

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Charakteristische Eigenschaften sekretorischer Proteine	1
1.2 Proteintranslokation in Gram - negativen Bakterien.....	4
1.3 Proteintranslokation in Gram - positiven Bakterien	9
1.4 Ziele der Arbeit.....	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1 Bakterienstämme und Phagen, Plasmide, Oligonukleotide.....	14
2.2 Chemikalien	17
2.3 Medien und Lösungen	17
2.4 Mikrobiologische Methoden	20
2.4.1 Stammhaltung.....	20
2.4.2 Transformation von Bakterien	21
2.4.3 Test auf Wachstumskomplementation konditional - letaler <i>sec</i> - Mutanten	22
Wachstumskomplementation des <i>Escherichia coli secA51^{ts}</i> Stammes MM52	22
Wachstumskomplementation der <i>Escherichia coli</i> SecB - Null- mutante CK1953	22
2.4.4 Isolierung eines OmpA - negativen <i>Escherichia coli</i> - Stammes	22
2.5 Proteinchemische Methoden	23
2.5.1 Probenaufarbeitung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
2.5.3 "Western Blot"	24
2.5.4 Radioaktive Markierung von Zellproteinen und Immunfällung	25
2.5.5 Quantifizierung radioaktiver Markierung von Zellproteinen	26
2.6 DNA Techniken	26
2.6.1 Allgemeine gentechnische Methoden	26
DNA Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	26
Auffüllen überhängender 5'-DNA Enden	26
Dephosphorylierung von DNA.....	26
Ligationen.....	26
Agarose - Gelelektrophorese	27
Isolierung von DNA - Fragmenten	27
2.6.2 Synthese und Aufarbeitung spezifischer Oligonukleotide.....	27
2.6.3 Amplifikation von DNA - Fragmenten durch PCR.....	27
2.6.4 DNA Präparationen	28
Isolierung chromosomaler DNA.....	28
Minilysate zur Isolierung von Plasmid DNA	28
Plasmidisolierung im präparativen Maßstab	29
2.6.5 DNA - DNA ("Southern") - Hybridisierung	29
2.6.6 DNA - Sequenzierung	31
3. Ergebnisse.....	33
3.1 Untersuchungen zum Proteinexport Gram - negativer Bakterien	33
3.1.1 Einfluß einer erhöhten SecA - Konzentration auf den Export des <i>Escherichia coli</i> Außenmembranproteins OmpA*	33

Konstruktion der Plasmide pEF3S1 und pEF3S3 zur induzierbaren Überproduktion der OmpA-Signalsequenzmutanten S1 und S3 (OmpA*), sowie Selektion eines OmpA-negativen <i>Escherichia coli</i> Stammes	33
Nachweis von funktionellem, Plasmid - kodiertem SecA - Protein und der Überexpression in <i>Escherichia coli</i>	36
Einfluß einer erhöhten SecA - Konzentration auf den Export der OmpA* - Signalsequenzmutanten	38
3.1.2 Einfluß einer erhöhten SecB - Konzentration auf den Export des <i>Escherichia coli</i> Außenmembranproteins OmpA*	40
Nachweis von funktionellem, Plasmid - kodiertem SecB - Protein und Überexpression in <i>Escherichia coli</i>	40
Einfluß einer erhöhten SecB - Konzentration auf den Export der OmpA - Signalsequenzmutanten	41
3.2 Untersuchungen zum Proteinexport Gram - positiver Bakterien	42
3.2.1 Einfluß der <i>Bacillus subtilis</i> SecA - Überexpression auf den Export der Lipase aus <i>Staphylococcus hyicus</i>	42
Induzierbare Expression der Lipase aus <i>Staphylococcus hyicus</i>	42
Konstruktion des Plasmids pWHsecA	43
Nachweis von funktionellem, Plasmid - kodiertem SecA - Protein und Überexpression in <i>Bacillus subtilis</i>	43
Nachweis der Überexpression des SecA - Proteins in <i>Bacillus subtilis</i> und Beeinflussung des Lipaseexportes	44
3.2.2 Einfluß der Expression des <i>Escherichia coli</i> SecB - Proteins auf den Export der Lipase in <i>Bacillus subtilis</i>	46
Konstruktion des Plasmids pWHsecB	47
Expression des heterologen <i>Escherichia coli</i> SecB - Proteins in <i>Bacillus subtilis</i> und Effekt auf den Lipaseexport	47
3.3 Isolierung <i>prsA</i> - homologer Gene aus <i>Bacillus licheniformis</i>	50
3.3.1 Hybridisierung chromosomaler DNA aus <i>Bacillus licheniformis</i> mit einer <i>prsA</i> - Gensonde aus <i>Bacillus subtilis</i>	51
3.3.2 Klonierung und Sequenzierung eines <i>prsA</i> - homologen Gens aus dem <i>Bacillus licheniformis</i> Wildtyp DSM13	51
3.3.3 Analyse der Sequenzdaten und Vergleich des <i>prsA</i> - homologen Gens aus <i>Bacillus licheniformis</i> mit dem <i>Bacillus subtilis prsA</i> - Gen	53
3.3.4 Klonierung und Sequenzierung eines <i>prsA</i> - homologen Gens aus dem <i>Bacillus licheniformis</i> Subtilisinproduktionsstamm P300	57
4. Diskussion	60
4.1 Einfluß einer erhöhten zellulären Konzentration der Exportkomponente SecA bzw. SecB auf die Proteinsekretion in <i>Escherichia coli</i> und <i>Bacillus subtilis</i> unter Überproduktionsbedingungen	60
4.1.1 Erhöhung der zellulären SecA - bzw. SecB - Proteinkonzentration in <i>Escherichia coli</i> und <i>Bacillus subtilis</i>	60
4.1.2 Einfluß einer erhöhten zellulären SecA - bzw. SecB - Konzentration auf den Proteinexport in <i>Escherichia coli</i> unter Überproduktionsbedingungen	62
4.1.3 Einfluß der erhöhten zellulären SecA - Konzentration bzw. der Expression des <i>Escherichia coli</i> - SecB auf den Proteinexport in <i>Bacillus subtilis</i> unter Überproduktionsbedingungen	64
4.2 Isolierung und Analyse der <i>prsA</i> - homologen Gene aus dem <i>Bacillus licheniformis</i> Wildtypstamm DSM13 und dem Subtilisinproduktionsstamm P300	65

4.2.1 Isolierung und Sequenzanalyse des <i>prsA</i> - Gens aus dem <i>Bacillus licheniformis</i> Wildtypstamm DSM13	65
4.2.2 Analyse der Aminosäuresequenz des <i>Bacillus licheniformis</i> PrsA- Proteins und Vergleich mit dem <i>Bacillus subtilis</i> PrsA	66
4.2.3 Isolierung des <i>prsA</i> - Gens aus dem <i>Bacillus licheniformis</i> - Produktionsstamm P300 und Vergleich der Sequenz mit dem <i>prsA</i> - Gen von dem <i>Bacillus licheniformis</i> Wildtyp DSM13	67
5. Zusammenfassung	69
6. Literatur	70