

Inhaltverzeichnis

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

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

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

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