147

## G Anhang

### 1 DNA-Sequenzen der identifizierten Chaperon- und Faltungskatalysatorgene aus dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*

#### PA0499

ATGGTTCCTTGCATCGATATTCGCCTGGCTGTGCATGTCCGCCCATGCCGATCTCTCGTTTCGACGGCCAGAACCCT  
 TTCGTGATGAAAGGCAAGCGCCTGCCGATCACGCTGGTCAACGAGGGCAAGGAGCCGGCCCTGGCGGAAATCTCC  
 CTGGATTGGGGTACCGACGGCAAGGGGCAAGGGCAGGGCCTGCCCTTCGCCGTGTCCAGGCCGCTGCTCCGCCTGGGCGCC  
 GGCCAGCGGGCAAGGTGGAGGTGCTCTACCAGGGCCAGGGCCTGCCACCGACCGCGAGACCTACCTGCTGTTG  
 AGCGTGCTGGACGTGCCGCACGCGCCAGTACTCCCAGACCCTGCAGATCGCCCTACGCCATCGCTTCAAGCTG  
 TTCTATCGGCCGCCCTGGAAGCCACCGTCGAGCAGGGCATCGAGGGCGTGACGTGGACGCTCGGCACCAGCGGC  
 AATCCGAAGGCACACAATCCTTCGCCCTACCACATCACCTTCAGCCAGTTGGAGTTCCTCGACGCATCGGAGCGG  
 AGCTGCGGCAGGACCATCGAACACCTGATGCTGGCGCCCTTCTCCAATCACCAGTTCGACATCGCCGCTGCCAT  
 CCCGACAAAGTGCCTTACGCGATCGTCAGCGACGGAGGGAACCTCCACCCTTATCACGGCGCATTGAAATCAGGC  
 GTAGAGACCAACGCCAAACACCCATGA

#### PA0538 *dsbB*

TTGAGCGCTCTCCTCAAGCCCTCGACAATCGCTTGTTCGGCCCGCGGTCCGCATCGGCGGCTGCTGATCCTC  
 GCTTTCGTCTCTACCTCCAGCACGTGCGCGGCTTCGCGCCCTGCTCGCTGTGCATCTTCATTCGCCTGGACGTG  
 CTCGGCCTGGTGCTCGCCGGGATCGTCGGCAGCCTCGCCCCGCGTTTCGCGGATCGCCGGCGGCATCGCCGCGCTG  
 GGCATGCTCGCCGCCAGCCTGGGCGGGATCTACCACGCCTGGTTCGCTGGTTCGCGAAGAGAACTGGCTGCCAG  
 GGCATGGGCAGTTGCAAGATGTTTCATGGGCTTCCCCGAATGGATAACCGCTGGATACTGGCTGCCGAGGTCTTC  
 CAGCCCCGAGGGGCTGTGCGGCGAAGTGGTCTGGACCCTGCTCGGCCAGTCCATGGCGGTCTGGTTCGCTGGCGCTG  
 TTCGTGTTCTGCCTGCTGGTCTGGCGGCCAAGCTGGCGTTTCGGCCGCCGACCCGCTGA

#### PA0594 *surA*

GTGAAGATCAAGCTATGTAACCGGCTGCGCCCCCTTGCAATTGGGCGCAGCACTCCTTTGCTCCTTCGCGCATGCC  
 GAAGTGGTACCCTGGACCGGGTTCGTCGCCATCGTCGACAACGATGTGATCATGCAGAGCCAGCTCGACCAGCGC  
 CTGCGTGAAGTGCACCAGACGCTGCTCAAGCGCGGTGCGCCGCTGCCGCCGAGCACGTGCTGACCCAGCAGGTG  
 CTGGAACGCCTGATCATCGAGAATCCAGCAGCAGATCGGCGACCGCTCCGGCATCCGCATCTCCGACGAGGAG  
 CTGAACAGGCGATGGGCACCATCGCCAGCGCAACGGCATGAGCCTGGAGCAGTTCAGACCGCCCTCACCCG  
 GACGGCTTGTCTACGCCGACGCCCCGCGAGCAGGTCCGTCGCGAGATGGTGATCAGCCGTGTGCGCCAGCGCGG  
 GTCGCGGAGCGCATCCAGGTTCAGCGAGCAGGAGGTGAAGAACTTCTTGCCTCGGACATGGGCAAGATCCAGCTT  
 TCCGAAGAGTACCGCCTGGCCAATATCTGATCCCGGTGCCGGAAGCCGCGTCTTCGGACGTGATCCAGGCCGCC  
 GCAAGGCAGGCCAGGAGCTCTACCAGCAGCTCAAGCAGGGCGCCGACTTTCGGCCAACCTGGCGATTTCGCCGCTCG  
 GCCGGCGACAACGCCCTGGAAGGGCGGAGATCGGCTGGCGCAAGGCCGCCAGCTGCCGCGAGCCGTTTCGACAGC  
 ATGATCGGCTCCCTGGCCGTCGCGCAGCTCACCGAGCCTGTCCGCAACCCCGGCGGCTTCATCATCTCAAGCTG  
 GAAGAGAAGCGCGGCGGCGAGCAAGATGGTCCGTGACGAAGTGCATGTCCGCCATATCTGCTCAAGCCAGCGAA  
 ATCCGCAGCGAAGCGGAGACCGAGAAGCTAGCGCAGAAGCTGTACGAGCGCATCCAGTCCGGGGAAGACTTCGGC  
 GAACTGGCGAAGAGCTTCTCCGAAGATCCGGGTTCCGCCCTCAACGGCGGCGACCTGAACTGGATCGATCCGGAA  
 GCCCTGGTGGCCGAGTTCCGCCAGGTGATGAACGATAACCCCGCAGGGCGAGCTGTCCAAGCCGTTCCGCTCGCAG  
 TTCGGCTGGCACATCTGCAGGTCTCGGCCGTGCGGCCACCGACAGCAGCGAGAAGTTCCGCGAGCAGCAGGCCG  
 GTAAGCGTACTGCGCAACCGCAAGTACGACGAGGAGCTGCAAGCCTGGCTGCGGCGAGATCCGCGACGAGGCCCTAC  
 GTGGAATCAAGCAGTGA

#### PA0699

ATGCGGCCGGCATTTCGTTGCGGCATCCTGGCGTTTCGCGCTTTCGCGCTTTCGCGCGGCTGTGGCCAGCGCGAGGAC  
 GCGCGCGCGGCCAGGCCAGGCCGCGCTTTCGCAAGCCATCTGCCAGCGCCGCGCGGAGCCCGGTTGGCCCGC  
 CTCGGTGCCTTTCAGGTGGCGCCGGACGAAGTGAAGGCGCTGCTGGCCGAGGTGCGCGGAAACCCGCGCGCAG  
 TTGAGCGAGAACCGCGACCGATGGAACCGTGGATGCGTGCGCGACTGGCCGAGAAGGCGCTTACGAACAGGCC  
 AGCGCCAGGACTGGCAACAGCGTCCGCGAGGTGAAGACGCTGATCGATGCGGCGGCGGCGGACATCGTCTGCGT  
 ACCTACCTGGAGTGGTGAGCACGGTGGCCGAGGACTACCCAGCGATGCCGAACTGCAGGCCGCTACCAGGCCG  
 AACAAGGCGCAACTGGCTGTACCGGCGCTGTACCGGGTTCAGCCAGATCTTCATCGCCGCTTTCGCGCCGGCGGG  
 CTTGCCGAAGCGCGCAAGCGCGCCAGGAACTTACCAGGCGAGCCGCGGACGGCGACTTTCGCCGAACTGGCGCGC  
 AAGCATTCCGACGACCCGAGACCGCCCGCAACGGCGGCGACATCGGTGGGTTACTGGCGCAGGCGCAACTGCTG  
 CCGGCGATCCGTCCGGCGCTGGAACGGCTAAAGGTTCGGCGCGGTGTCCGAGCCGATCCAGGGCGCAACGGTTTC

CACCTGGTCAAGCTGACCGAGCGTTCGCGACGCCCGCCTCGCCACCCTCGACGAGGTCCGTGGTTCGCCTGCGCGAA  
 AGCCTGCGCGCGCAACGCCAGGAGCAGATAGCCAAGGCCTACCTGGATGGCTGGTGAACAACGCTACCCTGAGC  
 ATCGACGGCGGTTGCTCGGCAAGACCCTGGCGGAACTGCACTGA

**PA0837 *slyD***

ATGCAGATCGCGGCCAACAAGGCGGTTTTCCATCGACTATACCCTGACCAACGACGCCGGGGATGTCATCGACAGT  
 TCCGCTGGTGGCGCGCCGCTGGTCTACCTGCACGGTGC CGGCAACATCATCGTGGCCTGGAGAAGGCCCTGGAA  
 GGCAAGAACGTCCGTGACGAAGTGCAGCTCGCCATCGAGCCGGAAGACGCCCTATGGCGAATACAGCGCCGAAGT  
 GTCGCGACCCTGACCCGCGAGATGTTTGAAGGCGTGCAGCAACTGGAAGTCCGGCATGCAGTTCCACGCCCTCGGCT  
 CCGGACGGCGGCATGCAGATCGTACCATCCGCGACATCGACGGCGACGACGTGACCGTCGATGGCAACCATCCG  
 CTGGCCGGCCAGCGCCTGAACTTCAAGGTCAAGGTAGTGCAGCTGCGCGAGGCCAACGCCGAGGAAATCGCCCAT  
 GGTACATCCATGGCGAAGGCGGTACCACCACTGA

**PA1068**

GTGGCAGAATCCCGCACCGGACCGCTCGCGTGCAGCGGACGCCATTCATCGAACGCTTGGATAGGGACATGCAA  
 AGCAGCTTTCCGCAATCGAACACTCCCAGATCCGTCGCGCTGGAGTCGACCTCAACGGCGTGATGTCGGTGTCTC  
 AGCAAGCACCTCTATTCCACGCCACCCTGGCGTTGCGCGAGCTGGTGCAGAACGCCACGACTCGATCCTCCGT  
 CGCCGCTGGAGCAGCCCGACTGGCAAGGGCCGTCGCGAATCGAGGTGATCGGGCAGAGTCCAGCAACACCCTG  
 CGCATCGTGCACACCGGCCCGGGCTCACCGAGCACGAAATCCACGCCCTACCTGGCCACCCTCGGGCTCGGGTAC  
 ACCCGCGGACTGCGCCAGTCCGGCCACGAGGACAGCGGGCTGATCGGCATGTTCCGGCTGGGCTTCCTCTCCGCT  
 TTCGTCCTGGCCCGCGGGTTCAGCGTGCAGGACACGTCCTACCAGCAGCCGGAAGTGGGCTTCTGCTACGTCCTC  
 AGCAACGCCGAGCAATACAGCGTGACGCCGATGCCGGCGCGCCCGTGGGTACCGAGATCACCTCGAACTGCAG  
 GACGAATACAGTGCCTGACCCAGGCCGCGCGCTGCGCGAGATCCTCGAACGCTACTGCGTGTCTGTCGCGAG  
 CCGATCCACGTCCGGCGCGACGCCAGTTCGATCAACCCGAGCCCGCCGCGTGGCGACTGGCCGCCGACGCCCGC  
 CTGCACCCGCTGCAACGGCAGCGCCGCGACTGGAGTTCCGCCACGCTTCGAGCAGACTTCGAGCCGATCTGC  
 TGCCTGCCGTTGCGCCGAGCAGCGGGTGCAGCTGCAGGGCCTGCTGTGGATCCAGGACGGCGGCCTATGGC  
 ACCAGCGACAACCGCAATCTCTCGGTTTTCTCCGCGCATGCTGCTCGACGATGACGCCCGCGACTGCTGCGC  
 TCCTGGGCCGGGTTCTGTCGGCGGGTGCATCGAATCGAACCGCCTGACGCCACCGCCAGCCGCGAGGACCTGCAG  
 CGTGACGACCATTACGCGGGATCCAGCATGCGCTGGCCGAGGCGCTGATCGCTGGGCTCGGCGAGGTGGCGCG  
 CAGCAGCCGAGGCTGGCGGGGCTCTGCTGCGGCACAACGAGGCCCTGCTGGGAGCGGCTTGTGCGACGAG  
 CGTCTGTTTCGCGCTGATGATGGACAGCCTGCGCGTACCCACCTCCAGGGCGACTCCCGGCTTCCGAACTCCTT  
 TCGCGCGGAGCGGTGCATGTGCTGCTGGACAACGACAGCGGCTTCGAGGAAATGCTGTTCCGTGCCATGGGCGTA  
 CCGGTGGCCCATGGCAATCGCTATGCGGTGGTACCCTTCTCCGTCGCTGGGCGCAGGCCAAGGGGATGCGCCTG  
 GTGGAGCTGGGCACCGAGCAGGGCAACCGCCAGTTGTTCCGCCTCGACCGACTGCCCGAGCAGAGACC GGCTGG  
 CTGGCCGAACACCTGGGCGGCGCCGAGGAGCAACTGGTGCATCGCCCGCTTCAGCCCCGAGGAATTCGCGCTTGTG  
 GTGGTGCCTGACCGCGACGCCGAACTCAAGCGGCGACTGGAGGACGACGAGGCCGACAAGCGTATTTCCACCGCG  
 GCGTTGCGCCTGGCCCGGCGAGTTACCCCGCAAGCTCGACAATCGCCAGCCGAGCCGGCTCTACGTCAACCTCGAC  
 AATCCGGCGGTGCAGGCGCTGCTGCGGGCCGTCGGCGAGGAACGCGACGAAGCGGCCCATGCGGCGTTGCTGCTG  
 CGCTCGTTCAAAGTGATCATCGCCGACAGGGACGCGGCCAGCCCGGACCTCGCTGAACCAGGCCCTGGCCGGA  
 CTCGCCGATTCCGGTGAAGCGCCTGCTGGAGCAATA

**PA1481 *cmG***

TTGAAACGAGCGATTCTGCTGCTGCCGCTGGGGATCTTCTGATCGTCCGGTGTTCCTCTTCCGCGGCTCTGG  
 CTGGACCCAGCAGACTGCCCTCGGCGCTGATCGGCAAGCCGTTCCCGGCTTCGACCTGCCAGCCTGCAGGAC  
 CCGGCCCGGCGCCTGACCGAGGCCGACTCAAGGGCAAGCCGGCGCTGGTCAACGTCTGGGGACCTGGTGCCTG  
 TCGTGCCTGGTTCGAGCACCCGGAAGTGCACCGACTGGCCGAGCAGGGCGTGGTGCATCTACGGGATCAACTACAAG  
 GACGACAACGCCCGCCGATCAAGTGGTGAACGAGCTGCACAATCCCTACCTGCTGAGCATCAGCGACGCCGAC  
 GGCACCCTGGGCTGGACCTGGGCGTGTACGGTGCGCCGAAACCTACCTGATCGACAAAAGGGCATCATCCGC  
 CACAAGATCGTCCGGTGGTTCGACAGAAAGTCTGGCGGAGCAACTGGCGCCGCTGTACCAGCAACTGCTGGAC  
 GAGCCGGAGGCCCGATGA

**PA1596 *htpG***

ATGAGCGTGGAAACCCAAAAAGAGACTGGGCTTTTCAGACTGAAGTGAAGCAACTGCTTCACCTGATGATTTCAT  
 TCTCTCTATTTCGAACAAGGAAATCTTCTCCGCGAAGTGAATTTCCAACGCCCTCGGACGCCCGGACAAGCTGCGT  
 TTCGAAGCCCTGGCCAATCCCGAGCTGCTCGAGGGCGGCGCCGAGCTGAAAGATCCGCGTCAGCTTCGACAAGGAA  
 GCCAACACCGTACCCTGGAAAGACAACGGCATCGGCATGAGCCGCGAGGATGTGGTGAAGTCACTGGGACCATC  
 GCCAAGTCCGGGACCGCCGACTTTCCTGAAGAAGTGTCTGGCGACAGAAAGGATTCGCACCTGATCGGCCAG  
 TTCGGCGTCCGTTTCTACAGCGCCTTCATCGTCCCGACAAGGTGCATGTCTACTCCCGTCCGCGCCGCCAGCCG  
 GCCAGCGAAGGCGTGCATGGTTCGTGCAAGGGCGAGGGCGAGTTTCGACGTGCCACCATCGACAAGCCGAGCGC  
 GACCCCGCATCGTCTCACCTGAAAAGGGCGAGGAGGAAATTCGCCGATGGCTGGCGCCTGCGCAACGTGATC  
 AAGAAATACTCCGATCACATCGCTTTGCCGATCGAGTACCTCAACGAATTCACCGGCAAGAGCCGACAAGCCG  
 GCCGAGCCGGAATGGGAAACGGTCAACCGCGCCAGCGCGCTGTGGACCCGTCGCGCGCCGAGGTGAAGGACGAG  
 GAATAACAGGAGTTCTACAAGCACGTGCCCCATGACTTCGAGAACCCTGAGCTGGAGCCACAACAAGGTGCGAA  
 GGCAAGCTGGAATACACCTCGCTGCTCTACGTGCCGGGCGCGCGCCGTTTCGACCTGTACCATCGCGAAGCGCCG

CGGGGCCTGAAGCTGTACGTACAGCGCGTGTTCATCATGGACCAGGCCGACGAGTTCCTGCCGCTGTACCTGCGC  
TTCATCAAGGGTGTGGTGCAGCTCCAACGACCTGTGCTGAAACGTCTCCCGGGAAATCCTGCAGAAGGATCCGGTG  
ATCGACTCGATGAAGTCGGCGTTGACCAAGCGCGTGTGGACATGCTGGAGAAGCTGGCGAAGAACGAGCCGGAG  
CAGTACAAGACCTTCTGGAAGAACTTCGGCCAGGTCTCAAGGAAGGCCCGGCGGAAGACTTCGGCAACAAGGAG  
AAGATCGCCGGCTGTGCGCTTCCGCTCCACCGGCGACGATTTCGGGCGAGCAGAGCGTAGCGCTGGCCGACTAC  
ATCGGTCCGATGAAGGAAGGCCAGGACAAGATCTACTACCTCACCGGCGAGAGCTACTCGCAGGTGAAGAACAGC  
CCGCACCTGGAAGTCTTCCGCAAGAAGGGCATCGAGGTGCTGCTGCTCACCGATCGCATCGACGAGTGGCTGATG  
AGCTACCTGCCGGAGTTCGACGGCAAGCAGTTCGTGATGTCGCCCGCGGCGACCTGGACCTGGGCAGCCTGGAC  
TCGGAAGAGGACAAGAAGGCCAGGAAGAAGTTCGCCAAGAGCAAGGAAGGCCCTGATCGAGCGCTGAAGAAGGTG  
CTCGACGAGCAGGTGAGCGAAGTCCGCGTTTCCCACCGCTGACCGATTTCGCCGGCGATCCTCGCCATCGGGCAA  
CAGGACCTTGGCCTGCAGATGCGCCAGATCCTCGAGGCCAGCGGGCAGAAAAGTGCCGGACTCGAAGCCGATCTTC  
GAGATCAACCCGCGAGCATCCGCTGATCGAGAAGCTGGATGCGGAGCCGGACGAGGACCGCTTCGGCGAGCTGTCG  
CATATTCTCTTCGACCAGGCCGCCCTGGCCCGGGGGACAGCCTCAAGGATCCGGGCGCTACGTACGCCGACTG  
AACAAGCTGCTGGTGGAGCTGTCCGCTTAA

**PA1793 *ppiB***

ATGATCAAGCTGCATACCAACCATGGCGTCATCACCTGAAGCTCGATGAAGAGAAAAGCCCCGAAAACCGCGGCC  
AACTTCAAGGAGTACGTGAAAAGCGGCCACTACGACAACACCGTCTTCCACCGCGTGATCAACAACCTTCATGATC  
CAGGGCGGCGGTTTCGAGCCGGGCATGAAGCAGAAGCCACTCGCGCACCGATCAAGAACGAAGCCAACAACGGC  
CTGACCAACAAGGTGCGCAGCATCGCCATGGCTCGTACCATGGACCCGATTCGGCCAGCGCGCAGTTCTTCATC  
AACGTCGCCGACAACGATTTCTCAACCATAACGCCCCACCACCAGGGCTGGGGCTATGCCGTCTTCGGCGAA  
GTGGTCGAGGGCATGGACGTGGTCAACAAGATCAAGGGCGTGGCCACCACCATGCGCAGCGGCCACCAGGACGTG  
CCGGCCGAGGACGTGATCATCGAGAAGGCCGAAATCGTCAAGAATGA

**PA1800 *tig***

ATGCAAGTTTCTGTTGAAAGCACTTCCGCTCTTGAGCGCCGCATGACCGTTGGTGTGCCTGCCGAGCGTATCGAG  
ACCGAAGTCAACAAGCGTCTGCAGCAGACCCCGCTCGTGCCAAGATTCCAGGTTTCCGCCCCGGCAAGGTGCCG  
ATGAGTGTCAATTCGTGAGCGCTACGAAGCTTCCGCGCGCCAGGAAGCCATGGGCGATCTGATCCAGGAAAACCTTC  
TACGAAGCCGTGGTTCGAGCAGAAGCTGAATCCGGCCGGTTCGCCGTGGTAGAGCCCAAGTCTTCGAGAAAAGGC  
AAGGACCTGGAATACATCGCAACCTTCAAGTCTTCCCGGAATTTACCGTTTCCGGCTGGAAGACATCAAGGTC  
GAGCGCCTGCAGGCCGAAGTTTCCGATGCTGATGTCGACAATATGCTCGACGTCCTGCGCAAGCAGAACACCCGT  
TTCGAAGTAGTTCGAGCGTGCAGCCCGAGAACGATGACCAGTTGAACATCGACTTCGTGCGCAAGATCGACGGCGAA  
GCCTTCCGCGGCGGTTCCGCCAAAGGCACCCTGCTGGTACTGGGCTCCGGTCGCATGATCGCCGGCTTCGAAGAA  
GGGCTGGTGGGGCGAAGGCCGGTGAAGAGCGTGTGCTCAACCTGACCTTCCCCGAGGACTACCAGAACCCTGGAC  
CTGGCCAACAAGGCTGCCGAGTTACCGTTACCGTCAATAGCGTAGCCGAGCCCAAGCTGCCGGAACCTGAACGAA  
GAGTTCTTCGCTCTGTTCCGGCGTGAAGGAAACCGGTCTCGATGGCTTCCGCGCCGAAGTGCAGAAGAACATGGAG  
CGCGAGCTGCGCCAGGCGATCAAGTCCAAGGTCAAGAACCAGGTGATGGAAGGTCTGCTGCAGGCCAACCCGATC  
GAAGTGCCCAAGGCCCTGATCGGCAACGAAGTGAACCGTCTGCGCGTGCAGGCCGTCCAGCAGTTTCGGCGGCAAC  
ATCAAGCCTGACCAACTGCCGGCCGAGCTGTTCAAGAGCAGGCCAAGCGCCGTGTGGTGTGGCCTGATCGTC  
GCCGAAGTGGTCAAGCAGCACGAGCTGAAGGCCGACGAAGGTGCGGTTCCGCGAAATGATCGAGGAAATGGCCTCG  
GCCTACCAGGAGCCCGAGCAGGTGCTGCGCTGGTACTTCAAGAACGAGCCCCAGCTGAACGAAGTCCGTTCTGTT  
GTACTGGAAGAACAAGTCTGATGATACTGTCTGCAAAAAGGCCACTGTGACCGATAAGCAGGTATCTTACGAAGAA  
GCGGTCAAGCCGGCCGAAGCTCCGCAAGCGGCCTGA

**PA1801 *clpP***

ATGTCTCGCAACTCTTTTATTCCGACAGTTCCTCGATATCCAGGCCGCGGTTGGCCTGGTGCCATGGTGGTGGAG  
CAGTCCGCCCCGGCGAGCGCGCCTACGACATCTATTGCGCCTGCTGAAGGAGCGGATCATCTTCTGTTGCGGC  
CAGGTGAGGACTACATGGCCAACCTGGTGGTTGCTCAGTTGCTGTTCTGGAGGCTGAAAAATCCCGAGAAGGAC  
ATTCATCTCTACATCAACTCGCCGGGTGGTTCCGTGACTGCCGGGATGTCATCTACGACACCATGCAGTTCATC  
AAGCCCAACGTCTCGACCACCTGTATCGGCCAGGCGTGCAGCATGGGTGCCCTGCTGCTTGCAGGCGGTGCCGCC  
GGCAAGCGCTACTGCCTGCCGATTCGCGGATGATGATCCACCAGCCGCTGGGCGGTTTCCAGGGCCAGGCCCTCG  
GATATCGAGATCCATGCCAAGGAAATCCTCTTTCATCAAGGAGCGTCTGAACCAGATCCTGGCGCACCACACCGGC  
CAGCCCCTGGACGTCAATTGCCCGGATACCGATCGTGACCGCTTTATGAGCGGTGACGAAGCCGTCAAGTATGGC  
CTGATCGACAAGGTGATGACCCAGCGGACCTGGCCGTCTAA

**PA1802 *clpX***

ATGACTGATACCCGCAACGGCGAGGACAACGGCAAGCTGCTGTATTGCTCCTTCTGCGGCAAGAGCCAGCACGAA  
GTGCGAAGTTGATTGCCGGCCCCCTCGTCTTTATCTGCGACGAGTGTGTCGACCTGTGCAATGACATCATCCGC  
GAGGAGGTGCAGGAAGCGCAGGCGGAAAGTAGTGGGCACAAACTTCCGGCGCCGAAAGAGATCCGCACCATCCTC  
GATCAGTACGTGATCGGGCAGGAGCGGGCCAAGAAGTTCTGGCGGTAGCGGTATACAACCACTACAAGCCCTC  
AACCAGCGTGACAAGAAGGACGATATCGAGCTCGGCAAGAGCAACATTCTGATGATCGGCCCAACCGGCTCGGGC  
AAGACCCTGCTGGCCGAGACCCTCGCACGTCTGCTGAACGTGCCGTTACCATCGCCGATGCGACCACGCTGACG  
GAAGCGGGCTACGTGGGCGAGGATGTGAGAAACATCATCCAGAACTCTTGCAGAAAGTGCAGATTACGATGTGGAG  
AAGGCCAGATGGGCATCGTCTACATCGACGAGATCGACAAGATTTCCCGGAAATCGGACAACCCCTCCATCACT

CGCGACGTCTCCGGCGAGGGTGTGCAGCAGGCCCTGCTGAAGCTCATCGAGGGTACCGTTGCCTCGGTACCGCCG  
CAGGGCGGTTCGCAAGCATCCGCAGCAGGAGTTCTGCAGGTGCATACGCGCAACATCCTGTTTCATCTGCGGCGGC  
GCTTTCGCCGGTCTGGAGCGGGTTCATCCAGAACCCTTCCGCGCGCGGCGGCATCGGTTTCAATGCCGAAGTGCGC  
AGTCAGGAGATGGGCAAGAAGGTGGGCGAGGCGTTCAAGGAAGTCGAACCGGAAGATCTCGTCAAGTTCGGTCTT  
ATTCCCAGATTTGTAGGGCGTTTGCCTGGTGCATCGGACTCTTGTAGCTCGACGAGGCTGCGCTCATGCAGATC  
CTGACCCGAGCCGAAGAAGCTCTACCAAGCAGTACGCCAAGCTGTTTGGAAATGGAAGGCGTGCATCTCGAATT  
CGTCCGGACGCACTCAAGCGGTTGCCCGCAAGGCGCTCGAACGCAAGACCGGTGCACGTGGCTTTCGCTTCAATT  
CTCGAAGGTATCCTTCTCGATACCATGTACGAGATTCCCTCCCAGCAGGATGTCAGCAAGGTGGTTCATCGATGAG  
AGTGTTCATCGATGGCTCGTGCACCCCTGATGATCTACGAGAACAGCGAAAAGCCAGCCAAGGCTGCGCCTGAG  
GCATGA

**PA1805 *ppiD***

ATGCTGCAGAACATCAGGGATAATCCCAGGGCTGGATCGCCAAGACCATCATTGGCGTGATCATCGTTCTCCTG  
TCGCTGACCGGCTTCGACGCGATCATCCGGGCCACCGACCACTCCAACGTGGCCGCAAGGTCAACGCGCAGCAT  
ATCAGTCTCAATGAAGTCCAACAGGCCGTGGACATGCAGCGTCGCCAGCTGCTGCAACGCTGGGCAAGGATTT  
GATCCATCCATGCTGGATGACAAGCTGCTCAAGGAAGCGGCCCTGAAGGGGCTGATCGAGCGTACCCTGCTGCTC  
CAGGCCGCAAGGACGACAAGTTTCGCTTCTCCGACCAGGCGCTGGACCAGTTGATCCTGCAAACTCCCAGATT  
CAGGTGCACGGCAAGTTCAACGCGGATCGCTTCGACCAGGTTCATCCGCCAGATGAACTACAGCCGCATGCAGTTC  
CGCCAGATGCTCGGCCAGGAAATGCTCATCGGCCAGCTTCGCGCCGGCCTGGCGGGCACCGGTTTCGTACCCGAC  
AACGAATTGCAGTCTTTCGCTCGCCTCGAGAAGCAGACCCGCGACTTCGCCACCCTGGCGATCAAGGCCGACGCC  
TCCAAGAGCAGCGTGAGCGACGACGAGGTGAAGGCCTTCTACGAAGGCCACAAGAGCGAGTTCATGACTCCCAG  
CAGGTGGTTCGTAATACGTGGAGCTGAAGAAGTCTCCTTCTTCGACCAGGTCAAGGTGAAGCAGGAAGACCTC  
GAGGCGCTGTACCAGAAGGAAATCGCCAACCTTTCGAGCAGCGCGATGCCGCCACATCCTGATCGAGGTGAAC  
GACAAGGTTCGCGCAGCAGGCAAGGCCAAGGCGAAGTGCAGAGATCAAGGCTCGCCTGGCCAAGGGCGAGGATTT  
GCCGCGCTGGCCAAGGATTTCTCCAGGATATCGGCTCGGCCGCCACCAGGCGGCGACTGGGTTACGCGCTCGC  
GGCGTGTACGACCCCGCTTCGAGGAGGCGCTGTATGCGCTGAAGCAAGGTGAGGTATCCGCCCGGTGAAGACT  
CCGTACGGCTACCACCTGATCAAGCTGCTGGGCGTGCAGGCGCCGGAAGTACCAGGCTGGAAAAGCCTCAAGCCG  
AAGCTCGAGGACGAAGTGAAGAAAAGATGGTTCGAGCAGCGCTTCGTTCGAGGCTACCAAGGACCTGGAAAAGCTCC  
GCCTACGAAGCCGCGACCTGAGCCAGCCGGCGCAGGAAATGGGCTGAAGGTCCAGACCAGCCAGCCGTTTCGGA  
CGTTCGGGGGGCGACGGCATCGCTGCCAACCGCCAGATCGTGCAGACCGGTTTCAGCGCCGAGGTGCTGGAAGAA  
GCCGCCAACAGTGGCGCCATCGAGCTGGATCCGGACACCGTGGTGGTGTGCTGCGGGTCAAGGAACACAACAAGCCG  
AAGGAGCAACCGCTGGAGCAGGTTCGCGGCGAACATCCGCGAGCGCCTGGCCGCCGAAAAGGCCGCCGAGGAGGCG  
CAGAAGCGTGGCGAGGCCCTGATCGCAGAGCTGCGTGAAGGCCGTACCTCTTCCGACGCGGTGAGTCTGGAAA  
GTGGTTCGAGGCGGCCTCCCGCGCCACGAAGGCGTGCATCCGAAAAGTCTCCAGGCGGTGTTCCGCATGCAGCGT  
CCGGAGGCCAAGGACAAGCCTTCGTTCTCTGGCGTGACCCTGGCCAATGGCGATTACGTGGTGTATCCGCTGAAT  
GGCGTACGCGAGCCGGAGGAGGCTATCTCCGACGACGAGAAGGCCATGTACCGCCGCTTCTTGCTTCGCGCAGC  
GGACAGGACAGACTTCGCCGCTTCCGCCGTGAGTTGCAGGACAAGGCGGAAGTGCAGAAAATACTGA

**PA1996 *ppiC1***

ATGCCCGTCCGCATGGCCCGCCACATCCTGGTCAAGACCGAAGCCGAGGCCGCGCAACTGAAGCAGCGCCTGGCC  
AAGGGCGAGGACTTCGCCACGCTGGCGAAGAAGCATTTCGACCTGCCCGTCCGGCAAGCGCGGCGGACCTCGGC  
GAGGTGCGCCCGGGCAGATGGTTCAGGTCCATCGACAATGCCATCTTCAGGAAAACCGTGGGCGTGTCCAGGGT  
CCGCTGAAGAGCCAGTTTCGGCTACCATCTCCTGGAAGTGTATTTCCGCGACTGA

**PA2129 *cupA2***

ATGCCAGACATTTCGTACCGATCCGGCAGGACATCGGCGCTTCTGCTCGTCTGCTGGCGAGCATCGCCAGGCG  
CGGGCAAGCGTGGTGGTGACCGGGACCGGGTGCATCTATCCGGCGAGGCACGGGAGAAGACCGTGCAACTGAGC  
AATCGCGATGCGTTTCCCAACGTCGTCCAGGCTGGGTGCATCGACGCCCCGACGCGCCGCCGAGCAGGCG  
GACGCGCCGTTCTGGTCAACCCGGCGGTATTCCGCATGGCCCCGGACAGCGGCCAGACGCTGCGCATCGTCTAC  
ACCGGGCAGGGCCTGCCGGGCGATCGCGAATCGCTGTTCCATCTCAACGTCCTGCAGATCCCGCCACGCAACAGC  
AGCCATGCGGATCGGAACCAGATGCTGCTGATGCTGCGCAATCGCCTGAAGCTGTTCTACCGCCGGCGGGCATC  
CAGGGCCGTCCCAGGACCTGCCCGGGCAACTGCGTTTTCGCACTGGTCCGGCGCAGCGCCGGCTGGGCGGTGCGG  
GTGGACAACCCGAGCGGCTACTACGCCTCGTTTCGCCAGCGCCACGCTCAGCGTCCGGCCAGCGCCGCTGGCGCTT  
CGCAGCGGCATGCTGGAGCCGCGCAGCCATGCCGAATGGCAGGCCGAAAACCCGAGAAGCCCTGCCGCCGGGACGC  
GTGCGCCTGCACGCGCTGCTGATCAACGACTACGGCGCCCATATGGATATCCGTCATGACCTATCGCCATGA

**PA2132 *cupA5***

GTGTCCAGTAGGCGCGCTCGCGCTGCTGGCCATGCTTTGCCTCGCGCCGACGAGCGAGGCCGGAGTGACCGCG  
GAGCGACCCGCTGGTGTTCGTGGAGGGCCAGCGGAGGCTCGTTGCTGCTGGTCAACCAGAATCCCTACCCG  
GTGCTGGTGCAGGCGTGGTTCGATGACGGCGCCCTCGACGGCGAACCAGGATAACCGCGTGGCTCCGTTCTGCGG  
CTGCCGCCGATTTCGCTGGAGCCGGGACGCCAGCGCAGCCTGCGCCTGCTGGCTACCGGCCAGGCCAGGCA  
CGGGATCGCAATCGCTGTACTGGCTGAACATCTACGAGATCCCCCGCAAGCCACCGCCGAGGCCGCTGGCCGG  
CCCCGGCTCACGGTACCCTGCGAACCAGATGAAGGTGCTGTACCGCCCGCACGGCTGCATCCGCACGCCGAG  
GACGCGGCCGCGAAGTGGGCTTCGCGCTGCGCGACGAGACCCTGCGGGTGGACAACCCGACGCCGTACTTTCGTG

TCCCTGGCGGGGCTGGCGCTGGAGATAGGGGAGACGCGCCTGGATCTGCCCGGAACGCTGCTGGCTCCGCGCTCG  
CAACGACGCCTCGGCCTGCCGCGGGTGGACGCGGGGACGCGCGGGAGGTGGCGTTTCGACTGGATCGACGCAC  
AACGGCGTCAGCCGCCAGGAAAGGAAAGCTCTACAGTGA

**PA2476 *dsbG***

ATGAGACTGCCGCGCAACCTGATCACCCCTTGGCCTGGGCTGACCCCTCTCAACGCCGGCTGGCCACGGCGGCG  
GAGGAGCTGCCGGCGCCGATCCGCATGGTCCAGGAGAAGGGCGCCCGCATCCTCGGCAGCTTCGACGCCCCGGAT  
GGCCTGCGCGCTACGCCGCCGAATACCAGAACCAGGGCATGGCGCTGTACCTGACGCCCCGACGGCAAGCACGTA  
CTCACCGGCCACCTGTTTCGACGCCCCAGGGCAAGGACCTCAGCCGCGAACCCGCTGGAGCGCCTGGTGTATGCGCCG  
CTGGCCAAGGAAATGTGGCAGAAGATGGAGCAGAGCGCCTGGATCGCCGATGGCCGTGCCGACGCGCCGCGCGTG  
GTCTACCTGTTTCAGCGACCCGAAGTGCCTGACTGCACCATGTTCTGGGAGCAGGCGCGACCCCTGGGTGGATGCC  
GGCAAGGTGCAGTTGCGGCATATCATGGTCCGCATCATCCGCGAGGACAGCGAAGCCAAGTCCGCCGCGCTGCTG  
GCCAGCAAGGACCCGCGAGAAGGCCCTGCACGACCATGAGCAGGCGGGCAAGGCCAGCACCCCTGAAGCCGCTGGCG  
AAGATCCCGCGGCGGTGCGCAAGCAGCTCGCCGGCAACATGGAAGTATGAGTGGAGTCGATGGGCGCCGCGGCGACC  
CCGGCGATCTTCTATCTCAATGCCGAGGGGCGCATGCAGCAGCAACAGGGCGCGCCGACCCGACAGTTGGCG  
GAGATCCTCGGTCCGCGCTGA

**PA2614 *lola***

ATGCGACTGATCCGCACGTTGTTTCGTTGCCGCCCTGGCCATGGGCGCTTTCGCTGGCCCATGCCGACGACAGCGCC  
GCCGTCCAGCGCCTGACCGGCCTGCTGAACAAGGCCAGACCCCTGACCGCGCGTTTTTCCAGCTGACCCCTGGAC  
GGTAGCGGCACGCGCCTGCAGGAAACCGCCGGCCAACTGAGCCTGAAGCGGCCGGGACTGTTCCGCTGGCATAAC  
GATGCGCCGAACGAGCAATTGCTCATTTCACCGCGAGAAGGTCTGGCTGTACGACCCGGACCTGGAGCAGGTG  
ACCATCCAGAAGCTCGATCAGCGCTGACCCAGACGCGCGCTGCTGCTCTCCGGCGACATCTCGAAGATCAGC  
GAAAGCTTCGCCATCACTACAAGGAAGGCCGCAACGTAGTCGATTTTCGTGCTCAAGCCGAAGACCAAGGACACC  
CTCTTCGACACCTTGCCTGCTGTTCCGCGAGCGCAAGGTGAACGACATGCAGATGATCGATGGCGCTCGGCCAG  
CGCACCAACATCCTGTTCTTCGACGTGAAGATGAACGAGGCGCTGGATGCCAAGCAATTCACCTTCGACGTTCCG  
CCGGCGCTCGACGTGATCCAGGAGTAA

**PA2725**

ATGGCCCTCGGGGCAATATGCTGTGGCCACGACACACGCTGTGAGCGACTATCGATGCCAGGGACTGCACTGTTTC  
GAAAAGCCACGCTGGTTGCGCGACCTCCTGCGCTTCTGCCCTCAAGAGCCAATTCGTCTCTCCGGGAACATC  
CGCGACCTGCAAGCCTGCGAAGTGGTGCCTGGTACGGTCAACCGCGCAGAGCTTCAACCAGACCTCTGCGACGCC  
CTGCTGGACGCGCGCTACGCCAGGTGCTGGCCTGGGATCCGCTGGCCGGGTTCGCGTGTGCGCCGGCCGGGC  
AGCGAGGCGGGGGCCACTCCGCAGGTGCTTCTCGACCTCGGCCTGACCCCGGTGGACGGCGCCGCGCCGGCCGGC  
ATCGACCTACTCGGCGCGACCCCTGCAACGCCTGGTCAACCGTAGCGGGGAGCCGATCGCCCTGATCGTTCGACTTC  
GCCTCGCGCCTGGCGGTGCGCAACGACGCCCTGAGCGCCGCGGAGCACCAGTTGTTCAACCAGGCCCTGGTGCTC  
TCCCACCAGGCCCGCAGCCGTCCCGCCGGGGAACAGCGCAAACCGTTCTTCAACAGCGTGCTGTGGGTGGTGAA  
AAGGAAGGCGACCTGCCCGACTGGCTGCTGGTGGACAACCCGCGCCTGCGCCATATCCCGGTGTCGAAGCCCGAC  
CAGCCGGCGCGCCGGGCCCTGGCCCCGGCGCTGCTCCGCGGGCTAGGCGGGCGGGCGTTCGCGAGGAGGCCCTG  
CAACAGGCGCCCGCAACCTTCGTCGAGAACACCGAAGGCCTGCTACTCCTCGATCTCAACGCCATCGTCCAGTTG  
GCGCGCTGGAAGGCCTGGCCATGGAACGCATCGCCGACGCGCTGCGCCGCTACAAGGTTCGCGCTCACCGAAGAC  
CCCTGGCTGAAGATCGACCGCCAGCGCATCCGCCAGGCCGAGAGATCGTCCGCCCGGGTCAAGGGCCAGCAG  
CACGCGGTGACCCACATGCTGGACATCGTCAAGCGCGCATGACCGGGGTTCGGCGCCAGCCGCAAGGGCAACCGC  
CCGCGCGGCGTGGCCTTCTCGCCGGGCCACCGGGGTTCGGCAAGACCGAGCTGGCGAAGACCGTCAACCAGCCTG  
CTGTTTCGGCGACGAGAGCGCCTACATCCGCTTCGACATGTCCGAGTTTCAGCGCCGAGCATGCCGACCAGCGCCTG  
ATCGGCGCGCCCGCCGGCTACGTCCGCTACGACGTCCGCGGCGAAGTACCAACCGCATCCGCGAAAAACCTTC  
AGCGTGGTGTCTTTCGACGAGATCGAGAAAGCCACCCCGGATCCTCGACAAGTTCTTCGAGATCCTCGACGAC  
GGCGTGCTCACCTCCGGGCGCGCGATCGCGTGTACTTCTCCGAGGCGCTGATCGTGTTCACCTCGAACCTGGGC  
ATCTACCGCCAGGGGAAAACGGCGAAGCAGTCCGCAACGTGCTCCCGCGGAGCCCTTCGAGGCGGTGCAGGGC  
AAGGTCCACGGCGAGATCGAGCGCTACTTCAAGCTGGTTCTCAACCGCCCGGAAATCCTCAACCGGATCGGCGAG  
AACATTATCGTCTTCGACTTCATCCGCGCCGACGTCCGCGAGCAGATCTTCACCCAGATGGTCAACGGCACCTTC  
GCCGACCTCCGCGAGCAGCGCCTCGTCATCGAACTGGCCGAGGCGCCGCGCCAGGCGCTGCACGACCTCTGCCTG  
GGCGACCTGTCAACGGCGGCGCGGCATCCGCAACCAGCTCGAAGCGCGCCTGCTCAACCCGTTGTCGCGGGCA  
CTGTTTCGACCAGGACGCGCAGCCGGGCGAGCGCTTCTGATCAGCGCCTGGACGCCGACGGCCTGACCCCTGGAA  
CGCCGCTGA

**PA2863 *lipH***

GTGCCGGCCCTCAGGTCATGCCGGCCAAGGTTCGCGCCGCTGCCAACCTCCTTCAGGGGCACCAGCGTCGATGGC  
AGTTTCAGTGTTCGACGCCAGCGGCAACCTGCTGATCACCCGCGACATCCGCAACCTGTTTCGACTACTTCTCAGC  
GCCGTCCGCGAAGAGCCCCTGCAGCAAAGCCTGGACCGCCTGCGCGCCTACATCGCCCGCCGAAGTCCAGGAGCCG  
GCGCGCGGCCAGGCGTTGGCGCTGATGCAGCAATACATCGACTACAAGAAGGAACTGGTGCTGCTCGAACGCGAC  
CTGCCGCGCCTGGCCGACCTCGACGCCCTGCGCCAGCGGGAAGCCGCGGTGAAAAGCCCTGCGCGCGCGGATCTTC  
AGCAACGAAGCGCACGTGGCGTTCTTCGCCGACGAGGAAAACCTACAACCAGTTTCACCCCTGGAGCGCCTGGCGATC  
CGCCAGGACGGCAAGCTCAGCGCCGAGGAAAAGGCCCGCCATCGACCGCTGCGCGCCAGCCTGCCGGAAGAC

CAGCAGGAAAGCGTGCTGCCGCAACTGCAAAGCGAACTGCAGCAGCAGACCGCCGCCCTCCAGGCCGCTGGCGCC  
GGCCCGGAAGCCATCCGCCAGATGCGTCAGCAACTGGTGGGCGCCGAAGCCACCACCCGCTGGAGCAACTCGAT  
CGGCAACGCTCGGCCTGGAAGGGCCGGCTGGACGACTATTTTCGCCGAGAAGAGCCGGATCGAAGGCAATACCGGG  
CTGAGCGAAGCCGACCGCCGCGCGGGTGAACGCCTGGCCGAGGAGCGCTTCAGCGAACAGGAACGCTTGCGC  
CTGGGCGCGCTGGAACAGATGCGCCAGGCCGAGCAGCGCTGA

**PA3126 *ibpA***

ATGAGCAACGCTTTTTCCCTCGCCCCGCTGTTCCGTCATTCCGTAGGCTTCGATCGCTTCAACGATCTGTTCGAG  
TCGGCCCTGCGTAATGAGGCCGGGAGTACCTACCCGCCCTACAACGTCGAAAAGCACGGTGACGACGAGTATCGC  
ATCGTTATCGCCGCCGGCTTCCAGGAAGAAGACCTGGACCTGCAGGTGAGCGCGGCGTGCTGACCGTCAGT  
GGCGGCAAGCGCGAGAAGTCCACGGACAACGTGACCTACCTGCACCAGGGCATCGCCAGCGCGCTTCAAGCTG  
TCGTTCCGCTCGCCGACCATATCGAGGTCAAGGCGGCTTCGCTGGCCAACGGCCTGCTGAACATCGACCTGGTC  
CGGCTGTTCCGGAAGAAGCCAAGCCGAAGCGTATCGCCATCAATGGCCAGCGCCCGGCACTGGACAACAGTAA

**PA3221 *csaA***

ATGGACATCATCGAATGGCAGGATTTTGAACGCGTGAAGTGCAGCTCGGACCATCCTCAGCGCCGCTCCCAAC  
CCCAAGGCACGCAAACCCGCTATGTCTCGAGGTGACCTCGGACCGCTCGGCCTGCGCACCTCCAGCGCGCAA  
CTGACCGCACACTACCAGGCCGAGCAACTGGTTCGACGCCAGGTCTCTGCGTCTGCAACTTCGCTCCGAAGCAG  
ATCGCCGGGGTGCCTCGGAGGTCTGGTACCCGGGGTCTACGATAGCGAGGACAAGGTGGTCTTGCCGGCTTC  
GACAAGCCCCTGCCCAACGGTGCAGCGCTGGCCTGA

**PA3227 *ppiA***

ATGCTCAAACGTCTCCTGATCGCCGCTGCACCCTGCTCTTCGCCGGTTCCCTGCTGGCCGCCACGCTGCCGCC  
AAGCCGCACGTCTGATCGCCACCAGCCTCGGCGAGATCGAGGTAGAACTCGATCCGGCCAAGGCGCCGATCAGC  
GTGAAGAACTTCTCGAGTACGTGACAGCGGCTACTACGACGGCACCTGTTCACCCGCTGATCCCGGGCTTC  
ATGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCGCCGGCATGCAGGAGAAGAAGACCCGTGCACCGATCAAGAACGAGGCCGAC  
AACGGCCTGCTCAACGAGCGCGCACCCCTCGCCATGGCCCGTACCGGAGTGGTTCGATTTCGGCCACCAGCCAGTTC  
TTCATCAACCTGACCGACAACGACTTCTCAACCATGGTGCCTCGGACTTCGGCTATGCGGTGTTTCGGCAAGGTG  
GTGCGTGGCATGGGCGTGGTTCGACAGATCGCCAAGGTTCCACCACCCGCGCAACGGCTTCGCCGACGTGCCG  
AGCGACGACGTGGTGTCTGTCCGCCAAACGCTCTGA

**PA3262**

ATGAAACAACATCGGTTGGCAGCAGCGATCGCACTGGTTCGGTCTGGTTCTCTCCGGCTGCGATTTCGACAGCCAAC  
GTTGAGTTGAAGACCCCGGCGCAGAAAGCTTCTATGGTATCGGCCCTGAACATGGGCAAGAGCCTGTCCAGGAA  
GGCATGGACGACCTGGATTGAAAGCCGTGCGCAAGGGCATCGAAGACGCCCTCGGCAAGAAGAAGCAGCAGCTC  
ACCGATGAAGAGCTGACCGAAGCCTTCGCCTTCTGCGAGAAACGTGCCGAGGAGCGGATGGCCGCCATCGGCGAC  
GAAAACGCCAAGGCCGGCAAGAAATTCCTCGAGGAAAACGGCAAGCGCGACGGCGTGACCACCACCGCTTCCGGC  
CTCCAGTACGAAATCGTGAAGAAGGCCGATGGCCCGCAACCGAAGGCCACCGACGTGGTGACCGTCCACTACGAA  
GGCCGCTGACCGATGGCACCGTCTTCGACAGCTCCATCGAGCGCGGACGCCGATCGACCTGCCGGTTCAGCGGC  
GTGATCCCGGGTTGGGTGCAAGCCCTGCAACTGATGCACGTGCGCGAGAAGATCAAGCTGTACATCCCAGCGAG  
CTGGCCTACGGCGCGCAGAGCCCGAGCCCGGCGATCCCGGCCAACTCGGTACTGGTCTTCGACATGGAAGTGTCT  
GGCATCAAGGATCCGTCCAAGCCGGACGCGGAGCCCGAGGCCGGTGCCGACGCGAGCCCGAAGCCAAGGCGGAC  
GCGAAGAAGTAA

**PA3365**

ATGCCTTTTCTGAGCGACATGCTTGACCAGTCCCGCCGGCAGCAGGACGAGGAACAGGCCCTGGCGCGGGAGAAT  
CTTGCCGAGGCAAGTCTGCTCCAGGCCACCTGAGTACCAGCAGCGCCCTGCGCAGCCGTTTCCGTTTCGACCCG  
GCGGCGGTGATGGACTGCCTGCGCGCCGAGGTGCTCGGCCAGGATCCGGCGCTACAGGCCGTGAGGACATGCTC  
AAGGTGGTTTCGCGCGGACATCGCCGACCCGCGCCGTCCGCTGTTTCAGCGCGCTGTTCTCGGCCACCAGGGGTC  
GGCAAGACCGAGATCGTGCAGCGCCCTGGCCAGGGCCCTGCACGGCGACCGGAGGGGTTCTGCGGGTGGACATG  
AACACCCTGTCCAGGAGCACTATGCCCGCCGCCCTACCGGTGCGCCGCGGGCTACGTTCGGGGCGAAGGAGGGC  
ACCACCCTGTTGGAGCAGGACAAGCTGGACGGCAGTCCCGGGCGCCCCGGCATCGTTCTCTTCGACGAACTGGAG  
AAGGCCAGCCCGAAGTGGTCCATGCGCTGCTCAACGTGCTCGACAACGGCCTGCTGCGGGTTCGCTTCCGGCGAA  
CGCACCTACCATTTCCGCAACACCCTGGTGTTCATGACCAGCAATCTCTGCGCCATGAGATCCAGCGCTACGAC  
GAGCGTCGCCAGCGCCTGCCCTGGCGCCTGCTGCCGGTTCGGCGGCGAGCGCCGGCGGGGACATCGACGGGATG  
GTCCGGGCCCCGGCTGCTGAAGACTTTCTCGCCGAGTTCGTCAATCGTCTCGATAGCGTGGTTCACCTTCAACTGG  
ATCGAACCGGACGTGCTGCGCGCCTGGTTCGAGTGGAGGTGACGGCTCAACCGGCGCCTGGAGAAGCATCGC  
TGCCGCTGGAGGCGACCCCGGAGGTGCTGGCGAAGATCGCCCGCGCCGGCTTCGACCGGCGATTCGGCGCCGT  
GCGTTGCGCCGACGCTCCGTTCATCATCTCGAGGTACCGCTGGCCGAGCATCTGCTCGACACCACCAGCCGGG  
GACGGAACTGCACGACCTACCTGGCGAGCCTGGAGCACGAGCGGGTTCGCTTTCGTGCGGCGCTGA

**PA3647 *skp***

GTGCGTAAGTTACCCAGTTCGTCTGATCACCAGCCATCATGGCGGCTCCTTCGGCGTTCGCTGAAATGAAG  
ATCGCGGTGCTCAACTACCAGATGGCGCTGCTCGAGTCCGATGCCGCCAAGCAATACGCCGTGGATGCCGAGAAG

AAGTTTCGGCCCCCAGCTGAACAAGCTGAAGAACCTCGAGCGCGACGCCAAGGCGCTGCAGGACAAGCTGGTTTCC  
AACGGCAGCAAGATGTCCAGGGCGACCGCGAGAAGGCCGAGCTGGACTTCAAGCAGAAGGCCCGTACTTCCAG  
TTCCAGTCCAAGGAATTGAACGAGTGAAGGCCGCGCCGACCGCGACATGCTGAAGAACTCAAGCCGAAGCTG  
GACCAGGCCGTGAGGAGACCATCAAGAAAGGTGGTTACGACATGGTCATCGAACGTGGCGCCGTGGTTCGACGTC  
AAGCCGCAATACGACATCACCCGCCAGGTGATCGAGCGGATGAACCAGCTGCGTTGA

**PA3717**

ATGAACGACCGACTGCAGATCGAAGACCTCCTCCTGGGCGACGGCAAGGAGGTAGTGAAGGGTGCCTGATCACC  
ACCCAGTACAAGGGCACCCCTGGAAGACGGCACGCTGTTTCGACTCCTCCTACGAGCGCGCCGCCATTCCAGTGC  
GTGATCGGCACCGGACGAGTGAAGGGTTGGGACCAGGGCCTGATGGGCATGAAGGTTCGGTGGCAAGCGACGG  
CTGTTTCGTCCCTTCCCACCTGGCCTACGGCGAACGGCAGGTTCGGCGCGACATCAAGCCCCACTCCAACCTGCTG  
TTCGAGATCGAACTGCTGGAAGTGTCAACCCGCGACGACTGA

**PA3737 *dsbC***

ATGCGCGTGACCCGTTTTCTGGCTGCTGCCGCCCTCGGCCTGATGAGTACCCTGGCCCTGGCAGACAATGCCGAT  
CAGAACATCCGCAAGACCCTGCAGGCCCTGCAACCGGACCTGCCCATCGACTCCATCGCCAGCAGCCCGCTGCAG  
GGGCTCTACCAGGTGCAGCTGAAGGGCGGCCGGGTGCTCTACGCCAGCGCCGACGGCCAGTTCGTCATGCAGGGC  
TACCTCTACCAGGTGAAGGACGGCAAGCCGGTCAACCTGACCGAGAAAGGCCGAGAGCCAGGGCATCGCCAAGGGC  
ATCAACGGCGTGCCCGCCAGCGAGATGGTGGTGTATCCGGCCAAGGGCCAGGCCAAGGGCGCACATCACGGTGTTC  
ACCGATACCACCTGCCCGTACTGCCAGAAGCTGCATGCCGAGGTGCCGGACCTGACCGAGCAGGGGATCGAGGTG  
CGCTACATGGCGTTCCCGCGGACAGGGGCCGAGTCCGGCGGGCGACAAGCAACTGCAGGCGGTCTGGTGTGCGAAG  
GAGCCGACCAAGGCGATGGACGCCATGATGAACGGCAAGGAGATCAAGTCTTCCGAGTGAAGAACCCTGGTGCAG  
AAGCAGTTCAGATGGGCCAGATGGTCCGGGTGCAGGGAACCGCCGGCGATCGTCCTTGCCAACGGCCAGTTGCTC  
CCCGGCTACCAGCCGGCCAAGCAGTTGGCCAAGCTGGCGCTGGAGGCCAAATAG

**PA3810 *hscA***

ATGGCCCTACTGCAGATCGCCGAGCCCGGTGAGAGTCCCAAGCCCCATGAGCGTCGCTGGCGGTTGGGATCGAC  
CTGGGTACCACCAATTGCTGGTGCCTCGCGGTGCGTAGCGCGTTCGCCGAGCCCTTGCCGGATGCGCAGGGACGC  
CTGATCCTGCCTTCCGCGGTGCGTTATCACGCCGAGCGGGCGGAAGTGGGCGAGAGCGCCCGCGCGCCCGCCGCG  
GAGGATCCCTTCAATACCGTCAATTTCCGTTCAAGCGCCTGATGGGGCGCGGCTGGAGGACGTCAAGCAACTGGGC  
GAGCAATTGCCCTACCCTTCCGCCAGGGCGAGTGCACATGCCCTTCATCGAGACCGTACAGGGGTTGAAGAGT  
CCTGTGGAAGTCTCGGCGGACATCCTGCGTGCAGTGCGCCAGCGCGCCGAAACCACCTCGGTGGCGAGCTGGT  
GGTGCGGTGCATCTGTCGCCGCTATTTTCGACGACGCCAGCGCCAGGCTACCAAGGATGCCGCGCGCTGGCC  
GGACTGAACGTCTGCGCCTGCTCAACGAGCCGACCGCCCGCCGCTGGCCTACGGCTTGACAAGGGCGCGGAA  
GGCCTGGTGGCCATCTATGACCTGGGTGGCGGAACCTTCGACATTTCCATCCTGCGCCTGACCCGCGGTGTCTTC  
GAAGTCTGGCCACCGGCGGCGATACGGCCCTGGGTGGCGACGACTTCGACCATGCCATCGCTGGCTGGGTGATC  
GAGCAGGCTGGCCTTTCTGCCGATCTGGACCCGGGCGAGCCAGCGGCAGTTGCTGCAAAATCGCCTGTGCGGCCAAG  
GAGCGTCTTACCAGCAGGGCGTCCGGTCCGGGTGCGCTATGGCGACTGGAGCGGCGAGCTGAGCCGGGCGACGCTC  
GACGAGTTGATCGAGCCGTTTCGTCGCTCGCAGCCTGAAGTCTTCGCCGCGAGCGGTGCGCGACTCCGGTGTGAT  
CTGGAAGAAATCCGCTCGGTGGTGCATGGTCCGGCGCTCGACCCCGGTGCCCGTGTGCGCACGGCGGTTGGCGAG  
TTGTTCCGGCTGCGAGCCGCTGACCGATATCGATCCGGACCAGGTGGTCCGATCGCCATCGGCGCGCCATCCAGCCGAT  
GCCCTGGCCGGAACAAGCGCGGCGAGGAATTGCTGCTGCTGGACGTCAATTCGCTGCTCGCTCGGCTGGAAACC  
ATGGGCGGGCTGATGGAGAAGGTGATTCCGCGCAATACCACCATCCCGGTGGCGCGCGCCAGGATTCACCACC  
TACAAGGACGGCCAGACGGCCATGATGATCCACGTGCTGCAGGGCGAGCGGAGCTGGTGAAGGATTGTCTGTTCCG  
CTGGCGCGCTTTCGAGCTGCGCGGCAATTCGCCGATGGTGGCGGGCGCGGCAAAATCCGGGTGACCTTCCAGGTC  
GACGCCGACGGCTTGTCTGGCGTGTCCGACCGCAACTGAGTTCCGGCGTTCGAGGCCAGCATCCAGGTCAAGCCG  
TCCTATGGGCTGACCGACGGCGAGATCGCGCGGATGCTCAAGGACTCCTTCGACTACGCCGGCGACGACAAGGCT  
GCCCGCGCCCTGCGCGAACAGCAGGTTCGAGGCGCAGCGGCTGCTGGAGGCCGTGAGTTCGGCGCTGGACGTCGAC  
GGCGAGCGGCTCCTGGACGAAGAGGAGCGCCTGGCCATCGCGGCGCAGATGGACACTTTGCGTGAAGTGGCCGGT  
GGTAGCGACACCGCGGCCATCGAGAACCAGATCAAGCGCCTGTCCCAGGTGACCGACGCTTTCGCCGACGGCGG  
ATGGACGCGACCGTCAAGGCCGCGCTCTCCGGCCCGGCTCAACGAAATCGAGGAATAA

**PA3811 *hscB***

GTGGGTAAACCCTGTCAATTTCCGCCAGTTTCGACCTGCAACCGGCTTTTCTGGTGCATCTCGACGAGCTCGGCCAG  
CGCTATCGCGAGTTGGTGCAGCGTCCATCCTGACCGTTTTCGCCGACGCTCCCGAGCGCGAGCAGCGTCTCGCC  
CTGGAACGCGCGGCGCAACTGAACGAGGCCTACCAGACCCTGAAGAGCGCTCCGCGCCGGGCCCTGTACTTGTG  
ACCCTGAGTGGTACAGAGTTGCCCTTGGAGGCTACGGTGCAGGATCCGGAGTTTCTCCTGCAGCAGATGCAGCTG  
CGCGAGGAATGGAGGAGTTGCAGGACAGCGCGGACCTGGCCGGCGTGGCGACCTTCAAGCGTTCGGCTCAAGGCC  
GCCAGGCCGAGCTGGAGCGTGAAGTTCGCCGCGTGTGGGACGATGCGCAGCGCCGGAAGAGGCCGAACGCCTG  
GTCGGTGCATGCAGTTCTCGACAAGCTGGCGCAGGAAGTGCGCCAGCTGGAAGAGCGACTCGACGATTA

**PA3842**

ATGAATCCACTCTACCAGCGCCGATCCACCAGCTTTTTCTCGCTCTCGATCTCCCGACGCCCAACGACGAGGAG  
AGCGTACTCAGCCTGCAGGTGGGCCCGCATCTCTGCCATCTGGCAGAACATCCGACCGATCACCTGTTGATGTTT

ACCCGCCTGGAAGGACAAGGAGACGCTACGGCCAACGAGCAGAACCTGTTTCAGCCAGGACCCCTTGCAAGCCGATC  
CTGGGCCGTGACCCCGAAAGCGGGCAACGGCTGCTCTGGAACCGCCAGCCCTTGCAAGTTGCTGGACAGGGCCAG  
ATCCACCATCAACTCGAACAACTGGTCGCCGCCGCCGAAGAGCTACGCTGA

**PA3871**

ATGAGTTGCTCCCACTACGAAGAACCGCTCGAGAAGGTGCAACTGCCGCAACTGAAGGTCAACGGCATGGCCATC  
GGCGAAGACCTGCTGGCCCGCAACTGCAATACCACCCGGCGGACAGCTATGCGCTGGCGCTGGAGGCCGCTGC  
CGTGCGCTGATCGTCCGCCAGTTGCTCCTGCAACGGGCCGACGCGCTGGGCATCGAGGCCCGCTGCGAAGACGGC  
GAGACGCCGGAGGAAGCGCGCATCCGCCAATTGCTGGAGGAAGAGGTGCAGGTCCCCGGAAGCCGACGAAGACGCC  
TGCCGGACCTGGTACGCGGCCAATCCGGGGCGCTGCTCGGCCCTGGCGCTGCAATTGCGCCATGTGCTGCTG  
GCCTGCGCGCCGGACGACCTGGAAGGCCGCGAGACGGCGCGCAAGCAGGCCGCGGAGCTGCTCGACGAGTTGCGC  
GGGCATCCCGAGCGCTTTCGTGACCTGGCCCGCGTTTTCTCCGCTGCCGTCGAAGGAGTCGGGTGGCGACCTT  
GGCTGGATCGAGCCGGGGCAGACCGTCCCCGAATTGAGAAGCGCCTGCTGCGCCGCGCGCCGGGCTGCTCGAG  
CATCCGCTGGAAGCCGCTATGGCCTGCATGTGGTGAAGTCTGGCGCGCAAGGCCGCGGAGCCGCTCGACTTC  
GACGCGGCCCGCGCACAGATCGCCGCGCACCTGCAAGCGCAGGTGTTGACGCGAGCGGTGGGACAGTACATCGGC  
GTGCTGGCGGGAGACGCCTGCATCGAGGGCTTCGCCTTCGAGGGCGCGGATGGGGCGCTGGTGAATAG

**PA4083 *cupB4***

GTGACCGGCGTGGCCCTGGGCCGATGCGGCACGGCCTGGGTCTGCTGGTGGCGCTGGTGGCCGATGCCTCCGCC  
TCGCTGTCCGTGATCGGGACCCGTTTTATCTATCCGGCGGGCGTTTTCCGCGCTGACGATCCGCGTCGGTAACGTC  
GGGACGCGCCCGGCCCTGGTCCAGACCTGGCTCGATCGCGGCGACGAGACGGCGGACCCGAGCGCTGTACAGGTG  
CCGTTTATCTGTGCGCCGCGCTGTTGCGTATGGACCCGAGGAGACCCAGGCGCTCCAGCTTCGCCATACCCGGC  
GAGCCGCTGCCGGACGACCCGGAATCGCTGTTCTGGGTCAACTGCTGGAGGTGCCGGGGCGGGAGGACGGCAGC  
GGCAACCTGCTGCTGGTGGTACCTACCCGCTGCGGATGAAGCTCCTGTTCCGTCGCGAGGGTCTGTCCGGCGATCCG  
CGAGCCGCGCGCGCAGGTGCTGCGCGCTGCGTCCGGCGGTACGGCCGGGGCAGCGGGCGCTGTGGAGGGCG  
GACAACCGCAGTCCCTATCACGTTTTCCCTGGTGCCTGGAGCTGGGGCAGGGCGACCTCGCCATGTCCTCCGGC  
AGCGTACCCTGCCGCTTTTCGCCCTTACCCCGTTGAGTCTGCCGGCCGTGCCCGGCGAGGCCGCGGGTCCAT  
TTCGATGCGGTGGGGGATGACGGCCAGATCGAGCGCGGCGACCGCCGGCAGAGAGATAACCCGTAG

**PA4085 *cupB2***

ATGGCGCCGCTAATGCATCGTTTTTATTCTTTTCGTGGCGGCAAGCGCCGTGGCCATCGCCCTGTGCGTCGGAACG  
GCTCACGCCGGGCTGATCGCACAGGGCACTCGCGTCTTTCCGGCCAGCGAGCGGAGGTACCTTTCGCGGTC  
AGCAATACCTCCGGCACTCCCGTGTGGCGCAAGCCTGGATCGACGATGGCCGGCAGGACGTTCCCCCGAGGAA  
CTGCAGGTTCCCTTTCAGTGTACGCGCGCCGTGACGCGAGTGGAGCCCAATGGCGGCGCTGTATTGCGCATCGCC  
TACCTGAAGGCCCCGTTGCCGACGGATCGCGAATCGCTGTTCTGGCTGAATATCCTGGAAGTTCCGCCAGGGAC  
GAAGACGAAAACAATGCATTGCAGTTTTTCTTTTCGTTTCGCGCTTCAAACCTCTTCTTTCGACCCAGCCAGTTGAAG  
AGTGTGATTCGGCTGCCGGGAAACTTCAATGGAAGTTTCTGGAGTCAGGGGGAGCAGGAAAAAAGACCGTAGTA  
CAGGTAAATAATCCGACGCCTTACTACGTTTTGTTTCGCGAGCGTCAATTGATTGTCGATGGCCGTGTCATGTCC  
GTGGGAAAGGGAATGGTGCGCCATTCTCGACGAAGGAGTTGACTGGCAGGGAAATCCGAAGAACATGGAAGCC  
GCTTCCGTGATACGAAGTCATCAACGATTACGGTGGCCGCAATACCCACGATAGGGCACTCGGCAAAATAA

**PA4176 *ppiC2***

ATGGCCCGAGCCACTGCCCGCCACATCCTGGTTTTCCAGCGAAGCCAAAGTGCAACGAACTGAAGACCCGCCATCGAA  
GGCGGTGCCGACTTCGCCGAAGTCGCCCCGCGAGCATTCTCTGCCCCCTCCGGCCGCGACGGCGGCAACCTGGGC  
TCGTTCCGGCCCCGGCCAGATGGTCCGCGAGTTGACCCAGGTGGTCTTCAGCGCGCCGCTGAACGTGGTCCAGGGG  
CCGGTGAAGACCCAGTTCCGGCTACCACCTGCTGGAAGTACCAGCCGCCAGGACTGA

**PA4385 *groEL***

ATGGCTGCCAAAGAAGTTAAGTTCCGGCGATTCCGCTCGCAAGAAAATGCTGGTGGCGTGAACGTGCTGGCCGAT  
GCCGTCAAGGCCACCCTCGGCCCGAAAGGCCGCAACGTGGTTCTGGACAAGTCTTTCGGCGCTCCGACCATCACC  
AAGGACGGCGTTTTCCGTGCGCAAGGAAATCGAGCTGAAAGACAAGTTTCGAGAACATGGGCGCGCAACTGGTGA  
GACGTTGCCTCAAGGCCAACGACGCTGCCGGTACGGCCACCACCACCGCGACCGTCTTGCCCCAGGCCATCGTC  
AACGAAGGCCTGAAGGCCGTTGCCGCCGGCATGAACCCGATGGACCTGAAGCGTGGCATCGACAAGGCCACCCTG  
GCTATCGTTCGCCAGCTGAAAGAGCTGGCCAAGCCCTGCGCCGACACCAAGGCCATCGCCAGGTAGGCACCATC  
TCCGCCAACTCCGACGAGTCCATCGGCCAGATCATTGCCGAAGCCATGGAAAAAGTTCGGTAAAGAAGGCGTGATC  
ACCGTCGAGGAAGGCTCGGGCCTGGAAAACGAACTGTCCGTGCTCGAAGGCATGCAGTTTCGATCGCGGCTACCTG  
TCCCCCTACTTTCGTGAACAAGCCGGACACCATGGCTGCCGAGCTGGATAGCCCGCTGCTGCTGCTGGTTCGACAAG  
AAGATCTCCAACATCCGCGAAATGCTGCCGGTCTGGAAGCCGTCGCAAGGCCGCGCCGCTCCGCTGCTGATCGTC  
GCCGAGGACGTCGAGGGCGAAGCCCTGGCCACCCTGGTGGTGAACAACATGCGTGGCATCGTCAAGGTCGCGCT  
GTCAAGGCTCCGGGCTTCGGCGATCGCCGCAAGGCCATGCTGCAAGGACATCGCCATCCTCACCGCGGTACCGTG  
ATCAGCGAAGAAGTCCGGCTGAGCCTGGAAGGCGCTACCCTGGAGCACCTGGGCAACGCCAAGCGCGTCTGATC  
AACAAAGGAAAACACCACCATCATCGATGGCGCCGGTGTGCAGGCTGATATCGAAGCCCGCGTCTTCGAGATCCGC  
AAGCAGATCGAGGAAACCACTTCCGACTACGACCGCGAGAAGCTGCAAGAGCGCCTGGCCAAGCTGGCCGGCGGT  
GTTGCCGTGATCAAGGTAGGCGCTGCCACCGAAGTGCAGATGAAAGAGAAGAAAAGCCCGCTCGAAGACGCCCTG

CACGCTACCCGTGCAGCGGTGGAAGAGGGCGTGGTTCCCGGGCGGCGGTAGCCCTGGTTTCGTGCCCTGCAAGCC  
 ATCGAAGGCCTGAAGGGTGACAACGAGGAGCAGAACGTCCGGTATCGCCCTGCTGCGTGCAGCCGTCGAATCGCCG  
 CTGCGCCAGATCGTGGCCAACGCCGGCGACGAGCCGAGCGTAGTGGTCGACAAGGTCAAGCAGGGTTCCGGCAAC  
 TACGGCTTCAACGCTGCTACCGGCGTGTACGGCGACATGATCGAGATGGGCATCCTGGACCCGGCCAAGGTCACT  
 CGTTCGCTCTGCAGGCTGCGGCCTCCATCGGCGGTCTGATGATCACCACCGAAGCCATGGTTGCCGAGATCGTG  
 GAAGACAAGCCGGCCATGGGCGGCATGCCTGACATGGGCGGCATGGGCGGCATGGGCGGCATGATGTAA

**PA4386 *groES***

ATGAAGCTTCGTCTCTGCATGATCGCGTCTTATCCGTGCGAGCGAGGAAGAGACCAAGACCCGAGGCGGCATC  
 GTGCTGCCGGGTTCCGCCGCGGAGAAGCCGAACCCGGTGAAGTGGTAGCCGTAGGTACCGGTCGTGTACTGGAC  
 AACGGCGAAGTGCAGGCTCTGGCAGTGAAGGTGGGCGACAAGGTGGTCTTCCGGGCTTACTCCGGCAGCAACGCC  
 ATCAAGGTCGATGGCGAGGAAGTCTGGTGTATGGGCGAGTCCGAAATCCTCGCCGTCCTGGAAGACTGA

**PA4558**

ATGGCTGAGTCGACCCGCATTGGCCAGGAGAGCCGCGTACCCTGCATTTCCGCCCTCAAGCTGGAGGACGGCAAC  
 GTCGTGCAGACACCTTGCACAAGCAGCCGGCCTCGTTCAAGGTCGGCGACGGCAACCTGCTGCCGGGCTTCGAA  
 CAGGCGCTGTTCCGGCTTGAAGGCTGGCGACAAGCGCACCCCTGAGCATTCTTCCCGAACAGGGCTTCGGCCAGCCG  
 AATCCGCAGAACGTGCAGATCATGCCGCGCGACCAAGTTCAGGACATGGAGCTGGCCGAGGGCTGCTGGTGATC  
 TTCAACGACGCGGCCAAGACCGAACTGCCGGGCGTGGTCAAGGCGTTCGATGAGCAGCAGGTTACCGTCGACTTC  
 AATCATCCGCTGGCCGGCAAGACCCCTGGCCTTCAAGTGCAGATCATCGACGTCAGCCGGCCTGA

**PA4572 *fkfB***

ATGAGCGAACTCAACCTGACCACTGACGAAGCCCGTGTACGCTACGGCATCGGCCGTCAACTGGGCGACCAACTG  
 CGCGAGAATCCGGTTCCGGGCATGACCCCTGGACGCGAGTCTGGCCGGCCTGTCCGATGCGTTTCGAGGTATCGAC  
 AGCCGGGTTTTCCGGCGAGGCGCTGTCCGCCAGCTTCCAGGTGATCCGCGAGCGCATGCAGGCCGAAGCCAGGCC  
 AAGGCCGAAGCCCGCTGGCGAAGGCCGCGCCTACCTGGCCGAGAACGCCAAGCGCGAAGGCGTGACCGTGCTG  
 CCCTCGGGCCTGCAGTTTGAAGTGCTGAGCACTGGCGAGGGCGCCAAGCCTTCCCGCGAGGATACCGTGCAGCACC  
 CACTACCACGGCACCCCTGATCGACGGCACCGTATTTCGACAGCTCCTACCAGCGTGGCCAGCCGGCCGAGTTCCCG  
 GTGGGCGGCGTGTATCGCCGGCTGGGTGCAAGCGCTGCAACTGATGAACGCGGCTCCAAGTGGCGCCTGCACGTA  
 CCGAGCGAACTGGCCTATGGCGGCCAGGCCGTGGCAGCATTCCCCCGCACAGCGTGCTGGTGTTCGACGTCGAA  
 CTGCTGGAATCCTCTGA

**PA4651**

ATGCCAGTCCACACCTACCTCTCCGCCCCAGCCGCTGGCTTTCGGGCGCTGCTGGCGCTGCTCCTGGGCGGCCCC  
 GCACAGGCCCGCAGTGCGGTGTGATCTGGCCGATCAACCCGGCCATCGAAGCCGACCAGCCGGCCACGGCGCTG  
 TGGCTGGAGAATCGCGGCAAGCAACCCGGTACCCCTGCAGGTGCGCGTGTCTCGGCTGGTCCAGGCGGATTTCCAA  
 GACGTCTATCGCAACCAGCAGGCGAGTATTCCAGCCCCCCTTTCGTCAAGGTGCGAGCCGGGCCCGCCGCAACTG  
 GTCCGGCTGATCCGCCAGGGCGGCCAGCCAGCACGCGGAGGACGCTACCGGGTGTGATCGACGAAGTGCCC  
 GACGGCGACGCGGGGCGAGCGCAACGAAGCCCCGGTCTCGCCCTGCAGTTCCAGATGCGCTATTCGGTACCGCTG  
 TTCGTGAGCGCCGACGGCGTCTGGACCCAGCCGCGTAGCGATGTGAGCGCGACCCGGCCGACGCGACCCGGCCG  
 AAGCTGGCCTGGCGGCTGGTTCGAGGAACAGGGCAAGCGTTACCTGCAGGTGCGCAACGAGGGTAGCGTGCACGCC  
 CGCCTCAGCCATGTCCGCTGGGAGGGCAACGGCCGACGCTGGCGCTGCTGGACGGCCTTCTCGGCTACGTGCTG  
 CCGGCCGGCAGATGCGCTGGCCGCTGCCGCCGGGCTGCTGCCGGACTCCGGCATGACCCCTGAAACTGCAACTG  
 GCGGACAACGACGCGCCGATCAGCGTTCCCGGGTACTGA

**PA4760 *dnaJ***

ATGGCGAAACGAGACTTTTACGAGGTTCTGGGGTTGAGCGTGGCGCCAGCGAGGCGGACCTGAAGAAGGCCTAC  
 CGCCGCTGGCGATGAAATACCAACCCGGACCGCAATCCTGGCGACAAGGAAGCCGAGGACAAGTTCAAGGAGGCC  
 AACGAGGCCTACGAGGTCCTCTCCGATGCCAGCAAGCGGGCGCCTACGACCAGTACGGCCATGCCGGCGTCGAT  
 CCGAATATGGGTGGGGGCGCTGGCGCCGGTTTTCCGGCGGGCGAGCTTCTCCGACATCTTCGGCGATGTGTTTCAGC  
 GATTTCTTCGGTGGCGGCGGTGCCCGCGGTGGCTCGCGCGGCGGCGCGCAGCGCGGCGCGGACCTGCGCTACACC  
 CTGGACCTCGACCTGGAGGAGGCGGTACGTGGCACCACCGTACCATCCGCGTGCCGACCCTGGTCCGTTGCAAG  
 ACCTGCAACGGCAGCGGCGCCAAGCCCGGCACCACACCGGTCACCTGCACCACCTTTCGGCGGTATCGGCCAGGTG  
 CGCATGCAGCAGGGCTTCTTCTCGGTCCAGCAGACCTGCCCGCGTGCACCGGCACCGGCAAGATGATTTCCGAT  
 CCCTGTGGCTCCTGCCATGGGCGAGGGCGCGTGAAGAGCAGAAGACCCTGTCCGGTGAAGGTGCCGGCCGGCGTTC  
 GACACGGCGACCGCATCCGCCTACCCGGCGAAGGCGAGGCGGCGAGCATGGGTGGTCCGGCGGGCGACCTGTAC  
 GTGGTGGTCAATGTGCGCGAGCACCCGATCTTCCAGCGCGACGGCAAGCATCTGTACTGCGAAGTGCCGATCAGT  
 TTCGCCACGCTGCGTTGGTGGCGAGCTGGAAGTGCCGACCCCTGGATGGCCGGGTCAAGCTGAAGATTCCGGAA  
 AGCACCAGACCGGCAAGCTGTTCCGCTGCGCGGCAAGGGCGTGGCCCCGGTGCAGCGGCGGCGGCGCCGGCGC  
 CTGATGTGCAAGGTGGTGGTGAACCCCGGTGAACCTGGACAAGCGCCAGCGGAGCTGCTCGAGGAGTTCCGC  
 AAGTCGTTGCAGAGCGACACCTCGCATTCGCCAAGGCCAGTGGCTGGTTTCGAAGGCATGAAGCGTTTCTTCGAC  
 GATCTATAA

**PA4761 *dnaK***

ATGGGCAAATCATTGGCATCGACCTGGGTACCACCAACTCCTGCGTGGCTATCCTGGAGAACGGTAACGTCAAG  
 GTCATCGAGAACGCCGAGGGCGCGGTACCACCCCTCGATCATCGCTACACCAACGATGGCGAAAACCTTGGTG  
 GGCCAGCCGGCCAAGCGCCAGGCGGTACCAACCCGAGAACACCCTGTATGCGGTGAAGCGCTGATCGGCCGT  
 CGCTTCAAGAGAACGTGGTTCAGAAAGACATCCAGATGGTGCCGTACAGCATCGTCAAGGCCGACAACGGCGAC  
 GCCTGGGTGGAAGTGAAGGGCCAGAAGATGGCGCCTCCGAGATTTCCGCCGAAGTGTGAAGAAAATGAAGAA  
 ACCGCCGAAGACTACCTCGGCGAGCCGGTACCGAAGCGGTGATCACCGTTCGGCCTACTTCAACGACAGCCAG  
 CGCCAGGCCACCAAGGACGCCGGCCGCATCGCCGGCTCGACGTCAAGCGGATCATCAACGAGCCGACCCGCGCG  
 GCGCTGGCCTACGGCCTGGACAAGGCCAAGGGCGACCACACCGTGTATCGTCTATGACCTGGGCGCGGTACCTTC  
 GACGTGTGCGTGATCGAGATCGCCGAAGTGCAGCGGAGCACCAGTTTCAAGTGTGCTGGCCACCAACGGCGACACC  
 TTCCTCGGCGGCGAAGACTTCGACATCCGCCTGATCGACTACCTCGTGCAGGAGTTCAAGAAGGAAAAGCGGCATC  
 AACCTGAAGGGCGACCCGCTGGCCATGCAGCGTCTGAAGGAAGCGGCCGAGAAAAGCAAGATCGAGCTGTCTCG  
 ACCAGCAGACCGACGTCAACCTGCCGTACGTGACTGCCGACGCGAGCGGTCCGAAGCACCTGAACGTCAAGGTT  
 TCCCGCGCCAAGCTGGAGTCCCTGGTTCGAAGACCTGGTGCAGCGCACCATCGAGCCGTGCCGACCCGCGCTGAAG  
 GATGCCGGCCTGGATGTTTCCGATATCCATGAAGTATCCTGGTTCGGCGGCCAGACCCGCATGCCGTGGTACAG  
 AAGACCGTTGCCGAGTTCTTCGGCAAGGAAGCGCGCAAGGACGTCAACCCGGACGAAGCCGTGGCTGTGCGTGCC  
 GCCATCCAGGGCGCGGTCTGGCCGGCGACGTGAAGGACGTGCTGCTGCTCGACGTGACCCCGCTGACCCCTCGGC  
 ATCGAGACCCTGGGCGGCGTGATGACCGGTCTGATCGAGAAGAACACCACCATCCCGACCAAGAAGTCGAGGTG  
 TTCTCCACCGCCGACGACAACCAGGGCGCGGTGACCATCCACGTGCTGCAGGGCGAGCGCAAGCAGGCCGCGCAG  
 AACAAGTGCCTGGGCAAGTTCGACCTGGCCGACATTCGCCCGGTCCGCGCGGCGTGCCGAGATCGAGGTGACC  
 TTCGATATCGATGCCAACGGCATCCTGCACGTCTCGGCGAAGGACAAGGCCACCGGCAAGCAGCAGTCCATCGTG  
 ATCAAGGCATCCTCCGGCCTGTCCGAGGATGAGATCCAGCAGATGGTCCGCGATGCCGAGGCGAACGCCGAGGAG  
 GACCCAAAGTTCGAGGAACCTGGCTGCCGTTCGCAACCGAGGCGACGCGCTGGTCCACGCGACCCGCAAGATGATC  
 ACCGAGGCGGGCGACAAGGCCACCCGCGAGGACAAGGCGACCATCGAGAAGGCGCTGGCGAGCTGGAAGCGGCG  
 GTGAAGGGCGACGACAAGGCCGAGATCGAGGCCAAGATGAACGCTCTGTCCAGGCTTCCACCCCGTGGCGCAG  
 AAGATGTACGCCGAACAGGCCAGCAGGGCGAAGACGCTCCCCAGGGCGAGCAGGCCAAAAGCCGCTGACGACGTG  
 GTGGACGCCGAGTTCGAAGAGGTCAAGGACAACAAGTAA

**PA4762 *grpE***

ATGGCTGACGAACAGCAGACCCTGGATCAACAGACCCCCGAGCAGCCCACCGGCGCGCCGAGGACCTGACCGCC  
 CGCGTGCAGGAACTGGAGGAGCAGCTGGCTGCCGCCAGGACCAGGCGCTGCGCATGGTTCGCGGATCTGCAGAAC  
 GTACGCCGGCGTGCAGGAGCAGGATGTGAGAAAGGCGACAAGTTCGCGCTGGAGAAATTCGCCGGCGACCTGCTG  
 GCGGTGGTGCACACCCTCGAGCGCGGCCCTGGAGATGTCCGATCCCAACGACGAGGCGATCAAGCCGATGCGCGAA  
 GGGATGAACTGACCCTGAAGATGTTGACGACACCCTGCGCCGCTACCAGGTGGAGGCGCTGAACCCGGAAGGC  
 GAGCCTTTCAACCCGAGCAGCACCAGGCGATGGCCATGCAGGAAAGCGCTTCGGCCGAGCCGGGCGAGTGCCTC  
 AAGGTGTTCCAGAAAGGCTACCTGCTCAACGGCCGCTGCTGCGTCCGGCGATGGTGGTAGTCAGCAAGGCGCCG  
 GCGGAAACCCCGCCGCTCCATCGACGAGCAGGCTTGA

**PA4845 *dipZ***

ATGCGCCGCTGCTGACCCTGATCCTCCTGCTGGTGCCTCGCCGCGGCGGGCTGTTTCGACAGCCGTCCC  
 GCGCCTCCCTCGGCGGCGGCTCGATGGCGGTGGCTTCTCAAGGTTCGACCAGGCGTTCAAGCCAGCGTCGAG  
 CGCAGCGACGCGCAGCAGTGTGCTGCTGCGCTTCGTCAACGCCGAGGGCTACTACCTTACCGCCACCGCTTCCAG  
 TTCAAGGTTCGAGCCAGCCAGGTCAGCCTCGGCCAGGTGCAGCTGCCGGCGGGCAAGCAGCACCACGACGAGTAC  
 TTCGGCGATACCGAGGTCTACTACAACATCGTTCGACCTGGAGATTTCCCTGAACAACCCGGCCCGGCGAGCCCTAT  
 ACCCTCGTGGTGACGTACCAGGGCTGCGCCGACAAGGGCTCTGCTACCCCGGAAAACAGGCGCTTCGACATC  
 GACGGCGGTGCCGCGACGCCAGCCGCGAGCGACGCGGCCGGAAGGGCCGCTCGAGCACAAGGGCAAGCGCAGC  
 CTGCTGTTCTTCTTCTCGCCGGCCTGACCCTGACCTTACCCCTGCGTGTGCGGATGCTGCCGATCCTCTCC  
 GGAGTGGTCTGCGCGGCCGCGGCGGGCGGTGGTTCGCGCTTCGTCTGTGCTGCGCTACGTGCTGCCGATGGCG  
 CTCTGCTTCGCCCTGCTCGGCGCGCTGATGGGCATGTTCCGGCCAGCCTCAATCTCCAGGCGCAATTGCAGTCG  
 CCCTGGGTACTGGTGCCATTGCGGGCGTTCCTTCGCGCTGTTCCGGCTGGCCATGTTCCGGCTTCTTCGAGCTGCGC  
 CTGCCCGGCTTCATCCGCAACCGCTCGACCGCCTGGCCGGCGATGCGCGCGGCGGCTCGATCCTCGGCGCGGCC  
 ACCCTCGGCGTGTTCAGCCTGCTGGTCTCGCCCTGCGTCTCCGCCCGCTGGCCGCTCGCTGCTCTATATC  
 AGCGCCAGCGGCGATGCTGGGGGGGCGGCTGCAACTGTTTCGCCCTCGGCTGGGCATGGGTACGCCGCTGGTG  
 GTGTTCCGGCGCCGGCGGCGGCCCTGCTGCCAAGAGCGGAGCCTGGATGAACGGCGTGCGCAACGCCTTCGGC  
 GTGCTGTTGCTGGCGGTGCGCGTGTGGCTGCTGGAGCGGGTGGTGTCCGGCCGGTGGCGCTGATGCTCTGGGGC  
 ATGCTCGCCGGCGGCGGCCGCTGGCCCTGGGCGCCCTCGAATTCACCCCGAAGAGCGCCGACGCCGCTGCTG  
 CAACTGCTTGGCCTGATGTTCTGACCTACGCGGTGGCCGCTGGATCGGCGCCCTGCAGGGCGAGTCGACCCG  
 ATCCATCCGTGGGCGCTCGGTGCGCTCGATCCATGCGCGGCGGCGGAGCAGCCCGGCAATGGCAGAACCTG  
 ACCACCCCGGCGCAGTTGGACGCCGCCCTGGCCGAGGCGAGCAGTCAAGCCGGCAAGCCGCTGCTGTTGATGTTAT  
 GCGGACTGGTGCATCAGTTGCAAGGTTCATCGAGCGCCAGGTTCTCACCGATCCCACGGTGCAGGACGACTGCCG  
 GCCTACCGCCTGCTGCGCTTCGACATCACCGAAAGCAACCCGGCCAGCGCGGCTGCTGGACCCTACAACCTG  
 TTCGGTCCGCCGGCGATCCTGTTCTTCGCCCGGGCGGTGACGAATGGAGCGACTTGCAGCTCATCGGAGAGATC  
 GACGCCCGGGCTCGCCGAACGACTGCGCCGGGCGCTACCCGGCAGTGA

**PA4873**

ATGAACCCGAGCACCGCCGCCCGCCCTGGGCATCGATTTTGGCACCTCCAACCTCCACCGTCCGGCTGGTGGCGG  
 CCGGAGGTGCAACCGCTGATCGAGCTGGAGGACGGCAAGATCACCTGCCCTCGGTGGTGTCTTCAACGTCGAG  
 GAGCGCCGCCCGGTCTACGGCCGCCAGGCGCTCGGCGAGTACCTGGAGGGCTACGAGGGCCGGCTGATGCGCTCG  
 CTGAAGAGCTGTGGGCTCCAAGCTGCTGAAGAGCGAGACCACCGTGTCTGGCAGCGCCCTGCCGTTCAAGGAC  
 CTGCTCGCCCTGTTTCACTCGGCCAGCTCAAGGCGCGCGGCGAGGCCGCCGCCGGGCAAGCCTTCGACGCGGTGGT  
 CTGGGTGCGCCGTGTTCTTCGTCGACGACGACCCGGAGGCCCGAGGCCCGCCGGGCAAGCCTTCGACGCGGTGGT  
 GCCAACAAGCTCGGCTTCAAGGAGGTTTCTTCCAGTACGAACCGATCGCCCGGCCCTTCGACTACGAGCGCTGC  
 ATCCAGCGCGAGGAAGTGGTCTGATCGTCGACATCGGCGGGCGCACCTCGGACTTCTCCCTGGTGCGCCCTGGCG  
 CCGGAGCGGGCAACCTGGCCGAGCGCCAGGACGACATCCTGGCCACCGGGCGGCGTGCACATCGGCGGTACCGAC  
 TTCGACAAGCAGCTCAGCCTGGAAGGCGTGATGCCGCTGTTTCGGCTACGGCAGCCGGATGAAGAGCGATGCCCTT  
 ATGCCACCAGCTACCACCTGAACCTGGCCACCTGGCACACCATCAACCGGTGTACGCGCAGAAAGTCGCAATTG  
 GCGCTGAAGAACATGCGCTACGACATCGTCGACAGCACCGGCATCGACCGCTTTCAGGCTCATCGAGGAACGC  
 GCCGGGCACTGGCTGGCGATGCAGGTGGAAGACAGCAAGATCCGCTGACCGAAACCGAGCGCTGCACCTCTCG  
 CTGGAGCGCATCGAGGCCGGGCTCGGCGTGGAGCTGACCCGTGGGCTGTTTCGAGAACGCCGTCGACGACTGCTG  
 GAGCGCGTGCACAACAGCGTCGCGCAACTGCTGGCCTCGGCCGGGGTGCACCCGGACCGGTCGACACGCTGTT  
 TTCACCGCGGTTTCGAGCGGCATTCCGGCGCTGCGCCGGAGCGTCTCGGCGATGCTGCCCAACGCCCTCATGT  
 GAGGGCAACCTGTTTCGGCAGCATCGGCAGCGCCCTGGCCATCGAGGCGAAGAAGCGCTACGGCTGA

**PA5053 *hslV***

TTGACCACCATCGTATCTGTCCGCCGCAACGGCAAAGTCGTTCATGGGCGGCGACGGCCAGGTTTCCCTGGGCAAC  
 ACCGTGATGAAAGGCAACGCCAAGAAGGTCCGGCGCCTGTATCACGGTCAGGTAAGTGGCCGGTTTCGCCGGCGCC  
 ACCGCCGATGCCTTACCCTGTTTCGAGCGCTTCGAGCAGCAATTGGAGAAAACACAGGGGCACCTGGTCCGCGCC  
 GCCGTGCAACTGGCCAAAGGACTGGCGCACCGGCTCCCTGAGCCGCTCGAAGCCATGTCGCGGTGCCAAC  
 AAGGATGCCTCGTTCATCACCGGCAACGGCGACGTGGTTCGAACCCGAACACGGCCATGTCGCTGCGGCTGCCAAC  
 GGCGGCGGCTTCGCCAGGCCGCGGCCCTGGCCCTGCTGCAGCACAACGCCGAGCTGAGCGCTCGGGAAAGTCGCC  
 GAGACCGCGCTGAACATCGCCGGCTCGATCTGCGTCTTACCAACCAGAACCTGACCATCGAGGAGCTGGACAGC  
 GCCGTCTGA

**PA5054 *hslU***

ATGTCCATGACGCCCCGCGAGATCGTCCACGAACCTCAACCGCCACATCATCGGCCAGGACGACGCCAAGCGCGC  
 GTCGCCATCGCCCTGCGCAACCGCTGGCGACGCATGCAACTGCCGGCCGAGCTGCGCGCCGAGGTAACACCGAAG  
 AACATCCTCATGATCGGCCCCACCGGCGTGGCAAGACCGAGATCGCCCGCCGCTGGCGCGCTGGCGAACCGG  
 CCGTTCATCAAGGTCGAGGCGACCAAGTTACCGAGGTCGGCTATGTTCGGACGCGACGTCGAATCGATCATCCGC  
 GATCTCGCCGACGCCGCGGTGAAGATGCTCCGCGAACAGGAGATCCAGAAGGTCAAGTATCGCGCCGAGGACGCC  
 GCCGAAGAGCGCATCCTCGATGCCCTGCTGCCGGCCGCGCGTCCCGCCATGGGCTTCGGCGACGAGCCGGCACGC  
 GAGGACAGCAACACCCGCCAGCTGTTCCGCAAGCGCCTGCGCGAAGGCCAGCTGGACGACAAGGAAATCGACATC  
 GAGGTGGCCGACAACCCGGCCGGCGTGGAGATCATGGCCCCGCCGATGGAGGAGATGACCAACCAGTTGCAG  
 AACCTGTTCTCCGGCATGAGCAAGGGCAAGAAGAAGACCCGCAAGCTGAAGGTGCGCGAGGCCCTGAAGCTGATC  
 CGCGACGAAGAGGCGGTGCGCCTGGTCAACGAGGAAGAGCTCAAGGCACGCGCCCTGGAGGCGGTGCGACGAC  
 GGCATCGTCTTTCATCGACGAGATCGACAAGATCGCCAAGCGGCCAACCGCGCGCCGACGTCCTCCGCGAG  
 GCGTACAGCGCGACCTGCTGCCGCTGATCGAGGGCTGCACGGTGAACACCAAGCTGGGATGTTCAAGACCGAC  
 CACATCCTGTTTCATCGCCTCCGGCGCCTTCCACCTGAGCAAGCCGAGCGACCTGGTTCGCCGAGCTGCAGGGCCGC  
 CTGCCGATCCGCGTGGAGCTCAAGGCCCTCAGTCCGAACGATTTTCGAGCGCATCCTCACCGAGCCGCATGCCCTCG  
 CTCACCGAGCAGTACCGCGAGCTGCTGAAGACCGAGGGCTGGCCATCGAGTTTCGCCGAGGACGGCATCAAGCGC  
 CTTGCCGAGATCGCCTGGCAGGTCAACGAGAAGACCGAGAACATCGGTGCCCGCCGCTGCATACGCTGCTCGAG  
 CGGCTGCTGGAAGAGGTCTCGTTTCAGCGCCCGACCTGGCCAGCGAGCATAGCGACAAGCCGATCCTGATCGAT  
 GCCGGCTACGTCAACAGCCACCTCGGCGAGCTGGCCGAGGACGAGGACCTGTCCGCTACATCCTTTGA

**PA5128 *secB***

ATGACCGAGCAAGCTACCAACGGCGCTGCCGACGAGCAGCAACCCAGTTCCTCCCTGCAGCGCATCTACCTGCGC  
 GACCTGTGTTTCGAGTCGCCGAAGTACCGGAAATCTTCCGCCAGGAATGGAACCCGTCCATCAGCTGGACCTG  
 AACACTCGCCAGAAGCAGCTGGACGGCGACTTCTACGAAGTGGTCTTACCGTATCGGTGACCGTGAAGAACGGC  
 GAGGACACCACTGCCTTCATCGCCGAAGTGCAGCAGGCCGGCATCTTCTGATCAAGAACCTCGATCCGTCGAGC  
 ATGAGCCATACCCTTGGCGCGTTCGCCCCGAACATCCTCTTCCCGTACGCTCGCGAAGCCCTGGACAACCTGGT  
 GTACGCGGTTTCGTTCCCGGCGCTGATGCTGTGCGCGGTGAACCTTCGACGCCCTTACGCCAGGAAATCGCCCGC  
 ATGCAGGCCTCCGGCGAGATCCCGACGCCGTGGTCCAGTAA

**PA5193 *yrfI***

ATGTCCCATTTCAGATCAGAGCCAGCGTTTCTTTTCGACGATACCGACGTGCGCGGCGAGATGGTTCGATCTCGAG  
 CGCAGCTACAGCGAAGTGTGGCCAAACATCCCTATCCGGAACCGGTGCGCGAGCTGCTCGGGGAGATGCTCGCG  
 GCGGCCCTCGCTGCTTGCGGCACGCTCAAGTTTCGACGGCCTGCTGGTATTGACAGGCGCGCTCCAGCGGCGCGGTT  
 CCGCTGTTGATGGTGGAGTGTTCAGCGACCGCCAGGTGCGTGGCCTGGCCCCGCTATTTCGGCGGAGTCCATCGGC  
 GCCGACGCCGGCATGCAGGAAGTATGCCCGAAGGCGTGTGACCTCACCGTGGACCCGGTCAAGGGCCAGCGC

TACCAGGGGATCGTCGCCCTGGAGGGGGTGAACCTGGCGGAATGCCTGTCCAACACTTTCGCCAGCTCGGAACAG  
CTGCCGACCCGTTTCTGGCTCAACGCCAACGGCCGCCGTGCCCGCGCCTGTCTGCTGCAGCAGCTTCCCGCCGAC  
CGCCTGAAGGACCCCGAGGCCCGCGAGGCCAGTTGGCAGCACCTGACCACCCTGGCCGACACGCTGACCGCCGAA  
GAGCTGCTGGCGCTGGACAACGAGACCCGTCCTGCACCGCCTCTACCACGAGGAAAACCGTGCCTGTTTCGAGCCG  
CAACCGCTGGTCTTCCATTGCAGTTGCTCGCGGGAACGTTTCGGCCAACGCCCTGGTCACTCTCGGGCAGGCCGAC  
TGCGAGCGGCTGCTCGAGGAGGAAGAAGGCTCGATCAGCATCGACTGCCAGTTCTGCAACCAGCGCTACCTGTTT  
GACGCCTCCGACGTCGCCCAGTTGTTTCGCTGGCGCTGGCAGCCAGGGGCCCTTCCGAGACCCGCCACTGA

**PA5195**

GTGAGCGAGAAAGACGACGACAAGGTGGCCTGGACAAGTGGCTCTGGGCGGCGCGCTTCTTCAAGACCCGGGCG  
CTGGCCAAGGCCGCGATAGAGGGCGGCAAGGTGCATTGCCGGGGCGAGCGGTGCAAGCCGAGCAAGGAACCCAGG  
GTAGGGGAGGAGTTGACCATTTCGTACGGGCTTCGACGAGCGAACCGTGACCATTTCGCGCGCTTGCCGTAGTCCGT  
CGTGGCGCGCAGGAGGCCAGGCTCTCTACGAGGAAAACCGCGACAGCGTGAAAGCCGCGAGCGCGCGGGCC  
ATGCGCAAGGCCGGGGCGCTGGGCGTACAGACCGAGGGCGGCGGAGCAAGAAGCAGCGGCGCAGATCCACCAG  
TTGCGCGGCGGCCAGGACTGA

**PA5254**

ATGCCGCGCCGCCTTTTCATCGGTCTTTTTCTACTGCCGCTGCCGCTTTTCGCCGCGCCTCCCAAGGACGAACTG  
GCCTATGCCGTAGGCGCCCGCCTGGGTATGCGCCTACAGCAGGAAAATGCCCGGCCTAGAGCTATCCGAGCTACTT  
CTCGGACTGCGCCAGGCCTATCGCGGGCAGGCACTTGAAATCCCCCGAACGCATCGAACAACTTCTGCTGCAA  
CACGAGAACGCCACGACGGAACACCGCGGACCACACCCGCGGAGGCCCGCTTCTGGCCAACGAAAAAGCCCGC  
TTCGGCGTCCGCGAATTGACCGGCGGCGTCTCGTCAGCGAATTACGTCGTGGCCAAGGTAACGGCATCGGCGCG  
GCAACCCAGGTACACGTCCTGTTACCGCGGCTGCTTGGCGACGGTCAAGTGTTCGACCAGAGCGAAAGCGCCGAG  
TGGTTCGCCCTGGACAGTGTGATAGAGGGATGGCGGACAGCGTTGCGAGCGATGCCTGTGCGCGCGCTGGCGA  
GTGGTGATTCTTCGGCGCAAGCCTATGGTACGAAGGCGCTGGCGACCTGATCCCGCCCGACGCTCCGCTGGT  
TTCGAGATCGACCTGCTGGGCTTCCGCTGA

**PA5256 *dsbH***

ATGCCCTGGCCAGCCCCGTCAGCTTTTCTCTCGGTTTCTGGCCTGCGTCGCCATCATGGGCGGGGCGCTG  
TACCTGGAACATGTGGTTGGCCTGGAGGCTGCCCGCTGTGCGTGTGCGAGCGGATCTTCTTCATCCTGATCGGC  
CTGACCTGCCTTGTGGCGGATCCAGGGGCCCGCCTGCGTGGGCGGCGTATCTACTCCGTGCTGGTGTTCCTG  
CTCGCTCTCGGCGGCGGGGCCACGGCCGCCAGGTATGGTTGCAGACCGTTCGCTGGACCAACTGCCGGCC  
TGCCTGCCCAGCCTCGACTACATGATGCAGGCGCTTCCCTTCCAGGAAGTATCCGCTGGTCTGATGGCACC  
GCGGATTGTGCCAGGTGAGCTGGACGCTATTACCCCTGAGCATTCCCGAATGGAGCCTGCTGGCGTTCGTTGCC  
TATCTCGGCTTCTCCATCGTGCAGTTCTCCGACGTGCCTGA

**PA5489 *dsbA***

ATGCGTAACCTGATTCTCACCGCCATGCTGGCCATGGCCAGCCTGTTTCGGCATGGCCGCCAGGCCGACGACTAT  
ACCGCCGGCAAGGAATACGTCGAGCTGAGCAGCCCGGTGCCGGTGTCCAGCCGGGCAAGATCGAAGTGGTGGAA  
CTGTTCTGGTATGGCTGCCCGCATTGCTACCGGTTTCGAGCCGACCATCGTGCCGTGGAGCGAGAAGCTGCCGGCA  
GATGTCCATTTTCGTGCGCCTGCCTGCCCTGTTTCGGCGGTATCTGGAACGTCCATGGGCAGATGTTCTGACCCTG  
GAAAGCATGGGTGTGAGCATGACGTACACAACCGCGTGTTCGAGGCGATCCACAAGGAGCACAAGAAGCTCGCC  
ACTCCGGAAGAAATGGCCGATTTCTCGCCGGCAAGGGCGTGGACAAGGAAAAATTCCTGAGCACCTATAATTCC  
TTTGCCATCAAGGGCCAGATGGAAAAGGCCAAGAAGCTGGCGATGGCCTACCAGGTACCGGCGTACCAGCCATG  
GTGGTCAATGGCAAATATCGCTTCGACATCGGCTCCGCCGGTGGTCCGGAGGAAAACCTCAAGCTGGCCGACTAC  
CTGATCGAGAAAGAGCGCGCAGCGGCCAAGAAGTAG

## 2 Isolierung der Chaperon- und Faltungskatalysatorgene aus

### *P. aeruginosa*

**Tabelle G-1: Übersicht der verwendeten Primer zur Isolierung der identifizierten Gene von Faltungsmodulatoren aus dem Bakterium *P. aeruginosa*.**

Name	Primersequenz	Name	Primersequenz
PA0499up	CACCATGGTCTTGCATCGATATTCG	PA0499dwn	TCATGGGTGTTTGGCGTTGGT
PA0538up	CACCTTGAGCGCTCTCTCAAGCC	PA0538dwn	TCAGGCGGTGCGGGCGCC
PA0594up	CACCGTGAAGATCAAGCTATGTAACCG	PA0594dwn	TCACTGCTTGATTTCCACGTAGGCC
PA0699up	CACCATGCGGCCGGCATTTCTGT	PA0699dwn	TCAGTGCAGTTCGCCAGGGTCT
PA0837up	CACCATGCAGATCGCGGCCAAC	PA0837dwn	TCAGTGGTGGTGACCGCCTTCG
PA1068up	CACCGTGGCAGAATCCCGCAC	PA1068dwn	TTATTGCTCCAGCAGGCGCTTC
PA1481up	CACCTTGAACGAGCGATTCTGCG	PA1481dwn	TCATCGGGCTCCGGGTC
PA1596up	CACCATGAGCGTGAAACCCAAAA	PA1596dwn	TTAAGCGGACAGCTCCACCAGC
PA1793up	CACCATGATCAAGCTGCATACCAACC	PA1793dwn	TCATTCTTCGACGATTTCCGGCTT
PA1800up	CACCATGCAAGTTTCTGTTGAAAGCA	PA1800dwn	TCAGGCCGCTTGCGGAGCTTC
PA1801up	CACCATGTCTCGCAACTCTTTTAT	PA1801dwn	TTAGACGGCCAGGTGCGCG
PA1802up	CACCATGACTGATACCCGCAACG	PA1802dwn	TCATGCCTCAGGCGCAGCCT
PA1805up	CACCATGCTGCAGAATCAGGG	PA1805dwn	TCAGTATTTCTCGACTCCGCCCTTG
PA1996up	CACCATGCCCGTCGCCATGGC	PA1996dwn	TCAGTGCAGGAAATACACTTCCAGGA
PA2129up	CACCATGCCAGACATTTCGTACC	PA2129dwn	TCATGGCGATAGGTGATGACGGA
PA2132up	CACCGTGTCCAGTAGGGCGCG	PA2132dwn	TCACTGTAGAGCTTCTCTTCCCTGGC
PA2476up	CACCATGAGACTGCCGCGCAACC	PA2476dwn	TCAGCGCGACCGAGGATCT
PA2614up	CACCATGCGACTGATCCGCACGT	PA2614dwn	TTACTCCTGGATCACGTGACGCC
PA2725up	CACCATGGCCCTCGGGCAATATG	PA2725dwn	TCAGCGCGCTTCCAGGTCA
PA3126up	CACCATGAGCAACGCTTTTCCCTC	PA3126dwn	TTACTGGTTGTCCAGTCCGGGG
PA3221up	CACCATGGACATCATCGAATGGCAGG	PA3221dwn	TCAGGCCAGGCGCGCACCGTT
PA3227up	CACCATGCTCAAACGTCTCCTGATC	PA3227dwn	TCAGAGGCGTTTGGCGGACA
PA3262up	CACCATGAAACAACATCGGTTGGC	PA3262dwn	TTACTTCTTCGCGTCCGCCCTTG
PA3365up	CACCATGCCTTTTCTGAGCGACAT	PA3365dwn	TCAGCGCCGACGAAGCG
PA3717up	CACCATGAACGACCGACTGCAGAT	PA3717dwn	TCAGTCGTGCGGGTGAGCAC
PA3737up	CACCATGCGCGTGACCCGTTTTT	PA3737dwn	CTATTGGCCTCCAGCGCCAGC
PA3810up	CACCATGGCCCTACTGCAGATCGC	PA3810dwn	TTATTCTCGATTTCTGTTGAGCC
PA3811up	CACCGTGGGTAAACCCTGTCAATTC	PA3811dwn	TTAATCGTCGAGTCGCTCTTCCAGC
PA3842up	CACCATGAATCCACTTACC GCG	PA3842dwn	TCAGCGTAGCTCTTCCGGCGC
PA3871up	CACCATGAGTTGCTCCACTACGA	PA3871dwn	CTATTGCACCAGCGCCCCATC
PA4083up	CACCGTGACCGCGTCCGGCC	PA4083dwn	CTACGGGTATCTCTGCGCGCGC
PA4085up	CACCATGGCGCCGCTAATGCATC	PA4085dwn	TTATTGGCCAGTGCCCTATCGTGG
PA4176up	CACCATGGCCCGAGCCACTGCC	PA4176dwn	TCAGTCTTGGCGGCTGGTGACTT
PA4385up	CACCATGGCTGCCAAGAAGTTAAGT	PA4385dwn	TTACATCATGCCGCCCATGCC
PA4386up	CACCATGAAGCTTCGTCTCTGCAT	PA4386dwn	TCAGTCTTCCAGGACGGCGAG
PA4558up	CACCATGGCTGAGTCGACCCGCAT	PA4558dwn	TCAGGCCGGCTGGACGTGCATGA
PA4572up	CACCATGAGCGAACTCAACCTGAC	PA4572dwn	TCAGAGGATTTCCAGCAGTTCGACG
PA4651up	CACCATGCCAGTCCACACCTAC	PA4651dwn	TCAGTACCCGGGAACGCTGATC
PA4760up	CACCATGGCGAAACGAGACTTTTA	PA4760dwn	TTATAGATCGTGAAGAAACGCTTCATG
PA4761up	CACCATGGGCAAAATCATTGGC	PA4761dwn	TTACTTGTGTGCTTACCTCTTCGAAC
PA4762up	CACCATGGCTGACGAACAGCAGAC	PA4762dwn	TCAAGCCTGCTCGTGCATGGA
PA4845up	CACCATGCGCCGCTGCTGAC	PA4845dwn	TCAGTCCGGGTAGCGGCC
PA4873up	CACCATGAACCCGAGCACCGCC	PA4873dwn	TCAGCCGTAGCGCTTCTTCGCC
PA5053up	CACCTTGACCACCATCGTATCTGTCC	PA5053dwn	TCAGACGGCGCTGTCCAGCT
PA5054up	CACCATGTCCATGACGCCCCG	PA5054dwn	TCAAAGGATGTAGCGGGACAGGTC
PA5193up	CACCATGTCCATTTCAGATCAGAGC	PA5193dwn	TCAGTGGCGGGTCTCGGAAG
PA5195up	CACCGTGAAGCGAAGACGACG	PA5195dwn	TCAGTCTTGGCCGCGCGCA
PA5254up	CACCATGCCGCGCCGCTTT	PA5254dwn	TCAGCGGAAGCCAGCAGGTC
PA5256up	CACCATGCCCTGGCCAGCC	PA5256dwn	TCAGGCACGTGCGAGGAACTGC
PA5489up	CACCATGCGTAACTGATTCTCACCG	PA5489dwn	CTACTTCTTGGCCGCTGCGC

---

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne 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, 28.08.2006

Andrea Kreuz

