

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung</b> .....	1
I.1 Das Signalpeptid .....	2
I.2 „Targeting“ an die Sec-Translokase .....	3
I.3 Aufbau der Sec-Translokase. ....	6
I.3.1 SecA: Der Nanomotor der Proteintranslokation. ....	6
I.3.2 SecY, SecE und SecG: Der Translokationskanal. ....	9
I.3.3 SecD, SecF, YajC und YidC: zusätzliche Komponenten der Sec-Translokase.....	12
I.4 Sec2: Eine zusätzliche Proteintranslokationsmaschinerie in Gram-positiven Bakterien. ....	12
I.4.1 Die SecA2-abhängige Proteintranslokation. ....	13
I.4.2 Die SecA2/SecY2-abhängige Proteintranslokation. ....	15
I.5 : Zielsetzung dieser Arbeit .....	18
<b>II. Material und Methoden</b> .....	20
II.1 Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide.....	20
II.2 Chemikalien und Enzyme.....	26
II.3 Medien und Lösungen .....	26
II.4 Mikrobiologische Methoden.....	30
II.4.1 Kultivierung von Bakterien .....	30
II.4.2 Stammhaltung .....	30
II.4.3 Wachstumskurven .....	31
II.4.4 Transformation von Bakterien.....	31
II.4.4.1 Transformation von <i>E. coli</i> Stämmen.....	31
II.4.4.2 Transformation von <i>B. subtilis</i> Stämmen .....	31
II.4.4.3 Transformation von <i>C. glutamicum</i> Stämmen.....	32
II.4.4.4 Transformation von <i>S. carnosus</i> Protoplasten.....	33
II.4.5 Durchführung von „plasmid-curing“-Experimenten .....	33
II.5 Gentechnische Methoden .....	34
II.5.1 Allgemeine gentechnische Methoden.....	34
II.5.1.1 Agarose-Gelelektrophorese .....	34
II.5.1.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen .....	35
II.5.1.3 Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase.....	35
II.5.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten.....	35
II.5.1.5 Umwandeln von überhängenden 5' Enden in glatte Enden .....	35
II.5.1.6 Entsalzung von DNA- Lösungen.....	36
II.5.1.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen .....	36
II.5.2 Präparation von DNA .....	36
II.5.2.1 Präparation chromosomaler DNA .....	36
II.5.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA .....	36

II.5.2.3 Plasmidisolierung im präparativen Maßstab .....	37
II.5.3 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	37
II.5.4 Durchführung der „cross-over“-PCR .....	38
II.5.5 Nicht radioaktive DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode.....	38
II.5.6 DNA-DNA Hybridisierung nach Southern .....	40
II.6 Proteinchemische Methoden.....	41
II.6.1 Isolierung von Proteinen aus Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen.....	41
II.6.1.1 Induktion der Genexpression.....	41
II.6.1.2 Herstellung von <i>E. coli</i> Gesamtzellextrakten .....	42
II.6.1.3 Herstellung von <i>B. subtilis</i> und <i>S. carnosus</i> Gesamtzellextrakten .....	42
II.6.1.4 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus <i>C. glutamicum</i> .....	42
II.6.1.5 Aufarbeitung von Kulturüberständen .....	43
II.6.1.6 Fraktionierung von <i>S. carnosus</i> in Protoplasten und Zellwand.....	43
II.6.1.7 Osmotischer Schock mit <i>E. coli</i> .....	43
II.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	44
II.6.3 Coomassie- Färbung von Proteingelen.....	45
II.6.4 Silber-Färbung von Proteingelen.....	45
II.6.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern .....	45
II.6.6 Pulse-Chase mit <i>B. subtilis</i> .....	46
II.6.6.1 Markierung von <i>B. subtilis</i> WT .....	46
II.6.6.2 Markierung von <i>B. subtilis</i> NIG1152 .....	47
II.6.6.3 Aufarbeitung der Proben .....	48
II.6.6.4 Gelaufarbeitung .....	48
II.6.7 MALDI-TOF Massenspektroskopie.....	49
II.6.8 Herstellung polyklonaler Antikörper.....	50
II.6.9 $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäts-Test.....	51
II.6.10 Katalase-Aktivitäts-Test .....	51
<b>III. Ergebnisse.....</b>	<b>53</b>
III.1 Untersuchungen zum „targeting“ von SecA2/SecY2-Substraten in <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> und <i>S. carnosus</i> . .....	53
III.1.1 Untersuchungen zum SecA2/SecY2-„targeting“ in <i>E. coli</i> .....	53
III.1.1.1 Ein authentisches SecA2/SecY2-Substrat wird in <i>E. coli</i> nicht exportiert. ...	53
III.1.1.2 Ein SecA2/SecY2-Signalpeptid erlaubt ein „targeting“ an die klassische Sec-Translokase in <i>E. coli</i> . .....	56
III.1.2 Untersuchungen zum SecA2/SecY2-„targeting“ in <i>B. subtilis</i> . .....	59
III.1.2.1 Das SrrSPPProLip-Protein wird in <i>B. subtilis</i> nicht exportiert. ....	59
III.1.3 Analyse des „targetings“ von SecA2/SecY2-Substraten in <i>S. carnosus</i> .....	61
III.1.3.1 Das SrrSPPProLip-Protein wird in <i>S. carnosus</i> über den Sec1-Weg transloziert. ....	61
III.1.3.2 Analyse der Translokation weiterer Fusionsproteine über den Sec1-Weg in <i>S. carnosus</i> . ....	63
III.1.3.3 Analyse der Translokation von verkürzten, authentischen SecA2/SecY2- Substraten in <i>S. carnosus</i> . ....	66
III.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zum „targeting“ von SecA2/SecY2- Substraten in <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> und <i>S. carnosus</i> . .....	70
III.2 Untersuchung der Wechselwirkungen des <i>S. aureus</i> SecA2-Proteins mit Komponenten der Sec1-Translokase.....	70

III.2.1 Das <i>S. aureus</i> SecA2 kann mit Komponenten der <i>B. subtilis</i> Sec1-Translokase und einem klassischen Sec-Substrat keine funktionellen Wechselwirkungen eingehen. ....	71
III.2.2 Chromosomale Integration der <i>S. aureus</i> <i>secA</i> -Gene in <i>B. subtilis</i> NIG1152. ....	73
III.2.3 Funktionelle Wechselwirkungen zwischen <i>S. aureus</i> SecA2, Komponenten der <i>B. subtilis</i> Sec1-Translokase und einem Protein mit SecA2/SecY2-Signalpeptid finden nicht statt. ....	78
III.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der Wechselwirkungen des <i>S. aureus</i> SecA2-Proteins mit Komponenten der Sec1-Translokase von <i>B. subtilis</i> . ....	79
<b>III.3 Studium der Bedeutung der Sec2-abhängigen Protein-translokation in nicht-pathogenen Bakterien. ....</b>	<b>79</b>
III.3.1 Untersuchung der SecA2/SecY2-abhängigen Proteintranslokation in <i>S. carnosus</i> . ....	80
III.3.1.1 In <i>S. carnosus</i> liegt ein <i>secA2/secY2</i> -Operon vor. ....	80
III.3.1.2 Das <i>S. carnosus</i> <i>secA2</i> ist nicht essentiell. ....	83
III.3.1.3 Die Deletion des <i>secA2</i> hat keinen Effekt auf die Proteintranslokation in <i>S. carnosus</i> . ....	86
III.3.1.4 Der Promotor des <i>secA2/secY2</i> -Operons von <i>S. carnosus</i> ist aktiv. ....	88
III.3.1.5 Das <i>S. carnosus</i> SecA2/SecY2-System ist nicht funktionell. ....	91
III.3.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der SecA2/SecY2-abhängigen Proteintranslokation in <i>S. carnosus</i> . ....	92
III.3.2 Studium der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in <i>C. glutamicum</i> . ....	93
III.3.2.1 Die SecA-Proteine von <i>C. glutamicum</i> . ....	93
III.3.2.2 Das <i>secA2</i> -Gen von <i>C. glutamicum</i> ist essentiell. ....	98
III.3.2.3 <i>C. glutamicum</i> besitzt zwei essentielle <i>secA</i> -Gene. ....	104
III.3.2.4 Konstruktion einer <i>C. glutamicum</i> <i>secA2</i> -Promotoraustauschmutante. ....	107
III.3.2.5 Die Lokalisierung der Katalase ist in <i>C. glutamicum</i> SecA2-abhängig. ....	112
III.3.2.6 Überexpression des <i>C. glutamicum</i> SecA2-Proteins führt zu erhöhter Katalase-Sekretion. ....	114
III.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Studium der Bedeutung der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in <i>C. glutamicum</i> . ....	116
<b>IV. Diskussion .....</b>	<b>117</b>
IV.1 Untersuchungen zum „targeting“ von SecA2/SecY2- Substraten in <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> und <i>S. carnosus</i> . ....	117
IV.1.1 Das authentische SecA2/SecY2-Substrat von <i>S. aureus</i> wird in <i>E. coli</i> nicht transloziert. ....	118
IV.1.2 Ein SecA2/SecY2-Signalpeptid erlaubt ein „targeting“ an die klassische Sec-Translokase. ....	119
IV.1.3 Nicht-glykosylierte SecA2/SecY2-Substrate können über die klassische Sec-Translokase transloziert werden. ....	123
IV.2 Untersuchungen der Wechselwirkungen des <i>S. aureus</i> SecA2-Proteins mit Komponenten der Sec1-Translokase. ....	126
IV.2.1 Das <i>S. aureus</i> SecA2 kann mit Komponenten der <i>B. subtilis</i> Sec1-Translokase und klassischen Sec-Substraten keine funktionellen Wechselwirkungen eingehen. ....	127

IV.2.2 Das <i>S. aureus</i> SecA2 kann mit Komponenten der <i>B. subtilis</i> Sec1-Translokase und einem Protein mit einem SecA2/SecY2-Signalpeptid keine funktionellen Wechselwirkungen eingehen.....	129
IV.3 Bedeutung der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in nicht-pathogenen Bakterien. ....	130
IV.3.1 Untersuchung der SecA2/SecY2-abhängigen Proteintranslokation in <i>S. carnosus</i> . ....	131
IV.3.1.1 Das SecA2/SecY2-Sytem von <i>S. carnosus</i> ist nicht funktionell.....	132
IV.3.2 Untersuchung der SecA2-abhängigen Proteintranslokation in <i>C. glutamicum</i> ..	135
IV.3.2.1 Aminosäuresequenz-Analyse der <i>C. glutamicum</i> SecA-Proteine.....	136
IV.3.2.2 <i>C. glutamicum</i> besitzt als bislang einziges Bakterium zwei essentielle SecA-Proteine.....	137
IV.3.2.3 Die SecA2-abhängige Proteintranslokation ist in <i>C. glutamicum</i> wie in <i>M. tuberculosis</i> am Schutz vor oxidativem Stress beteiligt. ....	142
<b>V. Zusammenfassung</b> .....	145
<b>VI. Literatur</b> .....	146