

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	- 1 -
I.1	MARGESCHNEIDERTE BIOKATALYSATOREN UND PRODUKTIONSSYSTEME FÜR DIE WEIBE BIOTECHNOLOGIE	
I.1.1	<i>Fallbeispiel: Lipasen aus extremophilen Mikroorganismen</i>	- 2 -
I.1.2	<i>Sekretorische Proteingewinnung in Gram-positiven Mikroorganismen</i>	- 5 -
I.2	ALLGEMEINES ZUM PROTEINTRANSPORT IN GRAM-POSITIVEN BAKTERIEN	- 6 -
I.3	DER GENERELLE SEKRETIONSWEG	- 8 -
I.3.1	<i>Das Signalpeptid des Sec-Weges</i>	- 8 -
I.3.2	<i>„Targeting“ an die Sec-Translokase</i>	- 9 -
I.3.2.1	Posttranslationales Targeting	- 9 -
I.3.2.2	Cotranslationales Targeting	- 10 -
I.3.3	<i>Die Sec-Translokase</i>	- 11 -
I.3.3.1	Wichtige Komponenten und strukturelle Eigenschaften der Sec-Translokase	- 12 -
I.3.3.1.1	Der SecYEG-Translokationskanal	- 12 -
I.3.3.1.2	Die SecA-ATPase	- 13 -
I.3.3.1.3	Akzessorische Komponenten: SecD, SecF, YajC	- 13 -
I.3.3.1.4	YidC	- 13 -
I.3.4	<i>Späte Schritte der Sec-abhängigen Proteintranslokation</i>	- 14 -
I.3.5	<i>Die Gram-positive Zellwand als Hindernis</i>	- 15 -
I.3.6	<i>Engpässe des Sec-Weges für die Sekretion heterologer Proteine</i>	- 15 -
I.4	DER TAT-WEG ALS ALTERNATIVER SEKRETIONSWEG FÜR DIE HETEROLOGE PROTEINSEKRETION	- 17 -
I.4.1	<i>Die Signalpeptide des Tat-Weges</i>	- 18 -
I.4.1.1	Spezies- bzw. Translokase-Spezifität von Tat-Signalpeptiden	- 19 -
I.4.2	<i>Wichtige Komponenten der Tat-Translokase</i>	- 20 -
I.4.3	<i>Abweichende Typen der Tat-Translokase in Gram-positiven Bakterien</i>	- 21 -
I.4.4	<i>Tat-Komplexe und deren Funktion während der Translokation</i>	- 21 -
I.4.5	<i>Möglicher Mechanismus der Tat-Translokation</i>	- 22 -
I.4.6	<i>Qualitätskontrolle durch die Tat-Translokase</i>	- 23 -
I.4.7	<i>Tat-Substrate und Chaperone</i>	- 23 -
I.4.8	<i>Proofreading von Tat-Substraten durch Chaperone der TorD-Familie</i>	- 24 -
I.4.9	<i>Arbeitsmodell für das Tat-Proofreading durch TorD</i>	- 26 -
I.4.10	<i>Mögliche Engpässe bei der Tat-abhängigen Sekretion heterologer Proteine</i>	- 26 -
I.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	- 28 -
II.	MATERIAL UND METHODEN	- 29 -
II.1	CHEMIKALIEN UND ENZYME	- 29 -
II.2	BAKTERIENSTÄMME, OLIGONUKLEOTIDE UND PLASMIDE	- 29 -
II.3	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	- 34 -
II.3.1	<i>Nährmedien</i>	- 34 -
II.3.2	<i>Kultivierungsbedingungen</i>	- 35 -
II.3.3	<i>Indikatoragarplatten mit Tributyrin oder Tween80 für Agardiffusionsassays</i>	- 35 -
II.3.4	<i>Wachstumskurven</i>	- 35 -
II.3.5	<i>Stammhaltung</i>	- 35 -
II.3.6	<i>Transformation von Bakterien</i>	- 36 -
II.3.6.1	Transformation von chemokompetenten <i>E.coli</i> Stämmen	- 36 -
II.3.6.2	Transformation von elektrokompetenten <i>E.coli</i> Stämmen	- 36 -

Inhaltsverzeichnis

II.3.6.3	Transformation von <i>B.subtilis</i> Stämmen.....	- 37 -
II.3.6.4	Transformation von <i>C.glutamicum</i> Stämmen.....	- 38 -
II.3.6.5	Transformation von <i>S.carnosus</i> Protoplasten nach Götz und Schuhmacher	- 39 -
II.4	GENTECHNISCHE METHODEN.....	- 40 -
II.4.1	Präparation von DNA.....	- 40 -
II.4.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab.....	- 40 -
II.4.1.2	Plasmidisolierung im präparativen Maßstab (Midi- und Maxi-Präparation).....	- 41 -
II.4.1.3	Präparation chromosomaler DNA.....	- 41 -
II.4.2	Aufreinigung von DNA	- 41 -
II.4.3	Phenol/Chloroform-Extraktion	- 41 -
II.4.3.1	Entsalzung und Aufkonzentrierung von DNA-Lösungen durch Ethanol-fällung ..	- 42 -
II.4.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	- 42 -
II.4.5	Agarose-Gelelektrophorese	- 42 -
II.4.5.1	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	- 43 -
II.4.6	Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase.....	- 43 -
II.4.7	Ligation von DNA-Fragmenten	- 43 -
II.4.8	Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	- 43 -
II.4.8.1	Durchführung der Kolonie-PCR.....	- 44 -
II.4.8.2	Durchführung der „Crossover-PCR“	- 44 -
II.4.8.3	Ortspezifische Mutagenese	- 45 -
II.4.8.4	Zufallsmutagenese durch epPCR	- 45 -
II.4.9	DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode	- 46 -
II.4.9.1	DNA-Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden (LI-COR-Apparatur)	- 46 -
II.4.9.2	DNA-Sequenzierung mit unmarkierten Oligonukleotiden (Kapillarsequenzier „3100-Avant“)	- 47 -
II.5	PLASMIDKONSTRUKTIONEN	- 48 -
II.5.1	Konstruktion der Genfusion <i>pproGTL</i> und <i>pproTSL</i>	- 48 -
II.5.2	Konstruktion der Genfusion <i>pGTL</i>	- 48 -
II.5.3	Subklonierung der Lipase <i>GTL</i> mit ihrem authentischen Signalpeptid <i>aGTL</i>	- 50 -
II.5.4	Konstruktion der Genfusion <i>TorA^{SP}GTL</i>	- 50 -
II.5.5	Konstruktion der Genfusion <i>TorA^{SP}TSL</i>	- 50 -
II.5.6	Konstruktion der Genfusionen <i>TorA^{SP}SHL</i> , <i>TorA^{SP}proSHL</i> und <i>TorA^{SP}Cut</i>	- 51 -
II.5.7	Konstruktion der Plasmide <i>pVW2-tatAC(C.g.)</i> , <i>pVW2-tatABC(E.c.)</i> , <i>pVW2-tatAC(E.c.)</i> , <i>pVW2-tatC</i>	- 51 -
II.5.8	Konstruktion der Plasmide <i>pVW2-TorD</i> und <i>pVW2-TorDhis</i>	- 52 -
II.5.9	Konstruktion der Plasmide <i>pEK2-TorAGFP/TorDhis</i> und <i>pEK2-TorAGFP/TorDINV</i>	- 52 -
II.6	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	- 52 -
II.6.1	Isolierung von Proteinen aus Gesamtzell-extrakten und Kulturüberständen	- 52 -
II.6.1.1	Induktion der Genexpression.....	- 52 -
II.6.1.2	Herstellung von <i>E.coli</i> Gesamtzell-extrakten	- 53 -
II.6.1.3	Herstellung von <i>B.subtilis</i> und <i>S.carnosus</i> Gesamtzell-extrakten	- 53 -
II.6.1.4	Herstellung von Gesamtzell-extrakten aus <i>C.glutamicum</i>	- 53 -
II.6.2	Aufarbeitung von Kulturüberständen.....	- 54 -
II.6.3	Osmotischer Schock von <i>E.coli</i> Zellen	- 54 -
II.6.4	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	- 55 -

Inhaltsverzeichnis

II.6.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)	- 55 -
II.6.5.1	Coomassie-Färbung von Proteingelen	- 56 -
II.6.6	Immunologischer Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern (Western Blot)... - 56 -	
II.6.7	Herstellung polyklonaler Antikörper	- 57 -
II.6.8	Zymogramm-Techniken	- 58 -
II.6.8.1	Lipase-Aktivitätsfärbung mit α -Naphthylacetat	- 58 -
II.6.8.2	Lipase-Aktivitätsfärbung mit MUF-Palmitat	- 58 -
II.6.9	Photometrische Lipase-Aktivitätsbestimmung mit <i>para</i> -Nitrophenyl-Estern.....	- 58 -
II.6.10	Hochdurchsatz-Screening mit dem Tecan-Pipettierroboter	- 59 -
III.	ERGEBNISSE	- 61 -
III.1	ETABLIERUNG VON SEKRETIONSSYSTEMEN ZUR GEWINNUNG VON THERMOSTABILEN LIPASEN AUS EXTREMOPHILEN BAKTERIEN	- 61 -
III.1.1	Etablierung der <i>Sec</i> -abhängigen Sekretion von thermostabilen Lipasen	- 63 -
III.1.1.1	Die Fusionslipase pproTSL ist instabil und wird sowohl intra- als auch extrazellulär stark proteolytisch abgebaut	- 64 -
III.1.1.2	Die Fusionslipase pproGTL wird zwar effizient sekretiert, ist aber kaum aktiv ..	- 68 -
III.1.2	Die Fusionslipase pGTL besitzt nur eine geringfügig erhöhte Aktivität in <i>S.carnosus</i> ..	- 69 -
III.1.3	Die Lipase aGTL wird zu einem signifikanten Anteil in den Kulturüberstand von <i>S.carnosus</i> sekretiert.....	- 70 -
III.1.4	Etablierung der <i>TAT</i> -abhängigen Sekretion der Modelllipase GTL in verschiedenen Wirtssystemen	- 72 -
III.1.4.1	In <i>S.carnosus</i> als Wirtssystem wird die thermostabile Lipase GTL <i>Tat</i> -abhängig sekretiert	- 74 -
III.1.4.2	In <i>B.subtilis</i> als Wirtssystem verursacht die Expression der thermostabilen Lipase TorA ^{SP} GTL eine Zellyse.....	- 77 -
III.1.4.3	In <i>C.glutamicum</i> als Wirtssystem wird die Lipase TorA ^{SP} GTL <i>Tat</i> -abhängig sekretiert, jedoch akkumuliert ein signifikanter Anteil intrazellulär	- 79 -
III.1.4.4	<i>Tat</i> -abhängige Sekretion von TorA ^{SP} -Hybridvorläuferlipasen in <i>C.glutamicum</i> als Wirtssystem.....	- 81 -
III.2	OPTIMIERUNG DER SEKRETION REKOMBINANTER PROTEINE ÜBER DEN <i>TAT</i>-WEG IN GRAM-POSITIVEN MIKROORGANISMEN	- 86 -
III.2.1	Strategie 1: Optimierung der <i>Tat</i> -abhängigen Sekretion durch eine verbesserte Anpassung eines <i>Tat</i> -abhängigen Signalpeptids an die <i>Tat</i> -Translokase von <i>C.glutamicum</i> ... -	87 -
III.2.1.1	Auswahl und Anpassung eines geeigneten Modellenzym und Vektorsystems für das HTS-Verfahren.....	- 89 -
III.2.1.2	Entwicklung eines Hochdurchsatz-Screening-Verfahrens zur Identifizierung von TorA-Signalpeptid-Varianten mit einer veränderten Sekretion in <i>C.glutamicum</i> WT-Zellen	
III.2.1.2.1	Entwicklung eines Kultivierungs-und Induktionsverfahrens für das HTS- Screening	- 90 -
III.2.1.2.2	Bestimmung der systemimmanenten Messungengenauigkeit des HTS-Verfahrens	- 91 -
III.2.1.3	Zufallsmutagenese des TorA-Signalpeptids.....	- 92 -
III.2.1.3.1	Abschätzung einer Mindestbibliotheksgröße für das TorA-Signalpeptid.....	- 93 -
III.2.1.3.2	Aufbau und Weiterführung der TorA-Signalpeptidbibliothek.....	- 94 -

Inhaltsverzeichnis

III.2.1.4	Beim Hochdurchsatz-Screening konnten keine <i>C. glutamicum</i> Zellen mit einer signifikant erhöhten Enzymaktivität im Kulturüberstand identifiziert werden	- 94 -
III.2.2	<i>Strategie 2: Coexpression heterologer und homologer Komponenten der Tat-Translokase</i>	
III.2.2.1	Zweivektorensystem zur Coexpression homologer und heterologer Tat-Translokasekomponenten.....	- 98 -
III.2.2.2	Coexpression heterologer Tat-Komponenten	- 99 -
III.2.2.2.1	Untersuchung der Komplementation der <i>C. glutamicum</i> Δ tatAC-Mutante durch <i>E. coli</i> Tat-Translokasekomponenten.....	- 99 -
III.2.2.2.2	Durch Expression von <i>E. coli</i> TatA und TatC Komponenten wird die Δ tatAC-Mutante nicht komplementiert	- 99 -
III.2.2.2.3	Durch Expression des <i>E. coli</i> TatABC-Systems wird die Δ tatAC-Mutante ebenfalls nicht komplementiert	- 99 -
III.2.2.2.4	Durch Coexpression von <i>E. coli</i> Tat-Komponenten im <i>C. glutamicum</i> WT wird die Translokation von TorA ^{SP} GFP blockiert.....	- 101 -
III.2.2.2.5	Wird das <i>E. coli</i> TatABC System vollständig im <i>C. glutamicum</i> WT exprimiert, tritt kein Exportblock auf	- 101 -
III.2.2.3	Coexpression homologer Tat-Komponenten.....	- 102 -
III.2.2.3.1	Durch Coexpression homologer Tat-Komponenten wird die Δ tatAC-Mutante komplementiert	- 102 -
III.2.2.4	Die Überexpression des <i>C. glutamicum</i> tatAC-Operons führt zu einer verbesserten Sekretion der Hybridlipase TorA ^{SP} GTLhis und TorA ^{SP} GFP	- 103 -
III.2.3	<i>Strategie 3: Ausnutzung des Tat-Proofreadings für eine verbesserte Sekretion rekombinanter Proteine durch Coexpression des Signalpeptid-spezifischen Chaperons TorD</i>	- 105 -
III.2.4	Zweivektorensystem zur Coexpression des Chaperons TorD.....	- 105 -
III.2.5	Die Coexpression von TorD führt in <i>C. glutamicum</i> zu einem Exportblock des Hybridproteins TorA ^{SP} GFP.....	- 107 -
III.2.6	Die Coexpression von TorD verursacht nicht nur einen Exportblock von TorA ^{SP} GFP, sondern auch einen Exportblock weiterer TorA ^{SP} -Hybridproteine	- 108 -
III.3	UNTERSUCHUNG DES TORD-ABLÖSEPROZESSES ALS KRITISCHER SCHRITT WÄHREND DES TAT-PROOFREADINGS IN EINEM HETEROLOGEN MODELLSYSTEM	- 110 -
III.3.1	<i>Modifikation des Zweivektorensystems zur Untersuchung des Ablöseprozesses von TorD während des Tat-Proofreadings im heterologen Umfeld von C. glutamicum</i>	<i>- 110 -</i>
III.3.2	<i>Validierung des modifizierten Zweivektorensystems zur Untersuchung des TorD-Ablöseprozesses im heterologen Modellsystem C. glutamicum.....</i>	<i>- 111 -</i>
III.3.2.1	Die Coexpression von TorD verbessert die Translokation von TorA ^{SP} GFP ins Periplasma von <i>E. coli</i>	- 111 -
III.3.3	<i>Untersuchung möglicher Faktoren, die bei dem Ablöseprozess des TorD Chaperons eine Rolle spielen können</i>	<i>- 113 -</i>
III.3.3.1	Durch Coexpression von <i>C. glutamicum</i> TatA und TatC Komponenten kann die Blockade der Sekretion durch TorD in <i>C. glutamicum</i> nicht aufgehoben werden.....	- 113 -
III.3.3.2	Die Anwesenheit von TorD verhindert nicht die Sekretion von TorA ^{SP} GFP im <i>C. glutamicum</i> WT, wenn das <i>E. coli</i> tatABC Operon anwesend ist.....	- 114 -

Inhaltsverzeichnis

IV. DISKUSSION	117 -
IV.1 ETABLIERUNG DER SEKRETORISCHEN GEWINNUNG VON THERMOSTABILEN LIPASEN IN GRAM-POSITIVEN BAKTERIEN	118 -
IV.1.1 Das <i>S.hycicus</i> Propeptid als Sekretionscarrier für die Sec-abhängige Sekretion in <i>S.carnosus</i>	118 -
IV.1.1.1 Sec-abhängigen Sekretion der Fusionslipase pproTSL	119 -
IV.1.1.2 Sec-abhängige Sekretion der Fusionslipase pproGTL	119 -
IV.1.2 Sec-abhängige Sekretion der Lipase GTL mit dem <i>S.hycicus</i> Signalpeptid in <i>S.carnosus</i> (pGTL)	119 -
IV.1.3 Sec-abhängige Sekretion der Lipase GTL mit ihrem eigenen Signalpeptid in <i>S.carnosus</i> (aGTL)	120 -
IV.1.4 Auswahl eines Wirtssystems für die Tat-abhängige Sekretion der Lipase GTL	121 -
IV.1.4.1 <i>S.carnosus</i> als Wirtssystem	121 -
IV.1.4.2 <i>B.subtilis</i> als Wirtssystem	122 -
IV.1.4.3 <i>C.glutamicum</i> als Wirtssystem	123 -
IV.2 STRATEGIEN FÜR DIE OPTIMIERUNG DER SEKRETION ÜBER DEN TAT-WEG IN GRAM-POSITIVEN BAKTERIEN...	
IV.2.1 Strategie 1: Optimierung der Tat-abhängigen Sekretion durch gerichtete Evolution des <i>E.coli</i> TorA-Signalpeptids	128 -
IV.2.1.1 Zufallsmutagenese und Hochdurchsatz-Screening zur Untersuchung von <i>C.glutamicum</i> Transformanten mit einer veränderten Enzymaktivität im Kulturüberstand	129 -
IV.2.2 Strategie 2: Coexpression heterologer und homologer Komponenten der Tat-Translokase	130 -
IV.2.2.1 Expression von <i>E.coli</i> Tat-Komponenten in der <i>C.glutamicum</i> ΔatAC-Mutante und im <i>C.glutamicum</i> WT	130 -
IV.2.2.2 Coexpression homologer Tat-Komponenten im <i>C.glutamicum</i> WT	133 -
IV.2.3 Strategie 3: Ausnutzung des Tat-Proofreadings für eine verbesserte Sekretion rekombinanter Proteine durch Coexpression des Signalpeptid-spezifischen Chaperons TorD - 134 -	
IV.2.3.1 In <i>C.glutamicum</i> ist die <i>E.coli</i> TorD Ablösung vom <i>E.coli</i> TorA-Signalpeptid blockiert	
IV.3 DER TORD-ABLÖSEPROZESSES ALS KRITISCHER SCHRITT WÄHREND DES TAT-PROOFREADINGS IN EINEM HETEROLOGEN MODELLSYSTEM	136 -
IV.3.1 Das <i>E.coli</i> TatABC-System ist an einer Ablösung von TorD beteiligt	138 -
IV.3.2 Weitere Strategien zur Verbesserung der Tat-abhängigen Sekretion in <i>C.glutamicum</i> – ein Ausblick	139 -
V. ZUSAMMENFASSUNG	140 -
VI. SUMMARY	141 -
VII. LITERATUR	142 -
DANKSAGUNG	155 -