

**Neue Strategien zur  
extrazellulären Produktion  
rekombinanter Proteine mit  
*Escherichia coli***

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
an der Technischen Fakultät  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von

**Dipl.-Biotech. Benjamin Sommer**

geboren am 12. April 1979

in Bielefeld

Juli 2008





# Inhaltsverzeichnis

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>EINLEITUNG</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>2</b>   | <b>THEORIE</b> .....  | <b>3</b>  |
| <b>2.1</b> | <b><i>Escherichia coli</i> – Aufbau der Zellhülle</b> .....                                   | <b>3</b>  |
| <b>2.2</b> | <b><i>Escherichia coli</i> – Proteinexportsysteme</b> .....                                   | <b>4</b>  |
| 2.2.1      | Der generelle Sekretionspfad (Sec).....   | 6         |
| 2.2.2      | Die Zwillingsarginin-Translokation ( <i>Tat</i> ).....  | 9         |
| 2.2.3      | Weitere Proteintransportmechanismen.....  | 12        |
| <b>2.3</b> | <b>Freisetzung periplasmatischer Proteine</b> .....   | <b>14</b> |
| 2.3.1      | Bacteriocin freisetzende Proteine (BRP).....  | 15        |
| 2.3.2      | Sekretion periplasmatischer Proteine durch BRP-Coexpression.....                              | 19        |
| <b>2.4</b> | <b>Modellproteine für die sekretorische Produktion</b> .....                                  | <b>21</b> |
| 2.4.1      | Die alkalische Phosphatase.....   | 22        |
| 2.4.2      | Die $\beta$ -Lactamase.....   | 23        |
| 2.4.3      | Die Ribonuklease Ba (Barnase).....  | 23        |
| 2.4.4      | Das grünfluoreszierende Protein (GFP).....  | 25        |
| 2.4.5      | Das Maltosebindeprotein (MBP).....  | 26        |
| <b>2.5</b> | <b>Das Arabinoseoperon <i>araBAD</i> und der Arabinosepromotor <math>P_{BAD}</math></b> ..... | <b>28</b> |
| <b>3</b>   | <b>ZIELE DER ARBEIT</b> .....   | <b>31</b> |
| <b>4</b>   | <b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....  | <b>33</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Mikrobiologische Methoden</b> .....  | <b>33</b> |
| 4.1.1      | Bakterienstämme und Plasmide.....   | 33        |
| 4.1.2      | Medien.....   | 34        |
| 4.1.3      | Stammhaltung.....   | 37        |
| 4.1.4      | Kultivierung von <i>E. coli</i> in Flüssigmedium und auf Festagar.....                        | 37        |
| 4.1.5      | Satzkultivierung von <i>E. coli</i> im Bioreaktor.....  | 37        |
| 4.1.6      | Hochzelldichtekultivierung von <i>E. coli</i> im Zulaufverfahren.....                         | 39        |
| 4.1.7      | Induktion des $P_{BAD}$ -Promotors durch <i>L</i> -Arabinose.....                             | 40        |
| 4.1.8      | Fraktionierter Zellaufschluss.....  | 40        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 4.1.9      | Präparation löslicher und unlöslicher Proteine .....                             | 41        |
| 4.1.10     | Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen ..... | 41        |
| 4.1.11     | Herstellung und Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....   | 42        |
| <b>4.2</b> | <b>Kultivierungsanalytik.....</b>  | <b>43</b> |
| 4.2.1      | Bestimmung der optischen Dichte.....   | 43        |
| 4.2.2      | Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration .....                                | 43        |
| 4.2.3      | Bestimmung der Plasmidstabilität .....   | 43        |
| 4.2.4      | Konzentrationsbestimmung von Glycerin, Arabinose und Glucose .....               | 44        |
| 4.2.5      | Bestimmung der Ammoniumkonzentration .....                                       | 44        |
| <b>4.3</b> | <b>Molekularbiologische Methoden .....</b>                                       | <b>45</b> |
| 4.3.1      | Plasmidisolierung .....  | 45        |
| 4.3.2      | Isolierung genomischer DNA aus <i>E. coli</i> .....                              | 45        |
| 4.3.3      | Agarosegelelektrophorese .....   | 45        |
| 4.3.4      | Polymerasekettenreaktion.....  | 46        |
| 4.3.5      | Restriktionsspaltung von Plasmiden und PCR-Produkten .....                       | 46        |
| 4.3.6      | Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten aus Agarosegelen ...           | 47        |
| 4.3.7      | Ligation von DNA-Fragmenten.....   | 47        |
| 4.3.8      | Erzeugung chromosomaler Mutationen .....   | 47        |
| 4.3.9      | Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen .....                                 | 48        |
| 4.3.10     | DNA-Sequenzierung .....  | 48        |
| <b>4.4</b> | <b>Proteinreinigung .....</b>  | <b>48</b> |
| 4.4.1      | Diafiltration .....  | 48        |
| 4.4.2      | Affinitätschromatographische Reinigung von MBP und MBP-Hybridproteinen.          | 49        |
| <b>4.5</b> | <b>Proteinanalytik .....</b>   | <b>49</b> |
| 4.5.1      | Tris-Glycin SDS-PAGE.....  | 50        |
| 4.5.2      | Tris-Tricin SDS-PAGE.....  | 51        |
| 4.5.3      | Western-Blot und immunologische Detektion .....                                  | 51        |
| 4.5.4      | Bestimmung der Proteingesamtkonzentration .....                                  | 52        |
| 4.5.5      | Bestimmung der Fluoreszenz des grünfluoreszierenden Proteins.....                | 52        |
| 4.5.6      | Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase .....                           | 53        |
| 4.5.7      | Aktivitätsbestimmung der $\beta$ -Lactamase .....                                | 53        |
| 4.5.8      | Aktivitätsbestimmung der Barnase.....  | 53        |
| 4.5.9      | Aktivitätsbestimmung der $\beta$ -Galaktosidase .....                            | 54        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| <b>4.6</b> | <b>Transkriptanalytik</b> .....  | <b>55</b>  |
| 4.6.1      | Gesamt-RNA-Isolierung und DNase-Verdau .....   | 55         |
| 4.6.2      | Genexpressionsanalyse mit der DNA-Chiptechnologie .....  | 56         |
| 4.6.3      | Bestimmung der Genexpression durch quantitative RT-PCR.....  | 57         |
| <b>5</b>   | <b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....   | <b>58</b>  |
| <b>5.1</b> | <b>Etablierung eines Expressionssystems für die Sekretion rekombinanter Modellproteine: Stammentwicklung</b> .....           | <b>58</b>  |
| 5.1.1      | Konstruktion eines plasmidbasierten Expressions- und Sekretionssystems für rekombinante Proteine .....                       | 59         |
| 5.1.2      | Konstruktion eines geeigneten <i>E. coli</i> -Stammes.....   | 60         |
| 5.1.3      | Funktionelle Charakterisierung des Expressionssystems .....  | 62         |
| 5.1.4      | Auswahl eines geeigneten BRPs .....  | 66         |
| 5.1.5      | Molekulare Optimierung des LppBRP: Funktionalität und Toxizität von LppBRP-Hybridproteinen .....                             | 71         |
| 5.1.6      | Schlussfolgerungen zur Etablierung eines geeigneten Sekretionssystems .....  | 78         |
| <b>5.2</b> | <b>Optimierung der extrazellulären Proteinproduktion durch kontrollierte BRP-Coexpression</b> .....                          | <b>79</b>  |
| 5.2.1      | Optimierung der extrazellulären Proteinproduktion durch angepasste BRP-Coexpression .....                                    | 79         |
| 5.2.2      | Steigerung der extrazellulären Proteinproduktion durch Hochzelldichtekultivierung .....                                      | 91         |
| 5.2.3      | Kinetik der BRP-Expression und Proteinsekretion .....  | 99         |
| 5.2.4      | Analyse der Genexpression unter BRP-Aktivität.....   | 102        |
| 5.2.5      | Optimierung der extrazellulären Proteinproduktion durch starke BRP-Expression bei maximalen Zelldichten .....                | 105        |
| 5.2.6      | Schlussfolgerungen zur Optimierung der extrazellulären Proteinproduktion durch regulierte BRP-Coexpression.....              | 112        |
| <b>5.3</b> | <b>Extrazelluläre Produktion und Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine durch Nutzung des Maltosebindeproteins</b> ..... | <b>115</b> |
| 5.3.1      | MBP-Sekretion nach Export über <i>Sec</i> - und <i>Tat</i> -Pfad.....  | 116        |
| 5.3.2      | Extrazelluläre Produktion von MBP-Hybridproteinen .....  | 119        |
| 5.3.3      | Affinitätsreinigung extrazellulärer MBP-Fusionsproteine.....   | 130        |
| 5.3.4      | Schlussfolgerungen zur extrazellulären Produktion und Affinitätsreinigung von MBP-Hybridproteinen .....                      | 136        |

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| <b>6</b>    | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>  | <b>138</b> |
| <b>7</b>    | <b>AUSBLICK .....</b>   | <b>141</b> |
| <b>8</b>    | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>   | <b>143</b> |
| <b>9</b>    | <b>ANHANG .....</b>   | <b>160</b> |
| <b>9.1</b>  | <b>Formelzeichen und Symbole .....</b>  | <b>160</b> |
| <b>9.2</b>  | <b>Indices .....</b>  | <b>161</b> |
| <b>9.3</b>  | <b>Abkürzungen .....</b>  | <b>161</b> |
| <b>9.4</b>  | <b>Präfixe .....</b>  | <b>163</b> |
| <b>9.5</b>  | <b>Plasmide .....</b>   | <b>163</b> |
| <b>9.6</b>  | <b>Oligonukleotide (Primer) .....</b>   | <b>172</b> |
| <b>9.7</b>  | <b>Ergänzende Daten .....</b>   | <b>174</b> |
| 9.7.1       | Kultivierungsverläufe zur sekretorischen Produktion von MBP-<br>Hybridproteinen ..... | 174        |
| 9.7.2       | Korrektur der Hintergrundfluoreszenz GFP-exprimierender Kulturen .....                | 176        |
| 9.7.3       | Chromatogramme der Affinitätsreinigung verschiedener MBP-<br>Hybridproteine .....     | 177        |
| <b>9.8</b>  | <b>Chemikalien .....</b>  | <b>178</b> |
| <b>9.9</b>  | <b>Geräte .....</b>   | <b>180</b> |
| <b>10</b>   | <b>PUBLIKATIONEN .....</b>  | <b>182</b> |
| <b>10.1</b> | <b>Forschungsarbeiten .....</b>   | <b>182</b> |
| <b>10.2</b> | <b>Vorträge, Kurzfassungen und Poster .....</b>                                       | <b>182</b> |
| <b>11</b>   | <b>DANKSAGUNG .....</b>   | <b>183</b> |

### **Definitionen**

In der Literatur finden sich vielfältige Begriffe, die den Proteintransport innerhalb von Zellkompartimenten, über Zellmembranen oder in die extrazelluläre Umgebung von Bakterien beschreiben und teilweise kontrovers verwendet werden. Desvaux *et al.* haben Terminologien für bakterielle Proteintransportvorgänge vorgeschlagen, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht ausnahmslos adäquat erscheinen (Desvaux *et al.*, 2004). Aus diesem Grund werden kurze Definitionen einiger zentraler Begriffe des Proteintransportes gegeben, die nachfolgend Verwendung finden.

Die **Translokation** bezeichnet eine aktive Ortsveränderung von Proteinen und wird für den gerichteten Transport über eine Membran verwendet. Da gerichtete Translokation in *Escherichia coli* nur über die innere Membran erfolgt, beschreibt der Begriff den Transport in das Periplasma. Der **Export** ist ein ebenfalls aktiver Transportvorgang und daher gleichermaßen dem Proteintransport in das Periplasma vorbehalten.

**Sekretion, Exkretion** und **Freisetzung/Freilassung** beschreiben im Rahmen dieser Arbeit eine ungerichtete Absonderung zellulärer Proteine an die extrazelluläre Umgebung von *E. coli* und werden synonym verwendet.

# 1 Einleitung

Das GRAM-negative Enterobakterium *Escherichia coli* gehört zu den bedeutendsten Organismen, die in der biotechnologischen Produktion rekombinanter Proteine ihren Einsatz finden. Solche Proteine können beispielsweise pharmazeutische Produkte, als bekannteste Beispiele sind hier Insulin und  $\beta$ -Interferon zu nennen, technische Enzyme für die Biokatalyse oder Futtermitteladditive sein. Insbesondere seit dem jüngsten Aufschwung der „weißen (industriellen) Biotechnologie“ haben rekombinante Proteine an akademischer und ökonomischer Relevanz gewonnen. Neben der Kultivierbarkeit zu hohen Zelldichten, den kurzen Generationszeiten, der Genügsamkeit bezüglich der Ansprüche an Nährmedien sowie der einfachen genetischen Modifizierbarkeit bietet das Darmbakterium *E. coli* noch weitere Vorzüge, die ihm zu einer Ausnahmestellung verholfen haben. So ist die sichere und unkomplizierte Nutzung vieler Stämme durch Einstufung in die Sicherheitsstufe 1 (§7(1); GenTG) möglich, da von ihnen „kein Risiko für die menschliche Gesundheit und Umwelt“ ausgeht. Die vollständige Sequenzierung des Genoms stellt darüber hinaus eine entscheidende Grundlage für sich ständig erweiternde Ansätze zur gezielten Steuerung zellulärer Stoffflüsse (*metabolic engineering*) dar.

Diese Vorzüge können jedoch einen grundlegenden Nachteil nicht bedingungslos kompensieren: die ausschließlich intrazelluläre Proteinakkumulation, welche einen Zellaufschluss in Verbindung mit der Proteingewinnung zwingend erforderlich macht. Neben dem obligatorischen Zellaufschluss und der Kontamination des Produktes durch Wirtsproteine sowie andere zelleigene Stoffe bringt die intrazelluläre Lokalisation weitere entscheidende Nachteile mit sich. So unterliegen cytoplasmatische Proteine aufgrund der unzureichenden Trennung von zellulären Proteasen einer erhöhten Proteolyse und neigen darüber hinaus zur Bildung unlöslicher Proteinaggregate, sog. Einschlusskörper (*inclusion bodies*). Solche *inclusion bodies* sind in der Regel biologisch inaktiv und die unerwünschte Folge einer häufig angestrebten starken Proteinexpression, die maximale Ausbeuten garantieren soll. Die Rückfaltung eingeschlossener Proteine in ihre biologisch aktive Konformation erfordert, sofern möglich, meist ein kosten- und zeitintensives De- und Renaturierungsprozedere, das nicht selten mit hohen Produktverlusten verbunden ist.

Demzufolge bedeutet eine Sekretion rekombinanter Proteine in das Medium, d.h. deren extrazelluläre Produktion, eine deutliche Vereinfachung für die Gewinnung, Isolierung und Reinigung der Produkte. Der Zellaufschluss wird obsolet und durch die einfache Fest-Flüssig-Trennung von Zellen und Medium kann bereits ein Großteil verunreinigender Substanzen

entfernt werden. Weitergehend ist die Neigung zur Bildung von *inclusion bodies* reduziert, da diese vorwiegend im Cytoplasma der Zellen entstehen.

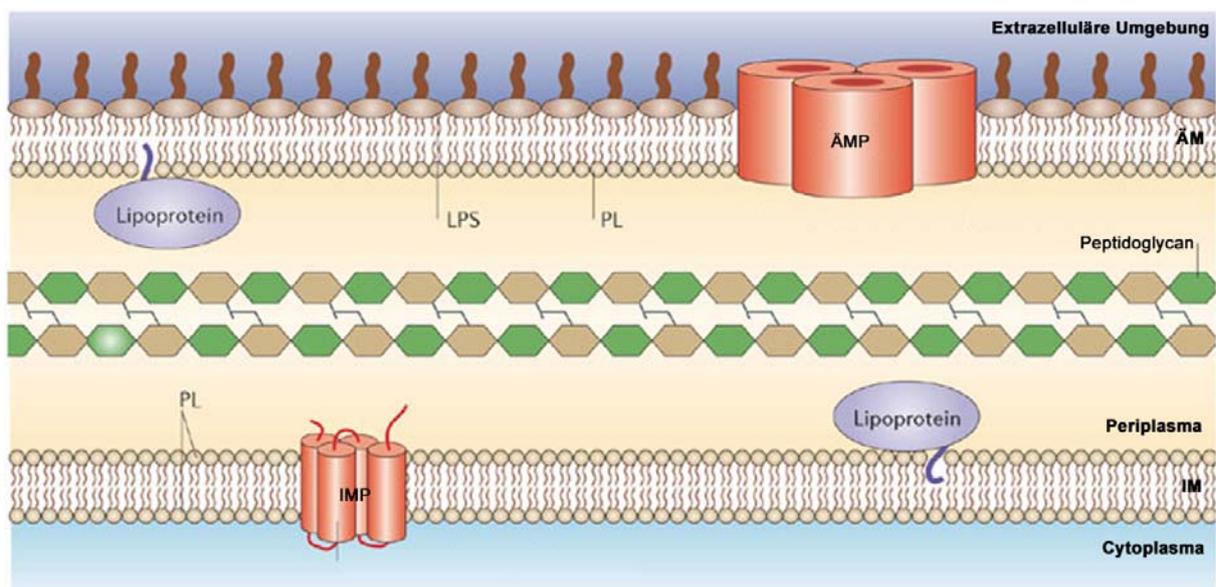
Die Lokalisation von Proteinprodukten stellt demnach einen kritischen Faktor für ihre Gewinnung dar. Sie sollte bei der Planung moderner Produktionsprozesse entsprechend berücksichtigt werden und ist zentraler Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit. Die Ziele dieser Arbeit werden im Anschluss an die nachfolgende theoretische Einführung in die Thematik erläutert (Abschnitt 3).

## 2 Theorie

Dieses Kapitel behandelt die theoretischen Grundlagen der Arbeit und gibt einen Überblick über den aktuellen Forschungs- und Wissensstand bezüglich des Proteintransports und der Proteinsekretion in GRAM-negativen Bakterien.

### 2.1 *Escherichia coli* – Aufbau der Zellhülle

Die Zellhülle GRAM-negativer Bakterien ist aus zwei Zellmembranen aufgebaut, die beidseitig der festen Zellwand aus Peptidoglycan angeordnet sind und den periplasmatischen Raum abgrenzen. Abb. 2.1 zeigt einen schematischen Aufbau der Zellhülle.



**Abb. 2.1 Schematischer Aufbau der Zellhülle GRAM-negativer Bakterien.** IM, innere Membran; ÄM, äußere Membran; IMP, inneres Membranprotein; ÄMP, äußeres Membranporin; LPS, Lipopolysaccharid; PL, Phospholipid; Erklärungen erfolgen im Text. Die Abbildung wurde aus der Literatur entnommen und modifiziert (Ruiz *et al.*, 2006).

Dabei trennt die innere Membran Cytoplasma und Periplasma, während die äußere Membran die Zelle von der extrazellulären Umgebung abgrenzt. Beide Membranen bestehen aus Lipid-Doppelschichten, wobei die innere Membran ausschließlich aus Phospholipiden und die äußere jeweils zur Hälfte aus Phospholipiden und Lipopolysacchariden zusammengesetzt ist. Sie enthalten diverse integrale (z.B. Kanalproteine und Porine; in Abb. 2.1 als IMP und ÄMP dargestellt) sowie oberflächenassoziierte Proteine, die unter anderem für den ge-

richteten Stofftransport (*Carrier*) verantwortlich sind oder die Membranen in der Peptidoglycanschicht verankern (Lipoprotein).

## 2.2 *Escherichia coli* – Proteinexportssysteme

Seine Zellwand verleiht dem Organismus *E. coli* mechanische Stabilität und erlaubt, aufgrund ihrer porösen Struktur, eine weitgehend ungehinderte Passage von Substanzen unterschiedlicher Größenspektren. Die beiden flexiblen Zellmembranen stellen hingegen Barrieren für den Im- und Export verschiedenster Substanzen dar. Diese bieten den Zellen einerseits Schutz vor unbeabsichtigtem Stoffaustausch, bereiten jedoch andererseits Komplikationen bei der sekretorischen Proteinproduktion.

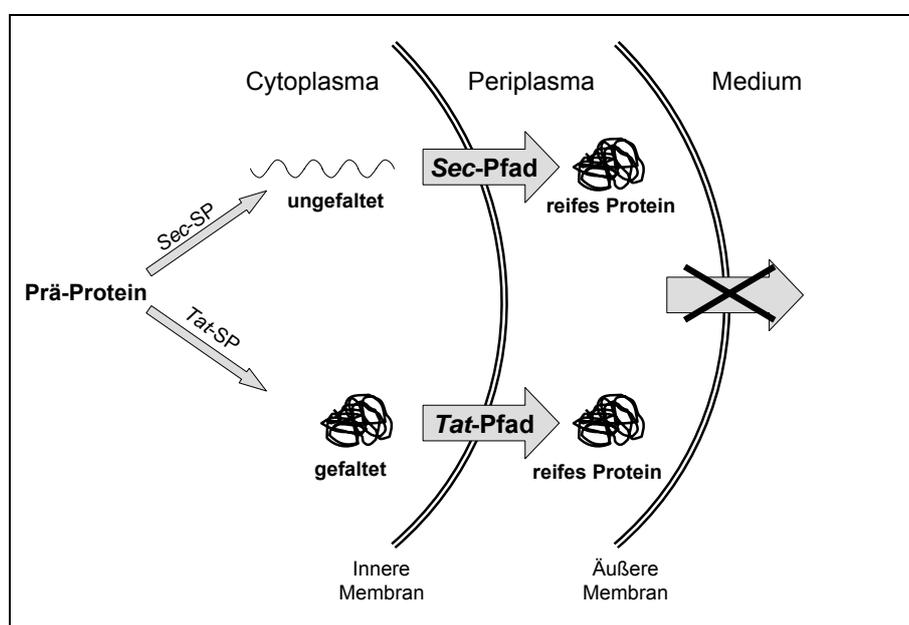
Da die Proteinsynthese an den cytoplasmatisch lokalisierten Ribosomen erfolgt, benötigt die Zelle spezielle Systeme, welche einen gerichteten und effizienten Proteintransport über die Membranen zu Funktionsorten außerhalb des Cytoplasmas gewährleisten. Dazu verfügen GRAM-negative Bakterien über die in unterschiedlichen, in Tabelle 2.1 zusammengefassten Transportsysteme, von denen einige nur in bestimmten Spezies, nicht jedoch in *E. coli* vorhanden sind. Beispiele hierfür sind die sog. Typ IV und Typ V Sekretionssysteme, sowie der „*main terminal branch*“ des Typ II Sekretionssystems. Transportsysteme, die ausschließlich in anderen GRAM-negativen Bakterien vorkommen, haben im Rahmen dieser Arbeit keine Relevanz. Für eine Revision dieser Systeme sei daher an eine andere Stelle verwiesen (Thanassi & Hultgren, 2000).

**Tabelle 2.1 Typisierung der verschiedenen Proteinsekretionssysteme GRAM-negativer Bakterien.**

| Typ | Eigenschaften / Mechanismus   | Prototyp / Funktion  |
|-----|---|--|
| I   | Trans-Zellhüllen-ABC-Transporter                                    | $\alpha$ -Hämolytase-Sekretion                                       |
| II  | „ <i>Main terminal branch</i> “ des GSP / Porin der äußeren Membran | Pullulanase-Sekretion durch <i>Klebsiella</i>                        |
| III | Pilus-förmiger Transzellhüllen-transporter                          | Begeißelung;<br>Injektion von Virulenzfaktoren durch <i>Yersinia</i> |
| IV  | Pilus-förmiger Transzellhüllen-transporter                          | Pertussis-Toxin-Injektion durch <i>Bacillus pertussis</i>            |
| V   | Porin der äußeren Membran   | IgA1-Toxin-Sekretion durch <i>Neisseria gonorrhoeae</i>              |

Grundsätzlich kann zwischen Systemen unterschieden werden, die Proteine nur über eine der beiden Zellmembranen transportieren und solchen, die einen direkten Proteintransport durch die gesamte Zellhülle erlauben.

In nicht-pathogenen *E. coli*-Stämmen existieren keine effizienten Systeme, die einen gerichteten, einstufigen Proteintransport durch die gesamte Zellhülle erlauben (Pugsley *et al.*, 1997; Sandkvist & Bagdasarian, 1996). Aus diesem Grund wird zur Proteinsekretion häufig eine Zwei-Schritt-Strategie gewählt, bei der die Proteine zunächst aktiv über die innere Membran in das Periplasma exportiert und anschließend durch unterschiedliche Verfahren aus dem Periplasma in die extrazelluläre Umgebung entlassen werden. Auch im Rahmen dieser Arbeit wird auf diese Vorgehensweise zurückgegriffen. Gemäß Abb. 2.2 stellt *E. coli* für den Proteintransport über die innere Membran mit dem Sec- und Tat-Pfad zwei Translokationsmaschinerien zur Verfügung, die auch für Fremdproteine genutzt werden können und in diesem Kapitel näher gehend vorgestellt werden.



**Abb. 2.2 Proteinmembrantransport in *E. coli*.** Nach der Translation werden Prä-Proteine anhand spezifischer Signalpeptide (SP) zu den Translokasen des Sec- oder Tat-Pfades geführt und über die innere Membran in das Periplasma exportiert. Bei Sec-Translokation erfolgt die Proteinfaltung nach dem Export, bei Tat-Translokation vorher. Eine aktive Sekretion in das Medium ist mangels entsprechender Systeme in der äußeren Membran nicht möglich.

In der äußeren Membran bietet *E. coli*, im Gegensatz zu anderen GRAM-negativen Bakterien, keine nativen Proteinexportsysteme. Die Entlassung periplasmatischer Proteine muss demnach auf andere Weise erfolgen. Der Umgang mit diesem Problem ist Gegenstand des Abschnittes 2.3.

*E. coli*-eigene Membrantransporter, die bislang im Sinne einer Anwendung für die sekretorische Proteinproduktion nicht überzeugen konnten, finden im Rahmen dieser Arbeit keine Berücksichtigung und werden aufgrund der Vollständigkeit in Abschnitt 2.2.3 als weitere Mechanismen einführend erläutert.

## 2.2.1 Der generelle Sekretionspfad (Sec)

Der generelle Sekretionspfad, auch *Sec*-Pfad (*Secretion pathway*) genannt, ist das bedeutendste und darüber hinaus am besten untersuchte Proteinexportsystem der inneren Membran GRAM-negativer Bakterien (Danese & Silhavy, 1998; Economou, 1999; Pugsley, 1993).

Nach deren Translation werden die Proteine in einem ungefalteten, exportkompetenten Stadium gehalten, zur inneren Membran geleitet und in das Periplasma transportiert, wo die endgültige Assemblierung erfolgt.

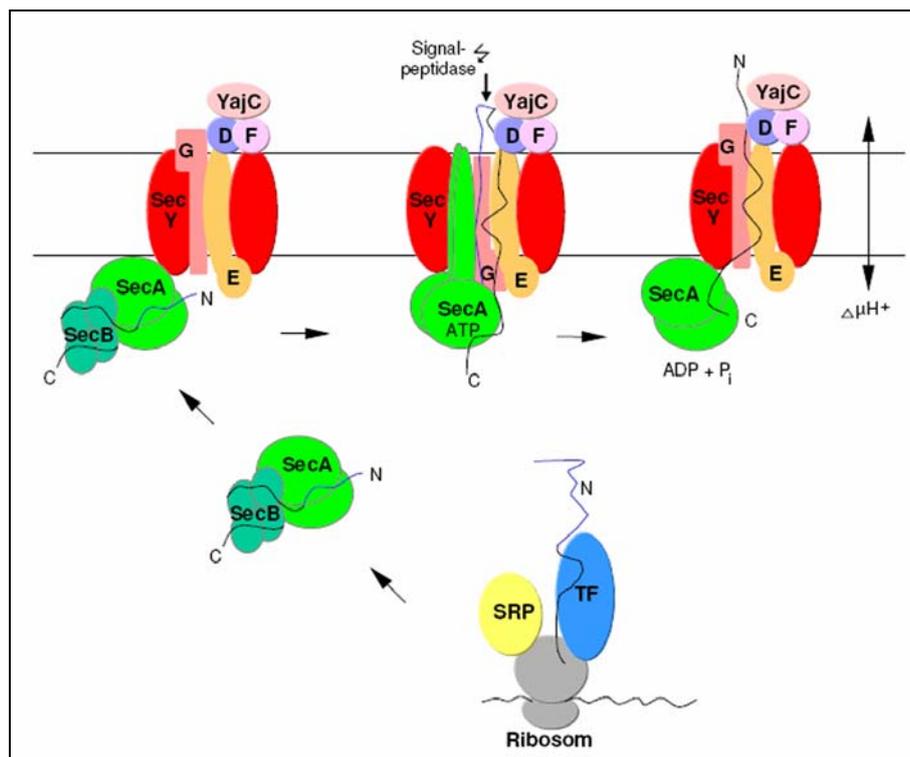
*Sec*-Substrate zeichnen sich durch 18-30 Aminosäuren umfassende Signalpeptide (SP) aus, die am N-Terminus des Proteins lokalisiert sind und ihre spezifische Erkennung gewährleisten. In Abb. 2.3 ist der Aufbau dieser SP dargestellt.



**Abb. 2.3** Schematischer Aufbau eines *Sec*-Signalpeptids mit n-, h- und c-Region am N-Terminus eines Prä-Proteins. Die Spaltstelle der Signalpeptidase ist durch das Blitzsymbol gekennzeichnet. Die Abbildung wurde aus der Literatur entnommen und modifiziert (Meißner, 2005).

Im Verlauf der Translokation werden diese Signalpeptide durch Signalpeptidasen, die als integrale Proteine der inneren Membran vorliegen (Paetzel *et al.*, 1998), anhand spezifischer Erkennungssequenzen abgespalten (prozessiert), wodurch die Vorläufer- oder Prä(kursor)-Proteine in ihre reife Form überführt werden. Sie bestehen aus drei konservierten Motiven (Cristobal *et al.*, 1999a; Izard & Kendall, 1994): einem basischen, positiv geladenen N-terminalen Abschnitt (n-Region), einem zentralen, hydrophoben  $\alpha$ -helikalen Segment (h-Region) und einem hydrophilen, C-terminalen Abschnitt, der die Schnittstelle der Signalpeptidase beinhaltet (c-Region).

An der Translokation *Sec*-abhängiger Proteine sind mindestens acht Proteine beteiligt, die in drei eigenständigen Komplexen (SecAB, SecYEG und SecDF/YajC) organisiert sind. Abb. 2.4 erläutert den Ablauf der *Sec*-Translokation und die Beteiligung dieser Proteinkomplexe.



**Abb. 2.4 Schematischer Ablauf der Sec-Translokation.** SecABDEFGY/YajC, Proteine des Sec-Translokons; SRP, *signal recognition particle*; TF, *trigger factor*. Erläuterungen erfolgen im Text. Die Abbildung wurde aus der Literatur entnommen und modifiziert (Beha, 2003).

Noch während der ribosomalen Synthese verhindert ein *trigger factor* (TF) die frühzeitige Faltung naszierender Proteine und hält diese in einer transportkompetenten Konformation (Beck *et al.*, 2000). Dies ermöglicht eine Übernahme des ungefalteten Proteins durch das Chaperon SecB und verhindert gleichzeitig die Bindung des Sec-Substrats an das mit dem Sec-Pfad konkurrierende *signal recognition particle* (Hesterkamp *et al.*, 1996) (siehe auch Abschnitt 2.2.3).

SecB ist ein cytoplasmatisches Homotetramer, das in der Funktion eines exportspezifischen Chaperons agiert. Es stabilisiert die ungefaltete Form von Sec-Substraten (Watanabe & Blobel, 1989) und verhindert dadurch die Faltung in eine exportinkompetente Form (Collier *et al.*, 1990). Nach der Translation tragen die Signalpeptide zunächst selbst zu einer Verzögerung der Faltung bei und verschaffen SecB dadurch Zeit für die Bindung (MacIntyre *et al.*, 1991). Da SecB auch an denaturierte Proteine bindet, wird davon ausgegangen, dass dessen Interaktion mit Sec-Vorläuferproteinen nicht von der Spezifität ihrer Signalpeptide abhängt (Randall *et al.*, 1997). Darüber hinaus vermittelt SecB die Übergabe des transportierbaren Proteins an SecA, die periphere Untereinheit der Sec-Translokase, welche eine Bindestelle hoher Affinität für SecB aufweist und die spezifische Erkennung des Signalpeptids übernimmt (Fekkes *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1998).

SecA fungiert als homodimeres *Shuttle*-Protein zwischen Cytoplasma und Cytoplasmamembran und geleitet den Komplex aus Präprotein, SecB und SecA zur membranintegralen Translokationspore SecYEG (Duong *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 1997; Nishiyama *et al.*, 1999). Nach Adsorption des Komplexes an den Translokationsapparat wird der Translokationsprozess initiiert. Dabei übernimmt SecA zunächst das Vorläuferprotein von SecB, wodurch dieses nicht länger benötigt und aus dem Komplex entlassen wird (Fekkes *et al.*, 1998; Fekkes *et al.*, 1997). SecA verfügt über zwei ATP-Bindestellen unterschiedlicher Affinität und nutzt die Energie des ATP um den Membrantransport anzutreiben (Economou *et al.*, 1995; Economou & Wickner, 1994). Dies geschieht in einem wiederholten zweistufigen Prozess (Economou & Wickner, 1994; Matsumoto *et al.*, 1998; Matsumoto *et al.*, 1997; van der Wolk *et al.*, 1998): (1) Die ATP-Bindung führt zu einer Rekonfiguration von SecA, die dem Protein eine Insertion in die proteinöse Ringstruktur aus SecY und SecE ermöglicht, welche die SecA/Präprotein-Struktur vor den hydrophoben Bedingungen der Membran schützt (Joly & Wickner, 1993). Dabei wird das Präprotein teilweise in das Periplasma transferiert und das Signalpeptid durch die Signalpeptidase abgespalten. (2) Unter Hydrolyse des gebundenen ATPs erfolgt eine Deinsertion von SecA aus dem SecYE-Ring, während der das Substrat seine Position nicht verändert. Durch wiederholte ATP-Bindung und SecA-Insertion/Deinsertion wird das Zielprotein somit schrittweise in das Periplasma transloziert und beginnt dort mit der Faltung. Dieser ATP-getriebene SecA-Zyklus wird durch die Protonen-motorische-Kraft ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) zusätzlich stimuliert (Nishiyama *et al.*, 1999).

Während des Translokationsprozesses erfolgt simultan zum SecA-Zyklus eine gekoppelte, alternierende Topologieinversion des mit SecYE assoziierten Proteins SecG (Nishiyama *et al.*, 1996). Diese vereinfacht den Insertions-/Deinsertionsprozess, stellt jedoch keine zwingende Voraussetzung für den Transport dar (Bost & Belin, 1997). Auch die Mitwirkung des SecDF-Komplexes ist eher unterstützend als essentiell. SecDF stabilisiert membraninsertiertes SecA und verhindert dadurch eine frühzeitige, revers orientierte Deinsertion des Substrats. Dies erhöht die Effizienz des Transportvorgangs (Duong & Wickner, 1997).

Durch Fusion Sec-abhängiger Signalpeptide an den N-Terminus rekombinanter Proteine können diese, unter Voraussetzung der Kompatibilität mit der Translokase, in das Periplasma gelangen. Einige Beispiele für die erfolgreiche Sec-Translokation rekombinanter Proteine in *E. coli* sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

**Tabelle 2.2** Einige Beispiele für die Sec-Translokation rekombinanter Proteine. (tPA, *tissue plasminogen activator*; hGH, *human growth hormone*)

| Protein           | Ursprung | (Referenz)                       |
|-------------------|----------|----------------------------------|
| hGH               | human    | (Uchida <i>et al.</i> , 1997)    |
| Cytochrom P4501A1 | human    | (Kaderbhai <i>et al.</i> , 2000) |
| Endostatin        | murin    | (Xu <i>et al.</i> , 2002)        |
| tPA               | human    | (Qiu <i>et al.</i> , 1998)       |
| Interleukin-2     | human    | (Halfmann <i>et al.</i> , 1993)  |
| Proinsulin        | human    | (Mergulhao <i>et al.</i> , 2003) |

### 2.2.2 Die Zwillingsarginin-Translokation (*Tat*)

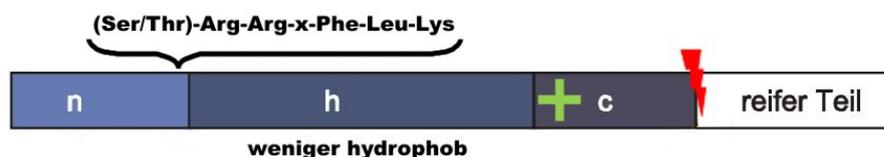
Die Zwillingsarginin-Translokation (*twin arginine translocation, Tat*) ist neben dem Sec-Pfad das zweite Proteintransportsystem in der Cytoplasmamembran von *E. coli*. Da die Existenz dieses Translokationspfades erst seit einigen Jahren bekannt ist, steht eine abschließende Aufklärung seines Transportmechanismus' noch aus.

Der zentrale Unterschied zum Sec-Pfad besteht in der Fähigkeit des *Tat*-Pfades vollständig gefaltete Proteine zu exportieren. Natürliche Substrate des *Tat*-Pfades sind häufig Cofaktor-führende Redoxproteine, die eine Chaperon-assistierte, cytoplasmatische Assemblierung erfordern. Auch heterooligomere Proteine, von denen nur eine Untereinheit über ein Signalpeptid verfügt, werden durch den *Tat*-Pfad exportiert (Rodrigue *et al.*, 1999). In beiden Fällen ist eine Translokation durch den Sec-Pfad, mit anschließender Assemblierung im Periplasma, nicht möglich. Wiederum andere Proteine falten zu schnell oder zu stark, um von SecB in einer elongierten Form gehalten werden zu können und erfordern die Exportkompetenz des *Tat*-Translokons (Berks, 1996).

Die Fähigkeit der Zwillingsarginin-Translokation zum Export gefalteter Proteine ist aus biotechnologischer Sicht von besonderer Relevanz, da mit dem *Tat*-Pfad ein alternatives Exportsystem für solche Proteine zur Verfügung steht, die keine periplasmatische Faltung erlauben und daher nach Transport über den Sec-Pfad keine biologische Aktivität erlangen.

*Tat*-Substrate verfügen über N-terminale Signalpeptide, die durch ihre n-, h- und c-Region eine homologe dreiteilige Struktur im Vergleich zu Sec-Signalpeptiden aufweisen (Abb. 2.5). Sie werden demnach ebenfalls als Vorläuferproteine synthetisiert, die noch einer abschließenden Prozessierung durch Signalpeptidasen bedürfen. *Tat*-SP tragen im Gegensatz zu Sec-SP im Übergangsbereich zwischen n- und h-Region ein charakteristisches und hochkonserviertes Sequenzmotiv, in dem zwei invariante und unmittelbar benachbarte Arginine vorkommen, denen der Translokationspfad seinen Namen verdankt (Berks *et al.*, 2000; Sar-

gent *et al.*, 1998). Sequenzanalysen verschiedener *Tat*-SPs ermöglichten die Identifikation des Konsensus-Erkennungsmotivs (S/T)-R-R-x-F-L-K in dem, neben den beiden invarianten Argininen, die übrigen Aminosäuren mit einer Häufigkeit von mindestens 50% vertreten sind (Berks, 1996).

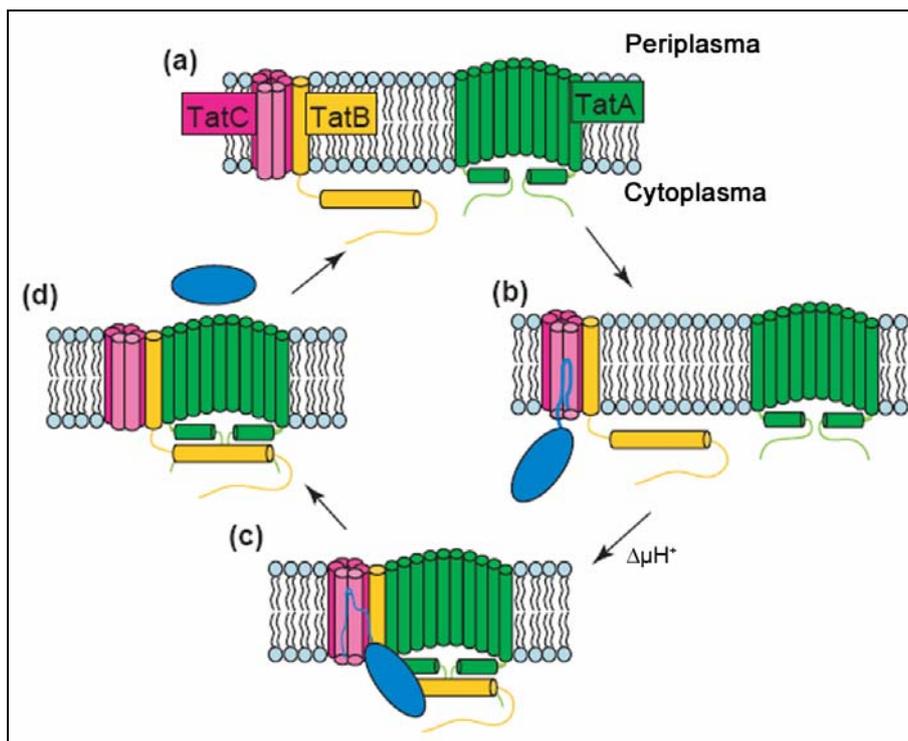


**Abb. 2.5 Schematischer Aufbau eines *Tat*-Signalpeptids** am N-Terminus eines Prä-Proteins. Die n-Region beinhaltet das charakteristische Doppelarginin-Motiv. Die h-Region ist im Vergleich zu *Sec*-SP weniger hydrophob und die c-Region positiv geladen. Die Spaltstelle der Signalpeptidase ist durch das Blitzsymbol gekennzeichnet. Die Abbildung wurde aus der Literatur entnommen und modifiziert (Meißner, 2005).

Mit einer Länge von durchschnittlich 40 bis maximal 58 Aminosäuren sind *Tat*-SP deutlich länger als die *Sec*-abhängiger Proteine (Bokranz *et al.*, 1991; Cristobal *et al.*, 1999a). Neben dem essentiellen RR-Motiv bestehen weitere Unterschiede zwischen *Sec*- und *Tat*-SP, die den beiden Membrantransportern eine Unterscheidung erlauben. So ist die zentrale h-Region von *Tat*-SP weniger hydrophob und die hydrophile c-Region wesentlich polarer sowie positiv geladen (Cristobal *et al.*, 1999a; Wexler *et al.*, 1998). Diese positive Ladung entscheidet letztlich über die Favorisierung der *Tat*-Route, da die *Sec*-Translokation keine basischen Aminosäuren im C-terminalen Bereich von SP erlaubt (Geller *et al.*, 1993). Sie stellt somit ein „*Sec*-Verhinderungs“ (*Sec-avoidance*)-Motiv dar (Blaudeck *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2000). Demzufolge wird die Wahl des Translokationspfades nicht allein durch das RR-Motiv bestimmt.

An der *Tat*-Translokation sind die vier Proteine TatA, TatB, TatC, und TatE beteiligt (Berks *et al.*, 2003). Diese Proteine werden konstitutiv synthetisiert, was die physiologische Relevanz des Transportsystems dokumentiert (Jack *et al.*, 2001). TatE ist ein zu TatA homologes Protein, das für die Translokation nur in Abwesenheit oder bei Defekt von TatA benötigt wird (Sargent *et al.*, 1998). Mit TatD existiert noch ein weiteres Protein, das jedoch nicht Bestandteil der *Tat*-Translokase ist, sondern eine cytoplasmatische Desoxyribonuklease darstellt (Wexler *et al.*, 2000).

Abb. 2.6 zeigt die Organisation der *Tat*-Translokase in der Cytoplasmamembran und beschreibt den Ablauf der Translokation.



**Abb. 2.6 Schematischer Ablauf der *Tat*-Translokation.** (a) Organisation der *Tat*-Proteine *TatABC* in der Cytoplasmamembran in inaktivem Zustand. (b) Erkennung und Bindung des SP eines *Tat*-Substrats (blau) durch *TatBC*. (c) Assoziation von *TatBC*/Präprotein mit *TatA*, getrieben durch die Protonen-motorische-Kraft ( $\Delta\mu H^+$ ). (d) Translokation des *Tat*-Substrats durch die variable *TatA*-Pore und Abspaltung des SP. Die Dissoziation von *TatBC*-Komplex und *TatA*-Oligomer überführt die Translokase wieder in den Ausgangszustand. Die Abbildung wurde aus der Literatur entnommen und modifiziert (Palmer *et al.*, 2005).

Die *Tat*-Proteine bestehen aus ein bis sechs  $\alpha$ -Helices, welche die Proteine in der Membran verankern. Im ruhenden Zustand, d.h. in Abwesenheit von *Tat*-Substraten, liegen Komplexe aus je einem Molekül *TatB* und *TatC* solitär vor (Bolhuis *et al.*, 2001; de Leeuw *et al.*, 2002; Sargent *et al.*, 2001). Bei Erkennung und Bindung eines *Tat*-Substrates durch den *TatBC*-Komplex (Buchanan *et al.*, 2002; Jongbloed *et al.*, 2000) erfolgt eine Assoziation mit der aus *TatA*-Oligomeren bestehenden Translokationspore, die durch die Protonen-motorische-Kraft ( $\Delta\mu H^+$ ) angetrieben wird. In Abhängigkeit der Größe des zu exportierenden Proteins werden zunehmend *TatA*-Moleküle durch das Translokon rekrutiert, so dass eine Pore variablen Durchmessers entsteht, die den Transport gefalteter Proteine über ein weites Größenspektrum erlaubt (Mori & Cline, 2002).

Die Energetisierung des *Tat*-Translokons erfolgt ausschließlich durch den Protonengradienten über die Cytoplasmamembran, so dass eine ATP-Hydrolyse wie beim *Sec*-Transport nicht erfolgt (Alami *et al.*, 2002; Mould & Robinson, 1991). Aus diesem Grund arbeitet der *Tat*-Apparat wesentlich langsamer als die *Sec*-Translokase und wird durch die Zelle, trotz des geringeren Energiebedarfs, weniger frequent genutzt (Santini *et al.*, 1998). Bioinformati-

sche Sequenzanalysen ergaben, dass nur ca. 6% aller bekannten oder vorhergesagten Zellhüllenproteine über *Tat*-Signalpeptide verfügen (Palmer *et al.*, 2005).

Analog zum *Sec*-Pfad kann auch der *Tat*-Pfad für die periplasmatische Produktion rekombinanter Proteine durch N-terminale Fusion eines *Tat*-SPs genutzt werden. Tabelle 2.3 enthält eine beispielhafte Auflistung einiger heterologer Proteine, die durch den *Tat*-Apparat erfolgreich transloziert werden.

**Tabelle 2.3** Einige Beispiele für die *Tat*-Translokation rekombinanter Proteine. (hGH, *human growth hormone*)

| Protein                | Ursprung                    | (Referenz)  |
|------------------------|-----------------------------|---|
| hGH                    | human                       | (Hsiung <i>et al.</i> , 1989)   |
| Alkalische Phosphatase | <i>Thermus thermophilus</i> | (Angelini <i>et al.</i> , 2001)   |
| Maltosebindeprotein    | <i>E. coli</i>              | (Blaudeck <i>et al.</i> , 2003)   |
| GFP                    | <i>Aequorea victoria</i>    | (Barrett <i>et al.</i> , 2003; Santini <i>et al.</i> , 2001; Thomas <i>et al.</i> , 2001) |
| $\beta$ -Glycosidase   | <i>Thermus thermophilus</i> | (Gerard <i>et al.</i> , 2002)   |
| $\beta$ -Galaktosidase | <i>E. coli</i>              | (Stanley <i>et al.</i> , 2002)  |

In Fusionsstudien mit heterologen Reporterproteinen und *Tat*-SP wurde gezeigt, dass diese nach inkorrektter Faltung nicht in das Periplasma transportiert werden (DeLisa *et al.*, 2003), während ein Transport unzureichend gefalteter nativer *Tat*-Substrate weiterhin möglich ist (Hynds *et al.*, 1998). Für einige Cofaktor-führende *Tat*-Substrate konnten cytoplasmatische Chaperone identifiziert werden, die spezifisch an deren Signalpeptide binden (Jack *et al.*, 2004; Oresnik *et al.*, 2001; Pommier *et al.*, 1998). Durch Abschirmung der SP verhindern sie eine Interaktion der Präproteine mit der *Tat*-Translokase bevor die Cofaktor-Insertion abgeschlossen ist (Hatzixanthis *et al.*, 2005; Sargent *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde für die *Tat*-Translokation sowohl ein Mindestmaß an Faltung, als auch eine interne Qualitätskontrolle postuliert (DeLisa *et al.*, 2003).

### 2.2.3 Weitere Proteintransportmechanismen

Neben den bereits vorgestellten Proteinexportmechanismen existieren in *E. coli* noch weitere Transportsysteme, die theoretisch für die sekretorische Produktion rekombinanter Proteine genutzt werden können. Sie sind jedoch entweder nicht universell einsetzbar, auf bestimmte pathogene *E. coli*-Stämme beschränkt, oder aufgrund einer geringen Transporteffizienz nur wenig geeignet und haben daher bislang keine vergleichbare Beachtung, wie die bereits beschriebenen Systeme erfahren.

### **Das Signal Recognition Particle (SRP)**

Das SRP steht in Konkurrenz bzw. in Komplementation zum ersten Abschnitt des Sec-Pfades (Luirink & Sinning, 2004). Es besteht aus dem Ffh-Protein und einer 4,5 S RNA (Poritz *et al.*, 1990). Das SRP kann SP-exponierende Proteine unmittelbar nach der Translation übernehmen, sofern diese nicht durch den *trigger factor* gebunden werden (Hesterkamp *et al.*, 1996) und dadurch in den Sec-Pfad gelangen. Das SRP vermittelt einen Transport zur Cytoplasmamembran, in dem es spezifisch an das membranintegrale Protein FtsY bindet (Gill & Salmond, 1990). Die meisten Substrate des SRP sind Proteine, die nach dem Kontakt von SRP und FtsY in die Cytoplasmamembran integriert werden (Cristobal *et al.*, 1999b). Das SRP kann seine „Fracht“ jedoch auch an die SecYEG-Pore weiterleiten und damit eine SecB-analoge Funktion übernehmen. Demnach kann das SRP einen Teil des Sec-Pfades komplementieren, wenn SecB nicht zur Verfügung steht. Im Sinne einer sekretorischen Proteinproduktion bietet es keine Vorteile gegenüber dem Sec-Pfad.

### **Die $\alpha$ -Hämolyisin-Sekretion (Typ I)**

Die  $\alpha$ -Hämolyisin-Sekretion gehört zur Gruppe der Typ I Sekretionssysteme und ist auf bestimmte pathogene *E. coli*-Stämme beschränkt (Binet *et al.*, 1997). In diesen Stämmen wird das Humantoxin  $\alpha$ -Hämolyisin aus dem Cytoplasma direkt in das Medium entlassen (Wandersman & Delepelaire, 1990). Der Transport erfolgt durch einen ABC-Transporter (ABC, *ATP binding cassette*), der die gesamte Zellhülle durchspannt und das Substrat anhand eines spezifischen C-terminalen Signalpeptids identifiziert (Thanabalu *et al.*, 1998). Aufgrund ihrer Pathogenität werden diese Stämme in der Biotechnologie bis heute gemieden. Neben weiteren Beispielen konnte die erfolgreiche Verwendung der TypI-Sekretion für die extrazelluläre Proteinproduktion anhand des humanen Interleukin 6 (Li *et al.*, 2002), der  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli* (Kenny *et al.*, 1991), der alkalischen Phosphatase aus *E. coli* (Gentshev *et al.*, 1990) und humanen *single chain-Fv*-Antikörperfragmenten (scFv) (Fernandez *et al.*, 2000) durch N-terminale Fusion an das  $\alpha$ -Hämolyisin gezeigt werden.

### **Das flagellare Typ III Sekretionssystem (TTSS)**

Das Typ III Sekretionssystem (*type three secretion system*, TTSS) dient in seiner nativen Funktion der Begeißelung von *E. coli*, d.h. der Ausbildung des Flagellums (Blocker *et al.*, 2003). Dabei werden Flagellin (FliC) und andere proteinöse Bausteine des Flagellums durch einen das Periplasma durchspannenden Proteintunnel transportiert und an das Ende des wachsenden Flagellums angeheftet (Minamino & Namba, 2004). Mutationen im FliD-Protein,

welches die abschließende Kappe des Flagellums bildet, führen zu einer unvollständigen Ausbildung der Geißel und zur FliD-Sekretion in die extrazelluläre Umgebung. Durch Fusion heterologer Proteinen an mutiertes FliD kann dieser Effekt zur sekretorischen Produktion genutzt werden (Majander *et al.*, 2005). Das Verfahren zeigt sich jedoch nicht universell einsetzbar, d.h. nur für den Transport bestimmter Proteine geeignet. So konnten das grünfluoreszierende Protein (vgl. Abschnitt 2.4.4), eine  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* und das Adhesin Peb1 aus *C. jejuni* erfolgreich sekretiert werden, während andere, nicht näher spezifizierte Fusionsproteine intrazellulär akkumulierten (Majander *et al.*, 2005). Darüber hinaus sind die extrazellulären Proteinkonzentrationen vergleichsweise gering ( $1\text{-}15\text{ mg L}^{-1}$ ).

### **Das YebF-Carrierprotein**

YebF ist ein kleines periplasmatisches Protein (10,8 kDa), das über den Sec-Pfad exportiert wird. Trotz seiner periplasmatischen Lokalisation werden aus bislang unbekannter Ursache jedoch nicht nur das Protein selbst, sondern auch Fusionsproteine aus YebF und heterologen Proteinen verstärkt im Medium entsprechender *E. coli*-Kulturen nachgewiesen (Zhang *et al.*, 2006). Die Sekretionseffizienz auf Basis dieses Carrierproteins zeigte sich jedoch gering, so dass der überwiegende Anteil einer rekombinanten  $\alpha$ -Amylase aus *B. subtilis* intrazellulär verblieb.

## **2.3 Freisetzung periplasmatischer Proteine**

Für die Produktion rekombinanter Proteine stellt die Periplasma-Translokation nicht nur einen wichtigen ersten Schritt auf dem Weg in das Medium dar, sondern bietet noch weitere Vorteile gegenüber einer cytoplasmatischen Expression.

So enthält das Periplasma signifikant weniger Proteasen und trägt dadurch zu einer erhöhten Stabilität des Produktes bei (Choi & Lee, 2004; Gottesman, 1996). Darüber hinaus ist die Proteinlöslichkeit im Periplasma aufgrund der abweichenden Redox-Bedingungen erhöht, was die Bildung von *inclusion bodies* signifikant reduziert (Bowden *et al.*, 1991). Des Weiteren ist die Konzentration kontaminierender Wirtsproteine im Periplasma vergleichsweise gering und beträgt nur ca. 4-8% des zellulären Gesamtproteins (Holland *et al.*, 1990). In einigen Fällen kann die Überexpression periplasmatischer Proteine, aus unbekannter Ursache, bereits zu einer anteiligen spontanen Sekretion in das Medium führen (Badyakina & Nesmeyanova, 2005; Georgiou *et al.*, 1988; Neitzel, 1999; Pages *et al.*, 1987).

Da die rein diffusive Sekretion auf sehr kleine Peptide bis ca. 600 Da begrenzt ist (Nikaido, 1992) und geeignete Proteinexportsysteme in der äußeren Membran von *E. coli* nicht ver-

füßbar sind, erfordert die Gewinnung periplasmatischer Proteine deren forcierte Freilassung, die durch in- oder externe Eingriffe erfolgen kann.

Dazu wurden unterschiedliche Verfahren entwickelt, die in der Permeabilisierung der äußeren Membran eine Gemeinsamkeit haben. Chemische, physikalische oder enzymatische Freisetzungsverfahren im Anschluss an die Kultivierung sind häufig unspezifisch und harsch und bieten aufgrund des zusätzlichen Aufwandes keinen ausschlaggebenden Vorteil gegenüber einem Zellaufschluss (Naglak *et al.*, 1990). Folglich wurde durch eine Reihe biologischer Ansätze versucht, die Membran gezielter zu permeabilisieren.

Eine Option stellen sog. *leaky*-Mutanten dar, die im Aufbau ihrer äußeren Membran gestört sind und kontinuierlich periplasmatische Proteine in das Medium sekretieren (Lazzaroni & Portalier, 1981). Diesen Stämmen liegen Defekte in der Synthese von Lipopolysacchariden, Lipoproteinen und/oder Proteinen der äußeren Membran zugrunde, die zu einer signifikanten Restriktion der Viabilität solcher *E. coli*-Stämme führen. Damit verbunden sind Probleme bei der Kultivierung dieser *leaky*-Mutanten, was ihren technischen Einsatz meist ausschließt (Ray *et al.*, 2002). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Expression membrandestabilisierender Proteine, die eine Porenbildung in der äußeren Membran hervorrufen und dadurch eine unspezifische Freisetzung periplasmatischer Protein bewirken (Baty *et al.*, 1987). Dieser Kategorie gehören beispielsweise die Bacteriocin freisetzenden Proteine (BRP) (van der Wal *et al.*, 1995b), Lyseproteine von Phagen (Dabora & Cooney, 1990) und der PAS-Faktor aus *Vibrio vulnificus* (Tokugawa *et al.*, 1994a; Tokugawa *et al.*, 1994b) an. Dabei sind BRP die am häufigsten eingesetzten Proteine. Sie werden auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt.

### 2.3.1 Bacteriocin freisetzende Proteine (BRP)

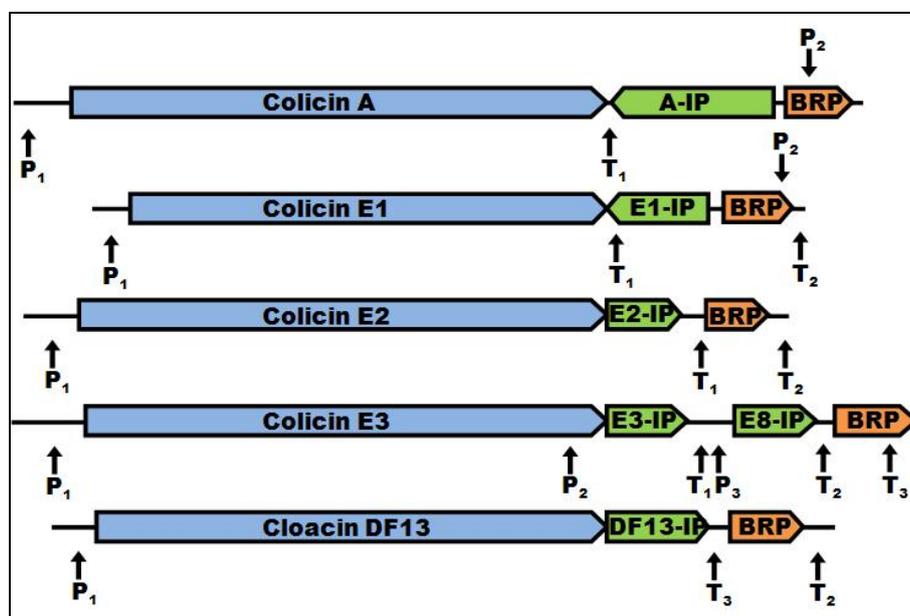
Bacteriocine sind antibiotisch wirkende Proteine, die von einigen Bakterien produziert werden. Ihre Wirkung beschränkt sich auf eng verwandte Spezies und gewährt den Bakterien Vorteile unter kompetitivem Wachstum (de Graaf & Oudega, 1986).

Es sind sechzehn unterschiedliche Bacteriocine bekannt, die aus verschiedenen Organismen stammen und nach ihrem bakteriellen Ursprung benannt sind. Die bekanntesten Vertreter sind die Colicine aus *E. coli*, die Cloacine aus *Enterobacter cloacae*, die Pesticine aus *Yersinia pestis* sowie die Vibriocine aus *Vibrio cholerae* (Brandis, 1975; Reeves, 1965). Bacteriocine unterscheiden sich nicht nur in ihrer Herkunft, sondern auch in ihrem Wirkmechanismus, d.h. der Ursache ihrer Toxizität. So finden sich unter ihnen beispielsweise Nukleasen, Lipasen und Inhibitoren der Zellwandsynthese.

Um bacteriocinogene Organismen vor der Bacteriocinaktivität zu schützen, werden diese stets in Verbindung mit spezifischen Immunitätsproteinen co-synthetisiert (van den Elzen *et al.*, 1980). Diese binden meist an die aktiven Zentren der Bacteriocine und blockieren da-

durch deren Aktivität (de Graaf & Klaasen-Boor, 1977). Da Bacteriocine ihre Toxizität erst innerhalb des Zielorganismus entfalten können, müssen sie zunächst in die extrazelluläre Umgebung sekretiert und anschließend durch die „Opfer-Zelle“ aufgenommen werden. Die Aufnahme der Bacteriocine erfolgt durch spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche, denen sie sich als Substratanaloga präsentieren (Nikaido, 1992; Nikaido, 1993).

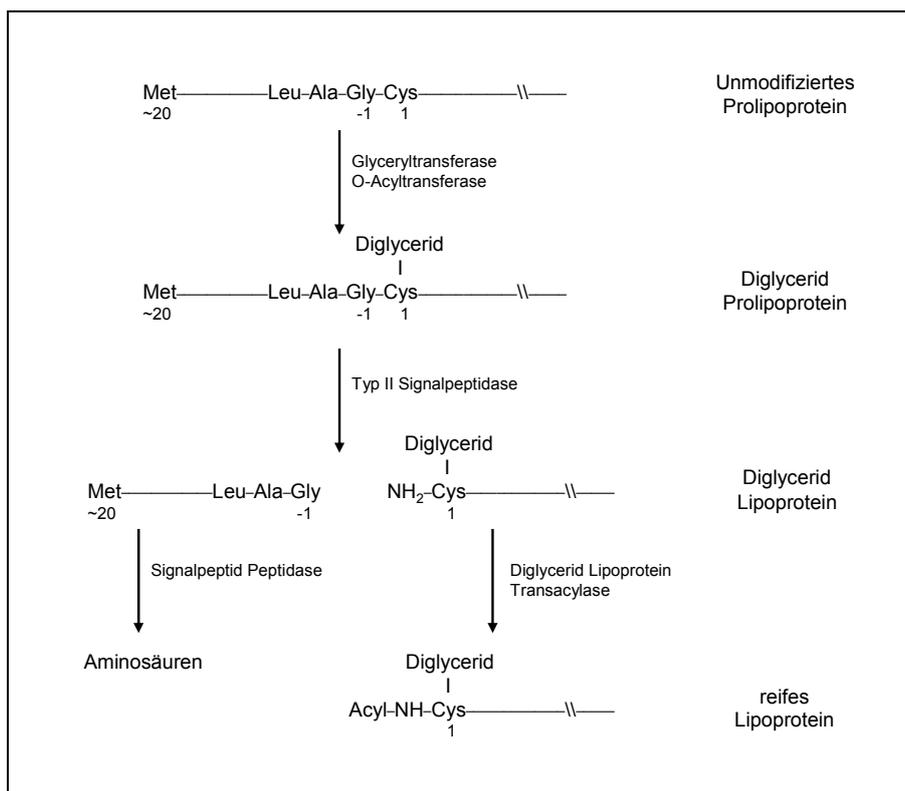
Aus biotechnologischer Sicht ist die vorherige Sekretion allerdings wesentlich interessanter. Diese geschieht unter Beteiligung sog. Bacteriocin freisetzender Proteine (*bacteriocin release proteins*, BRP), auch „Lysis“- oder „Kil“-Proteine genannt (Luirink *et al.*, 1987; Oudega *et al.*, 1982). BRP werden nach ihren zugehörigen Bacteriocinen bezeichnet. Sie sind, wie in Abb. 2.7 gezeigt, zusammen mit Bacteriocinen und Immunitätsproteinen in plasmidcodierten Genclustern organisiert und stellen somit eine optionale genetische Ausstattung ihrer Wirtsorganismen dar (de Graaf & Oudega, 1986; Pugsley, 1984).



**Abb. 2.7** Gencluster einiger Bacteriocine, ihrer Immunitätsproteine (IP) und BRP. Die Bacteriocingene sind in blau dargestellt, Immunitätsproteine in grün und BRP in orange. Die Pfeilorientierung gibt die Richtung der Transkription an. Die Expression der Bacteriocine erfolgt durch die Promotoren P<sub>1</sub>. IP und BRP werden durch die Promotoren P<sub>2</sub> und/oder P<sub>3</sub> exprimiert, insofern sie nicht ebenfalls der Regulation von P<sub>1</sub> unterliegen. T<sub>1-3</sub> geben die Transkriptionsterminatoren an. Die Aktivierung des Promotors P<sub>1</sub> und damit der Bacteriocin-Expression erfolgt durch die SOS-Antwort (Little & Mount, 1982). P<sub>2</sub> und P<sub>3</sub> sind konstitutive Promotoren. Eigene Darstellung in Anlehnung an die Literatur (van der Wal *et al.*, 1995b).

BRP weisen in ihrer Primärstruktur starke Homologien auf. So unterscheiden sich beispielsweise die reifen Anteile der Colicin E1 und Cloacin DF13 BRP in nur zwei der 28 Aminosäuren (Hakkaart *et al.*, 1981; Yamada *et al.*, 1982). Dies macht sie bezüglich der Bacteriocinfreisetzung untereinander funktionell austauschbar (Pugsley & Schwartz, 1983).

Mit einer Länge von 45-52 Aminosäuren sind BRP kleine Lipoproteine (ca. 5 kDa), die über N-terminale Signalpeptide verfügen (van der Wal *et al.*, 1995b). Sie werden über den Sec-Pfad in das Periplasma transportiert und erfahren im Zusammenhang mit der Prozessierung durch die Signalpeptidase eine Lipidmodifikation am N-Terminus des reifen Proteins. Den Ablauf der Lipoproteinreifung erläutert Abb. 2.8. (Hayashi & Wu, 1985; Wu & Tokunaga, 1986). Diese Lipidmodifikation erlaubt dem reifen BRP (ca. 3 kDa) eine Integration in die äußere Membran (Cavard *et al.*, 1989; Luirink *et al.*, 1988; Oudega *et al.*, 1984).



**Abb. 2.8 Ablauf der Lipoproteinreifung.** Nachdem ein Diglycerid auf das Cystein an der Spaltstelle des Prolipoproteins übertragen wird, kann die Typ II Signalpeptidase vor dem Cystein spalten. Durch N-terminale Acylierung wird das Diglycerid Lipoprotein in die reife Form gebracht. Die Signalpeptide werden nach Abspaltung proteolytisch verdaut. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen relativ zum Beginn des reifen Proteins an. Eigene Darstellung in Anlehnung an die Literatur (Sankaran & Wu, 1994; Wu & Tokunaga, 1986).

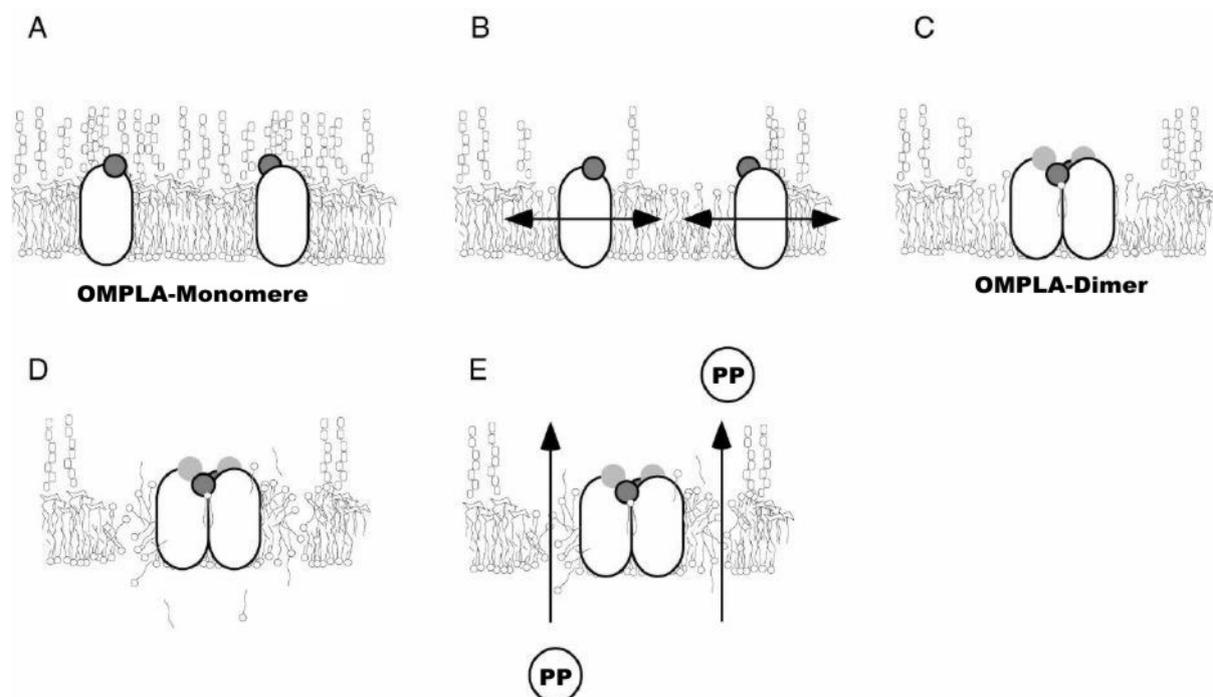
Im Gegensatz zu anderen Sec-Substraten werden Lipoproteine wie BRP durch eine alternative Signalpeptidase prozessiert. Die Reifung „normaler“ Sec- und Tat-Substrate erfolgt durch die Typ I Signalpeptidase (SPase I), welche C-terminal der spezifischen Erkennungssequenz Ala-x-Ala schneidet. Lipoproteine durchlaufen eine Prozessierung durch die Typ II SPase, welche das Konsensusmotiv Leu-Ala(Ser/Val)-Gly(Ala)-Cys, das auch als „Lipobox“ bezeichnet wird, erkennt (Tokunaga *et al.*, 1982). SPase II schneidet innerhalb der Lipobox unmittelbar vor dem Cystein. Während der Reifung wird zunächst ein Diglycerid-Rest auf das

Cystein in der Erkennungssequenz des Prolipoproteins übertragen. Diese Modifikation ist eine Voraussetzung für die Spaltung durch die SPase II, welche eine weitere Acylierung des N-terminalen Cysteins ermöglicht und die abschließende Maturation des Lipoproteins darstellt (Sankaran & Wu, 1994). Lipoproteine können sowohl in die innere als auch äußere Membran integrieren. Die Entscheidung über die finale Lokalisation wird durch die Aminosäure stromabwärts des Cysteins (Position +2) getroffen (Matsuyama *et al.*, 1997). Bestimmte Aminosäuren werden durch das periplasmatische *Carrier*-Protein LolA erkannt, das Lipoproteine an den korrespondierenden Rezeptor LolB in der äußeren Membran übergeben und somit deren Integration in diese Membran herbeiführen kann. Dieses Verfahren erfolgt auch bei BRP.

Die doppelschichtige äußere Membran von *E. coli* besteht jeweils zur Hälfte aus Lipopolysacchariden und Phospholipiden. Reife BRP verursachen eine Störung der äußeren Membran, in dem sie einen Austausch der Lipopolysaccharide gegen Phospholipide hervorrufen (Dekker *et al.*, 1999). Wie Abb. 2.9 zeigt, erhöht diese Modifikation die Fluidität der Membran und ermöglicht eine Dimerisierung der *outer membrane phospholipase A* (OMPLA) aufgrund vereinfachter lateraler Beweglichkeit ihrer Monomere (Dekker, 2000; Snijder *et al.*, 1999). Dimere OMPLA wird unter Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert und kann die fehlerhafte Präsenz von Phospholipiden in der äußeren Hälfte der Membran erkennen sowie korrigieren (Dekker *et al.*, 1997; Snijder *et al.*, 2001). Dadurch kommt es unter Freisetzung von Fettsäuren und Lysophospholipiden zu einer partiellen Degradation der Membran, die einen diffusiven Ausfluss periplasmatischer Proteine erlaubt. Diese Sekretion periplasmatischer Proteine ist semi-spezifisch, da nicht alle Proteine gleichermaßen in das Medium entlassen werden (Snijder & Dijkstra, 2000). Aufgrund der lokalen Membrandegradation wird die Fluidität der Lipiddoppelschicht erhöht, was die OMPLA-Assoziation und den Membranabbau zusätzlich erleichtert.

Da die Bacteriocine selbst nicht über Signalpeptide verfügen, war lange Zeit unklar, wie diese trotz cytoplasmatischer Lokalisation durch die perforierte äußere Membran gelangen können, ohne vorher die innere Membran zu überqueren. Obwohl der verantwortliche Mechanismus noch immer nicht vollständig aufgeklärt ist, gilt es inzwischen als sicher, dass die Freisetzung von Bacteriocinen einer Interaktion der reifen BRP in der äußeren Membran mit ihren noch in der Sec-Pore stabil verweilenden Signalpeptiden bedarf (van der Wal *et al.*, 1994). Es wird davon ausgegangen, dass die Interaktion zwischen BRP und Signalpeptid einen Kontakt und eine temporäre Fusion der inneren und äußeren Membran ermöglicht. Dadurch entsteht eine Trans-Zellhüllenpore, durch die Bacteriocine direkt aus dem Cytoplasma nach außen freigesetzt werden (Luirink *et al.*, 1991). Die Mechanismen der Spezifität dieses Bacteriocintunnels, d.h. der Vermeidung einer Sekretion sämtlicher cytoplasmatischer Proteine, sind nicht bekannt. Bei Austausch des nativen stabilen BRP-SPs gegen ein

instabiles Signalpeptid anderen Lipoproteinursprungs erfolgt keine Bacteriocinfreisetzung (van der Wal *et al.*, 1995c). Diese kann jedoch unter Expression des nativen SPs als separater Einheit wiederhergestellt werden, was die Beteiligung des SPs an der Bacteriocinsekretion beweist. Die als Begleiterscheinung auftretende Entlassung periplasmatischer Proteine bleibt von dem SP-Austausch unbeeinflusst.



**Abb. 2.9 Ablauf der BRP-vermittelten Membrandegradation.** (A) OMPLA liegt monomer und inaktiv in der äußeren Membran vor. (B) Der BRP-verursachte Austausch von Lipopolysacchariden gegen Phospholipide erhöht die Beweglichkeit der OMPLA-Monomere. (C) Unter Kontakt zweier Monomere und Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  (schattierte Kreise) erfolgt eine Dimerisierung. (D) Aktive, dimere OMPLA lysiert lokal die Phospholipid-Doppelschicht. (E) Periplasmatische Proteine (PP) werden diffusiv nach außen entlassen. Die Abbildung wurde aus der Literatur übernommen und modifiziert (Snijder & Dijkstra, 2000).

### 2.3.2 Sekretion periplasmatischer Proteine durch BRP-Coexpression

BRP lösen eine Degradation der äußeren Membran aus, in dem sie, durch Einführung von Phospholipiden, die Aktivität einer membranintegralen Phospholipase stimulieren. Mit Ausnahme der Stellen, an denen eine Interaktion zwischen reifem BRP und Signalpeptid bzw. zwischen innerer und äußerer Membran erfolgt, werden periplasmatische Proteine durch die permeabilisierte Membran semispezifisch in die Umgebung entlassen (van der Wal *et al.*, 1995d). Dieser Effekt kann grundsätzlich zur sekretorischen Produktion rekombinanter Proteine genutzt werden, insofern diese zuvor über den *Sec*- oder *Tat*-Pfad in das Periplasma exportiert wurden. Während für die extrazelluläre Proteinproduktion auf Basis des *Tat*-Pfades

bislang keine Daten vorliegen, konnte eine Reihe Sec-translozierter Proteine durch BRP-Beteiligung erfolgreich in das Medium entsprechender *E. coli*-Kulturen entlassen werden (Choi & Lee, 2004; Shokri *et al.*, 2003). Beispiele einiger solcher Proteine sind in Tabelle 2.4 zusammengestellt. Wie die Tabelle zeigt, liegt die maximale Größe bislang durch BRP-Nutzung freigesetzter Proteine im Bereich von 75 kDa. Dies gibt Hinweise auf eine mögliche Obergrenze der Größe durch BRP freisetzbarer Proteine.

**Tabelle 2.4** Einige Beispiele für rekombinante Proteine, die nach Sec-Translokation durch BRP-Beteiligung in die extrazelluläre Umgebung sekretiert werden. Die Proteine sind aufsteigend nach ihrer Molmasse sortiert. (hGH, *human growth hormone*)

| Protein                                 | Ursprung  | Molmasse [kDa] | (Referenz)                          |
|---|---|----------------|-------------------------------------|
| hGH                                     | human   | 21             | (Hsiung <i>et al.</i> , 1989)       |
| Chaperon FaeE                           | <i>E. coli</i>  | 25             | (van der Wal <i>et al.</i> , 1995d) |
| $\beta$ -Glucanase                      | <i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. subtilis</i> (hybrid) | 26             | (Miksch <i>et al.</i> , 1997b)      |
| Alkalische Protease                     | <i>B. stearothermophilus</i>                              | 27             | (Fu <i>et al.</i> , 2003)           |
| $\beta$ -Lactamase                      | <i>E. coli</i>  | 29             | (Yu & San, 1992)                    |
| Penicillinase                           | <i>Bacillus cereus</i>                                    | 33             | (Aono, 1989a)                       |
| $\alpha$ -Galaktosidase                 | Guar-Pflanze  | 40             | (van der Wal <i>et al.</i> , 1995a) |
| Phytase                                 | <i>E. coli</i>  | 46             | (Kleist <i>et al.</i> , 2003)       |
| Alkalische Phosphatase                  | <i>E. coli</i>  | 46             | (Aono, 1989b)                       |
| $\alpha$ -Amylase                       | <i>Bacillus sp.</i>                                       | 55             | (Yu & San, 1992)                    |
| Hybridchaperon (Fae) <sub>2</sub> -FaeG | <i>E. coli</i>  | 75             | (van der Wal <i>et al.</i> , 1995d) |

Für den BRP-Einsatz zur sekretorischen Proteinproduktion eignen sich besonders BRP-Varianten mit instabilen Signalpeptiden. Diese verhindern einerseits die Ausbildung von *trans-envelope*-Poren und erhöhen dadurch die Anzahl verfügbarer Poren für die Sekretion periplasmatischer Proteine (Luirink *et al.*, 1991). Andererseits ist die Verstopfung der Sec-Translokase mit proteolytisch stabilen BRP-Signalpeptiden reduziert (van der Wal *et al.*, 1992). Ein Beispiel für solche BRP ist die als LppBRP bezeichnete Variante des Cloacin DF13 BRP, welche mit dem SP des *E. coli* Murein Lipoprotein (Lpp) modifiziert ist und auch im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kommt (van der Wal *et al.*, 1995d).

Die Überexpression von BRP führt zu einem Phänomen, welches als „Quasi-Lyse“ bezeichnet wird und sich in einer Abnahme der Kulturtrübung niederschlägt (van der Wal *et al.*, 1995b). Dieser Effekt von BRP ist vollkommen unabhängig von der Bacteriocin-Aktivität und tritt auch bei solitärer BRP-Expression auf. Die schädigende Veränderung der äußeren Membran (BRP-Toxizität) stellt ein Begleitphänomen der Proteinsekretion bei starker BRP-

Expression dar und hindert die Zellen am Wachstum (van der Wal *et al.*, 1995b). Anstelle einer Stagnation der Kulturtrübung durch Erliegen des Wachstums wird häufig sogar eine Reduktion der Trübung beobachtet, welche auf die Membrandegradation und die Freilassung periplasmatischer Proteine zurückgeführt wird. Da die BRP-Toxizität in der Regel keine vollständige Zellyse (Freisetzung cytoplasmatischer Proteine) hervorruft (Miksch *et al.*, 1997b; van der Wal *et al.*, 1995d; Yu & San, 1992), wird die Reduktion der Kulturtrübung als „Quasi-Lyse“ bezeichnet. Obwohl die tatsächliche Zellyse meist vernachlässigbar ist, stellt die BRP-Toxizität ein gravierendes Problem bei der Nutzung von BRP dar. Das vorzeitige Erliegen des bakteriellen Wachstums schlägt sich in reduzierten (extrazellulären) Produktkonzentrationen nieder. Aufgrund ihrer Toxizität muss die BRP-Coexpression daher streng kontrolliert ablaufen. Generell sind mit der schwachen konstitutiven Expression und der starken Expression bei hohen Biomassekonzentrationen zwei unterschiedliche Expressionsstrategien denkbar. Die Problematik der konstitutiven Expression wird bereits durch den Mangel entsprechender Literaturstellen zur erfolgreichen Etablierung eines solchen Verfahrens dokumentiert. Für die Expression bei hohen Zelldichten zeigten sich stationärphasenabhängige Promotoren, die ihre Aktivität bei Erschöpfung des wachstumslimitierenden Substrats entfalten, als interessante Option (Miksch *et al.*, 1997a). Dabei ist die Regulation der Promotoraktivität jedoch oft nicht stringent, so dass die BRP-Expression stark von der Komposition des Mediums und den Kultivierungsbedingungen abhängt, wodurch die Induktion ggf. frühzeitig hervorgerufen werden kann.

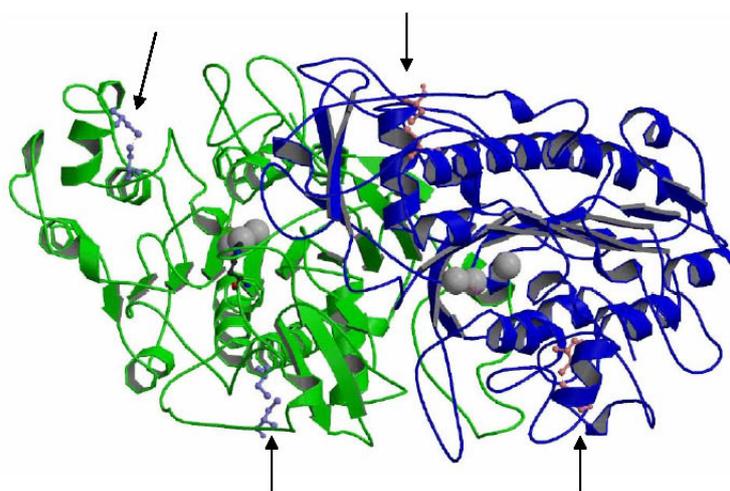
## **2.4 Modellproteine für die sekretorische Produktion**

Untersuchungen zur extrazellulären Proteinproduktion mit GRAM-negativen Bakterien erfordern den Einsatz von Proteinen, die durch das gewählte Sekretionsverfahren in das Kulturmedium gelangen können. Zu wissenschaftlichen Zwecken bieten sich dafür vor allem Modellproteine an, die aufgrund ihrer Funktion oder anderer Charakteristika einfach nachgewiesen werden können. Solche Proteine werden als Reporterproteine bezeichnet. Dies sind häufig Enzyme, deren Aktivität direkt oder indirekt anhand ihrer Substratumsetzung bestimmt wird. Insofern verfügbar, werden dafür bevorzugt künstliche, chromophore Substrate eingesetzt, die eine einfache photometrische Bestimmung erlauben. Idealerweise heben sich die phänotypischen Signale der Reporter deutlich von Hintergrundsignalen ab und ermöglichen dadurch deren präzise Quantifizierung. Im Falle der vorliegenden Arbeit wird die Reporterquantifizierung zur Ermittlung der Proteinlokalisierung eingesetzt. Im Folgenden werden die Modellproteine, die in dieser Arbeit zur Überwachung oder Vereinfachung der sekretorischen Proteinproduktion zum Einsatz kommen, vorgestellt.

### 2.4.1 Die alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase (AP) (EC 3.1.3.1) aus *E. coli* ist ein periplasmatisches Enzym, welches durch das *phoA*-Gen chromosomal codiert und über den *Sec*-Pfad exportiert wird. Das Protein weist eine Molmasse von 49 kDa in der Prä-Form und 46 kDa in der reifen Form nach Prozessierung des Signalpeptids auf. Es wird in seinem ursprünglichen Kontext unter Phosphatmangel synthetisiert und spaltet anorganische Phosphatreste von verschiedenen phosphorylierten Molekülen ab.

Aktive AP liegt als Homodimer vor (McCracken & Meighen, 1980), wobei die Dimerisierung eine vorherige Ausbildung zweier intramolekularer Disulfidbrücken erfordert (Abb. 2.10) (Sone *et al.*, 1997; Torriani, 1968).



**Abb. 2.10 Quartärstruktur des AP-Dimers.** Pfeile kennzeichnen die Positionen der Disulfidbrücken (www.expasy.org; modifiziert).

Disulfidbrücken können in *E. coli* aufgrund des erforderlichen oxidierenden Milieus nur im Periplasma ausgebildet werden. Cytoplasmatisch lokalisierte AP ist daher inaktiv, solange die Redoxbedingungen des Cytoplasmas durch die verantwortlichen Systeme aufrecht erhalten werden (Bessette *et al.*, 1999; Derman & Beckwith, 1991). Dies macht die AP zu einem optimalen Reporter für die Periplasmatranslokation und die anschließende Sekretion in das Medium (Aono, 1989b).

Ein Export der AP über den *Tat*-Pfad nach Austausch des nativen *Sec*-SPs gegen ein *Tat*-SP ist nicht möglich. Durch eine postulierte Qualitätskontrolle des *Tat*-Translokons wird die unter den reduzierenden Bedingungen des Cytoplasmas fehlerhaft gefaltete AP am Export gehindert (DeLisa *et al.*, 2003). Das AP-Präprotein verbleibt dann inaktiv im Cytoplasma.

AP katalysiert die Umsetzung des künstlichen Substrats *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP) zu *p*-Nitrophenol (pNP), ein photometrisch detektierbares Chromophor, das eine Quantifizierung dieses Reporterenzym erlaubt.

Alkalische Phosphatasen werden in der Molekularbiologie häufig zur Dephosphorylierung linearer Nukleinsäuren eingesetzt. Dies kann zur Verhinderung der Vektorreligation bei der molekularen Klonierung oder zur Vorbereitung für eine radioaktive Markierung mit P<sup>32</sup>-Isotopen erforderlich sein. Demnach kann eine effiziente sekretorische Produktion und die damit verbundene vereinfachte Gewinnung alkalischer Phosphatasen durchaus von ökonomischem Interesse sein.

### 2.4.2 Die $\beta$ -Lactamase

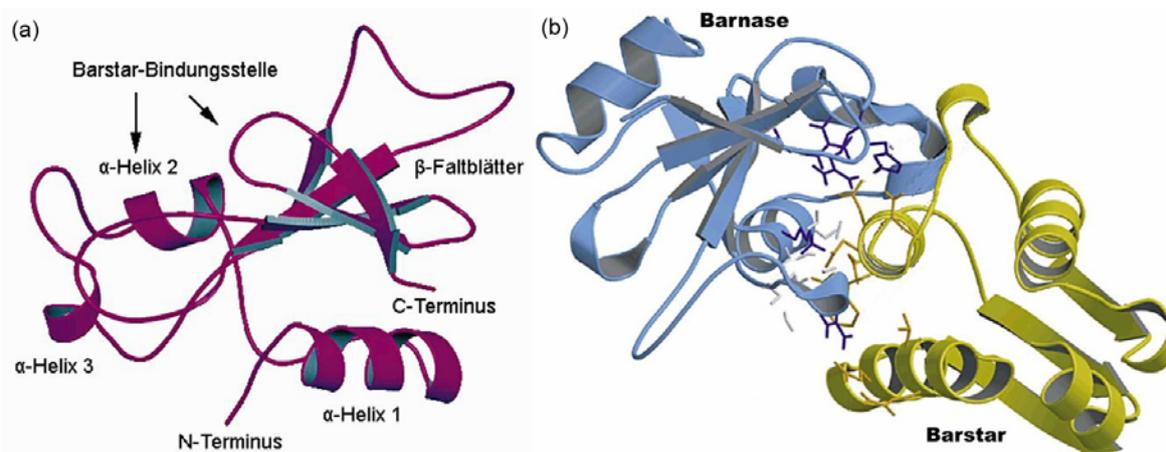
Die  $\beta$ -Lactamase (Bla) (EC 3.5.2.6) ist ein in *E. coli* periplasmatisch vorliegendes Enzym, welches in vielen GRAM-negativen und -positiven Bakterien vorkommt (Richmond & Sykes, 1973; Wang & Benkovic, 1998). Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte  $\beta$ -Lactamase hat eine Molmasse von 32 kDa (Präprotein) bzw. 29 kDa (reife Form). Sie wird über den Sec-Pfad transloziert und vermittelt Resistenz gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wie z.B. Ampicillin oder Penicillin (Beha *et al.*, 2003).  $\beta$ -Lactamasen setzen die künstlichen chromophoren Substrate PADAC<sup>TM</sup>, Nitrocefin und CENTA<sup>TM</sup> um (Jones *et al.*, 1982a; Jones *et al.*, 1982b; O-Callaghan *et al.*, 1972) und können daher auch als quantifizierbare Reporter für die Proteinsekretion dienen.

Bei Überexpression wird die  $\beta$ -Lactamase trotz periplasmatischer Lokalisation auch verstärkt im Medium entsprechender *E. coli*-Kulturen gefunden (Georgiou *et al.*, 1988). Eine erhöhte  $\beta$ -Lactamase-Freisetzung in das Kulturmedium unter BRP-Expression konnte bereits gezeigt werden (Yu & San, 1992), so dass sich dieses Enzym zur Dokumentation der Proteinsekretion durch BRP-Expression eignet.

### 2.4.3 Die Ribonuklease Ba (Barnase)

Die Ribonuklease Ba (RNase Ba; Barnase) (EC 3.1.27) aus dem GRAM-positiven *Bacillus amyloliquefaciens* gehört zu einer Familie aus ca. 25 mikrobiellen extrazellulären RNasen (Condon & Putzer, 2002; Hill *et al.*, 1983). Sie hydrolysiert Ribonukleinsäuren und stellt dem Bakterium dadurch Substrate für den Nukleinsäurestoffwechsel zur Verfügung (Hahnen *et al.*, 2000). Das reife Protein weist eine Molmasse von 12 kDa auf und ist über einen großen pH- (3-10) und Temperaturbereich ( $\leq 50$  °C) stabil (Hartley, 1977). Die Barnase benötigt weder Cofaktoren noch enthält sie Disulfidbrücken (Nishimura & Nomura, 1958; Paddon & Hart-

ley, 1987). Demnach kann das Protein grundsätzlich sowohl cyto-, als auch periplasmatisch (bzw. bei GRAM-negativen extrazellulär) seine aktive Konformation erhalten. Cytoplasmatische Aktivität muss jedoch aufgrund der letalen Degradation zellulärer RNA zwingend vermieden werden, was durch Coexpression des assoziierten Inhibitors Barstar gewährleistet wird (Deyev *et al.*, 2003; Hartley, 1988). Barstar ist ein ebenfalls kleines (10 kDa), cytoplasmatisch lokalisiertes Protein ohne Signalpeptid, welches am Export der RNase nicht beteiligt ist (Deyev *et al.*, 2003; Paddon & Hartley, 1987; Paddon *et al.*, 1989). Die Inhibition erfolgt durch Ausbildung eines festen, nicht-kovalenten Barnase-Barstar-Komplexes, der eine ionische Interaktion der basischen Barnase (pI 9,5) mit dem sauren Barstar (pI 4,5) zugrunde liegt (Hartley, 1989; Lee & Tidor, 2001). Dabei wird das aktive Zentrum der Barnase sterisch blockiert (Abb. 2.11).



**Abb. 2.11 3-D-Struktur der Barnase (a) und des Barnase-Barstar-Komplexes (b).** Die Abbildung wurde aus der Literatur übernommen und modifiziert (Huang *et al.*, 1999; Lee & Tidor, 2001).

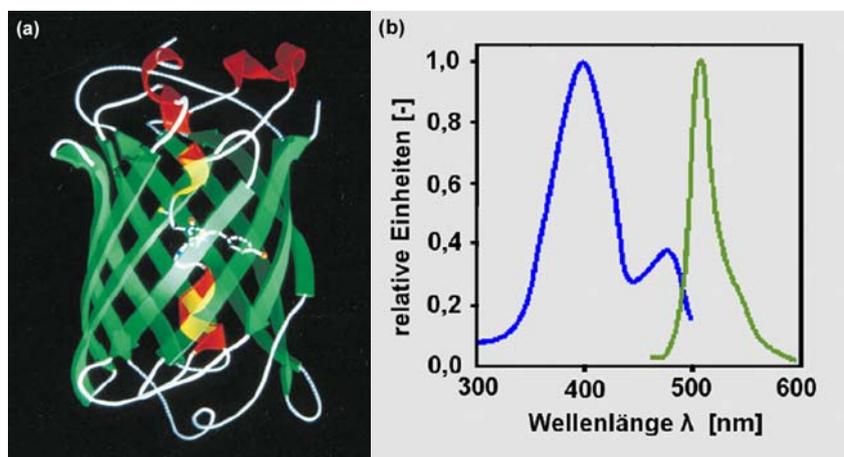
Die Unabhängigkeit der Barnase von Disulfidbrücken und Cofaktoren und die damit verbundene Faltungsfähigkeit im Cyto- und Periplasma lässt eine Sekretion sowohl auf Basis des *Sec*- als auch des *Tat*-Pfades möglich erscheinen und macht die Barnase zu einem interessanten Reporter für den Proteinexport durch *E. coli*. Bei Nutzung der Barnase als Reporterprotein kann die RNA-Hydrolyse zur photometrischen Quantifizierung genutzt werden. Obwohl das Reaktionsoptimum der Barnase bei pH 8,5 liegt (Hartley, 1989; Martin *et al.*, 1999), wird die Messung häufig bei pH 5 durchgeführt, da RNase und Inhibitor bei diesem pH dissoziiert vorliegen (Rushizky *et al.*, 1964).

Bei Überexpression der Barnase in *E. coli* wurde, ähnlich des im Zusammenhang mit der  $\beta$ -Lactamase beschriebenen Phänomens, eine erhöhte Sekretion in das Kulturmedium beobachtet (Hartley, 1988).

RNAsen werden primär in der Molekularbiologie zur Abreicherung von RNA während der DNA-Isolierung und -Reinigung eingesetzt. Rekombinante RNAsen sind insbesondere bei der Produktion von DNA-Vakzinen und Plasmid-DNA für die Gentherapie von Interesse, da sie die häufig gebräuchliche bovine RNase A ersetzen können und damit den pharmazeutischen Qualitätsanforderungen bezüglich der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) gerecht werden (Voss *et al.*, 2006). Es konnten aber auch antitumorale Wirkeigenschaften für RNAsen beobachtet werden, so dass pharmazeutische Einsatzmöglichkeiten ebenfalls untersucht werden (Laccetti *et al.*, 1994). Demnach sind RNAsen von ökonomischer Relevanz.

#### 2.4.4 Das grünfluoreszierende Protein (GFP)

Das grünfluoreszierende Protein (GFP) stammt aus der Quallenart *Aequorea victoria* (Shimomura *et al.*, 1962). Unter Anregung mit UV-Licht zeigt das 27 kDa große Protein eine charakteristische Grünfluoreszenz, der es seine Bezeichnung verdankt (Morise *et al.*, 1974; Prasher *et al.*, 1992). Die Anregungs- und Emissionsmaxima des Proteins liegen bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 395 \text{ nm}$  bzw.  $\lambda_{\text{Em}} = 509 \text{ nm}$  (Tsien, 1998). Das Protein ist, wie durch Abb. 2.12 dokumentiert, in einer hohlzylindrischen Struktur aus  $\beta$ -Faltblättern organisiert, die das fluorophore Zentrum von der Umgebung abschirmen (Ormö *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996).



**Abb. 2.12 Tertiärstruktur (a) und Absorptions-/Emissionsspektrum (b) des GFP.** (a)  $\beta$ -Faltblätter (grün) bilden einen Hohlzylinder („ $\beta$ -Fass“), der eine  $\alpha$ -Helix (rot/gelb) beherbergt. Die  $\alpha$ -Helix beinhaltet das fluorophore Zentrum (Kugel und Stab-Darstellung). (b) Absorptionsspektrum (blau) mit Maxima bei 395 nm, bzw. 470 nm und Emissionsspektrum (grün) mit Maximum bei 509 nm. Die Abbildung wurde aus der Literatur entnommen und modifiziert (Brejc *et al.*, 1997; Chalfie *et al.*, 1994).

Bis zur Exposition der Fluoreszenz durchläuft das GFP eine sauerstoffabhängige, autokatalytische Reifung (Cubitt *et al.*, 1995).

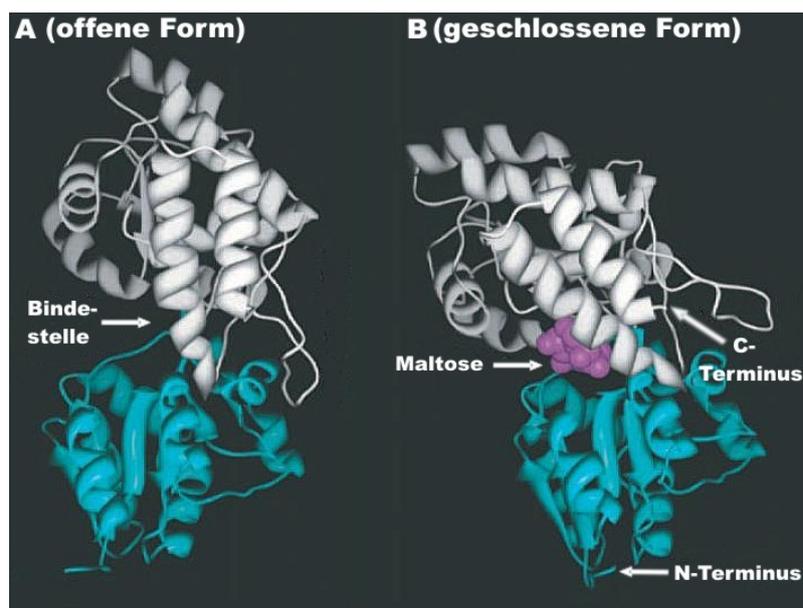
GFP eignet sich aufgrund seiner exponierten C- und N-Termini ideal als Fusionspartner für Proteinlokalisationsstudien. Inzwischen existiert eine Vielzahl gentechnisch erzeugter GFP Varianten, die veränderte Absorptions-/Emissionsspektren aufweisen (Heim *et al.*, 1994), schneller reifen (Andersen *et al.*, 1998), eine erhöhte Fluoreszenz zeigen (Cormack *et al.*, 1996; Cramer *et al.*, 1996) oder einer erhöhten Proteolyse unterliegen (Andersen *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wird eine als GFPuv bezeichnete Variante mit bis zu 45fach verstärkter Fluoreszenz verwendet (Cramer *et al.*, 1996).

In *E. coli* erfordert die Ausbildung der Fluoreszenz eine cytoplasmatische Proteinfaltung, so dass der Transport über den Sec-Pfad nicht möglich ist (Feilmeier *et al.*, 2000). Der Tat-Pfad erlaubt jedoch einen Export in das Periplasma (Santini *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001), was das GFP zu einem möglichen Sekretionsreporter auf Basis des Tat-Pfades macht. Die BRP-vermittelte Sekretion periplasmatischer GFPs in das Medium wurde bislang jedoch noch nicht gezeigt bzw. untersucht.

#### 2.4.5 Das Maltosebindeprotein (MBP)

Das Maltosebindeprotein (MBP) ist kein Reporterprotein im klassischen Sinne, da es über keine einfach messbaren Eigenschaften verfügt. Es kann zwar durch einen kommerziell verfügbaren Antikörper (NewEnglandBiolabs) immunologisch detektiert werden, seinem Wert für die Proteinproduktion liegen jedoch andere Charakteristika zugrunde.

Das Protein stammt aus *E. coli* und ist dort periplasmatisch lokalisiert, wobei der Export durch den Sec-Pfad erfolgt (Kellermann & Szmelcman, 1974). Als eines von wenigen bekannten Proteinen kann MBP nach Austausch des nativen gegen ein Tat-abhängiges Signalpeptid auch über den Tat-Pfad in das Periplasma gelangen (Blaudeck *et al.*, 2003). MBP enthält keine Cysteine und bildet daher keine Disulfidbrücken aus (Bedouelle & Duplay, 1988). Diese Eigenschaft ist vermutlich für die Exportkompetenz mit dem Tat-Pfad verantwortlich und macht das MBP zu einem idealen Fusionspartner, sowohl für rekombinante Proteine, die eine periplasmatische, als auch solche, die eine cytoplasmatische Faltung erfordern. MBP bindet das Disaccharid Maltose und andere Maltodextrine durch Erkennung der  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindung (Abb. 2.13) und ist an der zellulären Aufnahme dieser Kohlenstoffquellen beteiligt (Shuman, 1982). Die Dissoziationskonstante des nativen MBP beträgt für Maltose  $K_d = 1,2 \mu\text{M}$  (Telmer & Shilton, 2003). Das Protein adsorbiert jedoch auch an länger-kettige  $\alpha$ -1,4-Glucane wie z.B. Amylose und kann dadurch zur Affinitätsreinigung von Fusionsproteinen aus MBP und Zielproteinen genutzt werden (Ferenci & Klotz, 1978). Entsprechende Verfahren sind etabliert (Maina *et al.*, 1988; Riggs, 2000) und werden von der Firma NewEnglandBiolabs in einer Komplettanwendung kommerziell vertrieben (pMAL™ Protein Fusion and Purification System).



**Abb. 2.13 Tertiärstruktur des Maltosebindeproteins** ohne (A) und mit (B) gebundener Maltose, deren Bindestelle sich im Übergangsbereich zwischen den beiden Domänen (grau und blau) befindet. Weitere Erläuterungen erfolgen im Text. Die Abbildung wurde aus der Literatur übernommen und modifiziert (Medintz & Deschamps, 2006).

MBP liegt als 43,4 kDa großes Monomer vor (reife Form: 40,7 kDa) (Bedouelle & Duplay, 1988). Das Protein ist in zwei Domänen organisiert, die über ein Gelenkmotiv, welches die Maltosebindestelle beherbergt, verbunden sind. Unter Assoziation von Maltose oder verwandten  $\alpha$ -1,4-Glucanen verändert es seine Konformation, indem die Domänen am Gelenk zusammenklappen (Medintz & Deschamps, 2006).

Natives, chromosomal codiertes MBP wird aufgrund der Genregulation durch Substratinduktion nur in Anwesenheit von Maltose verstärkt gebildet (Kellermann & Szmelcman, 1974). Eine geringe basale Expression ist jedoch auch in Abwesenheit zu beobachten. Dies gilt insbesondere unter Glucosemangel, wenn die Katabolitrepression nicht aktiv ist (Schlegel *et al.*, 2002).

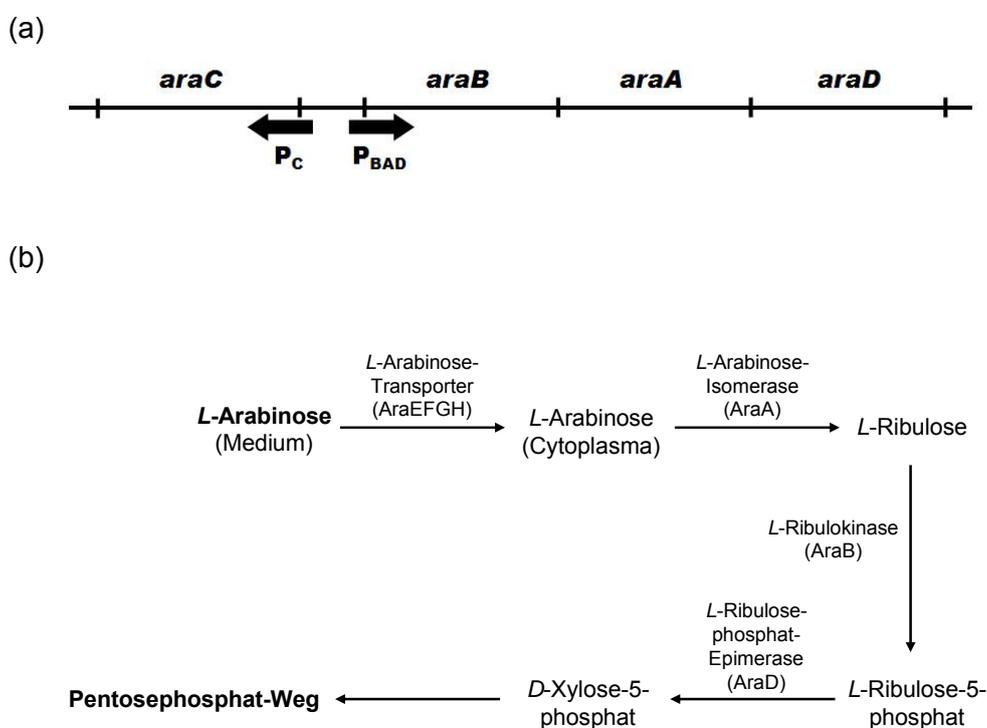
Neben den bereits beschriebenen Qualitäten bietet das MBP noch zwei weitere Vorteile. Es kann als Fusionspartner zu einer deutlichen Erhöhung der Proteinlöslichkeit beitragen und dadurch der Bildung von *inclusion bodies* entgegenwirken (Kapust & Waugh, 1999). Weiterhin erfolgen Adsorption und Desorption unter physiologischen Bedingungen, so dass die Verwendung von MBP als Affinitätspartner eine schonende Aufreinigung rekombinanter Proteine ermöglicht.

## 2.5 Das Arabinoseoperon *araBAD* und der Arabinosepromotor

### $P_{BAD}$

Das Arabinoseoperon *araBAD* und sein Promotor  $P_{BAD}$  nehmen in dieser Arbeit eine zentrale Position im Zusammenhang mit der Expression von BRP ein. Die physiologische Relevanz des Operons und des Arabinosestoffwechsels, sowie die Besonderheiten der Genregulation durch den  $P_{BAD}$ -Promotor werden daher kurz vorgestellt.

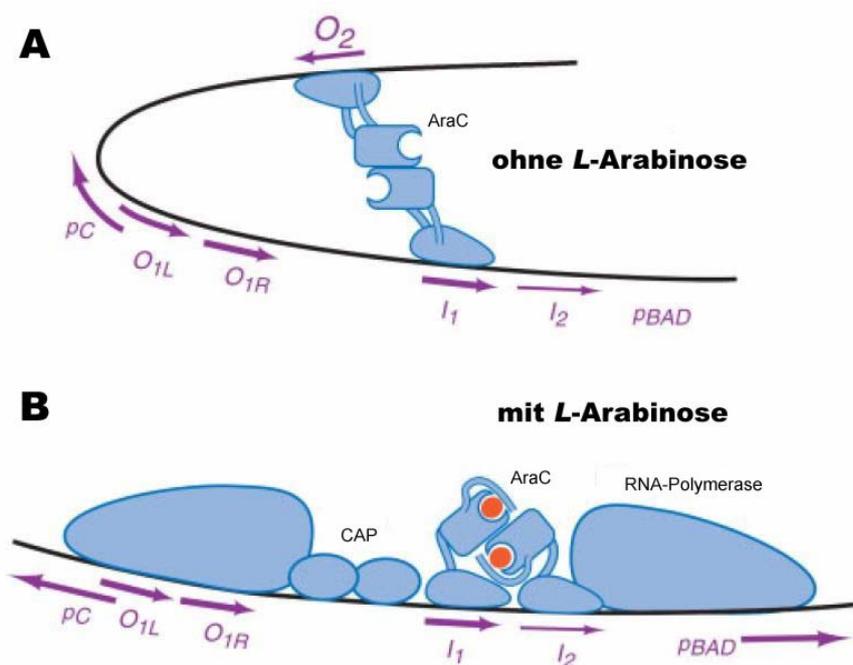
In *E. coli* sind an der Verstoffwechslung der Kohlenstoffquelle Arabinose, neben den vier Transporterproteinen AraFGHJ (Schleif, 1969), drei Enzyme beteiligt, die in einem gemeinsamen Operon (*araBAD*) codiert sind (Abb. 2.14) (Gross & Englesberg, 1959).



**Abb. 2.14 Genetische (a) und enzymatische (b) Organisation des Arabinoseoperons und Arabinosemetabolismus'. (a)** AraC wird konstitutiv durch  $P_C$  transkribiert. Es dient als *L*-Arabinose-abhängiges Regulatorprotein für die Expression der *araBAD*-Strukturgene durch  $P_{BAD}$ . **(b)** Die Enzymprodukte der drei Gene *araBAD* sind an der Umsetzung der C-Quelle *L*-Arabinose zu *D*-Xylose-5-phosphat beteiligt, welches in den Pentose-Phosphat-Weg einfließt. Abbildungsteil (a) wurde aus der Literatur übernommen und modifiziert (Schleif, 2003).

Die Gene der Transportproteine sind auf dem *E. coli*-Chromosom separiert vom *araBAD*-Operon lokalisiert (Horazdovsky & Hogg, 1989; Lee *et al.*, 1986). Da das Aufnahme- und Stoffwechselsystem in *E. coli* spezifisch für *L*-Arabinose ist, beziehen sich entsprechende

Stellen dieser Arbeit grundsätzlich auf die *L*-Form des Saccharids. Nach dem Transport in das Cytoplasma wird *L*-Arabinose unter Beteiligung der Enzyme *L*-Arabinose-Isomerase (AraA), *L*-Ribulokinase (AraB) und *L*-Ribulosephosphat-Epimerase (AraD) zu *L*-Ribulose, *L*-Ribulose-5-phosphat und schließlich zu *D*-Xylose-5-phosphat umgesetzt, welches in den Pentosephosphat-Weg (Glycolyse) einfließt. *L*-Arabinose ist daher eine potente Kohlenstoffquelle für das Bakterium. Die Expression der zentralen Gene *araBAD* des Arabinosemetabolismus erfolgt durch den gemeinsamen Promotor  $P_{araBAD}$ , der auch kurz als  $P_{BAD}$  bezeichnet wird (Johnson & Schleif, 1995). Der Promotor wird durch das Regulatorprotein AraC reguliert (Casadaban, 1975; Englesberg *et al.*, 1965), dessen Gen benachbart von *araBAD* lokalisiert ist, jedoch über einen eigenen Promotor unabhängig und konstitutiv exprimiert wird. Wie in Abb. 2.15 gezeigt, fungiert AraC dabei in Abwesenheit von Arabinose als Transkriptionsrepressor. In Anwesenheit von Arabinose kann es die Transkriptionsrepression nicht nur aufheben, sondern zusätzlich verstärken, in dem es durch eine Positionsveränderung auf der DNA die Bindung der RNA-Polymerase vereinfacht (Englesberg *et al.*, 1969a; Englesberg *et al.*, 1969b).



**Abb. 2.15 Regulationsmechanismus des Arabinoseoperons *araBAD*.** (A) In Abwesenheit des Induktors Arabinose bilden Homodimere des AraC-Regulator-Proteins eine Schleife in der DNA aus, die den  $P_{BAD}$ -Promotor für die RNA-Polymerase sterisch blockiert. (B) Unter Arabinosebindung (rote Kugeln) durchläuft das AraC-Dimer eine Konformationsänderung, und bindet dadurch an zwei benachbarte Positionen unmittelbar vor  $P_{BAD}$ . Die DNA-Schleife und löst sich auf und ermöglicht die Bindung der Polymerase an  $P_{BAD}$ . Die Bindung wird durch die gemeinsame Präsenz von AraC und CAP drastisch vereinfacht. Weitere Erläuterungen im Text. Die Abbildung wurde aus der Literatur übernommen und modifiziert (Schleif, 2003).

---

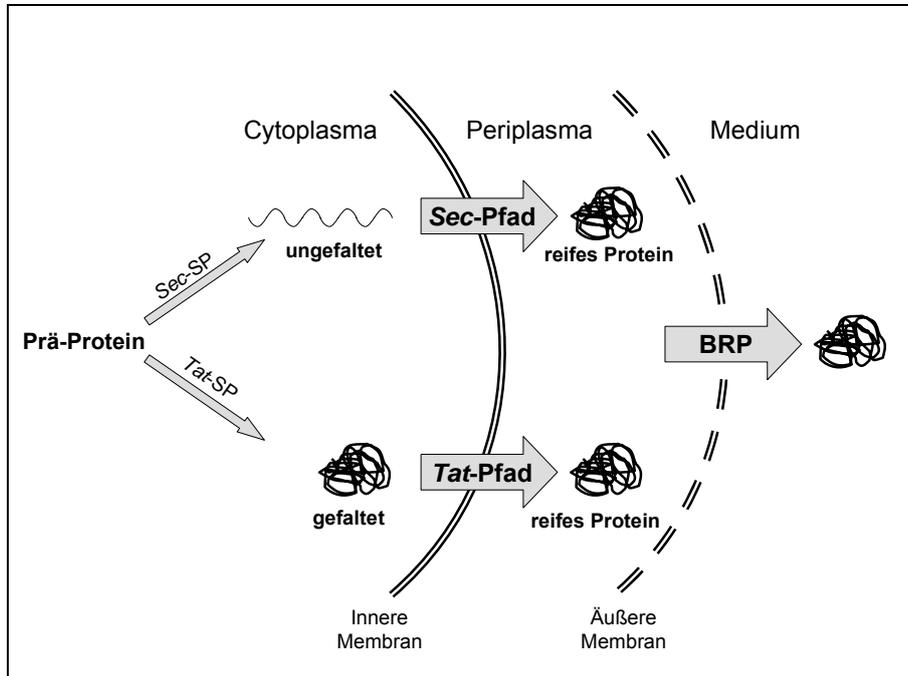
Unmittelbar vor dem  $P_{BAD}$ -Promotor liegt eine CAP-Bindestelle, die auf Basis des cAMP/CAP-Mechanismus' (Katabolitrepression) die überflüssige *araBAD*-Expression in Anwesenheit der energetisch günstigeren Kohlenstoffquelle Glucose verhindert. Im inaktiven Zustand bindet ein AraC-Homodimer an die beiden weit (210 bp) auseinander liegenden Bereiche  $I_1$  und  $O_2$  stromaufwärts des  $P_{BAD}$ -Promotors (Seabold & Schleif, 1998). Dadurch bildet sich eine Schleifenstruktur in der DNA aus, die den Promotor durch sterische Hinderung unzugänglich für die RNA-Polymerase macht (Schleif, 1992). Unter Arabinosebindung erfährt das AraC-Dimer eine Rekonfiguration, wodurch die  $O_2$ -Bindestelle frei und die  $I_2$ -Bindestelle besetzt wird (Schleif, 2003). Aufgrund der nun unmittelbar benachbarten Lokalisation beider AraC-Moleküle löst sich die DNA-Schleife auf und der  $P_{BAD}$ -Promotor wird zugänglich. Die AraC-Assoziation mit dem stromaufwärts von  $P_{BAD}$  anliegenden  $I_2$ -Bereich stimuliert dabei die Bindung der Polymerase zusätzlich (Zhang *et al.*, 1996).

Die ambivalente Eigenschaft des AraC-Regulators, gleichermaßen als Transkriptionsrepressor und -verstärker fungieren zu können, erlaubt extreme Unterschiede zwischen basaler und induzierter Transkription der *araBAD*-Gene. Aufgrund dieser Eigenschaft wird der  $P_{BAD}$ -Promotor häufig zur Expression heterologer Proteine genutzt. Dazu wurde der *araC-P<sub>BAD</sub>*-Bereich des Operons in eine Reihe von Plasmiden kloniert, die als pBAD-Vektoren bekannt sind und auch in dieser Arbeit verwendet werden (Guzman *et al.*, 1995). Durch Einsatz von Arabinose in Subsättigungskonzentration lässt sich die Genexpression über einen Bereich bis zum 1200fachen des reprimierten Zustandes modulieren.

### 3 Ziele der Arbeit

Natürlicherweise sekretieren *E. coli* K12 sowie Abkömmlinge dieses gefahrlos einsetzbaren Stammes aktiv keine Proteine in das Kulturmedium. Das Bakterium stellt jedoch verschiedene Proteintransportsysteme zur Verfügung, die nach entsprechender Modifikation oder durch ergänzende gentechnische Maßnahmen theoretisch zur sekretorischen Produktion rekombinanter Proteine genutzt werden können. Praktisch erwiesen sich die Systeme als unterschiedlich geeignet und wurden gemäß ihrer biotechnologischen Relevanz in den vorausgehenden Abschnitten vorgestellt.

Das am häufigsten verwendete, da am universellsten und effizientesten einsetzbare Verfahren basiert auf der in Abb. 3.1 dargestellten Zwei-Schritt-Sekretion, bei der die Proteine zunächst durch die zelleigenen Transporter des *Sec*- und *Tat*-Pfades in den periplasmatischen Raum exportiert und anschließend durch Coexpression von Bacteriocin freisetzenden Proteinen (*bacteriocin release proteins*, BRP) semi-spezifisch in das Medium entlassen werden (Choi *et al.*, 2000; Park *et al.*, 1999; Swartz, 2001; Weikert *et al.*, 1998). Dieses Verfahren ist der zentrale Bestandteil der vorliegenden Arbeit.



**Abb. 3.1 Extrazelluläre Proteinproduktion mit *E. coli* durch Nutzung Bacteriocin freisetzender Proteine (BRP).** Zunächst werden die rekombinant eingeführten Proteine durch die Translokasen des *Sec*- oder *Tat*-Pfades über die innere Membran in das Periplasma exportiert. Die Coexpression von BRP verursacht eine Permeabilisierung der äußeren Membran, durch die periplasmatische Proteine diffusiv in das Kulturmedium gelangen können.

Das Ziel bestand in der Entwicklung neuer Strategien zur extrazellulären Gewinnung rekombinanter Proteine mit *E. coli* durch Nutzung der BRP-Coexpression. Dabei sollte insbesondere dem Problem der BRP-Toxizität, die zu einem Erliegen des bakteriellen Wachstums („Quasi-Lyse“) führen kann, begegnet werden. Dazu sollten verschiedene molekularbiologische und prozesstechnische Ansätze verfolgt werden.

Auf molekularbiologischer Ebene sollten unterschiedliche BRP bezüglich ihrer Toxizität und ihrer Funktionalität, d.h. der Fähigkeit zur Förderung der Proteinsekretion, verglichen werden. Durch molekulare Veränderung der BRP war eine mögliche Entkopplung von Toxizität und Sekretionsaktivität zu untersuchen. In Kooperation mit dem Institut für Technische Chemie der Universität Hannover sollte die Reaktion der Zelle auf BRP-Aktivität durch Analyse der Genexpression untersucht werden, um Hinweise für Optimierungsansätze auf zellulärer Ebene zu erhalten.

Die Optimierung auf prozesstechnischer Ebene bestand in einer Steuerung der BRP-Expression, so dass eine maximale Proteinsekretion in das Medium bei minimaler Beeinflussung des Wachstumsprozesses erfolgt. Sie sollte durch eine Anpassung der Expressionsstärke und des Expressionszeitpunktes erfolgen.

Um das Potenzial der sekretorischen Proteinproduktion zu verdeutlichen und gleichzeitig ein Anwendungsbeispiel für einen integrierten Produktionsprozess anzuführen, wurde versucht, Hybridproteine aus MBP und verschiedenen Modellproteinen in das Kulturmedium von *E. coli* zu sekretieren und im Anschluss durch die Affinitätsfunktion des MBP direkt aus dem Medium zu reinigen. Bislang können solche Proteine ausschließlich aus dem Periplasma gewonnen und gereinigt werden. Auf Basis der Zwillingsarginin-Translokation konnte bis heute weder eine extrazelluläre noch eine periplasmatische Produktion und Gewinnung von MBP-Fusionsproteinen gezeigt werden, so dass sich die Nutzung des MBP als Fusionspartner bislang auf solche Proteine beschränkt, die über den *Sec*-Pfad aktiv exportiert werden können. Es ist zwar bekannt, dass solitäres MBP auch über den *Tat*-Pfad in das Periplasma gelangen kann (Blaudeck *et al.*, 2003), für MBP-Fusionsprotein liegen jedoch keine vergleichbaren Daten vor. Der Einsatz des MBP-Affinitätssystems für die extrazelluläre Proteinproduktion und -reinigung auf Basis der *Tat*-Translokation würde somit dessen Einsatzmöglichkeit für weitere Proteine eröffnen und sollte ebenfalls untersucht werden.

## 4 Material und Methoden

Nachfolgend sind die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Methoden und die dabei verwendeten Materialien dokumentiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien vom Reinheitsgrad p.a. und zweifach destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) als Solvenz verwendet. Gewöhnliche Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Sigma und J.T. Baker bezogen. Spezialchemikalien, Enzyme, Antikörper, Primer (Oligonukleotide) und Komplettanwendungen sind im Text benannt oder im Anhang (Abschnitt 9) aufgeführt. Selbiges gilt für die verwendeten Geräte.

### 4.1 Mikrobiologische Methoden

#### 4.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die Tabelle 4.1 führt die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme und Plasmide auf.

**Tabelle 4.1** Verwendete *E. coli*-Stämme und deren Genotypen.

| Bakterienstamm               | Genotyp   | Quelle (Referenz)                            |
|------------------------------|---|--|
| <i>E. coli</i> Top10         | F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15<br>Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK</i><br><i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i> | Invitrogen                                   |
| <i>E. coli</i> (K12) MG1655  | F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i>   | Laborbestand (Blattner <i>et al.</i> , 1997) |
| <i>E. coli</i> (K12) Ara1655 | F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> <i>ilvG- rfb-50 rph-1 ΔaraBA Cm<sup>R</sup></i>   | Diese Arbeit                                 |

Der *E. coli*-Stamm Top10 wurde für molekulare Klonierungen eingesetzt. Die Untersuchungen zur sekretorischen Proteinproduktion erfolgten anhand der Stämme *E. coli* MG1655 und *E. coli* Ara1655.

In Tabelle 4.2 sind alle finalen Plasmidkonstrukte dieser Arbeit, einschließlich ihrer relevanten Eigenschaften, aufgeführt. Eine vollständige Tabelle aller Plasmide und deren Konstruktionshistorie ist dem Anhang zu entnehmen (Abschnitt 9.5).

Tabelle 4.2 Konstruierte Plasmide und deren Eigenschaften.

| Plasmid                 | Eigenschaften  |
|-------------------------|--|
| pAraKO                  | <i>ori</i> (pSC101); <i>bla</i> ; <i>araC-ΔaraBA-cat-araD</i>  |
| pBAD-LppBRPphoAbla      | <i>km<sup>r</sup></i> ; <i>araC</i> ; <i>P<sub>BAD</sub></i> ; <i>lppbrp</i> (CloDF13); <i>P<sub>bla</sub></i> ; <i>phoA</i> ; <i>bla</i>  |
| pBAD-BRPphoAbla         | <i>km<sup>r</sup></i> ; <i>araC</i> ; <i>P<sub>BAD</sub></i> ; <i>brp</i> (CloDF13); <i>P<sub>bla</sub></i> ; <i>phoA</i> ; <i>bla</i>     |
| pBAD-KilColE1phoAbla    | <i>km<sup>r</sup></i> ; <i>araC</i> ; <i>P<sub>BAD</sub></i> ; <i>kil</i> (ColE1); <i>P<sub>bla</sub></i> ; <i>phoA</i> ; <i>bla</i>       |
| pBAD-LppBRP-His6phoAbla | <i>km<sup>r</sup></i> ; <i>araC</i> ; <i>P<sub>BAD</sub></i> ; <i>brphis6</i> (CloDF13); <i>P<sub>bla</sub></i> ; <i>phoA</i> ; <i>bla</i> |
| pLppBRPbar              | <i>km<sup>r</sup></i> ; <i>araC</i> ; <i>P<sub>BAD</sub></i> ; <i>lppbrp-bar</i> ; <i>P<sub>bla</sub></i> ; <i>phoA</i> ; <i>bla</i>       |
| pLppBRPmalE             | <i>km<sup>r</sup></i> ; <i>araC</i> ; <i>P<sub>BAD</sub></i> ; <i>lppbrp-malE</i> ; <i>P<sub>bla</sub></i> ; <i>phoA</i> ; <i>bla</i>      |
| pLppBRPbla              | <i>km<sup>r</sup></i> ; <i>araC</i> ; <i>P<sub>BAD</sub></i> ; <i>lppbrp-bla</i> ; <i>P<sub>bla</sub></i> ; <i>phoA</i>                    |
| pLppBRPphoA             | <i>km<sup>r</sup></i> ; <i>araC</i> ; <i>P<sub>BAD</sub></i> ; <i>lppbrp-phoA</i> ; <i>P<sub>bla</sub></i> ; <i>bla</i>                    |
| pBAD-LppBRPmalE         | <i>km<sup>r</sup></i> ; <i>araC</i> ; <i>P<sub>BAD</sub></i> ; <i>lppbrp</i> (CloDF13); <i>P<sub>bgl</sub></i> ; <i>malE</i>               |
| pBAD-LppBRPtorAmalE     | <i>km<sup>r</sup></i> ; <i>araC</i> ; <i>P<sub>BAD</sub></i> ; <i>lppbrp</i> (CloDF13); <i>P<sub>bgl</sub></i> ; <i>torAmalE</i>           |
| pBAD-LppBRPmalEphoA     | <i>km<sup>r</sup></i> ; <i>araC</i> ; <i>P<sub>BAD</sub></i> ; <i>lppbrp</i> (CloDF13); <i>P<sub>bgl</sub></i> ; <i>malE-phoA</i>          |
| pBAD-LppBRPtorAmalEphoA | <i>km<sup>r</sup></i> ; <i>araC</i> ; <i>P<sub>BAD</sub></i> ; <i>lppbrp</i> (CloDF13); <i>P<sub>bgl</sub></i> ; <i>torAmalE-phoA</i>      |
| pBAD-LppBRPmalEbar      | <i>km<sup>r</sup></i> ; <i>araC</i> ; <i>P<sub>BAD</sub></i> ; <i>lppbrp</i> (CloDF13); <i>P<sub>bgl</sub></i> ; <i>malE-bar</i>           |
| pBAD-LppBRPtorAmalEbar  | <i>km<sup>r</sup></i> ; <i>araC</i> ; <i>P<sub>BAD</sub></i> ; <i>lppbrp</i> (CloDF13); <i>P<sub>bgl</sub></i> ; <i>torAmalE-bar</i>       |
| pBAD-LppBRPtorAgfp      | <i>km<sup>r</sup></i> ; <i>araC</i> ; <i>P<sub>BAD</sub></i> ; <i>lppbrp</i> (CloDF13); <i>P<sub>bgl</sub></i> ; <i>torAgfp</i>            |
| pBAD-LppBRPtorAmalEgfp  | <i>km<sup>r</sup></i> ; <i>araC</i> ; <i>P<sub>BAD</sub></i> ; <i>lppbrp</i> (CloDF13); <i>P<sub>bgl</sub></i> ; <i>torAmalE-gfp</i>       |

### 4.1.2 Medien

In den nachfolgenden Tabellen sind die Zusammensetzungen und Herstellungsverfahren der in dieser Arbeit verwendeten Kulturmedien und Antibiotika aufgeführt (Tabelle 4.3 - Tabelle 4.7).

Tabelle 4.3 Zusammensetzung des *Lysogeny Broth* (LB)-Mediums und des LB-Festagars.

| Komponente             | Konzentration [g L <sup>-1</sup> ] |
|------------------------|------------------------------------|
| CaseinTrypton/Pepton   | 10                                 |
| Hefeextrakt            | 5                                  |
| NaCl                   | 10                                 |
| Agar-Agar <sup>a</sup> | 15                                 |

<sup>a</sup> Nur bei LB-Festagar.

LB-Medium und -Agar wurden auf pH 7,4 eingestellt und nach dem Ansetzen durch Autoklavieren (25 min; 121 °C) sterilisiert. LB-Medium wurde zur Herstellung kompetenter Zellen

(Abschnitt 4.1.10 und 4.1.11) und zur Erzeugung chromosomaler Deletionen (vgl. 4.3.8) verwendet.

**Tabelle 4.4 Zusammensetzung des SOC-Mediums.**

| Komponente           | Konzentration [mM]   |
|----------------------|----------------------|
| CaseinTrypton/Pepton | 20 g L <sup>-1</sup> |
| Hefeextrakt          | 5 g L <sup>-1</sup>  |
| NaCl                 | 10                   |
| KCl                  | 2,5                  |
| MgCl <sub>2</sub>    | 10                   |
| MgSO <sub>4</sub>    | 10                   |
| Glucose              | 2                    |

Glucose wurde als Konzentrat separat von den übrigen Komponenten durch Autoklavieren (25 min; 121 °C) sterilisiert und anschließend hinzugefügt. SOC-Medium wurde für die Transformation kompetenter Zellen (vgl. 4.1.10 und 4.1.11) verwendet.

**Tabelle 4.5 Zusammensetzung des synthetischen Glycerin/Ammoniumsulfat(SGA)-Mediums.**

| Komponente     | Substanz  | Konzentration [g L <sup>-1</sup> ] <sup>a</sup> |
|----------------|---|---|
| C-Quelle       | Glycerin (99%ig)                                      | 15 (30)   |
| N-Quelle       | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       | 5 (15)  |
| Salze (pH 7,0) | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                       | 13,53   |
|                | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 6,62  |
|                | MgSO <sub>4</sub>                                     | 0,585   |
|                | Citronensäure   | 1,71  |
|                | EDTA  | 8,4 mg L <sup>-1</sup>                          |
| Spurenelemente | FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O                | 10,8 mg L <sup>-1</sup>                         |
|                | ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                | 2,76 mg L <sup>-1</sup>                         |
|                | MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O                  | 3,7 mg L <sup>-1</sup>                          |
|                | CoSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                | 1,12 mg L <sup>-1</sup>                         |
|                | CuCl <sub>2</sub>                                     | 0,34 mg L <sup>-1</sup>                         |
|                | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        | 2,0 mg L <sup>-1</sup>                          |
|                | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O | 5,0 mg L <sup>-1</sup>                          |

<sup>a</sup> Bei Bioreaktorkultivierungen wurden die Konzentrationen der C- und N-Quelle gemäß den Angaben in Klammern erhöht.

Die Komponenten des chemische definierten SGA-Mediums wurden als Konzentrate separat angesetzt, durch Autoklavieren (121 °C, 25 min) sterilisiert, anschließend zusammengefügt und mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf das erforderliche Volumen aufgefüllt.

Das Medium wurde für die Analysen zur Proteinsekretion in Schüttelkolbenkultivierungen mit Probenahme (vgl. 4.1.4) und zur Kultivierung im Bioreaktor (vgl. 4.1.5) eingesetzt. SGA-Medium enthält Glycerin als singuläre Kohlenstoffquelle, und erlaubt, neben einem monoautotrophen, Wachstum auch eine Arabinoseinduktion des P<sub>BAD</sub>-Promotors (vgl. 4.1.7) unter Vermeidung der Katabolitrepression. Die in Abschnitt 5.2.5 beschriebene Variante des SGA-Mediums enthält 25 g L<sup>-1</sup> Glucose anstelle von 30 g L<sup>-1</sup> Glycerin.

**Tabelle 4.6 Zusammensetzung des halbsynthetischen Glycerin(HSG)-Mediums.**

| Komponente                           | Konzentration [g L <sup>-1</sup> ] |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| Glycerin                             | 14,9                               |
| CaseinTrypton/Pepton                 | 13,5                               |
| Hefeextrakt                          | 7                                  |
| NaCl                                 | 2,5                                |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 1,5                                |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 2,5                                |
| MgSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O | 0,14                               |

HSG-Medium wurde nach dem Ansetzen durch Autoklavieren (25 min; 121 °C) sterilisiert. Das Medium wurde für die Plasmidisolierung aus Flüssigkulturen (vgl. 4.3.1), die Herstellung von Glycerindauerkulturen (vgl. 4.1.3) und zur Stammreaktivierung aus Glycerindauerkulturen eingesetzt.

Je nach Resistenz des *E. coli*-Stammes wurden den Medien die in Tabelle 4.7 aufgeführten Antibiotikakonzentrationen zugefügt.

**Tabelle 4.7 Verwendete Antibiotikumskonzentrationen.**

| Antibiotikum    | Konzentration [mg L <sup>-1</sup> ] |
|-----------------|-------------------------------------|
| Kanamycin       | 50                                  |
| Ampicillin      | 200                                 |
| Chloramphenicol | 30                                  |
| Tetracyclin     | 25                                  |

### 4.1.3 Stammhaltung

Die kurzfristige *E. coli*-Stammhaltung erfolgte auf LB-Festagar (Tabelle 4.3) bei 4 °C. Zur langfristigen Stammhaltung wurden Flüssigkulturen mit 100 g L<sup>-1</sup> Glycerin (steril) versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 4.1.4 Kultivierung von *E. coli* in Flüssigmedium und auf Festagar

Die Kultivierung der verschiedenen *E. coli*-Stämme (Tabelle 4.1) erfolgte, falls nicht abweichend angegeben, bei 37 °C. Für die Kultivierung in Flüssigmedium wurden Schüttelkolben und Kulturröhrchen mit Volumina von 1 L, 300 mL und 30 mL verwendet. Schüttelkolben wurden zur analytischen Kultivierung mit Probenahme in chemisch definiertem SGA-Medium (Tabelle 4.5), zur Herstellung von Vorkulturen und zur Herstellung kompetenter Zellen (vgl. 4.1.10 und 4.1.11) eingesetzt. Kulturröhrchen dienten der Bereitstellung von Kulturen für die Plasmidisolierung sowie der Herstellung von Glycerindauerkulturen (vgl. 4.1.3) unter Verwendung des HSG-Mediums (Tabelle 4.6). Plattenkultivierungen erfolgten auf LB-Festagar (Tabelle 4.3) nach der Transformation von *E. coli*-Stämmen mit Plasmid-DNA (vgl. 4.1.10 und 4.1.11) und zur kurzfristigen Stammhaltung (vgl. 4.1.3). Schüttelkolbenkultivierungen wurden auf einem Rotationsschüttler bei einer Schüttelfrequenz von 160 min<sup>-1</sup> und einer Auslenkung von 25 mm durchgeführt. Der Füllgrad lag bei analytischen Kultivierungen zwischen 10 und 15%. Bei Vorkulturen, sowie bei Kulturen für die Herstellung kompetenter Zellen, betrug der Füllgrad bis zu 25%. Kultivierungen in Kulturröhrchen erfolgten mit 5 mL Medium bei einer Schüttelfrequenz von 400 min<sup>-1</sup> und einer Auslenkung von 5 mm auf einem Kulturröhrchenschüttler.

Übernachtkulturen wurden mit Einzelkolonien von Festagar oder aus Glycerindauerkulturen beimpft. Analytische Schüttelkolbenkultivierungen in SGA-Medium mit Probenahme wurden stets mit Übernachtskulturen auf eine optische Dichte von OD<sub>600</sub> = 1 inokuliert.

### 4.1.5 Satzkultivierung von *E. coli* im Bioreaktor

Die Fermentation von *E. coli* unter kontrollierten Bedingungen erfolgte in einem, *in situ* sterilisier- und reinigbaren, 7 L Rührkesselreaktor des Typs LAB 7L Laborreaktor (Fa. MBR Bio Reactor) mit einem Arbeitsvolumen von 5 L. Der Reaktor entsprach in Abmessung und Aufbau den DECHEMA-Empfehlungen für Bioreaktoren (DECHEMA, 1991). Aufbau und Peripherie des Bioreaktors wurden in früheren, am Lehrstuhl für Fermentationstechnik der Universität Bielefeld angefertigten Dissertationen, bereits umfänglich beschrieben (Bettenworth,

2005; Blaesen, 2006; Voss, 2001), so dass an dieser Stelle nur die wichtigsten Mess- und Regelvorrichtungen erneut benannt werden.

Der pH wurde durch eine pH-Einstabmesskette (Fa. Mettler Toledo) bestimmt und durch PID-geregelte Zugabe von 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bzw. 2 M NaOH statisiert. Eine konduktometrische Sonde diente zur Überwachung der Schaumbildung und löste ggf. die geregelte Zugabe von Antischaummittel (Pluronic<sup>®</sup> PE-8100, Fa. BASF) aus. Die Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium wurde durch einen polarographischen O<sub>2</sub>-Sensor (Fa. Mettler Toledo) bestimmt und über die Rührerdrehfrequenz geregelt, wobei nur eine Erhöhung der Drehfrequenz möglich war. Eine Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Reaktorabluft wurde durch das Abgasanalyse-System URAS10E (Fa. Hartmann und Braun) ermöglicht. Die wichtigsten Fermentationsparameter und deren Sollwerte sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst.

Proben wurden manuell durch ein dampfsterilisierbares Probenahmeventil oder, falls es die Stabilität der Analyte erlaubte, mithilfe eines automatischen Probensammlers (Gilson FC205) genommen, der über einen Ansatzstutzen des Fermenters angeschlossen war. Der Probensammler wurde während des Fermentationsprozesses durch einen Julabo F10-Kryostat auf 4 °C temperiert.

Für Fermentationen im Bioreaktor wurde ausschließlich chemisch definiertes SGA-Medium (Tabelle 4.5) eingesetzt. Dazu wurde zunächst ddH<sub>2</sub>O im Fermenter durch Autoklavieren (121 °C; 25 min) sterilisiert. Die sterilen Medienkomponenten wurden anschließend über ein Septum hinzugefügt. Bioreaktorkulturen wurden mit Schüttelkolbenvorkulturen gleichen Mediums auf initiale optische Dichten von ca. OD<sub>600</sub> = 1 inokuliert, nachdem die Volumina der Vorkulturen durch Zentrifugation für 5 min bei 5000g auf 50 mL eingengt wurden.

**Tabelle 4.8 Parameter und Sollwerte der Satzbioreaktorkultivierungen.**

| Parameter  | Sollwert                         |
|--|----------------------------------|
| Volumen, V   | 5 L                              |
| Temperatur, T  | 37 °C                            |
| Absolutdruck, p  | 1,2 bar                          |
| pH   | 7,0                              |
| Belüftung, $\dot{V}$   | 5 L min <sup>-1</sup> (1 vvm)    |
| Rührerdrehfrequenz, n  | 200 ≤ n ≤ 2000 min <sup>-1</sup> |
| relativer Sättigungsgrad des gelösten Sauerstoffs, pO <sub>2</sub> | 60% Sättigung                    |

#### 4.1.6 Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* im Zulaufverfahren

Die Kultivierung von *E. coli* zu hohen Zelldichten erfolgte im Zulaufverfahren. Dabei folgten Satzkultivierungen, welche gemäß Abschnitt 4.1.5 durchgeführt wurden, Phasen mit Substratzufütterung. In Anlehnung an die Methode von Korz *et al.* erfolgte die Zudosierung der in Tabelle 4.9 aufgeführten Zufütterungslösung durch ein vordefiniertes exponentielles Profil (Korz *et al.*, 1995), welches in Abschnitt 5.2.2 näher beschrieben wird. Um die Satzphasen über Nacht durchführen zu können, wurden diese durch Inokulation auf geringere optische Dichten von  $OD_{600} = 0,1$  anstatt  $OD_{600} = 1$  verlängert. Dadurch verlängerte sich die Satzphase von ca. 10 h auf ca. 16 h Kultivierungsdauer.

**Tabelle 4.9** Zusammensetzung der Zufütterungslösung für HZDK auf Basis des definierten definierten, synthetischen Glycerin/Ammoniumsulfat(SGA)-Mediums.

| Komponente  | Konzentration [g L <sup>-1</sup> ] |
|---|------------------------------------|
| Glycerin (99%ig)                                      | 500-1000 <sup>a</sup>              |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       | 0-167 <sup>a</sup>                 |
| MgSO <sub>4</sub>                                     | 10                                 |
| EDTA  | 16,8 mg L <sup>-1</sup>            |
| FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O                | 16,2 mg L <sup>-1</sup>            |
| ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                | 4,14 mg L <sup>-1</sup>            |
| MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O                  | 5,55 mg L <sup>-1</sup>            |
| CoSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                | 1,68 mg L <sup>-1</sup>            |
| CuCl <sub>2</sub>                                     | 0,51 mg L <sup>-1</sup>            |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        | 3,0 mg L <sup>-1</sup>             |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O | 7,5 mg L <sup>-1</sup>             |

<sup>a</sup> Die Glycerin- und (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Konzentrationen variierten in Abhängigkeit von der Zufütterungsstrategie gemäß Abschnitt 5.2.2.

Die Zufütterungslösung wurde unter Verwendung einer ISMATEC MV-Pumpe über eine Durchführung des Reaktordeckels eingebracht. Dabei erfolgte die Steuerung der Pumpe anhand der VisiDAQ 3.11-Software (Fa. Advantech), durch welche das exponentielle Zufütterungsprofil programmiert wurde. Indem die Zufütterungslösung auf einer Precisa 12000G Waage platziert wurde, konnte die zudosierte Masse unter Nutzung der DASyLab 6.0-Software (Fa. National Instruments Services) protokolliert werden.

Während der Zulaufphase wurden die in Tabelle 4.10 zusammengestellten Kultivierungsparameter gewählt.

**Tabelle 4.10 Parameter und Sollwerte der Zulaufkultivierungen.**

| Parameter   | Sollwert                         |
|---|----------------------------------|
| Volumen (Satzphase), $V_B$                              | 4 L                              |
| Zulaufvolumen, $V_F$                                    | 1 - 1,6 L <sup>a</sup>           |
| Temperatur, T   | 28 °C                            |
| Absolutdruck, p   | 1,5 bar                          |
| pH  | 7,0                              |
| Belüftung, $\dot{V}$                                    | 10 L min <sup>-1</sup> (2 vvm)   |
| Rüherdrehfrequenz, n                                    | 200 ≤ n ≤ 2000 min <sup>-1</sup> |
| relative Gelöstsauerstoffkonzentration, pO <sub>2</sub> | 30% Sättigung                    |

<sup>a</sup> Das Zulaufvolumen variierte in Abhängigkeit von der Zufütterungsstrategie gemäß Abschnitt 5.2.2.

Um den im Vergleich zu den Satzfermentationen erhöhten Sauerstoffbedarf während der Zufütterungsphase decken zu können, wurde die Belüftungsrate von 1 auf 2 vvm (5 auf 10 L min<sup>-1</sup>) erhöht und die relative Gelöstsauerstoffkonzentration auf 30% anstatt 60% Sättigung eingeregelt (vgl. Tabelle 4.8). Die Sauerstofflöslichkeit wurde durch Erhöhung des Absolutdrucks von 1,2 auf 1,5 bar sowie durch Temperatursenkung von 37 °C auf 28 °C erhöht. In Abhängigkeit von der gewählten Zufütterungsstrategie (vgl. Abschnitt 5.2.2) erfolgte die pH-Statisierung während der Zulaufphase entweder durch geregelte Zugabe von 5 M NaOH oder 25% (v/v) Ammoniumhydroxid. Als Säure wurde gemäß der Satzphase (vgl. Abschnitt 4.1.5) 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zudosiert.

#### 4.1.7 Induktion des P<sub>BAD</sub>-Promotors durch L-Arabinose

Die Induktion des P<sub>BAD</sub>-Promotors erfolgte durch Zugabe unterschiedlicher Arabinosekonzentrationen während der exponentiellen Wachstumsphase oder beim Übergang in die Stationärphase. Die Arabinosekonzentrationen lagen zwischen 1-1000 mg L<sup>-1</sup> und wurden, falls nicht anders angegeben, auf die optische Dichte (OD<sub>600</sub>) zum Induktionszeitpunkt normiert, um die Biomassekonzentration bezüglich der Induktionsstärke zu berücksichtigen. Für die Induktion wurden autoklavierte Arabinosestammlösungen (0,5-500 g L<sup>-1</sup>) verwendet.

#### 4.1.8 Fraktionierter Zellaufschluss

Zur Trennung von Medium, Periplasma und Cytoplasma (sowie ggf. Membranen und Zelltrümmern) wurden fraktionierte Zellaufschlüsse in Anlehnung an die Methode des kalten osmotischen Schocks durchgeführt (Neu & Heppel, 1965). Dazu wurden 2 mL Kultur für 5 min bei 15000g zentrifugiert und der Überstand als Mediumsfraktion verwahrt. Das Zellpellet

wurde in 2 mL Zellfraktionierungspuffer #1 (0,2 M Tris [pH 8,0]; 200 g L<sup>-1</sup> Saccharose; 0,1 M EDTA) resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 10000g wurde das Pellet in 2 mL Zellfraktionierungspuffer #2 (10 mM Tris [pH 8,0]; 5 mM MgSO<sub>4</sub>) gelöst und für 10 min auf Eis schüttelnd inkubiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation für 10 min bei 5000g und 4 °C als Periplasmafraktion verwahrt und das Pellet erneut in 2 mL Zellfraktionierungspuffer #2 resuspendiert. Das Cytoplasma wurde durch Ultraschallaufschluss mit einem Branson Sonifier 450 (Stufe 2) in Zyklen von 20 s Beschallung und 20 s Ruhe auf Eis freigesetzt. Die Zyklen wurden wiederholt bis die Lösung klar war. Membranhaltige Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 15000g entfernt und ggf. in 2 mL Zellfraktionierungspuffer #2 gelöst aufbewahrt. Membranfraktionen wurden nur präpariert, falls eine Membranständigkeit der Proteine erwartet wurde und vor weiteren Analysen gründlich durchmischt.

Angaben in dieser Arbeit zu intrazellulären Konzentrationen/Enzymaktivitäten stellen Summen der Bestimmungen in Cyto- und Periplasmafraktionen dar. Dieses Verfahren gewährleistet einerseits eine höhere Reproduzierbarkeit als der solitäre Gesamtaufschluss durch Ultraschall und kompensiert andererseits die häufig nicht-quantitative Trennung von Cyto- und Periplasma.

#### **4.1.9 Präparation löslicher und unlöslicher Proteine**

Zur Präparation löslicher und unlöslicher Proteine aus *E. coli*-Kulturen wurden ca.  $5 \times 10^9$  Zellen (5 mL einer Kultur der optischen Dichte  $OD_{600} = 1$ ) durch Zentrifugation für 5 min bei 15000g pelletiert und in 1 mL Zellfraktionierungspuffer #2 (vgl. 4.1.8) resuspendiert. Die Proteine wurden durch Ultraschallaufschluss mit einem Branson Sonifier 450 (Stufe 2) in Zyklen von 20 s Beschallung und 20 s Ruhe auf Eis freigesetzt. Die Zyklen wurden wiederholt bis die Lösung klar war. Unlösliche Proteine und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 15000g separiert. Nach Abnahme der löslichen Proteine (Überstand) wurden die unlöslichen Proteine im gleichen Volumen (1 mL) Zellfraktionierungspuffer #2 aufgenommen. Vor weiteren Analysen wurde die Fraktion unlöslicher Proteine gründlich durchmischt.

#### **4.1.10 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen**

##### *Herstellung*

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden 250 mL LB-Medium (Tabelle 4.3) in einem 1 L Schüttelkolben mit einer LB-Übernachtskultur auf eine optische Dichte von  $OD_{600} \sim 0,2$  inokuliert und schüttelnd inkubiert (vgl. 4.1.4). Bei Erreichen einer optischen

Dichte von  $0,8 < OD_{600} < 0,9$  wurde die Kultivierung abgebrochen und die Kultur für 15 min auf Eis geschwenkt. Die Zellen wurden für 10 min bei 4000g und 4 °C abzentrifugiert und in 10 mL eiskaltem Puffer #1 (2 mM Tris-HCl [pH 7,4]; 0,1 M  $CaCl_2$ ) durch vorsichtiges Schwenken gelöst. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4000g und 4 °C wurde das Zellpellet in 10 mL eiskaltem Puffer #2 (2 mM Tris-HCl [pH 7,4]; 0,1 M  $CaCl_2$ ; 100 g L<sup>-1</sup> Glycerin) vorsichtig resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden in 100 µL-Aliquots mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

#### *Transformation*

Chemisch kompetente Zellen wurden zur Transformation mit isolierten, superspiralisierten Plasmiden (vgl. 4.3.1), sowie mit Ligationsansätzen verwendet. Bei der Transformation mit Plasmiden wurde ein 100 µL-Aliquot mit 1 µL Plasmidlösung (ca. 100-200 ng) versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Die DNA-Aufnahme erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 1 min mit einer anschließenden Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 950 µL SOC-Medium (Tabelle 4.4) wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Danach wurde das Volumen durch Zentrifugation (5 min; 1000g) auf 100-200 µL eingeeengt und die Zellen auf LB-Selektivagar ausplattiert. Transformationen mit Ligationsansätzen (vgl. 4.3.7) erfolgten nach gleichem Verfahren, wobei 100 µL der kompetenten Zellen mit 10 µL eines 20 µL-Ligationsansatzes versetzt wurden.

### **4.1.11 Herstellung und Transformation elektrokompenter *E. coli*-Zellen**

Wenn chemisch kompetente Zellen (vgl. 4.1.10) eines *E. coli*-Stammes eine zu geringe Kompetenz für die Transformation aufwiesen, wurden elektrokompente Zellen zur Transformation mit isolierten, superspiralisierten Plasmiden (vgl. 4.3.1) verwendet.

#### *Herstellung*

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurden zwei 1 L Schüttelkolben mit jeweils 250 mL LB-Medium (Tabelle 4.3) anhand einer LB-Übernachtskultur auf  $OD_{600} \sim 0,1$  inokuliert und schüttelnd inkubiert (vgl. 4.1.4). Bei Erreichen einer optischen Dichte von  $OD_{600} \sim 0,7$  wurden die Kultivierungen abgebrochen, und die Kulturen für 15 min auf Eis geschwenkt. Die Zellen wurden für 15 min bei 4000g und 4 °C zentrifugiert, die Zellpellets zunächst durch Überschichten mit eiskaltem sterilen ddH<sub>2</sub>O gespült, und anschließend in 150 mL eiskaltem sterilen ddH<sub>2</sub>O durch Schwenken resuspendiert. Beide Ansätze wurden vereint und für 15 min bei 4000g und 4 °C zentrifugiert. Nach Resuspension in 50 mL Glycerinlösung (150 g L<sup>-1</sup>) wurden die Zellen, wie zuvor, zentrifugiert und in 10 mL Glycerinlösung (100 g L<sup>-1</sup>)

durch vorsichtiges Pipettieren gelöst. Die kompetenten Zellen wurden in 60 µL-Aliquots mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

### *Transformation*

50 µL der kompetenten Zellen wurden mit 1 µL salzfreier Plasmidlösung (ca. 100-200 ng) versetzt und in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (BioRad, 0,1 cm Schichtdicke) überführt. Die Elektroporation wurde in einem BioRad GenePulser II bei 1,8 kV, 400 Ω und 25 µF durchgeführt. Dabei betrug die Pulsdauer 6-9 ms. Die Zellen wurden unverzüglich in 950 µL SOC-Medium (Tabelle 4.4) aufgenommen und für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Danach wurde das Volumen durch Zentrifugation (5 min; 1000g) auf 100-200 µL eingengt und die Zellen auf LB-Selektivagar ausplattiert. Transformationen mit Ligationsansätzen (vgl. 4.3.7) erfolgten ausschließlich mit chemisch kompetenten Zellen.

## **4.2 Kultivierungsanalytik**

### **4.2.1 Bestimmung der optischen Dichte**

Die Bestimmung der optischen Dichte von *E. coli*-Kulturen erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) in einem Shimadzu UV 1202 UV-VIS Spectrophotometer. Um im linearen Bereich zu arbeiten, wurden die Kulturen bei  $OD_{600} > 0,8$  nach entsprechender Verdünnung vermessen. Bei *E. coli* entspricht 1  $OD_{600}$  ca.  $1 \times 10^9$  Zellen  $mL^{-1}$ .

### **4.2.2 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration**

Zur Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration wurden 2 mL *E. coli*-Kultur in tarierten 2 mL-Reaktionsgefäßen für 5 min bei 16000g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 mL physiologischer Kochsalzlösung ( $0,9 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$ ) resuspendiert, erneut für 5 min bei 16000g zentrifugiert und nach quantitativer Entfernung des Überstandes im Vakuum bei 60 °C für mindestens 24 h getrocknet. Die Bestimmung der Trockenmasse erfolgte durch Differenzwägung.

### **4.2.3 Bestimmung der Plasmidstabilität**

Die Bestimmung der Plasmidstabilität erfolgte indirekt durch Ermittlung des Plasmidmasseanteils an der Biotrockenmasse (Plasmidgehalt) sowie durch elektrophoretische Untersuchung der Plasmidintegrität (vgl. 4.3.3). Dazu wurden die Plasmide aus ca.  $5 \times 10^9$  Zellen

(5 mL einer Kultur der optischen Dichte  $OD_{600} = 1$ ) isoliert (vgl. 4.3.1). Im Vorfeld wurde die Kapazität der Isolierungsmethode überprüft und ergab eine lineare Abhängigkeit der gewonnenen Plasmidmenge von der eingesetzten Biomasse für ca.  $1 \times 10^9$  bis  $1 \times 10^{10}$  Zellen (1-10 mL einer Kultur der optischen Dichte  $OD_{600} = 1$ ). Zur Bestimmung des Plasmidgehalts wurde die Konzentration der isolierten Plasmide photometrisch quantifiziert (vgl. 4.3.9) und auf die zugrunde liegende Biotrockenmasse bezogen. Bei der elektrophoretischen Untersuchung wurden identische Volumina der isolierten DNA eingesetzt, um die zelluläre Plasmidkonzentration qualitativ visualisierbar zu machen.

#### 4.2.4 Konzentrationsbestimmung von Glycerin, Arabinose und Glucose

Die Konzentrationsbestimmung der Kohlenhydrate Arabinose und Glucose sowie des Polyalkohols Glycerin erfolgte durch HPLC anhand einer Kationenaustauschersäule (Nucleogel ION 300 OA, Fa. Macherey-Nagel). Glycerin und Glucose dienten in Kultivierungen als singuläre Kohlenstoffquellen, Arabinose als Induktor des  $P_{BAD}$ -Promotors. Die Substanzen wurden in den zellfreien Kulturüberständen nachgewiesen.

Als mobile Phase diente 2,5 mM Schwefelsäure, die nach Entgasung durch einen ERMA CR. Degasser ERC-3612 mittels einer Pumpe (PUMP  $\Sigma$  871 Liquid Chromatograph, Fa. IRI-CA Instruments) mit einem Volumenstrom von  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$  über die Säule gefördert wurde. Die Injektion von 20  $\mu\text{L}$  Probe erfolgte automatisch und sequentiell alle 45 min unter Verwendung eines MARATHON-Probengebers (Fa. Spark Holland). Zur Temperierung der Säule auf die Betriebstemperatur von  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  wurde ein ERC Gecko 2000-Säulenofen (Fa. ERMA CR.) genutzt. Für die Detektion kam ein ERC-7515A-RI-Detektor (Fa. ERMA CR.) zum Einsatz. Prozessteuerung und Datenaufnahme erfolgten anhand der Software ChromStar (Fa. SCPA). Vor den Analysen wurde die Säule für mindestens 1 h äquilibriert und die Messkammer des RI-Detektors gleichzeitig gespült. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach 1-Punkt-Kalibrierung anhand eines Standards mit Konzentrationen von  $20 \text{ g L}^{-1}$  der jeweiligen Substanzen (Glycerin, Glucose, Arabinose).

#### 4.2.5 Bestimmung der Ammoniumkonzentration

Die Bestimmung der Ammoniumkonzentration erfolgte potentiometrisch anhand einer ammoniaksensitiven Elektrode (Fa. WTW), welche an einem CONSORT P507K-Messumformer betrieben wurde. Zu 10 mL  $\text{ddH}_2\text{O}$  wurde 1 mL Probe gegeben. Ammoniak wurde aus Ammonium durch Zugabe von 150  $\mu\text{L}$  10 M NaOH freigesetzt. Nach Kalibrierung der Elektrode mittels eines Ammoniumstandards erfolgte die Messung unter Rühren auf einem Magnetrührer.

## 4.3 Molekularbiologische Methoden

### 4.3.1 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979) mit anschließender Reinigung der Plasmide über eine Silica-Matrix. Dafür wurden das Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Fa. Promega) und das Qiaprep Spin Miniprep Kit (Fa. Qiagen) alternativ eingesetzt. Die Isolierung wurde nach Angaben der Hersteller aus ca.  $10^{10}$  Zellen mit einer finalen Elution der DNA in 50  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O durchgeführt und erlaubte eine Gewinnung von ca. 5-10  $\mu\text{g}$  pDNA. Der Isolierungserfolg wurde durch AGE (vgl. 4.3.3) überprüft.

### 4.3.2 Isolierung genomischer DNA aus *E. coli*

Bei der Isolierung genomischer *E. coli*-DNA kam das Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Fa. Promega) zum Einsatz, wobei nach Herstellerangaben verfahren wurde. Die Isolierung erfolgte aus dem *E. coli*-Stamm K12 MG1655 (Tabelle 4.1) und wurde anschließend durch AGE (vgl. 4.3.3) überprüft.

### 4.3.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese (AGE) wurde zur Trennung von Nukleinsäuren genutzt. Dabei kamen horizontale Gele mit Agarosekonzentrationen von 10 und 20  $\text{g L}^{-1}$  zum Einsatz. Die benötigte Agarosemenge wurde in 0,5x TAE-Puffer (20 mM Tris [pH 8,0]; 2,5 mM Natriumacetat; 0,5 mM EDTA) suspendiert, bis zum Sieden erhitzt und auf ca. 50 °C abgekühlt, bevor das Gel in die dafür vorgesehene Gießform des *i*-Mupid-Elektrophoresesystems (Fa. Eurogentec) gegossen wurde. Den Proben wurde 1/5 Volumen des 6fach konzentrierten Ladepuffers (10 mM Tris-HCl [pH 7,6]; 60 mM EDTA; 60 % [v/v] Glycerin; 300  $\text{mg L}^{-1}$  Bromphenol Blau; 300  $\text{mg L}^{-1}$  Xylencyanol FF) zugefügt bevor diese auf das mit 0,5x TAE-Puffer überschichtete Gel appliziert wurden. Als Größenstandards dienten GeneRuler™ 1 kb DNA-Ladder und GeneRuler™ 100 bp DNA-Ladder (beide Fa. Fermentas). Zur Trennung wurde eine Spannung von 100  $\text{V cm}^{-1}$  angelegt. Anschließend wurde das Gel für 15 min in 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  EtBr gefärbt und 5 min im Wasserbad entfärbt. Zur Geldokumentation wurden die Nukleinsäurebanden auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 312 \text{ nm}$  sichtbar gemacht und mit einer CCD-Kamera digitalisiert.

#### 4.3.4 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der *in vitro*-Amplifikation von DNA-Molekülen (Mullis & Faloona, 1987). Sie wurde zum analytischen DNA-Nachweis und zur präparativen Bereitstellung geeigneter DNA für die molekulare Klonierung genutzt. Dabei wurde für präparative PCR-Amplifikationen die hochpräzise Phusion Polymerase (Fa. Finnzymes) und zum reinen Nachweis die vergleichsweise fehleranfälligere *Taq* Polymerase (Fa. Fermentas) verwendet. PCR-Reaktionen wurden mit Volumina von 100  $\mu$ L (präparativ) bzw. 10  $\mu$ L (analytische) angesetzt und nach Herstellerangaben in einem Px2 Thermal Cycler (Fa. Thermo) durchgeführt. 100  $\mu$ L-Reaktionen enthielten neben Polymerasen und Puffern gemäß der Herstellervorgaben, 1-2  $\mu$ L *Template*-DNA, sowie 5 mM dNTPs (Fa. Fermentas). Die Amplifikation erfolgte in 30 Zyklen, wobei die optimale *Primer*-Hybridisierungstemperatur im Vorfeld anhand der Software Clone Manager Professional Suite Version 8 (Fa. Scientific & Educational Software) bestimmt und ggf. durch Nutzung der Gradientenfunktion des *Thermocyclers* angepasst wurde. Die verwendeten Primer sind im Anhang (Abschnitt 9.6) aufgeführt. Der Amplifikationserfolg wurde durch AGE (vgl. 4.3.3) überprüft.

#### 4.3.5 Restriktionsspaltung von Plasmiden und PCR-Produkten

Der Verdau von DNA-Molekülen (Restriktionsspaltung) wurde zu deren Charakterisierung (analytisch) oder zur Vorbereitung von DNA-Fragmenten für die molekulare Klonierung (präparativ) eingesetzt. Dazu wurden Restriktionsenzyme der Firma Fermentas mit den zugehörigen Puffersystemen nach Angaben des Herstellers verwendet. Für den analytischen Einsatz (Restriktionsmuster) wurden ca. 100-200 ng DNA in 10  $\mu$ L-Reaktionen eingesetzt, für präparative Zwecke (Klonierung) ca. 1-1,5  $\mu$ g DNA in 20  $\mu$ L-Reaktionen. Der Verdau erfolgte bei 37 °C für 1-2 h (analytisch) bzw. über Nacht (präparativ). Bei der Vorbereitung von Vektorfragmenten für die molekulare Klonierung durch präparative Restriktion, wurden die 5'-DNA-Termini dephosphoryliert. Dies erfolgte durch Zugabe von jeweils 1  $\mu$ L (1 U) Calf Intestine Alkaline Phosphatase (Fa. Fermentas) zu den Reaktionen und sollte eine anschließende Religation des Vektors erschweren. Anschließend wurden die Restriktionsfragmente durch AGE (vgl. 4.3.3) aufgetrennt. Diese diente der Dokumentation des Restriktionsmusters oder der Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Gel (vgl. 4.3.6) für eine spätere Ligation (vgl. 4.3.7). Im Fall der Auftrennung präparativer Ansätze wurden die Ansätze auf mehrere Spuren des Gels aufgeteilt, um das Gel nicht zu überladen.

### 4.3.6 Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Entfernung der Reagenzien aus PCR-Reaktionen wurden die PCR-Produkte mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Fa. Promega) nach Angaben des Herstellers gereinigt, wobei das Volumen von 100 µL auf 50 µL reduziert wurde. Das System wurde auch zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen eingesetzt, nachdem die entsprechenden Banden mit einem Skalpell unter UV-Licht ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) aus dem Gel geschnitten wurden. Die Elution der DNA erfolgte dann aufgrund der geringen Konzentrationen in 30 µL ddH<sub>2</sub>O. Der Reinigungserfolg wurde durch AGE (vgl. 4.3.3) überprüft.

### 4.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur molekularen Klonierung wurden durch Restriktion (vgl. 4.3.5) vorbereitete *Insert*-DNA-Fragmente in entsprechend präparierte Vektor-DNA ligiert. Dazu wurde T4 DNA Ligase (Fa. Fermentas) mit dem zugehörigen Puffer gemäß den Herstellerangaben verwendet. Ligationen wurden in 20 µL-Reaktionen durchgeführt. 2 µL des Vektorfragments wurden mit 8 µL des *Insert*-Fragments, 2 µL 10x Ligation Buffer und 1 µL (1U) T4 DNA Ligase vermischt und für 2 h bei 22 °C, sowie für weitere 2 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Inkubation bei 65 °C für 15 min abgestoppt. Die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen mit Ligationsansätzen erfolgte gemäß Abschnitt 4.1.10 unter Verwendung des Stammes Top10 (Tabelle 4.1).

### 4.3.8 Erzeugung chromosomaler Mutationen

Die Erzeugung chromosomaler Mutationen erfolgte durch homologe Rekombination auf Basis von Plasmiden mit temperatursensitiver Replikation (Hamilton *et al.*, 1989). Die Methode wurde zur Deletion der zentralen Gene des Arabinosemetabolismus in *E. coli* MG1655 eingesetzt. Dies erfordert mehrere Rekombinationsereignisse und erfolgte anhand des dafür konstruierten Plasmids pAraKO (vgl. Abschnitt 9.5), welches zunächst in *E. coli* MG1655 eingebracht wurde (vgl. 4.1.11). Die Kultivierung in LB-Medium unter Ampicillin- und Chloramphenicol-Präsenz bei der replikationsinhibitorischen Temperatur von 44 °C ermöglichte eine Integration des Plasmids in das Chromosom (Cointegratbildung). Anschließend wurde unter Chloramphenicol-Präsenz, jedoch ohne Ampicillin bei der replikationspermissiven Temperatur von 30 °C kultiviert, wodurch sich die Cointegratstruktur wieder auflöste und das Plasmid aus dem Chromosom entlassen wurde. Eine erneute Kultivierung in ausschließlicher Anwesenheit von Chloramphenicol bei der replikationsinhibitorischen Temperatur von 44 °C,

führte zum Verlust des Plasmids (*curing*) wobei die Chloramphenicol-Resistenz (*cat*) an der Stelle der Gene *araBA* des Arabinosemetabolismus im Genom zurückblieb.

Der erfolgreiche Austausch der Gene *araBA* durch *cat* wurde anhand der Unfähigkeit zum Wachstum in Minimalmedium mit Arabinose als singulärer Kohlenstoffquelle unter Chloramphenicol-Präsenz gezeigt. Eine Überprüfung erfolgte durch PCR-Nachweis mit anschließender DNA-Sequenzierung.

### 4.3.9 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch mit dem NanoDrop<sup>®</sup>-Photometer (Fa. Nanodrop Technologies) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm bestimmt. Dazu wurden 1-2  $\mu$ L der Nukleinsäurelösungen eingesetzt. Die Konzentrationen wurden auf Basis der Relation  $\rho_{\text{dsDNA}} = A_{260} * 50$  [ $\text{mg L}^{-1}$ ] bzw.  $\rho_{\text{ssRNA}} = A_{260} * 40$  [ $\text{mg L}^{-1}$ ] durch die zugehörige NanoDrop ND-1000-Software berechnet.

### 4.3.10 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden zur Kontrolle molekularer Klonierungen im Auftrag durch die *Sequencing Core Facility* (CeBiTec, Universität Bielefeld) durchgeführt. Die dazu verwendeten Primer sind im Anhang (Abschnitt 9.6) aufgeführt. Die Authentizität der Sequenzen wurde durch Abgleiche der ermittelten mit den theoretischen Sequenzen anhand der *Alignment*-Funktion der Clone Manager Professional Suite Version 8 (Fa. Scientific & Educational Software) validiert.

## 4.4 Proteinreinigung

Die Aufreinigung von MBP-Hybridproteinen, sowie des nativen MBPs aus proteinhaltigen Lösungen erfolgte durch Affinitätschromatographie, welcher, falls nicht abweichend angegeben, eine Diafiltration vorausging.

### 4.4.1 Diafiltration

Die Diafiltration diente der Überführung von MBP(-Hybridproteinen) in den Säulenpuffer der anschließenden Affinitätschromatographie. Dazu wurden 150 mL des zellfreien Kulturüberstandes und eine Pellicon<sup>®</sup> XL 5 kDa Ultrafiltrationsmembran (Fa. Millipore) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Das Retentat wurde durch eine Schlauchpumpe im Zyklus geführt

und bei Erreichen eines Drittels des Ausgangsvolumens (50 mL) mit Säulenpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA) wieder auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Dabei wurde die Proteinlösung stets mit Eis gekühlt. Auf eine Volumenreduktion wurde während der Filtration verzichtet, um vergleichbare Voraussetzungen für die Affinitätschromatographie ohne vorherige Diafiltration zu schaffen.

#### 4.4.2 Affinitätschromatographische Reinigung von MBP und MBP-Hybridproteinen

Für die affinitätschromatographische Reinigung von MBP und MBP-Hybridproteinen wurde eine Agarose-Amylose-Kompositmatrix genutzt. Dazu wurde eine Pharmacia XK 16-Säule (Fa. Pharmacia Biotech) mit 15 mL des Amylose Resin High Flow (Fa. New England Biolabs) gepackt und an einer GradiFrac FPLC-Anlage (Pharmacia Biotech) mit einer PUMP P-50 Pumpe (Fa. Pharmacia Biotech) betrieben. Äquilibrieren, Beladen, Waschen, Elution, Reinigung und Lagerung erfolgten nach Angaben des Herstellers. Zur Dokumentation des Chromatographieprozesses wurde die UV-Absorption bei  $\lambda = 280$  nm (Applied Biosystems 757 Absorbance Detector) anhand der Software DASyLab 6.0 (Fa. National Instruments Services) protokolliert. Die Äquilibrierung der Säule erfolgte mit 5 Säulenvolumina (SV) des Säulenpuffers (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA) bei einer linearen Fließgeschwindigkeit von  $v_{lin} = 150$  cm  $h^{-1}$ . Zur Beladung wurden 150 mL der (diafiltrierten) Überstände (10 SV) eingesetzt ( $60$  cm  $h^{-1} \leq v_{lin} \leq 150$  cm  $h^{-1}$ ). Im Anschluss wurde mit Säulenpuffer gewaschen ( $v_{lin} = 150$  cm  $h^{-1}$ ) bis sich wieder ein stabiles UV-Signal einstellte. Die Elution erfolgte durch Einsatz von 10 mM Maltose im Säulenpuffer ( $v_{lin} = 60$  cm  $h^{-1}$ ). Während des Beladungs- und Waschvorgangs wurden kontinuierlich Fraktionen von je 1 SV gesammelt. Die Elutionsfraktion wurde anhand des UV-Signals (*Peak*) separat aufgefangen. Abschließend wurde die Säule mit 3 SV ddH<sub>2</sub>O gespült, mit 3 SV 1 g L<sup>-1</sup> SDS regeneriert und erneut mit 3 SV ddH<sub>2</sub>O gespült ( $v_{lin} = 150$  cm  $h^{-1}$ ). Die Lagerung erfolgte in 20% (v/v) Ethanol bei 4 °C.

#### 4.5 Proteinanalytik

Zur Analytik der (rekombinant) erzeugten Proteine kamen sowohl Nachweisverfahren auf Basis der elektrophoretischen Trennung als auch enzymatische Aktivitätsbestimmungen zum Einsatz. Die Bestimmung der Proteingesamtkonzentration erfolgte kolorimetrisch.

### 4.5.1 Tris-Glycin SDS-PAGE

Zur Trennung und zum Nachweis von Proteinen mit Molmassen zwischen 15 und 100 kDa wurde die diskontinuierliche Tris-Glycin SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt (Laemmli, 1970). Die Trennung erfolgte in vertikalen Gelen von 1 mm Stärke mit  $120 \text{ g L}^{-1}$  Polyacrylamid (PAA) (12%ige Gele) denen 5%ige Sammelgele ( $50 \text{ g L}^{-1}$  PAA) vorgeschaltet waren. Dazu wurden zunächst die Komponenten der Trenngele (Tabelle 4.11) zusammengefügt, zwischen spezielle, durch Silikondichtungen versiegelte Glasplatten gegossen, und mit  $800 \mu\text{L}$  Isopropanol überschichtet. Die Polymerisation erfolgte für 30 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nach Entfernen des Isopropanols wurden die Komponenten der Sammelgele auf die Trenngele gegossen und die Kämme für die Probestaschen eingesetzt. Die Gele polymerisierten bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  innerhalb von 10 min aus.

**Tabelle 4.11 Zusammensetzung der Tris-Glycin SDS-PAA-Gele.**

| Sammelgel 5%              |                   | Trenngel 12%               |                    |
|---------------------------|-------------------|----------------------------|--------------------|
| Komponente                | Volumen           | Komponente                 | Volumen            |
| H <sub>2</sub> O          | 775 $\mu\text{L}$ | H <sub>2</sub> O           | 1,5 mL             |
| 0,25 M Tris (pH 6,8)      | 1,25 mL           | 1 M Tris (pH 8,8)          | 2,8 mL             |
| Bis/Acrylamid (0,8%, 30%) | 425 $\mu\text{L}$ | Bis/ Acrylamid (0,8%, 30%) | 3,0 mL             |
| 5% SDS                    | 50 $\mu\text{L}$  | 5% SDS                     | 150 $\mu\text{L}$  |
| 10% Ammoniumpersulfat     | 25 $\mu\text{L}$  | 10% Ammoniumpersulfat      | 37,5 $\mu\text{L}$ |
| TEMED                     | 3 $\mu\text{L}$   | TEMED                      | 5 $\mu\text{L}$    |

Die Kämme und Silikondichtungen wurden entfernt und die Gele in eine XCell *SureLock*<sup>TM</sup> Mini-Cell-Elektrophoreseeinheit (Fa. Invitrogen) eingesetzt, bevor die Einheit mit Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris [pH 8,3]; 192 mM Glycin;  $1 \text{ g L}^{-1}$  SDS) befüllt wurde.

10  $\mu\text{L}$  Probe wurden mit demselben Volumen des 2x Laemmli-Puffers (250 mM Tris-HCl; 40% [v/v] Glycerin; 20% [v/v] 2-Mercapthoethanol;  $80 \text{ g L}^{-1}$  SDS;  $40 \text{ mg L}^{-1}$  BPB) verdünnt, für 5 min bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert und auf die Gele appliziert. Als Größenstandard diente PageRuler Prestained Protein Ladder<sup>TM</sup> (Fa. Fermentas). Der Trennung wurde bei einer Stromstärke von 15 mA/Gel im Sammelgel und 20 mA/Gel im Trenngel durchgeführt. Sofern im Anschluss an die SDS-PAGE kein Western-Transfer mit immunologischer Detektion (vgl. 4.5.3) vorgesehen war, wurden die Gele für 2 h oder über Nacht in Färbelösung (10% [v/v] Essigsäure; 25% [v/v] Isopropanol;  $2 \text{ g L}^{-1}$  Coomassie Brilliant Blau G-250) schwenkend gefärbt und anschließend in Entfärber (10% [v/v] Essigsäure; 25% [v/v] Isopropanol) gewaschen bis sich die Banden deutlich vom Hintergrund abhoben. Anschließend wurden die Gele unter Weißlicht mit einer CCD-Kamera digitalisiert.

#### 4.5.2 Tris-Tricin SDS-PAGE

Für den Nachweis von Proteinen mit Molmassen unter 15 kDa kam die Tris-Tricin SDS-PAGE zum Einsatz (Schägger & von Jagow, 1987). Dazu wurden Tris-Tricin Gele mit  $160 \text{ g L}^{-1}$  PAA kommerziell bezogen (Novex<sup>®</sup> 16% Tricine Gels, Fa. Invitrogen) und in einer XCell *SureLock*<sup>™</sup> Mini-Cell-Elektrophoresekammer (Fa. Invitrogen) mit Novex<sup>®</sup> Tricine SDS Running Buffer (Fa. Invitrogen) nach Angaben des Herstellers betrieben. Die Probenvorbereitung erfolgte analog zu Abschnitt 4.5.1. Als Größenstandards dienten PageRuler Prestained Protein Ladder<sup>™</sup> (Fa. Fermentas) und Mark12<sup>™</sup> Protein Standard (Fa. Invitrogen).

#### 4.5.3 Western-Blot und immunologische Detektion

Zum spezifischen Nachweis wurden die durch Tris-Glycin oder Tris-Tricin SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels Western-Blot auf PVDF-Membranen (Fa. Roth) transferiert und anschließend immunologisch detektiert. Unmittelbar nach der Elektrophorese wurden PVDF-Membranen auf die Gele gelegt und gemeinsam nach Herstellerangaben in ein XCell II<sup>™</sup> Blot Module (Fa. Invitrogen) überführt. Nach Einsatz des Blotmoduls in die zugehörige XCell *SureLock*<sup>™</sup> Mini-Cell Kammer (Fa. Invitrogen) wurde dieses mit Western-Transferpuffer ( $25 \text{ mM Tris-HCl [pH 8,3]$ ;  $192 \text{ mM Glycin}$ ;  $20 \% \text{ [v/v] Methanol}$ ;  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ SDS}$ ) befüllt und der Proteintransfer für 2 h bei einer Stromstärke von 250 mA durchgeführt. Während des Transfers wurde das Blotmodul durch die mit Eiswasser befüllte Kammer gekühlt. Anschließend wurden die Membranen kurz in TBS-T-Lösung ( $50 \text{ mM Tris [pH 7,5]$ ;  $150 \text{ NaCl}$ ;  $1 \text{ g L}^{-1} \text{ Tween 20}$ ) gewaschen und freie Bindungsstellen der Membran mit 25 mL Blockpuffer ( $30 \text{ g L}^{-1} \text{ Magermilchpulver in TBS-T-Lösung}$ ) durch schwenkende Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Zum Nachweis wurden die Membranen mit Lösungen, der in Tabelle 4.12 aufgeführten Antikörper (AK), inkubiert. Dazu wurden die AK nach Angaben der Hersteller in Antikörperpuffer ( $30 \text{ g L}^{-1} \text{ BSA in TBS-T-Lösung}$ ) verdünnt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte schwenkend mit 20 mL AK-Lösung für 1,5 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Falls kein Nachweis durch einen Sekundärantikörper erforderlich war (konjugierter Primär-AK), wurden die Membranen nach dreimaligem Waschen für 15 min in TBS-T-Lösung der Detektion zugeführt. Bei Nachweis durch einen Sekundär-AK wurden die Inkubation mit dem Sekundär-AK und der anschließende Waschvorgang analog zum Verfahren beim Primär-AK wiederholt, bevor die Detektion erfolgen konnte.

Die Detektion HRP-konjugierter AK erfolgte durch das 4C1N-Substrat. 18 mg 4C1N wurden in 6 mL Methanol gelöst, mit 24 mL Puffer ( $1 \text{ M Tris-HCl [pH 8,0]$ ;  $90 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$ ) sowie  $60 \mu\text{L}$  30% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  vermischt und auf die Membran gegeben. Nachdem das blaue, unlösliche Reaktionsprodukt innerhalb von 15 min auf der Membran ausfiel, wurde die Reaktion durch

Spülen mit ddH<sub>2</sub>O gestoppt. AP konjugierte AK wurden mit dem BCIP/NBT-System nachgewiesen. Dazu wurden 132 µL NBT-Lösung (50 g L<sup>-1</sup> in 70% [v/v] DMF) mit 66 µL BCIP-Lösung (50 g L<sup>-1</sup> in 100% [v/v] DMF) sowie 20 mL Puffer (0,1 M Tris-HCl [pH 9,5]; 0,1 M NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>) vermischt und auf die Membran gegeben. Die Reaktion bildete ein blaues unlösliches Produkt und wurde nach spätestens 15 min durch Spülen mit ddH<sub>2</sub>O abgestoppt. Abschließend wurden die Western-Blots mit Hilfe einer CCD-Kamera unter Weißlicht digitalisiert.

**Tabelle 4.12 Antikörper für den spezifischen Proteinnachweis.**

| Antikörper                                  | Epitop             | AK-Typ   | Ursprung           | Konjugat (Nachweis) | Hersteller          |
|---|--------------------|----------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Anti-MBP Monoclonal Antibody HRP Conjugated | MBP                | primär   | murin (monoklonal) | HRP (4C1N)          | New England BioLabs |
| Penta-His Antibody                          | His <sub>5-n</sub> | primär   | murin (monoklonal) | - (Anti-Maus-AK)    | Qiagen              |
| Anti-GFP                                    | GFP                | primär   | murin (monoklonal) | - (Anti-Maus-AK)    | Roche               |
| Anti-Mouse IgG AP conjugate                 | Maus-IgG           | sekundär | Ziege (polyklonal) | AP (BCIP/NBT)       | Sigma               |

#### 4.5.4 Bestimmung der Proteingesamtkonzentration

Bestimmungen der Proteingesamtkonzentration wurden durch einen modifizierten Bradford-Test (Bradford, 1976; Zor & Selinger, 1996) unter Verwendung der Roti<sup>®</sup>-Nanoquant-Lösung (Fa. Roth) durchgeführt. 800 µL der Arbeitslösung wurden mit 200 µL Probe vermischt und bei  $\lambda = 590$  nm, sowie  $\lambda = 450$  nm photometrisch vermessen. Bei  $A_{590} > 1$  wurden die Proben angemessen verdünnt. Als Referenz diente ddH<sub>2</sub>O. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte gegen einen verdünnten BSA-Standard (Albumin Fraktion V, Fa. Roth) anhand des Absorptionsquotienten  $A_{590}/A_{450}$ .

#### 4.5.5 Bestimmung der Fluoreszenz des grünfluoreszierenden Proteins

Zur Bestimmung der GFP-Fluoreszenz wurde 1 mL Probe mit einer Pharmacia LKB Pump P-1 bei maximaler Geschwindigkeit durch die Messzelle eines RF-551 Fluorescence HPLC Monitors (Fa. Shimadzu) geführt. Dabei wurde der maximale Emissionswert bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{Ex} = 395$  nm und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda_{Em} = 509$  nm protokolliert. Die Messung erfolgte gegen ddH<sub>2</sub>O als Referenz.

#### 4.5.6 Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase

Die Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase erfolgte anhand des chromophoren Substrats *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP) (Torriani & Rothman, 1961). AP katalysiert die Umsetzung von pNPP zu *p*-Nitrophenol (pNP) dessen Entstehung bei 405 nm photometrisch verfolgt werden kann. Dazu wurden 650  $\mu\text{L}$  Reaktionspuffer (1 M Tris-HCl [pH 8,0]; 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ) mit 250  $\mu\text{L}$  Reagenz (14,5 mM pNPP in 1M  $\text{NaHCO}_3$  [pH 8,0]) gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  AP Probe gestartet und bei 405 nm unter Raumtemperatur in einem Pharmacia Biochrom 4060-Photometer verfolgt. Die Aktivität wurde anhand der Absorptionsänderung ( $\Delta A/\Delta t$  [ $\text{min}^{-1}$ ]) im Vergleich mit einem verdünnten AP-Standard definierter Aktivität (Bacterial Alkaline Phosphatase, Fa. Fermentas) bestimmt. Eine Unit (U) hydrolysiert 1  $\mu\text{mol}$  pNPP  $\text{min}^{-1}$ .

#### 4.5.7 Aktivitätsbestimmung der $\beta$ -Lactamase

Die Aktivitätsbestimmung der  $\beta$ -Lactamase erfolgte anhand des chromophoren Substrats Nitrocefin<sup>TM</sup> (Fa. Calbiochem), dessen Umsetzung bei 486 nm photometrisch verfolgt werden kann (O'Callaghan *et al.*, 1972). 10 mg Nitrocefin wurden in 1 mL DMSO aufgenommen und mit 19 mL Phosphatpuffer (0,1 M K-Phosphat [pH 7,0]; 1 mM EDTA) vermischt. Diese Stammlösung wurde aliquotiert und bei  $-80$  °C unter Lichtabschluss gelagert. Aus der Stammlösung wurde eine Arbeitslösung durch 20fache Verdünnung mit Phosphatpuffer hergestellt. Zur Messung wurden je 750  $\mu\text{L}$  Arbeitslösung in Küvetten der Schichtdicke  $d = 1$  cm vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Probe bei Raumtemperatur gestartet. Nitrocefin weist einen Absorptionskoeffizienten von  $\epsilon_{486} = 20,5 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  auf, der zur Bestimmung der Aktivität ( $a_{\text{Bla}}$ ) anhand des Lambert-Beer'schen-Gesetzes herangezogen wurde (Gleichung 1). 1 Unit (U) hydrolysiert 1  $\mu\text{mol}$  Nitrocefin  $\text{min}^{-1}$ .

$$a_{\text{Bla}} \left[ \frac{\text{U}}{\text{mL}} \right] = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot d \cdot \Delta t} = \frac{\Delta A_{486}}{20,5 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm} \cdot \text{min}} \left( \frac{800 \mu\text{L}}{50 \mu\text{L}} \right) \quad (\text{Gleichung 1})$$

#### 4.5.8 Aktivitätsbestimmung der Barnase

Die Bestimmung der Barnase-Aktivität erfolgte durch die photometrische Quantifizierung säurelöslicher Nukleotide, die das Enzym aus Hefe-RNA freisetzt (Rushizky *et al.*, 1964). 400  $\mu\text{L}$  Reaktionspuffer (0,1 M Na-Acetat [pH 5,0]) wurden mit 500  $\mu\text{L}$  RNA-Lösung (2,5 g  $\text{L}^{-1}$  Hefe-RNA [Fa. VWR]) und 100  $\mu\text{L}$  Barnase Probe gemischt und für exakt 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250  $\mu\text{L}$  eiskaltem Fällungsmittel (20 mM

Uranylacetat in 30% [v/v] Perchlorsäure) und Inkubation für 15 min auf Eis abgestoppt. Dabei wurde intakte RNA präzipitiert, während die unter Barnase-Aktivität freigesetzten Nukleotide in Lösung blieben. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13000g wurde der Überstand mit einem NanoDrop®-Photometer (Fa. Nanodrop Technologies) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm vermessen. Die Messung erfolgte gegen eine identisch behandelte Referenz, die 100  $\mu\text{L}$  Reaktionspuffer anstelle von 100  $\mu\text{L}$  Probe enthielt. 1 U der Barnase verursacht eine Erhöhung der Absorption von 1,0 bei 260 nm und 37 °C in 15 min.

#### 4.5.9 Aktivitätsbestimmung der $\beta$ -Galaktosidase

Die  $\beta$ -Galaktosidase wurde als cytoplasmatisches Markerprotein zur exemplarischen Beurteilung der Freisetzung cytoplasmatischer Proteine (Zelllyse) verwendet. Eine Aktivitätsbestimmung war durch Hydrolyse des chromophoren Substrats *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ONPG) möglich (Miller, 1972). In 1 cm-Küvetten wurden 900  $\mu\text{L}$  Z-Puffer (0,1 M Na-Phosphat [pH 7,0]; 10 mM KCl; 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 50 mM 2-Mercaptoethanol) mit 200  $\mu\text{L}$  Substratlösung (4 g  $\text{L}^{-1}$  ONPG in Z-Puffer) gemischt. Die Reaktion wurde unter Raumtemperatur durch Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  Probe gestartet und bei Entwicklung einer Gelbfärbung durch Addition von 500  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1 M) abgestoppt, wobei die Reaktionszeit protokolliert wurde. Unter Berücksichtigung der Reaktionszeit  $\Delta t$  erfolgte die Bestimmung der Aktivität durch Messung der Absorptionsdifferenz  $\Delta A$  bei  $\lambda = 420$  nm gegen eine identisch behandelte Referenz, die Z-Puffer anstelle von Probe enthielt. Der Absorptionskoeffizient von ONPG beträgt  $\varepsilon_{420} = 21,3 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und wurde zur Berechnung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität  $a_{\beta\text{-Gal}}$  gemäß Gleichung 2 herangezogen. 1 Unit (U) hydrolysiert 1  $\mu\text{mol}$  ONPG  $\text{min}^{-1}$ .

$$a_{\beta\text{-Gal}} \left[ \frac{\text{U}}{\text{mL}} \right] = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot d \cdot \Delta t} = \frac{\Delta A_{420}}{21,3 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm} \cdot \text{min}} \left( \frac{1700 \mu\text{L}}{100 \mu\text{L}} \right) \quad (\text{Gleichung 2})$$

## 4.6 Transkriptanalytik

Zur Analyse der Genexpression auf Basis von mRNA-Transkripten wurden die DNA-Chiptechnologie (*Microarrays*), sowie die quantitative RT-PCR eingesetzt.

### 4.6.1 Gesamt-RNA-Isolierung und DNase-Verdau

Die Microarray-basierte Analyse der Genexpression erfordert relativ große Mengen Gesamt-RNA von ca. 300 µg pro Experiment. Entsprechende Zellzahlen (ca.  $3 \times 10^{10}$  Zellen, bzw. ca. 30 mL einer Kultur der optischen Dichte  $OD_{600} = 1$ ) wurden für die RNA-Isolierung eingesetzt. Der Instabilität von RNA muss durch eine rasche Probenverarbeitung Rechnung getragen werden. Dazu wurden die Kulturproben unmittelbar nach Entnahme für 1 min bei 4 °C und 10000g zentrifugiert, das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Sämtliche Schritte des nachfolgend beschriebenen Isolierungsverfahrens sowie des anschließenden DNase-Verdaus wurden, falls nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt. Zentrifugationsschritte erfolgten stets bei 4 °C. Alle Lösungen wurden in ausgebackenen Gefäßen (160 °C; 3 h) mit RNase-freiem DEPC-Wasser (0,1% [v/v] DEPC; autoklaviert) angesetzt und gelagert. Eingesetzte Verbrauchsmaterialien waren grundsätzlich zertifiziert RNase-frei.

#### *Isolierung*

Das Zellpellet wurde in 900 µL TE-Lysozymlösung (10 mM Tris [pH 8,0]; 1 mM EDTA; 1 g L<sup>-1</sup> Lysozym) resuspendiert und nach Zugabe von 90 µL SDS-Lösung (10 g L<sup>-1</sup>) für 2 min auf 64 °C erhitzt. Auf eine Addition von 100 µL Na-Acetat (1 M [pH 5,2]) und 1 ml Phenol (Roti®-Phenol, Fa. Roth) folgte eine erneute Inkubation bei 64 °C für 6 min, wobei das Reaktionsgefäß alle 45 s zehnmal invertiert wurde. Nach einer zweiminütigen Inkubation auf Eis wurde für 10 min bei 16000g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt. Im Anschluss an eine 10fache Inversion des Reaktionsgefäßes wurde erneut bei 16000g für 5 min zentrifugiert, der Überstand mit 1/10 Volumen 5 M NaCl und 2 Volumina eiskaltem Ethanol vermischt und für 20 min bei -80 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 16000g wurde das Pellet mit 1 mL Ethanol (75% [v/v]) gewaschen, luftgetrocknet und in 100 µL DEPC-Wasser gelöst.

#### *DNase I-Verdau*

Die Entfernung von DNA-Rückständen in der Gesamt-RNA wurde durch einen DNase I-Verdau mit anschließender Ethanol-fällung vollzogen.

100 µL Gesamt-RNA-Lösung wurden mit 11 µL 10x DNase I Puffer (0,1 M Tris-HCl [pH 7,5]; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>) und 40 U DNase I (Fa. Sigma) versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Ethanolfällung gemäß des für die RNA-Isolierung beschriebenen Verfahrens, beginnend mit der Zugabe von 5 M NaCl (s.o.). Die Resuspension des luftgetrockneten RNA-Pellets erfolgte erneut in 100 µL DEPC-Wasser. Das Isolierungsverfahren erlaubte die Gewinnung von durchschnittlich 300-500 µg Gesamt-RNA. Zur Überprüfung der RNA-Integrität und der DNA-Entfernung wurde die RNA nach dem Verdau qualitativ durch AGE (vgl. 4.3.3) untersucht.

#### 4.6.2 Genexpressionsanalyse mit der DNA-Chiptechnologie

Für die Genexpressionsanalyse auf Basis der DNA-Chiptechnologie (*Microarrays*) wurden *whole-genome E. coli* K12 V2 Arrays der Firma MWG verwendet, die das komplette Genom (alle 4288 ORFs) des *E. coli* Stammes K12 MG1655 (Blattner *et al.*, 1997) repräsentieren. Die Analysen wurden extern am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover durchgeführt, so dass an dieser Stelle nur das generelle Verfahren der Methode wiedergegeben wird.

Zunächst wurden die Gesamt-RNA unter Zuhilfenahme von DNA-Hexanukleotiden zufälliger Sequenzen und reverser Transkriptase unspezifisch in cDNA revers transkribiert. Dabei erfolgte eine Markierung der cDNA mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5, welche eine spätere Unterscheidung zwischen cDNA aus zwei unterschiedlichen Proben auf einem DNA-Chip erlaubte. Bei Hybridisierung von cDNA auf die *Microarrays* aus mehr als zwei Proben wurde das *Loop-Design* genutzt (Kerr & Churchill, 2001a; Kerr & Churchill, 2001b), welches weniger DNA-Chips als das klassische *Dye-Swop*-Verfahren benötigt. Die DNA-Chips wurden in einem Laserscanner bei Cy3- und Cy5-spezifischen Wellenlängen und unterschiedlichen Verstärkungsfaktoren digitalisiert und aus den Fluoreszenzintensitäten der *Spots* und des Hintergrundes wurden Expressionsdaten der Gene/ORFs berechnet. Dabei kamen unterschiedliche mathematische Verfahren zur Normalisierung der Intensitäten innerhalb von und zwischen verschiedenen *Microarrays* zum Einsatz. Fehler durch unterschiedliche Inkorporationsraten der beiden Fluoreszenzfarbstoffe wurden ebenso ausgeglichen, wie systematische Fehler (Loess/Lowess-Regression) und Ausreißer-Werte (Mandel-Test). Die finalen Daten enthielten Expressionsangaben für jeden ORF sowie statistisch signifikante Angaben über dessen Regulationszustand im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Dies ermöglichte eine separate Betrachtung der tatsächlich differentiell regulierten ORFs.

### 4.6.3 Bestimmung der Genexpression durch quantitative RT-PCR

Die quantitative PCR (qPCR) mit einem vorgeschalteten reversen Transkriptions(RT)-Schritt (qRT-PCR), wurde zur Bestimmung der relativen und absoluten Expressionsstärken von Genen (in diesem Fall des LppBRP-Gens) auf Basis ihrer mRNA-Transkripte genutzt. Dies war insbesondere hilfreich, wenn sich deren Proteinprodukte, wie im Fall von BRP, nur schwer quantifizieren ließen.

Ca. 30-50 µg der isolierten und verdauten Gesamt-RNA wurden erneut, nach dem in Abschnitt 4.6.1 beschriebenen Verfahren, mit DNase I verdaut und anschließend unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Fa. Qiagen) nach Angaben des Hersteller gereinigt. Dies sollte eine weitestgehende Entfernung von DNA-Rückständen gewährleisten und war, aufgrund der Sensitivität PCR-basierter Methoden, insbesondere bei *high-copy* plasmidcodierten Genen, wie dem in dieser Arbeit verwendeten LppBRP-Gen, notwendig. Da die geringe Größe von qPCR-Amplikons (meist 100-200 bp) selbst nach dreifacher DNase I-Behandlung häufig noch eine Amplifikation von pDNA-Templates in RNA-Proben zulässt, erfolgte die Expressionsquantifizierung stets mittels zweier unabhängiger Ansätze, von denen nur einer die Reverse Transkriptase (RT) enthielt. Durch Subtraktion der DNA-abhängigen Amplifikation (qPCR ohne RT) von der Gesamt-Amplifikation (qRT-PCR) wurde die aus dem RT-Schritt stammende, RNA-abhängige Amplifikation und damit die Transkriptquantität bestimmt.

Zur mRNA-Quantifizierung wurde das Quantitect® SYBR® Green RT-PCR Kit (Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers mit 50 ng Gesamt-RNA pro 20 µL-Reaktion eingesetzt, welches die reverse Transkription und die anschließende qPCR in einem einzigen Ansatz (*one-step* qRT-PCR) erlaubt. Die bei der *real-time* PCR verwendeten, spezifischen Primer sind im Anhang aufgeführt (Abschnitt 9.6). Zur Quantifizierung wurde das Rotor-Gene 3000 Real-Time Multiplexing System (Fa. Corbett Research) unter den Herstellervorgaben für das Quantitect® SYBR® Green RT-PCR Kit programmiert. Bei der Berechnung, sowohl der absoluten als auch der relativen Expression konnte auf die mitgelieferte Software Rotor-Gene 6 (Fa. Corbett Research) anhand der implementierten Funktionen „Quantitation“ und „Comparative Quantitation“ zurückgegriffen werden. Die absolute Quantifizierung erfolgte durch Kalibrierung mit einem DNA-Standard, der aus einem gereinigten und photometrisch quantifizierten ( $\lambda = 260$  nm) PCR-Produkt bekannter Zusammensetzung bestand. Das PCR-Produkt wurde anhand derselben Primer durch Amplifikation von der ursprünglichen LppBRP-DNA (pJL17lpp) gewonnen. Zur Überprüfung der Authentizität von qRT-PCR-Produkten wurde grundsätzlich eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Die durchgeführten Arbeiten lassen sich in drei Abschnitte untergliedern. Zunächst wird die Etablierung eines geeigneten *E. coli*-Systems für die extrazelluläre Proteinproduktion und die gentechnische Stammentwicklung beschrieben. In diesem Zusammenhang werden verschiedene BRP bezüglich ihrer Eignung für die sekretorische Proteinproduktion charakterisiert und die Möglichkeiten für eine Optimierung der BRP durch molekulare Veränderung aufgezeigt. Anschließend werden prozesstechnische Optimierungsansätze für die sekretorische Proteinproduktion dokumentiert, die sich primär auf die Steuerung der BRP-Coexpression durch externe Eingriffe fokussieren. Dabei werden auch die BRP-Toxizität und die zelluläre Reaktion auf die BRP-Expression untersucht. Der letzte Abschnitt befasst sich mit der vereinfachten Gewinnung mehrerer rekombinanter Proteine durch Sekretion in das Medium. Unter Verwendung des Maltosebindeproteins als Fusionspartner werden diese direkt aus dem Medium affinitätsgereinigt, um exemplarisch die Vorzüge der extrazellulären Proteinproduktion herauszustellen.

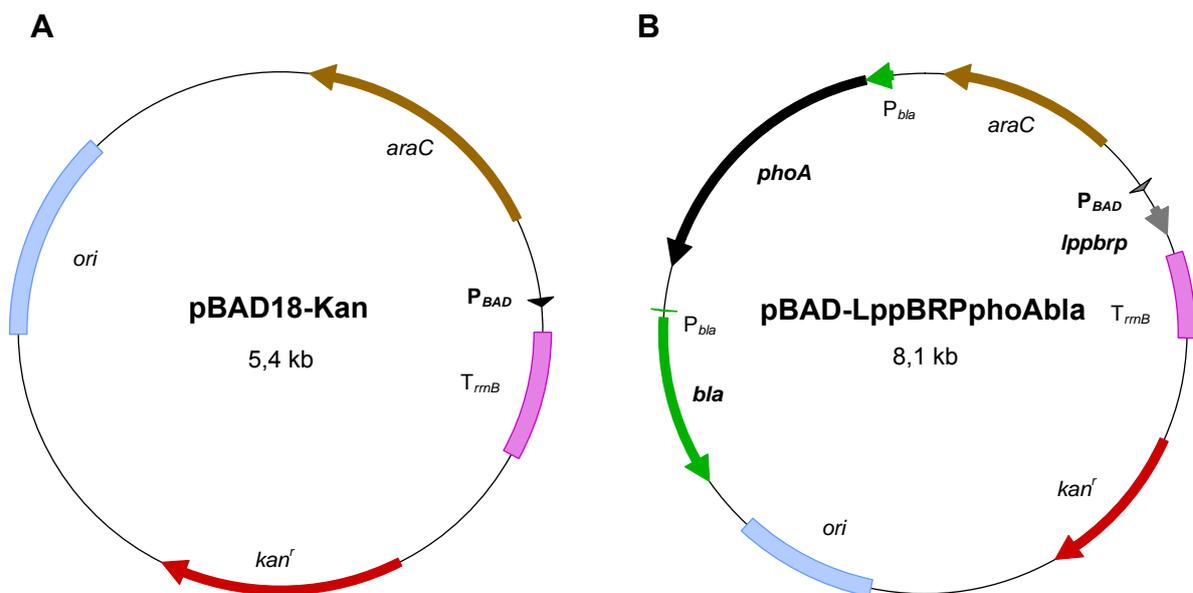
### 5.1 Etablierung eines Expressionssystems für die Sekretion rekombinanter Modellproteine: Stammentwicklung

Die BRP-Coexpression kann zur Sekretion periplasmatischer Proteine in das Kulturmedium genutzt werden. Unter starker BRP-Aktivität tritt jedoch ein Erliegen des Wachstums (BRP-Toxizität) bzw. eine Abnahme der Kulturtrübung (Quasi-Lyse) ein, weshalb die BRP-Expression kontrolliert ablaufen muss. Ein induzierbares und in der Stärke regulierbares BRP-Expressionssystem erschien dafür bevorzugt geeignet. Ihre höhere Kopienzahl und die resultierende höhere Gendosis sowie die einfache Übertragbarkeit zwischen unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen ließen plasmidbasierte Expressionssysteme, gegenüber chromosomal codierten, favorisieren. Diese Plasmide konnten darüber hinaus auch Zielproteine codieren, welche unter BRP-Einwirkung in das Medium sekretiert werden sollten. In früheren Arbeiten konnte die Expression von BRP und Zielprotein durch ein singuläres Plasmid bereits als vorteilhaft gegenüber binären Plasmidsystemen gezeigt werden (van der Wal *et al.*, 1995d). Als weitere Möglichkeit, der BRP-Toxizität zu begegnen, wurde die vergleichende Charakterisierung verschiedener BRP bezüglich ihrer Toxizität und Funktionalität gesehen. Mit Hilfe molekularer Veränderungen sollte eine Entkopplung der sekretionsfördernden, von der toxischen Eigenschaft des BRP, erreicht werden.

### 5.1.1 Konstruktion eines plasmidbasierten Expressions- und Sekretionssystems für rekombinante Proteine

Als Grundlage für ein induzier- und regulierbares BRP-Expressionssystem kann der  $P_{BAD}$ -Promotor des Arabinoseoperons (*araBAD*) aus *E. coli* dienen (Englesberg *et al.*, 1969b). Er ist sowohl durch Arabinose induzierbar, als auch über einen großen Bereich regulierbar (Guzman *et al.*, 1995). Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Sekretionssystem basiert auf dem Plasmid pBAD18-Kan (Abb. 5.1), welches neben dem  $P_{BAD}$ -Promotor auch das AraC-Regulatorprotein des Promotors codiert. Es diente als Grundlage für die Konstruktion unterschiedlicher Vektoren zur  $P_{BAD}$ -regulierten BRP-Expression. Optional wurden die Gene verschiedener rekombinanter Modellproteine hinzugefügt, welche unter BRP-Aktivität eine Sekretion in das Medium erfahren sollten.

Für die Optimierung der Sekretion wurde zunächst das Plasmid pBAD-LppBRPphoAbla erstellt, welches in Abb. 5.1 ebenfalls dargestellt ist.



**Abb. 5.1** Schematische Karten des ursprünglichen Plasmids pBAD18-Kan (A) und des konstruierten Plasmids pBAD-LppBRPphoAbla (B). pBAD-LppBRPphoAbla dient der Expression der Modellproteine alkalische Phosphatase (*phoA*) sowie  $\beta$ -Lactamase (*bla*) und deren Sekretion durch das Cloacin DF13 LppBRP (*lppbrp*).  $P_{bla}$ , konstitutiver Promotor der  $\beta$ -Lactamase; LppBRP, signalpeptidmodifiziertes Cloacin DF13 BRP;  $P_{BAD}$ , *araBAD*-Promotor (Arabinose-induzierbar);  $T_{rrnB}$ , *rrnB*-Transkriptionsterminator; *araC*, Regulatorprotein für  $P_{BAD}$ ; *kan<sup>r</sup>*, Kanamycinresistenzgen; *ori*, Replikationsursprung. Zentrale Bestandteile sind hervorgehoben. Die Konstruktion des Plasmids pBAD-LppBRPphoAbla ist dem Anhang (Abschnitt 9.5) zu entnehmen.

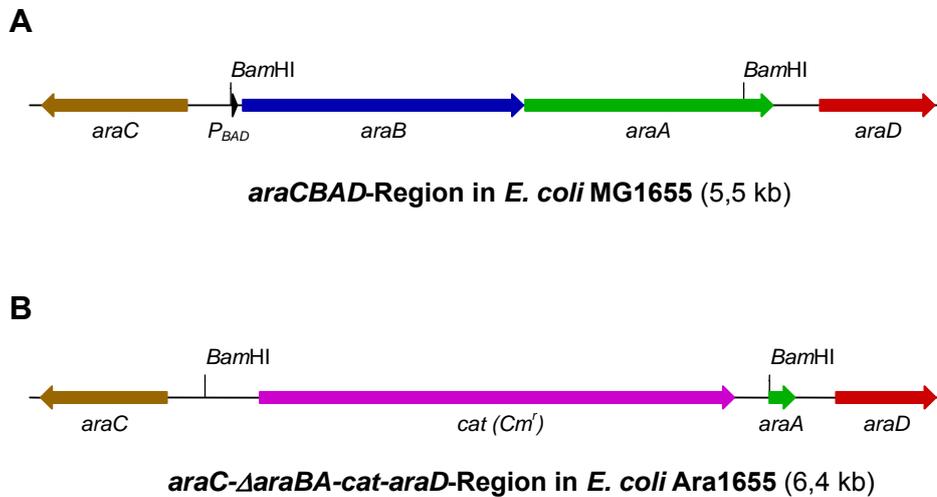
Es ermöglicht die  $P_{BAD}$ -regulierte Expression eines signalpeptidmodifizierten Cloacin DF13 BRP. Bei diesem BRP wurde das stabile, native SP durch das instabile SP des *E. coli* Mu-

reinlipoproteins (Lpp) substituiert (Luirink *et al.*, 1991). Das BRP wird daher als LppBRP (*lppbrp*-Gen) bezeichnet und soll im Vergleich zur nativen Variante eine geringere Cytotoxizität aufweisen. pBAD-LppBRPphoAbla codiert darüber hinaus die Modellproteine alkalische Phosphatase (AP, *phoA*-Gen) und  $\beta$ -Lactamase (Bla, *bla*-Gen), die in *E. coli* periplasmatisch lokalisiert sind und deren Synthese konstitutiv durch den  $P_{bla}$ -Promotor der  $\beta$ -Lactamase erfolgt. Unter BRP-Expression wurde für beide Proteine eine Sekretion in das Medium berichtet (Aono, 1989b; Yu & San, 1992). Mit Ausnahme von pAraKO (vgl. Abschnitt 5.1.2) sind sämtliche Plasmide, die im Rahmen dieser Arbeit für die BRP-vermittelte Proteinsekretion konstruiert wurden, Derivate von pBAD18-Kan und weisen einen analogen Aufbau zu pBAD-LppBRPphoAbla auf. Diese sind an den entsprechenden Stellen der Arbeit und im Anhang (Abschnitt 9.5) dokumentiert.

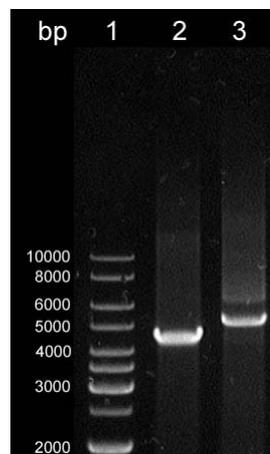
### 5.1.2 Konstruktion eines geeigneten *E. coli*-Stammes

*E. coli* kann *L*-Arabinose, den Induktor des  $P_{BAD}$ -Promotors, als Kohlenstoffquelle verwerten. Dies hat in der Regel einen raschen Verbrauch des Induktors zur Folge und muss im Kontext einer anhaltend induzierten BRP-Expression verhindert werden. Demzufolge ist ein effizienter Einsatz des  $P_{BAD}$ -Promotors nur in *E. coli*-Stämmen mit defektem Arabinosemetabolismus möglich. Die Arabinosedeградation kann durch chromosomale Deletion des beteiligten *araBAD*-Operons verhindert werden. Minimal ist dazu eine Inaktivierung des Proteins *L*-Arabinose Isomerase (*araA*-Gen) erforderlich, welches als initiales Enzym des Arabinosemetabolismus die Reaktion von *L*-Arabinose zu *L*-Ribulose katalysiert (vgl. Abschnitt 2.5, insb. Abb. 2.14). In der Vergangenheit wurden bereits *E. coli*-Stämme mit defektem Arabinosestoffwechsel erzeugt. Prominente Beispiele sind *E. coli* MC4100 und dessen Derivate (Casadaban & Cohen, 1980; Englesberg *et al.*, 1969b) sowie *E. coli* Top 10 (Fa. Invitrogen). Sie akkumulieren jedoch teilweise das toxische Arabinoseintermediat *L*-Ribulose-5-Phosphat (Englesberg *et al.*, 1962), oder weisen zahlreiche weitere, teils uncharakterisierte Mutationen auf. So konnte bei *E. coli* Top10 in Schüttelkolbenkultiverungen, aus unbekannter Ursache, nur eine geringe Proteinsekretion beobachtet werden (Daten nicht dargestellt). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Derivat des häufig verwendeten und gut charakterisierten *E. coli* Stammes K12 MG1655 (Blattner *et al.*, 1997) konstruiert, welches sich einzig durch einen Austausch der am Arabinosemetabolismus initial beteiligten Gene *araB* und *araA* durch das Chloramphenicolresistenz vermittelnde *cat*-Gen (CAT, Chloramphenicol Acetyltransferase) unterscheidet. Dieser Genaustausch erfolgte durch homologe Rekombination (Hamilton *et al.*, 1989) anhand des temperatursensitiven Plasmids pAraKO, in dem das *cat*-Gen beidseitig durch homologe Sequenzen des *araCBAD*-Bereichs von jeweils ca. 500 bp flankiert

wird. Die resultierende *araBA*-Deletion ist in Abb. 5.2 anhand eines chromosomalen Ausschnittes schematisch dargestellt.



**Abb. 5.2 Schematischer Vergleich der Region des Arabinoseoperons in *E. coli* MG1655 (A) und Ara1655 (B).** Der Bereich zwischen beiden *Bam*HI-Schnittstellen, welcher in MG1655  $P_{BAD}$ , *araB* und den Großteil von *araA* umfasst, ist in Ara1655 durch die Chloramphenicol-resistenz (*cat*) substituiert.



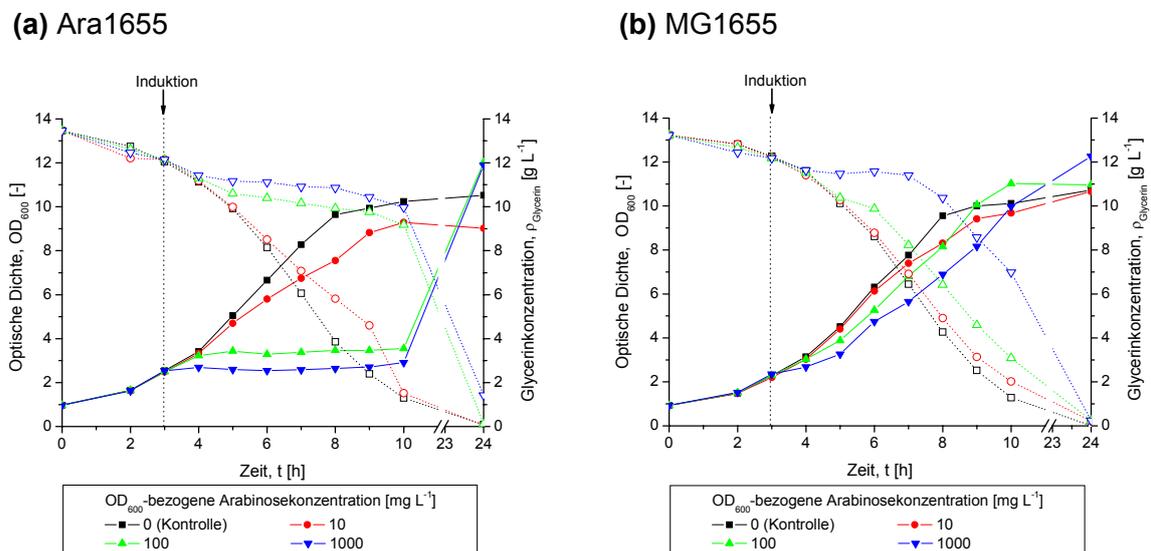
**Abb. 5.3 PCR-Amplifikation des *araBAD*-Operons in *E. coli* MG1655 und Ara1655.** Die Abbildung zeigt ein 1%iges Agarosegel in dem PCR-Produkte eines Teilbereichs des Arabinoseoperons aus *E. coli* MG1655 (Spur 2) und des gleichen chromosomalen Abschnitts in *E. coli* Ara1655 (Spur 3) aufgetrennt wurden. Ara1655 weist im Gegensatz zum 4,5 kb PCR-Produkt des nativen Arabinoseoperons von MG1655 ein DNA-Fragment der Größe 5,3 kb auf, welches dem Austausch durch das *cat*-Gen entspricht. Spur 1 enthält einen dsDNA-Standard, dessen Größen linksseitig aufgeführt sind. Die zur PCR-Amplifikation eingesetzten Primer sind in Tabelle 9.4 des Abschnittes 9.6 aufgeführt.

Das zur Rekombination eingesetzte Plasmid pAraKO und dessen Konstruktion ist im Anhang (Abschnitt 9.5) beschrieben. Neben der Unfähigkeit des konstruierten Stammes zum Wachstum unter Präsenz von Arabinose als singulärer Kohlenstoffquelle (Daten nicht dargestellt)

zeigte die in Abb. 5.3 dargestellte PCR-Amplifikation des Bereiches der homologen Rekombination die erfolgreiche Substitution von *araBA* gegen das *cat*-Gen, durch welche die Größe des PCR-Produktes um 0,8 kb zunahm. Die Verifikation der *araBA*-Deletion erfolgte durch anschließende Sequenzierung des PCR-Produktes (vgl. Abschnitt 9.6; Tabelle 9.4). Der generierte Stamm wurde fortan als *E. coli* Ara1655 bezeichnet.

### 5.1.3 Funktionelle Charakterisierung des Expressionssystems

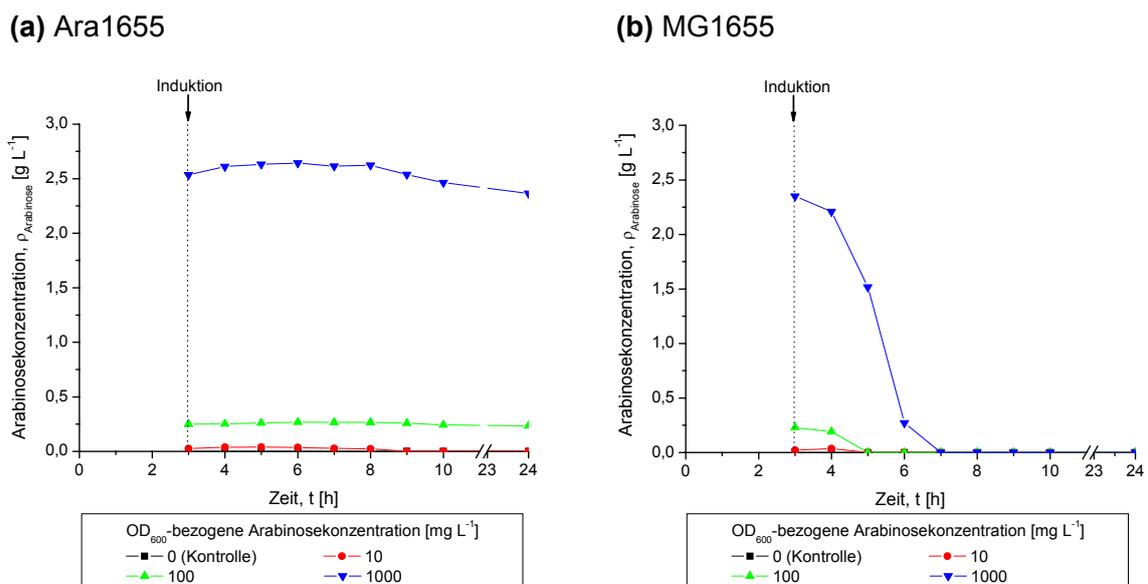
Zur vergleichenden Charakterisierung der beiden *E. coli*-Stämme MG1655 (*ara*<sup>+</sup>) und Ara1655 ( $\Delta$ *araBA*) bezüglich ihrer Eignung für die sekretorische Proteinproduktion, wurden diese mit dem Plasmid pBAD-LppBRPphoAbla transformiert. Die Untersuchungen erfolgten durch Schüttelkolbenkultivierung in synthetischem SGA-Medium. Dabei wurde die BRP-Expression während der exponentiellen Phase bei einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> ~ 2,5 durch Zugabe unterschiedlicher, auf die OD<sub>600</sub>-normierter Arabinosekonzentrationen induziert. Die Bestimmung der Glycerin- und Arabinosekonzentrationen sollte eine Bewertung der Verstoffwechslung beider potentieller Kohlenstoffquellen erlauben. Abb. 5.4. beschreibt die Wachstumsverläufe anhand der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) und dokumentiert den Verbrauch des Substrats Glycerin. Die Verläufe der Arabinosekonzentration sind in Abb. 5.5 dargestellt.



**Abb. 5.4 Wachstums- und Substratverbrauchsverläufe von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla (a) und *E. coli* MG1655 pBAD-LppBRPphoAbla (b).** Dargestellt sind die optischen Dichten (gefüllte Symbole) und die Glycerinkonzentrationen (offene Symbole) in Schüttelkolbenkultivierungen mit definiertem SGA-Medium. Die LppBRP-Expression erfolgte in unterschiedlicher Stärke durch Zugabe verschiedener OD<sub>600</sub>-bezogener Arabinosekonzentrationen.

Bis zum Induktionszeitpunkt wiesen alle Kulturen des jeweiligen Stammes vergleichbare optische Dichten auf. Während die optische Dichte der nicht-induzierten Kulturen beider Stämme bis zur Glycerinerschöpfung scheinbar unlimitiert zunahm, wurde nach Induktion der BRP-Expression insbesondere bei *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla eine von der Induktorkonzentration abhängige Beeinflussung der Wachstumsverläufe beobachtet. Aufgrund toxischer BRP-Expression kam es zu einem verringerten ( $10 \text{ mg L}^{-1}$  Arabinose) oder gestoppten Wachstum ( $100; 1000 \text{ mg L}^{-1}$  Arabinose). Während dieser Wachstumsstagnation war der Glycerinverbrauch stark reduziert.

Für den Kontrollstamm *E. coli* MG1655 pBAD-LppBRPphoAbla konnte hingegen selbst bei maximaler Induktorkonzentration von  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  pro  $\text{OD}_{600}$ -Einheit nur eine geringe, temporäre Beeinflussung des Wachstums beobachtet werden. Bei dieser Induktionsstärke erfolgte, trotz anhaltenden Wachstums, eine zwischenzeitliche Stagnation des Glycerinverbrauchs. Wie Abb. 5.5 zeigt, konnte diese durch die bevorzugte Verstoffwechslung der Arabinose erklärt werden.

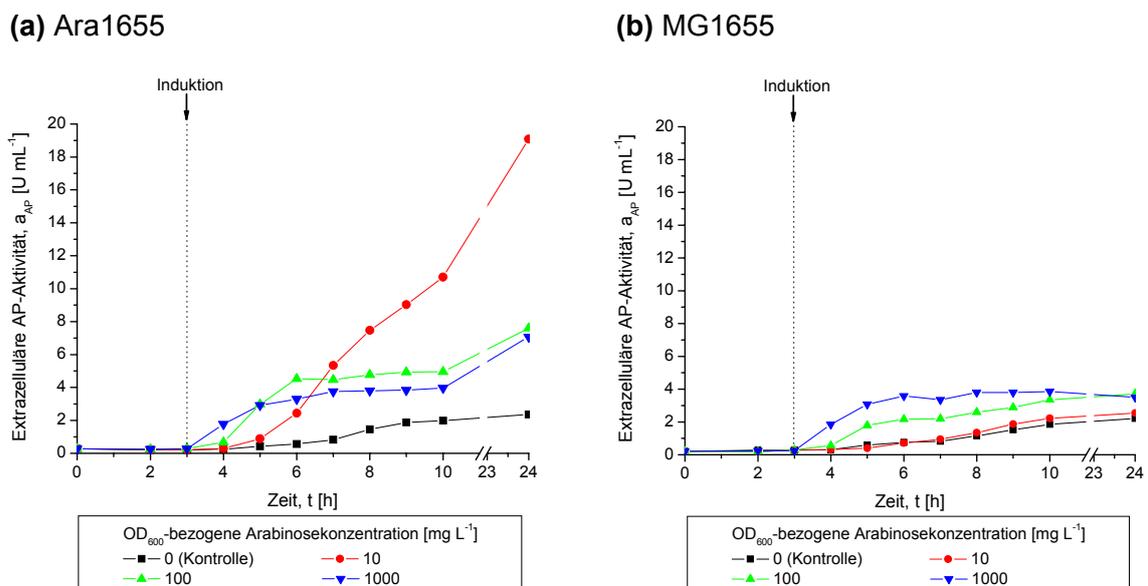


**Abb. 5.5** Arabinosekonsum in  $\Delta araBA$ -Mutante und Wildtyp. Verläufe der Arabinosekonzentrationen nach Zugabe während der Kultivierung von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla (a) und *E. coli* MG1655 pBAD-LppBRPphoAbla (b) in Schüttelkolben mit SGA-Medium.

Selbst nach Zugabe einer  $\text{OD}_{600}$ -bezogenen Arabinosekonzentration von  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  wurde das alternative Substrat durch den Kontrollstamm *E. coli* MG1655 pBAD-LppBRPphoAbla innerhalb weniger Stunden vollständig verstoffwechselt. Vermutlich ermöglichte der Induktorkonsum den Kulturen ein BRP-freies Wachstum in dem die BRP-Expression zum Erliegen kam.

Bei *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla blieben die Arabinosekonzentrationen aufgrund der Unfähigkeit des Stammes zur Nutzung des Kohlenhydrats über den gesamten Kultivierungsverlauf weitgehend unverändert. Die kontinuierliche Präsenz des Induktors führte bei ausreichender Konzentration zu einer anhaltend starken BRP-Expression, die den beobachteten andauernden Wachstumsstillstand erklären konnte. Das in Abb. 5.4 (a) dokumentierte wiedereinsetzende Wachstum der stark induzierten *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla-Kulturen nach längerem Wachstumsstillstand wurde des Öfteren beobachtet. Als Ursache für die Fähigkeit von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla zu erneutem Wachstum trotz andauernder Arabinosepräsenz konnte eine Stagnation der BRP-Expression durch Verlust des Plasmides pBAD-LppBRPphoAbla ermittelt werden (vgl. Abschnitt 5.2.1).

Anhand der extrazellulären Aktivität des Modellproteins alkalische Phosphatase beschreibt Abb. 5.6 die Proteinsekretion in Abhängigkeit von den eingesetzten Induktionsstärken.



**Abb. 5.6 Sekretion alkalischer Phosphatase in das Medium durch  $\Delta araBA$ -Mutante und Wildtyp.** Verläufe der extrazellulären AP-Aktivität in SGA-Schüttelkolbenkulturen von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla (a) und *E. coli* MG1655 pBAD-LppBRPphoAbla (b) bei unterschiedlicher Induktion der LppBRP-Expression durch Arabinosezugabe.

Für beide Stämme war eine Abhängigkeit zwischen der zugeführten Arabinosekonzentration und der AP-Sekretion, im Sinne einer rascher einsetzenden Freisetzung nach Zugabe höherer Konzentrationen, zu beobachten. Die induktionsfreien Kontrollkulturen zeigten in beiden Fällen nur einen vergleichbar geringen Anstieg der extrazellulären AP-Aktivität, welcher vermutlich durch spontane Sekretion begründet war. Eine direkte Korrelation zwischen einge-

setzter Induktorkonzentration und maximal erzeugter AP-Aktivität im Medium bestand aus verschiedenen Gründen nicht.

Aufgrund des Arabinoseverbrauchs kam die Proteinsekretion bei dem Kontrollstamm *E. coli* MG1655 pBAD-LppBRPphoAbla selbst nach maximaler Induktion ( $OD_{600}$ -bezogene Konzentration von  $1 \text{ g L}^{-1}$ ) innerhalb weniger Stunden zum Erliegen (Abb. 5.4 (b)). Dabei korrelierte der Zeitpunkt des Sekretionsstopps (ca. 6 h) mit dem Zeitpunkt des vollständigen Arabinoseverbrauchs zwischen 6 h und 7 h (vgl. Abb. 5.5). Demzufolge erlaubte die Induktion nur eine zeitweilige AP-Sekretion, wobei der überwiegende Anteil der Kultivierungen mit intrazellulärer AP-Produktion verlief. Insbesondere bei schwacher Induktion ( $10 \text{ mg L}^{-1}$  Arabinose pro  $OD_{600}$ -Einheit) war der Verlauf der extrazellulären AP-Aktivität annähernd identisch zur induktionsfreien Referenzkultur, so dass nur geringe Anteile der gebildeten AP sekretiert wurden. Die Arabinosedegradation verhinderte demnach bei dem Kontrollstamm *E. coli* MG1655 pBAD-LppBRPphoAbla eine kontinuierliche Proteinsekretion in das Kulturmedium.

Wie der stagnierende Anstieg extrazellulärer AP-Aktivität zeigt, wurde auch bei *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla nach starker Induktion ( $100$  bzw.  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  Arabinose pro  $OD_{600}$ -Einheit) ein Erliegen der Sekretion beobachtet. Im Gegensatz zu *E. coli* MG1655 pBAD-LppBRPphoAbla war dies vermutlich nicht durch den Verbrauch des Induktors der BRP-Expression (vgl. Abb. 5.5), sondern durch den Wachstumsstopp aufgrund toxischer BRP-Expression (vgl. Abb. 5.4) zu erklären. Deutliche Unterschiede gegenüber *E. coli* MG1655 pBAD-LppBRPphoAbla ergaben sich bezüglich der AP-Sekretion bei schwacher Induktion ( $10 \text{ mg L}^{-1}$  Arabinose pro  $OD_{600}$ -Einheit). So war das anhaltende, jedoch leicht gebremste, Wachstum des modifizierten Stammes durch einen stetigen Anstieg der extrazellulären AP-Aktivität begleitet. Dieser Zusammenhang wurde als Möglichkeit zur Regulation der BRP-Expressionsstärke interpretiert, die eine kontinuierliche Proteinsekretion unter Aufrechterhaltung des Wachstums erlaubte. Mit  $a_{AP} = 19,1 \text{ U mL}^{-1}$  konnte durch *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla bei Abbruch der Kultivierung eine etwa 2,7fach höhere extrazelluläre AP-Aktivität als nach maximaler Induktion mit  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  Arabinose pro  $OD_{600}$ -Einheit ( $a_{AP} = 7,1 \text{ U mL}^{-1}$ ) erreicht werden. Im Vergleich zur induktionsfreien Kontrollkultur ( $a_{AP} = 2,4 \text{ U mL}^{-1}$ ) betrug die Verstärkung der Proteinsekretion sogar Faktor 8.

Bei der schwach induzierten *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla-Kultur ( $10 \text{ mg L}^{-1}$  Arabinose pro  $OD_{600}$ -Einheit) wurde im Zeitraum zwischen 10 h und 24 h Kultivierungsdauer, trotz unveränderter Zelldichte, ein Anstieg der AP-Aktivität im Medium von  $10,7 \text{ U mL}^{-1}$  auf  $19,1 \text{ U mL}^{-1}$  bestimmt. Dieser ließ sich durch eine andauernde AP-Sekretion während der Stationärphase aufgrund beständiger BRP-Aktivität erklären, da bei der induktionsfreien Kontrollkultur im gleichen Zeitraum kein vergleichbarer Anstieg zu beobachten war. In der Phase wieder einsetzenden Wachstums nach starker Induktion der *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla-Kulturen ( $100$  bzw.  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  Arabinose pro  $OD_{600}$ -Einheit) erfolgte im

gleichen Zeitraum nur eine geringe Sekretion des Reporterproteins. Dieses konnte auf einen Verlust des Plasmides pBAD-LppBRPphoAbla zurückgeführt werden, wie in Abschnitt 5.2.1 näher erläutert wird.

Der Vergleich beider Stämme zeigte eine deutliche Optimierung der  $P_{BAD}$ -regulierten Sekretion durch Inaktivierung des Arabinosestoffwechsels. Einerseits erwies sich *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla als sensitiv gegenüber hohen Induktorkonzentrationen, da diese durch toxische LppBRP-Expression zu einem Erliegen des Wachstums führten. Andererseits ermöglichte dieser Stamm eine kontinuierliche Proteinsekretion und erforderte dazu nur geringe Konzentrationen des Induktors. Bei angepasster Induktion erfolgte die Proteinsekretion unter Aufrechterhaltung des Zellwachstums. So wurde aufgrund der stetigen Präsenz des Induktors durch *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla über fünfmal mehr AP in das Medium sekretiert als durch *E. coli* MG1655 pBAD-LppBRPphoAbla (maximal  $19,1 \text{ U mL}^{-1}$  gegenüber  $3,7 \text{ U mL}^{-1}$ ).

#### 5.1.4 Auswahl eines geeigneten BRPs

Nachdem die Eignung der  $P_{BAD}$ -regulierten LppBRP-Expression für die Proteinsekretion anhand des *E. coli*-Stammes Ara1655 und des Plasmides pBAD-LppBRPphoAbla gezeigt werden konnte, wurden verschiedene BRP bezüglich ihrer Fähigkeit zur Sekretion und ihrer Cytotoxizität untersucht. Dies sollte eine ggf. bevorzugte Eignung bestimmter BRP für die extrazelluläre Produktion rekombinanter Proteine aufdecken. Die Auswahl eines optimalen BRP wurde im Vorfeld von Untersuchungen zur Ermittlung der Effizienz BRP-vermittelter Sekretion (vgl. Abschnitt 5.2) durchgeführt.

BRP unterschiedlichen Ursprungs variieren primär in der Struktur ihrer Signalpeptide (van der Wal *et al.*, 1995b). So unterscheiden sich die reifen Anteile der beiden bisweilen häufig eingesetzten BRP des Cloacins DF13 und des Colicins E1 in nur zwei ihrer 28 Aminosäuren. Aus diesem Grund sind verschiedene BRP im Hinblick auf die Freisetzung von Bacteriocinen funktionell austauschbar (Hakkaart *et al.*, 1981; Oudega *et al.*, 1984; Yamada *et al.*, 1982).

Frühere Arbeiten zeigten jedoch Differenzen bezüglich der Stabilität, d.h. der proteolytischen Degradation, ihrer Signalpeptide nach Prozessierung der BRP durch die Signalpeptidase (van der Wal *et al.*, 1994). Die hohe Stabilität des nativen Cloacin DF 13 BRP-Signalpeptides führt zu einer Verstopfung der Sec-Poren in der inneren Membran und verringert die Zellviabilität dadurch zusätzlich, während ein Austausch durch das instabile Lpp-Signalpeptid (LppBRP) dessen Toxizität reduziert (Luirink *et al.*, 1991). Das SP des Colicin E1 BRP unterliegt im Gegensatz zu dem des nativen Cloacin DF13 BRP einer schnelleren Degradation

(Cavard, 1991), so dass für dieses BRP analog zum signalpeptidmodifizierten Cloacin DF13 LppBRP eine reduzierte Toxizität erwartet werden konnte.

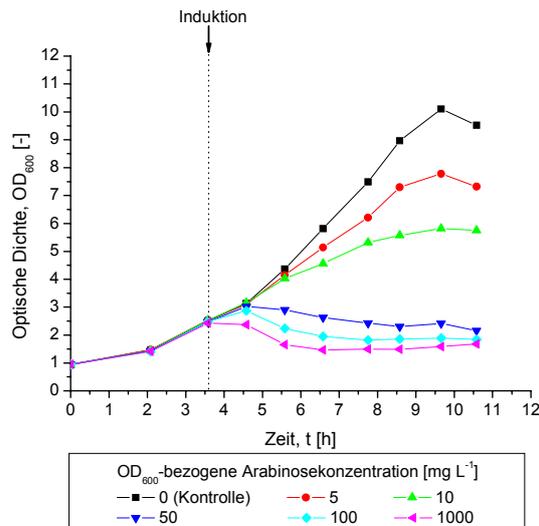
Vor dem Hintergrund ihrer Eignung für die extrazelluläre Proteinproduktion wurden das Cloacin DF13 BRP und seine LppBRP-Variante sowie das Colicin E1 BRP verglichen. Darüber hinaus wurde eine Variante des Cloacin DF13 LppBRP miteinbezogen, die C-terminal durch einen Hexahistidin-*tag* modifiziert ist und einen immunologischen Nachweis des BRPs ermöglichen sollte (Cloacin DF13 LppBRP-His<sub>6</sub>). Die Expression der verschiedenen BRP erfolgte durch den P<sub>BAD</sub>-Promotor. Dazu wurden Vektoren konstruiert, die eine analoge Organisation zu pBAD-LppBRPphoAbla (vgl. Abb. 5.1) aufwiesen, wobei das LppBRP durch die verschiedenen BRP substituiert war. Die so erzeugten Plasmide sind in Tabelle 5.1 aufgeführt und wurden in *E. coli* Ara1655 eingebracht. Zur Dokumentation der Proteinsekretion wurde das Reporterprotein AP herangezogen.

**Tabelle 5.1** Übersicht der verglichenen BRP und ihrer Plasmidhintergründe. Die Konstruktion der Plasmide ist dem Anhang (Abschnitt 9.5) zu entnehmen.

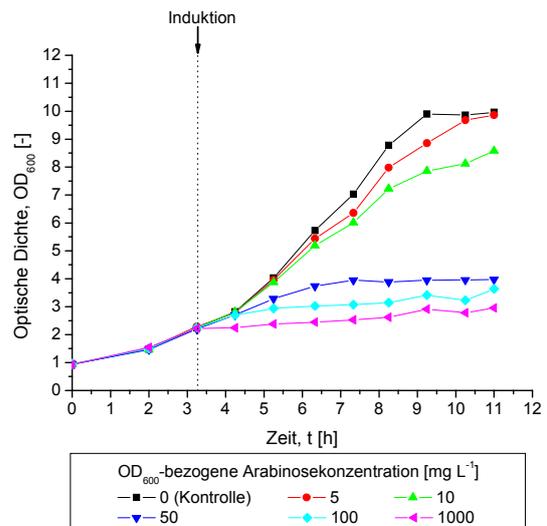
| BRP                                  | Plasmid                              |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Cloacin DF13 BRP                     | pBAD-BRPphoAbla                      |
| Cloacin DF13 LppBRP                  | pBAD-LppBRPphoAbla                   |
| Colicin E1 BRP                       | pBAD-KilE1phoAbla                    |
| Cloacin DF13 LppBRP-His <sub>6</sub> | pBAD-LppBRP-His <sub>6</sub> phoAbla |

Eine vergleichende Charakterisierung der Toxizität und Funktionalität der verschiedenen BRP erfolgte analog zu Abschnitt 5.1.3 durch Schüttelkolbenkultivierungen in SGA-Medium mit Induktion der BRP-Expression durch verschiedene OD<sub>600</sub>-normierte Arabinosekonzentrationen. Die BRP-Toxizität wurde anhand der wachstumscharakteristischen optischen Dichte beurteilt und ist in Abb. 5.7 dargestellt. Die Kultivierungsverläufe belegen insgesamt geringe Unterschiede bezüglich der Toxizität dieser BRP. So führten OD<sub>600</sub>-bezogene Induktorkonzentrationen von mehr als 10 mg L<sup>-1</sup> Arabinose stets zu einem annähernden oder vollständigen Erliegen des Wachstums. Die Toxizität zeigte sich jedoch bei den nativen BRP (CloDF13 BRP und ColE1 BRP) im Vergleich zum SP-modifizierten CloDF13 LppBRP und CloDF13 LppBRP-His<sub>6</sub> leicht erhöht. So war die Induktion mit mindestens 50 mg L<sup>-1</sup> Arabinose bei den nativen BRP stets mit einer Abnahme der optischen Dichte verbunden (Quasi-Lyse), während die Kulturen mit CloDF13 LppBRP und CloDF13 LppBRP-His<sub>6</sub> bei diesen Induktionsstärken entweder Stagnationen oder noch geringe Anstiege der OD<sub>600</sub> zeigten. Auch bei schwacher Induktion mit 5 bzw. 10 mg L<sup>-1</sup> Arabinose wiesen die Stämme mit den beiden modifizierten BRP etwas geringere Wachstumsbeeinflussungen auf.

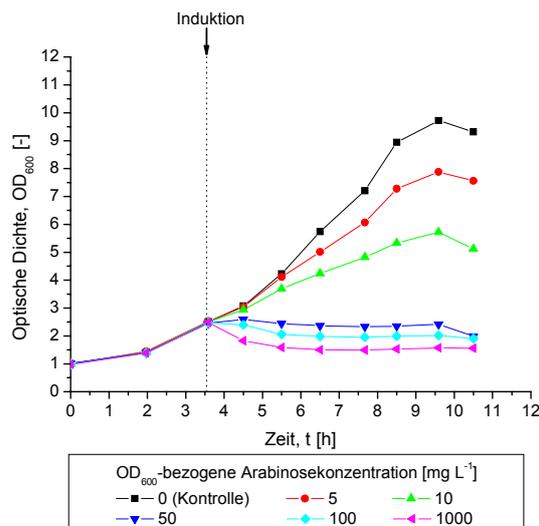
(a) CloDF13 BRP



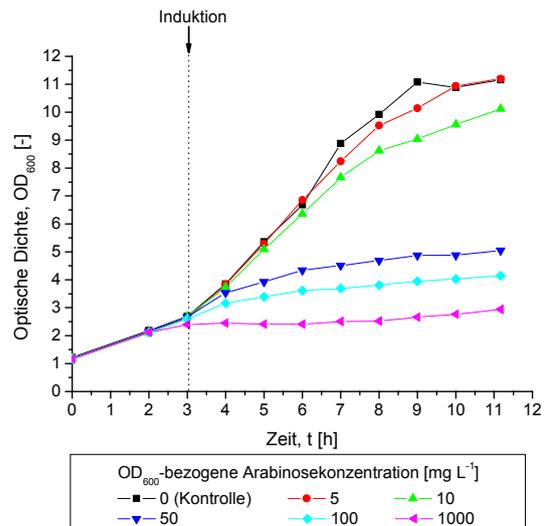
(b) CloDF13 LppBRP



(c) ColE1 BRP



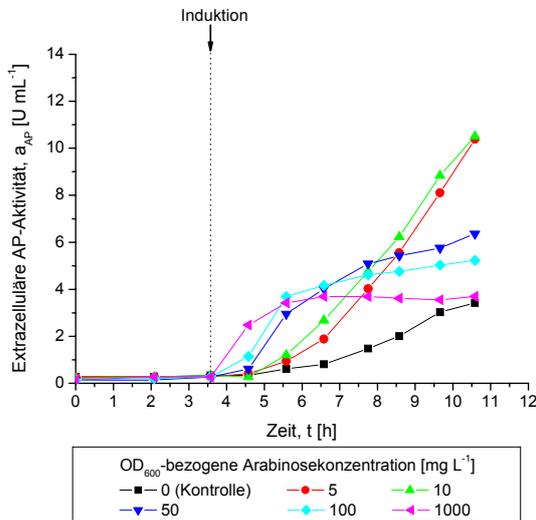
(d) CloDF13 LppBRP-His<sub>6</sub>



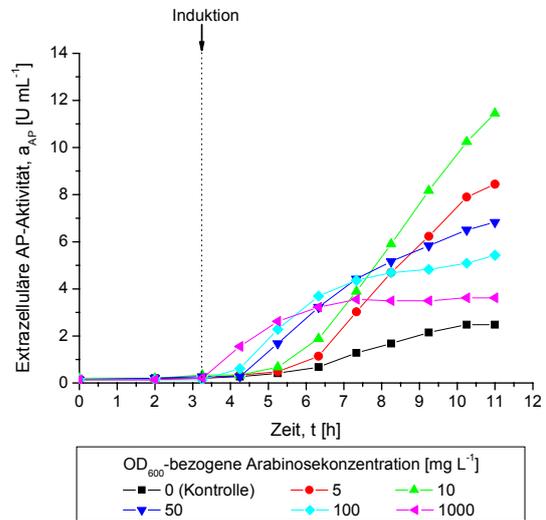
**Abb. 5.7 Wachstumsverläufe von *E. coli* Ara1655 unter Expression verschiedener BRP. (a)** Cloacin DF13 BRP; **(b)** Cloacin DF13 LppBRP; **(c)** Colicin E1 BRP; **(d)** Cloacin DF13 LppBRP-His<sub>6</sub>. Die BRP-Expression erfolgte in unterschiedlicher Stärke durch Zugabe entsprechender Arabinosekonzentrationen. Die Abbildung zeigt Schüttelkolbenkultivierungen in chemisch definiertem SGA-Medium.

Wie die in Abb. 5.8 aufgeführten extrazellulären AP-Aktivitäten belegen, ist auch die Funktionalität der betrachteten BRP vergleichbar.

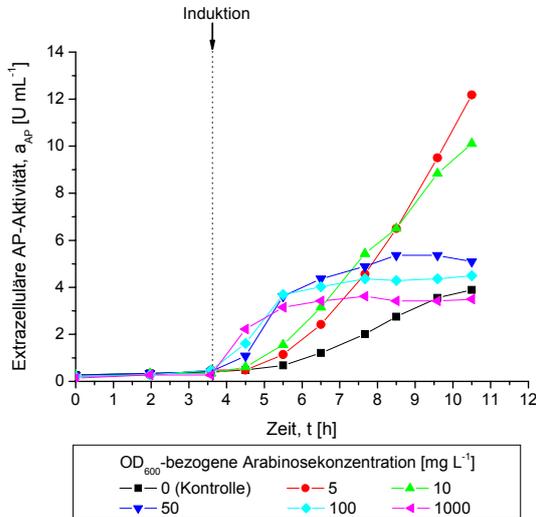
(a) CloDF13 BRP



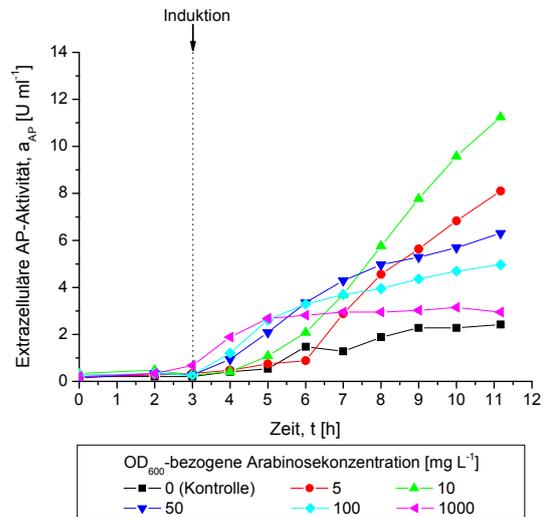
(b) CloDF13 LppBRP



(c) ColE1 BRP



(d) CloDF13 LppBRP-His<sub>6</sub>

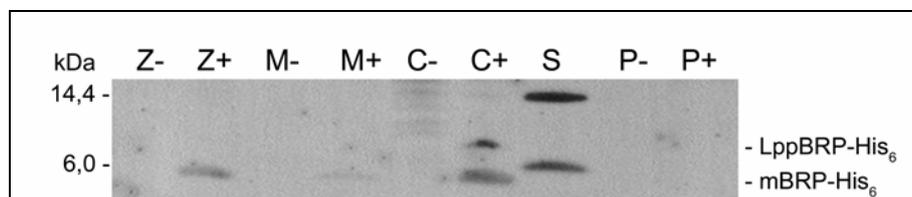


**Abb. 5.8 Sekretion alkalischer Phosphatase in das Medium durch verschiedene BRP.** (a) Cloacin DF13 BRP; (b) Cloacin DF13 LppBRP; (c) Colicin E1 BRP; (d) Cloacin DF13 LppBRP-His<sub>6</sub>. Die BRP-Expression erfolgte in unterschiedlicher Stärke durch Zugabe entsprechender Arabinosekonzentrationen. Die Abbildung basiert auf Schüttelkolbenkultivierungen in definiertem SGA-Medium.

Bei gleichen Induktionsstärken zeigten sich jeweils nur geringe Unterschiede bezüglich der Proteinsekretion. Optimale Bedingungen wurden für alle BRP bei OD<sub>600</sub>-bezogenen Induk-

torkonzentrationen von 5 und 10 mg L<sup>-1</sup> Arabinose beobachtet, da diese eine kontinuierliche Sekretion unter Aufrechterhaltung des bakteriellen Wachstums ermöglichten. Bei diesen Induktionsstärken lagen die bei Erreichen der Stationärphase erzielten extrazellulären AP-Aktivitäten für alle vier BRP in einem vergleichbaren Bereich zwischen 10,5 und 12,2 U mL<sup>-1</sup> und wiesen demnach eine Schwankung von nur 14% bezogen auf die maximal erreichte Aktivität auf. Die Aktivitäten waren jedoch noch im Anstieg, so dass während der Stationärphase vermutlich, wie in Abschnitt 5.1.3 beobachtet, eine weitere Zunahme hätte beobachtet werden können (vgl. Abb. 5.6 (a)). Da das Ziel dieser Analysen die vergleichende Charakterisierung der BRP bezüglich Toxizität und Funktionalität war, wird auf die Darstellung der Zusammenhänge während der Stationärphase an dieser Stelle verzichtet.

Anhand seines Hexahistidinanteils wurde die Lokalisation des CloDF13 LppBRP-His<sub>6</sub> innerhalb der Kultur immunologisch nachgewiesen. Der Nachweis ist in Abb. 5.9 dargestellt und zeigte eine primäre Lokalisation in membranhaltigen Zelltrümmern und im Cytoplasma. Die Cytoplasmafraktion enthielt neben der erwarteten unprozessierten Präform (LppBRP-His<sub>6</sub>), vorwiegend das reife mBRP-His<sub>6</sub>. Da die BRP-Prozessierung an den Sec-Transport über die innere Membran gekoppelt ist, konnte die reife Form nicht aus dem Cytoplasma stammen. Es wurde daher vermutet, dass während der Ultraschallpräparation des Cytoplasmas ein Teil des membranständigen mBRP-His<sub>6</sub> in die Cytoplasmafraktion gelangte und daher ebenfalls in dieser Fraktion nachweisbar war. Die Lokalisation des (Lpp)BRP-His<sub>6</sub> war demnach gegenüber der des nativen Cloacin DF13 BRP nicht verändert (Luirink *et al.*, 1988). Mit dem LppBRP-His<sub>6</sub> stand folglich eine immunologisch nachweisbare Variante des LppBRP zur Verfügung. Im Western-Blot zeigten sich Abweichungen der tatsächlichen von den theoretischen Molmassen des BRP (5,6 kDa für die Präform und 3,7 kDa für die reife Form), die durch dessen Lipidmodifikation erklärt werden könnten.



**Abb. 5.9** Lokalisation des LppBRP-His<sub>6</sub> in den Fraktionen Cytoplasma (C), Periplasma (P) und Medium (M), sowie in membranhaltigen Zelltrümmern (Z). Vergleich 3 h nach Induktion der Expression mit 1000 mg L<sup>-1</sup> Arabinose (+) und vor Induktion (-). Die Molmassen des Größenstandards S sind am linken Rand aufgeführt. Nachweis durch Western-Blot 12%iger SDS-Gele mit Penta-His-Antikörper.

Die dargestellten Untersuchungen belegen insgesamt geringe Unterschiede, sowohl bezüglich der Toxizität verschiedener BRP, als auch ihrer Fähigkeit zur Förderung der AP-

Sekretion in das Medium. Diese vergleichbare Funktionalität kann durch die annähernde Identität der reifen Anteile aller untersuchten BRP erklärt werden und bestätigt die, für Bacteriocine bekannte, funktionelle Austauschbarkeit von BRP (Pugsley & Schwartz, 1983) auch für das Modellprotein AP. Selbst die Erweiterung des Cloacin DF13 LppBRP durch das C-terminale Hexahistidin scheint keinen grundlegenden Einfluss auf dessen Toxizität und Funktionalität zu haben. Diese geringen Unterschiede beweisen eine vergleichbare Eignung aller betrachteten BRP für die extrazelluläre Proteinproduktion.

Die Modifikation des Cloacin DF13 BRP mit dem Lpp-SP stellt nach den vorliegenden Daten nur eine geringe Verbesserung dar und bewirkt lediglich eine schwache Reduktion der Toxizität. Auch die Toxizität der nativen BRP des Colicins E1 und des Cloacins DF13 zeigte sich trotz unterschiedlich stabiler SP vergleichbar. Demzufolge haben die Signalpeptide keinen maßgeblichen Einfluss auf die Vitalität BRP-exprimierender Zellen. Aufgrund ihrer leicht reduzierten Toxizität bzw. der immunologischen Nachweisbarkeit wurden das CloDF13 LppBRP bzw. das CloDF13 LppBRP-His<sub>6</sub> für alle weiteren Untersuchungen eingesetzt.

### **5.1.5 Molekulare Optimierung des LppBRP: Funktionalität und Toxizität von LppBRP-Hybridproteinen**

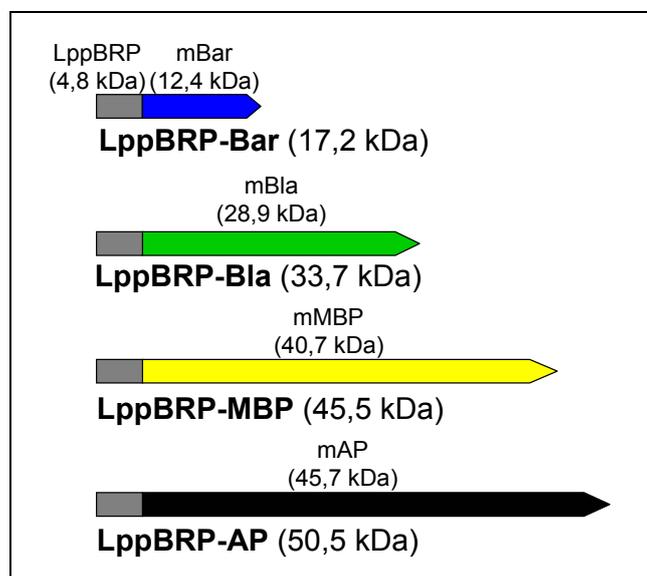
BRP verursachen eine Perforation der äußeren Membran, indem sie eine lokale Degradation der Lipide initiieren. Dies geschieht durch einen Austausch von Lipopolysacchariden gegen Phospholipide, welcher die Aktivität einer membranständigen Phospholipase stimuliert (Dekker *et al.*, 1999; Snijder & Dijkstra, 2000). Da der Wirkmechanismus von BRP, d.h. der Ablauf dieser Lipidsubstitution bislang nicht vollständig aufgeklärt wurde, sind auch die genauen Ursachen der BRP-Toxizität nicht bekannt.

Der Lipidanteil des BRP kann als alleiniger Effektor für die Störung des Membrangefüges ausgeschlossen werden, da vergleichbar organisierte Lipoproteine wichtige zelluläre Funktionen übernehmen und teilweise prominent in der äußeren Membran vertreten sind (Cascales *et al.*, 2002; Hirashima *et al.*, 1974). Eine alleinige Verantwortung des Proteinanteils für die BRP-Toxizität konnte in früheren Arbeiten durch gezielte Verhinderung der Lipidmodifikation ebenfalls widerlegt werden (Luirink *et al.*, 1988; Pugsley & Cole, 1987). Demzufolge sind sowohl Lipid- als auch Proteindomäne an der BRP-Funktionalität und -Toxizität beteiligt.

Die in Abschnitt 5.1.4 dargestellte vergleichende Charakterisierung deckte keine grundlegenden Unterschiede zwischen verschiedenen BRP auf, so dass eine Optimierung der BRP-vermittelten Proteinsekretion allenfalls durch molekulare Veränderung von BRP möglich erschien. In früheren Arbeiten konnte durch Mutations- und Deletionsanalysen der Proteindomäne des BRP nur eine geringe Entkopplung von BRP-Toxizität und -Funktionalität, jedoch

keine entscheidende Verbesserung für die sekretorische Proteinproduktion erreicht werden (Luirink *et al.*, 1989; van der Wal *et al.*, 1998). Am Beispiel des LppBRP wurde gezeigt, dass die C-terminale Fusion eines Hexahistidin-Peptids keine maßgebliche Veränderung der Funktionalität, Toxizität und Lokalisation des BRP hervorruft (vgl. Abschnitt 5.1.4). Auf Basis dieser Beobachtung wurde wie nachfolgend dargestellt untersucht, ob sich die zentralen Charakteristika des LppBRP in Anwesenheit von Fusionspartnern unterschiedlicher Natur und Größe verändern. Insbesondere galt es zu klären, ob die Erweiterung des Proteinanteils zu einer Reduktion der BRP-Toxizität beitragen kann.

Zur Konstruktion von LppBRP-Hybridproteinen wurde das LppBRP, wie in Abb. 5.10 aufgeführt, durch verschiedene Proteine C-terminal erweitert.



**Abb. 5.10 Schematischer Aufbau der LppBRP-Fusionsproteine.** Bei LppBRP-Bar wird zusätzlich der Inhibitor Barstar (nicht dargestellt) exprimiert, um die cytoplasmatische Aktivität der Barnase zu verhindern.

Als Fusionspartner wurden die Proteine Barnase (Bar),  $\beta$ -Lactamase (Bla), Maltosebindprotein (MBP) und alkalische Phosphatase (AP) verwendet. Mit Molmassen zwischen 12,4 und 46,3 kDa deckten diese ein ausgedehntes Größenspektrum ab und sollten anhand ihrer enzymatischen Aktivität bzw. immunologischen Nachweisbarkeit eine Lokalisationsbestimmung der LppBRP-Fusionsproteine erlauben. Um mögliche Komplikationen bei der Sec-Translokation der LppBRP-Hybridproteine zu umgehen, wurden ausschließlich Proteine ausgewählt, die analog zu BRP über den Sec-Pfad in das Periplasma exportiert werden können. Die nativen SP der Fusionspartner wurden bei der Klonierung entfernt, um eine intramolekulare Redundanz von Signalpeptiden zu verhindern. Bei dem Hybridprotein LppBRP-Bar erfolgte zusätzlich die Expression des Barnase-Inhibitors Barstar vom gleichen Plasmid (vgl.

Abschnitt 9.5; Abb. 9.1). Diese sollte die ebenfalls toxische cytoplasmatische Aktivität der Barnase nivellieren.

Die Proteinsekretion wurde mittels der Reporterproteine AP und  $\beta$ -Lactamase dokumentiert, wobei für das Fusionskonstrukt LppBRP-AP nur  $\beta$ -Lactamase und für LppBRP-Bla nur AP als sekretorische Modellproteine herangezogen wurde, um Interferenzen bei der Lokalisationsbestimmung beider LppBRP-Fusionsproteine zu vermeiden (Tabelle 5.2).

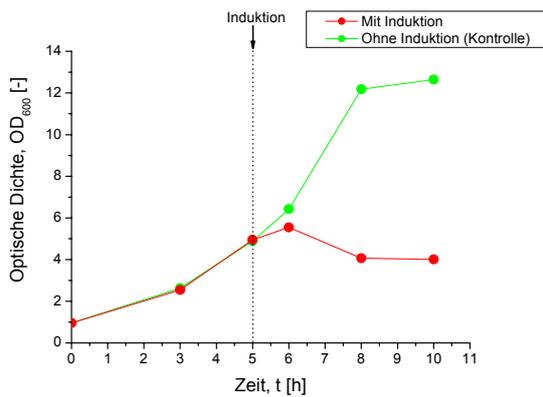
**Tabelle 5.2 Übersicht der konstruierten LppBRP-Fusionsproteine und verwendeten Sekretionsreporter.** Die Konstruktion der codierenden Plasmide ist dem Anhang (Abschnitt 9.5) zu entnehmen.

| Protein    | Fusionsanteil     | Sekretionsreporter | Plasmid     |
|------------|-------------------|--------------------|-------------|
| LppBRP-Bar | Barnase (Barstar) | AP / Bla           | pLppBRP-Bar |
| LppBRP-Bla | Bla               | AP                 | pLppBRP-Bla |
| LppBRP-MBP | MBP               | AP / Bla           | pLppBRP-MBP |
| LppBRP-AP  | AP                | Bla                | pLppBRP-AP  |

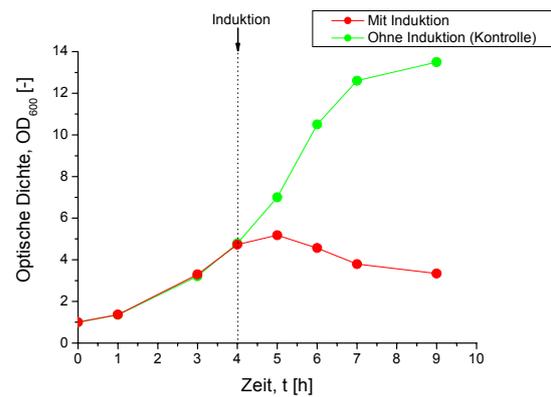
Nach jeweiliger Transformation des *E. coli*-Stammes Ara1655 mit den in Tabelle 5.2 aufgeführten Plasmiden wurden die erzeugten Stämme in SGA-Medium (Schüttelkolben) kultiviert. Die Expression der LppBRP-Hybridproteine sollte mit maximaler Stärke erfolgen, da nur eine grundlegende Reduktion der BRP-Toxizität als Optimierung betrachtet werden konnte. Dementsprechend wurden zur Expression der LppBRP-Fusionsproteine Induktorkonzentrationen eingesetzt, die sich gemäß der in Abschnitt 5.1.4 dargestellten Untersuchungen als toxisch erwiesen ( $OD_{600}$ -normierte Konzentration von  $1 \text{ g L}^{-1}$  Arabinose). Als Kontrollen dienten jeweils induktionsfreie Kulturen.

Die resultierenden Kultivierungsverläufe sind in Abb. 5.11 dargestellt. Für alle vier betrachteten Hybrid-BRP trat nach Induktion eine Stagnation oder Abnahme der  $OD_{600}$  ein. Demnach zeigte sich die Toxizität der LppBRP-Hybridproteine unverändert und verhinderte ein andauerndes Wachstum. Dem primären Ziel eine signifikante Reduktion der BRP-Toxizität zu erreichen, konnte somit durch keines der konstruierten Proteine entsprochen werden.

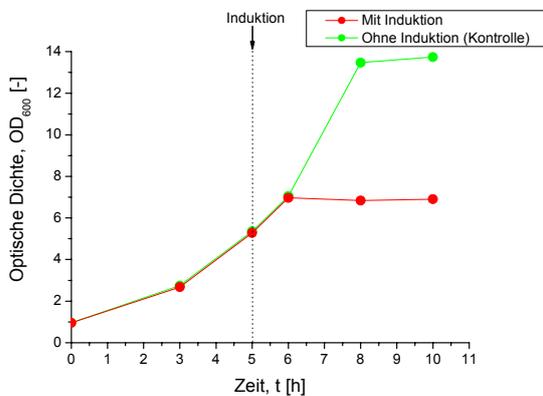
(a) LppBRP-Bar



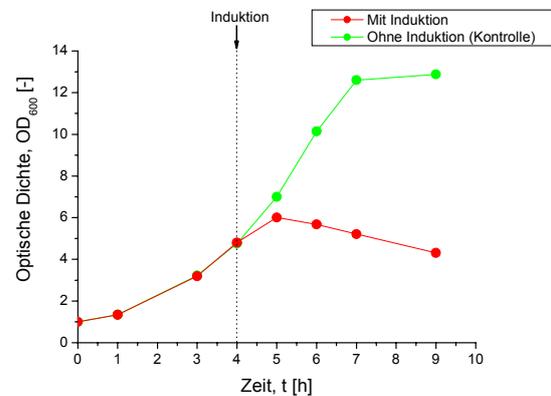
(b) LppBRP-Bla



(c) LppBRP-MBP



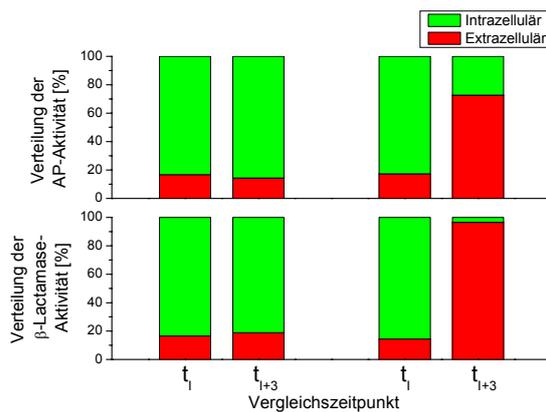
(d) LppBRP-AP



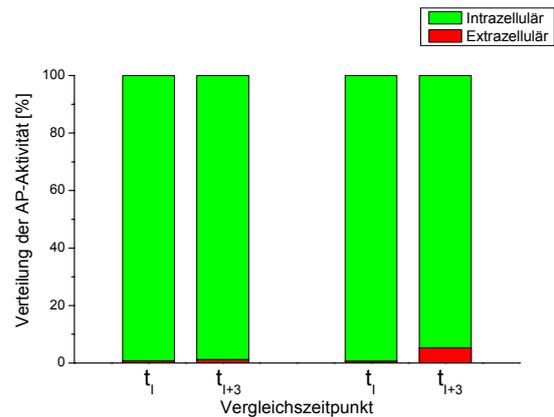
**Abb. 5.11** Wachstumsverläufe von *E. coli* Ara1655 unter starker Expression der LppBRP-Hybridproteine (a) LppBRP-Bar, (b) LppBRP-Bla, (c) LppBRP-MBP und (d) LppBRP-AP. Die BRP-Expression erfolgte mit einer OD<sub>600</sub>-normierten Arabinosekonzentration von 1 g L<sup>-1</sup>. Die Abbildung basiert auf Schüttelkolbenkultivierungen in definiertem SGA-Medium.

Die Funktionalität der BRP wurde dennoch untersucht und ist in Abb. 5.12 dargestellt. Anstelle der extrazellulären Aktivität der Reporterproteine AP und Bla wurde bei diesen Untersuchungen die Verteilung der Aktivität zwischen Zellen und Medium vor und nach Induktion bestimmt, um den Freisetzungsgrad der Modellproteine einschätzen zu können.

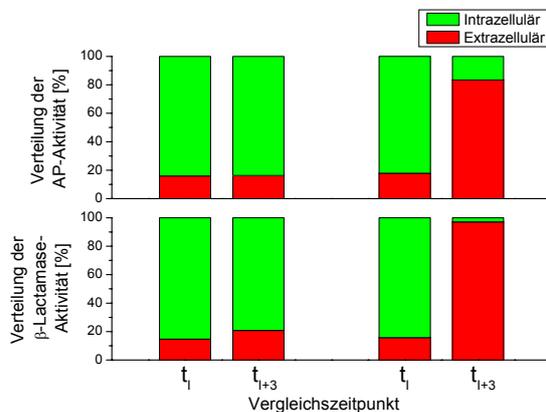
(a) LppBRP-Bar



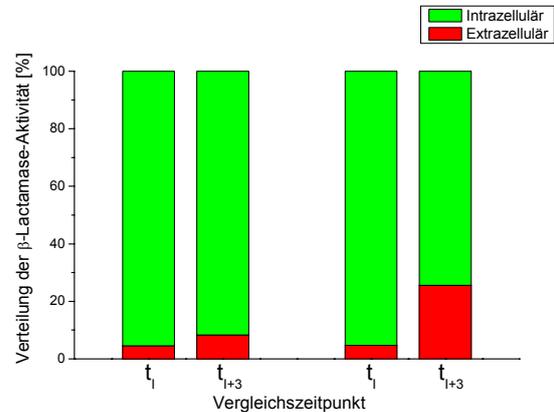
(b) LppBRP-Bla



(c) LppBRP-MBP



(d) LppBRP-AP

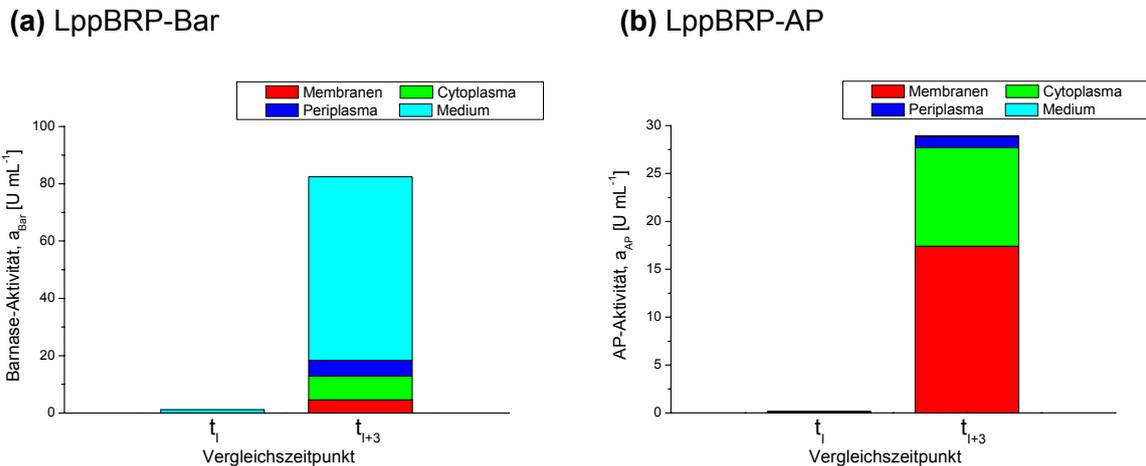


**Abb. 5.12** Verteilung der Sekretionsreporter AP und Bla zwischen Zellen und Medium vor ( $t_1$ ) und 3 h nach Induktion ( $t_{1+3}$ ) der Expression von (a) LppBRP-Bar, (b) LppBRP-Bla, (c) LppBRP-MBP und (d) LppBRP-AP. Die Aktivitätsbestimmung der Reporter erfolgte unmittelbar vor Induktion sowie beim Übergang der Kontrollkultur in die Stationärphase.

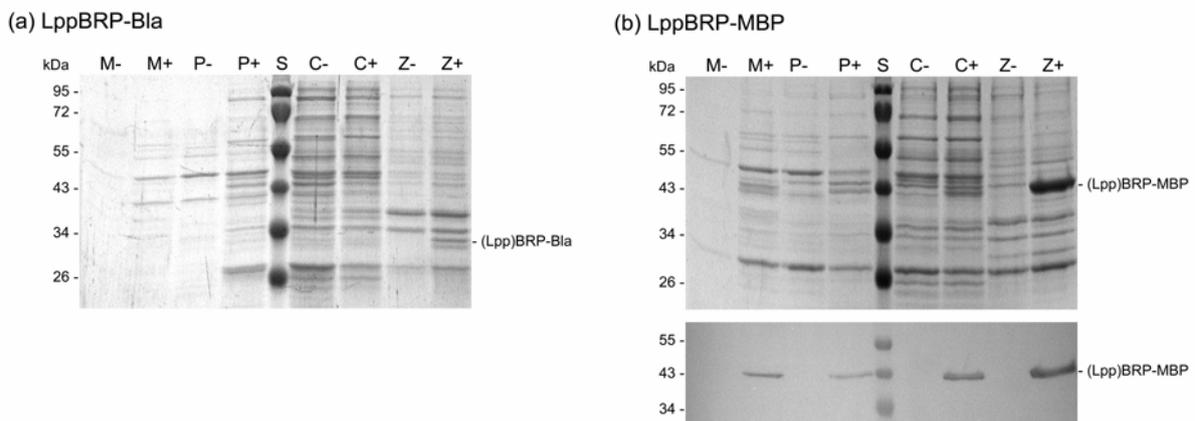
Für die beiden Hybrid-LppBRP mit Barnase- und MBP-Fusionsanteil zeigte sich eine weitgehende Freisetzung von AP (73-83% extrazellulärer Anteil) und eine annähernd quantitative Sekretion der  $\beta$ -Lactamase (jeweils 97%), so dass diese LppBRP-Fusionsproteine in ihrer Funktionalität nicht grundlegend beeinflusst waren. Für LppBRP-Bla und -AP wurde hingegen nur eine geringe Steigerung der extrazellulären Reporteranteile auf 5-26% ermittelt. Folglich führten die C-terminalen Anhänge bei diesen BRP, trotz unveränderter Toxizität, zu einem Verlust ihrer Funktionalität. Größenaspekte können als alleinige Ursache für den Funktionsverlust ausgeschlossen werden, da sich das im Vergleich zum LppBRP-Bla größere LppBRP-MBP aktiv zeigte.

Aufgrund des cytotoxischen Verlaufs der Expression aller LppBRP-Fusionsproteine, konnte für die vier Proteine eine Interaktion mit bzw. eine Lokalisation in der äußeren Membran er-

wartet werden. Die Bestimmung ihrer subzellulären Lokalisation erfolgte anhand der enzymatischen Aktivität der Hybrid-BRP bzw. im Fall des LppBRP-MBP durch immunologischen Nachweis. Das LppBRP-Bla-Protein konnte nur elektrophoretisch analysiert werden, da dessen  $\beta$ -Lactamase-Domäne enzymatisch nicht aktiv war. Die korrespondierenden Ergebnisse sind in Abb. 5.13 und Abb. 5.14 dargestellt.



**Abb. 5.13 Subzelluläre Lokalisation der LppBRP-Hybridproteine (a) LppBRP-Bar und (b) LppBRP-AP.** Die Bestimmung durch enzymatischen Nachweis erfolgte nach Induktion der BRP-Expression sowie vor dem Induktionszeitpunkt als Kontrolle.



**Abb. 5.14 Lokalisation der LppBRP-Hybridproteine (a) LppBRP-Bla und (b) LppBRP-MBP** in den Fraktionen Medium (M), Periplasma (P), Cytoplasma (C) sowie in membranhaltigen Zelltrümmern (Z) vor (-) und nach (+) deren Induktion. Die Molmassen des Größenstandards S sind vergleichsweise aufgeführt. Nachweis durch 12%ige Coomassie-gefärbte SDS-Gele. Der Western-Blot-Nachweis des LppBRP-MBP im unteren Bereich von Abbildungsteil (b) erfolgte durch einen MBP-Antikörper.

Erwartungsgemäß waren die Hybrid-BRP vor Induktion in keiner Kulturfraktion nachweisbar. Nach Induktion zeigten sich LppBRP-AP, LppBRP-Bla und LppBRP-MBP primär in memb-

ranhaltigen Zelltrümmern lokalisiert, so dass die Fusionsanteile keinen Einfluss auf die Proteinlokalisierung offenbarten. LppBRP-AP und LppBRP-MBP zeigten ebenfalls eine prominente Präsenz in den Cytoplasmafraktionen. Diese wurde auch für das LppBRP-His<sub>6</sub> beobachtet (vgl. Abschnitt 5.1.4, Abb. 5.9) und auf eine Freisetzung membranständiger Proteine während der Ultraschallpräparation des Cytoplasmas zurückgeführt. Eine theoretisch mögliche Interferenz des immunologischen Nachweises von LppBRP-MBP mit basal exprimiertem, chromosomal codiertem MBP konnte durch die Abwesenheit entsprechender Banden in den Spuren der induktionsfreien Kontrolle ausgeschlossen werden. Demzufolge war entweder die basale MBP-Expression oder die Sensitivität des MBP-Antikörpers nicht ausreichend für eine Detektion des nativen MBPs.

LppBRP-Bar wurde im Gegensatz zu den anderen Proteinen, trotz vergleichbarer Funktionalität und Toxizität des BRP-Anteils, vorwiegend im Medium vorgefunden. Die Proteine MBP-Barnase, ein anderes Hybridprotein mit Barnase-Anteil (vgl. Abschnitt 5.3.2) und native Barnase (Hartley, 1988) weisen ebenfalls eine erhöhte spontane Sekretion in das Medium auf. Möglicherweise gelangen Proteine mit Barnase-Domäne, aus unbekannter Ursache, vereinfacht in das Kulturmedium.

Wie Tabelle 5.3 zusammenfasst, zeigten die konstruierten Hybrid-BRP, mit Ausnahme von LppBRP-Bar, eine im Vergleich zu nativen BRP unveränderte Membranständigkeit. Diese konnte die ebenfalls konservierte Toxizität aller vier Proteine erklären. Der Funktionsverlust von LppBRP-Bar und LppBRP-AP zeigte, dass BRP leichter ihre Fähigkeit zur Förderung der Proteinsekretion als ihre Toxizität verlieren. Eine Entkopplung von BRP-Toxizität und -Funktionalität im Sinne einer Reduktion der Toxizität erschien daher nicht realisierbar.

**Tabelle 5.3 Toxizität, Lokalisation und Funktionalität verschiedener LppBRP-Hybridproteine.**

| <b>BRP-Hybrid</b>                                 | <b>Toxizität</b> | <b>primäre (sekundäre) Lokalisation</b> | <b>Sekretion (AP/Bla)</b> |
|---|------------------|---|---------------------------|
| LppBRP-His <sub>6</sub><br>(vgl. Abschnitt 5.1.4) | +                | Membranen (Cytoplasma)                  | +/n.u. <sup>a</sup>       |
| LppBRP-Bar  | +                | Medium                                  | +/+                       |
| LppBRP-Bla  | +                | Membranen                               | -/n.v. <sup>b</sup>       |
| LppBRP-AP   | +                | Membranen (Cytoplasma)                  | n.v. <sup>b</sup> /-      |
| LppBRP-MBP  | +                | Membranen (Cytoplasma)                  | +/+                       |

<sup>a</sup> n.u., nicht untersucht

<sup>b</sup> n.v., nicht vorhanden

### 5.1.6 Schlussfolgerungen zur Etablierung eines geeigneten Sekretions-systems

Durch Inaktivierung des Arabinosemetabolismus in *E. coli* Ara1655 konnte die bevorzugte Verstoffwechslung der Arabinose als alternativer Kohlenstoffquelle verhindert werden. Dies erlaubte eine kontrollierte und kontinuierliche BRP-Expression durch den  $P_{BAD}$ -Promotor und dokumentierte die grundsätzliche Eignung des etablierten Expressionssystems für die sekretorische Proteinproduktion. Kultivierungen mit Zugabe unterschiedlicher Induktorkonzentrationen ermöglichten eine submaximale BRP-Expression und eine stetige Proteinsekretion unter Aufrechterhaltung des bakteriellen Wachstums. Dabei waren die erforderlichen Induktorkonzentrationen mit  $5-10 \text{ mg L}^{-1}$  Arabinose, bezogen auf eine  $OD_{600}$ -Einheit, gering.

Vergleichende Kultivierungen unter Expression verschiedener BRP zeigten geringe Unterschiede bezüglich der Toxizität und Funktionalität dieser BRP und bestätigten deren, für die Bacteriocinsekretion bekannte, funktionelle Austauschbarkeit. Auch durch Fusion heterologer Proteine an den C-Terminus des LppBRP konnte keine Entkopplung von Sekretion und Toxizität erreicht werden. Da sich zwei dieser LppBRP-Hybridproteine unverändert cytotoxisch zeigten, der Fusionsanteil jedoch zu einem Verlust ihrer Funktionalität führte, erschien die Konstruktion eines unschädlichen BRP nicht realisierbar. Folglich war das größte Optimierungspotential, bei der BRP-vermittelten Proteinsekretion in der Entwicklung geeigneter Expressionsstrategien zu sehen.

## 5.2 Optimierung der extrazellulären Proteinproduktion durch kontrollierte BRP-Coexpression

Die im vorausgehenden Abschnitt dargestellten Untersuchungen belegen die generelle Eignung des etablierten Expressionssystems für die extrazelluläre Produktion rekombinanter Proteine. Bestrebungen zur Identifikation eines optimalen BRP bzw. zur Reduktion der Toxizität von BRP durch C-terminale Modifikationen brachten hingegen nicht den erhofften Erfolg. Da weder der Vergleich unterschiedlicher BRP, noch deren Modifikation auf molekularer Ebene, eine Entkopplung von BRP-Toxizität und Proteinsekretion hervorbrachte, musste dem Problem der negativen Beeinflussung des bakteriellen Wachstums durch entsprechende Steuerung der Expression begegnet werden. Dazu wurden prozesstechnische Optimierungsansätze verfolgt, die sich auf die Auswahl geeigneter Induktorkonzentrationen und Induktionsszeitpunkte für die BRP-Coexpression fokussierten.

### 5.2.1 Optimierung der extrazellulären Proteinproduktion durch angepasste BRP-Coexpression

Schüttelkolbenkultivierungen von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla zeigten die Möglichkeit einer stetigen BRP-Expression durch Verwendung des  $P_{BAD}$ -Promotors in einem *E. coli*-Stamm mit inaktiviertem Arabinosemetabolismus. Darüber hinaus konnte die Expressionsstärke durch entsprechend angepasste Induktorkonzentrationen auf submaximale Niveaus reguliert werden. Dabei blieb das bakterielle Wachstum trotz BRP-Toxizität erhalten und führte zu einem kontinuierlichen Anstieg der extrazellulären Aktivität des Modellproteins alkalische Phosphatase. Da die intrazellulär verbliebene Aktivität des Enzyms nicht bestimmt wurde, konnten keine Aussagen bezüglich der Effektivität BRP-vermittelter Sekretion, d.h. des Freisetzungsgrades von Zielproteinen getroffen werden.

Die Sekretionseffizienz wurde durch Kultivierungen im Bioreaktor, die nachfolgend dargestellt sind, untersucht. Diese sollten eine Analyse der Zusammenhänge zwischen regulierter BRP-Expression, Wachstumsverlauf und Lokalisation sekretorischer Modellproteine ermöglichen. Neben kontrollierten und statisierten Bedingungen konnten die Probenahme und -analyse ohne externe Eingriffe in die Kultur erfolgen und darüber hinaus die wachstumscharakteristische  $CO_2$ -Produktion der Kultur *online* dokumentiert werden. Im Zusammenhang mit der optischen Dichte und der Biotrockenmassekonzentration der Kulturen sollte dies einen tieferen Einblick in die BRP-Toxizität erlauben.

Bei den Fermentationen wurden die Konzentrationen der Kohlen- und Stickstoffquellen des SGA-Mediums (Glycerin und Ammoniumsulfat) verdoppelt. Analog zu den beschriebenen

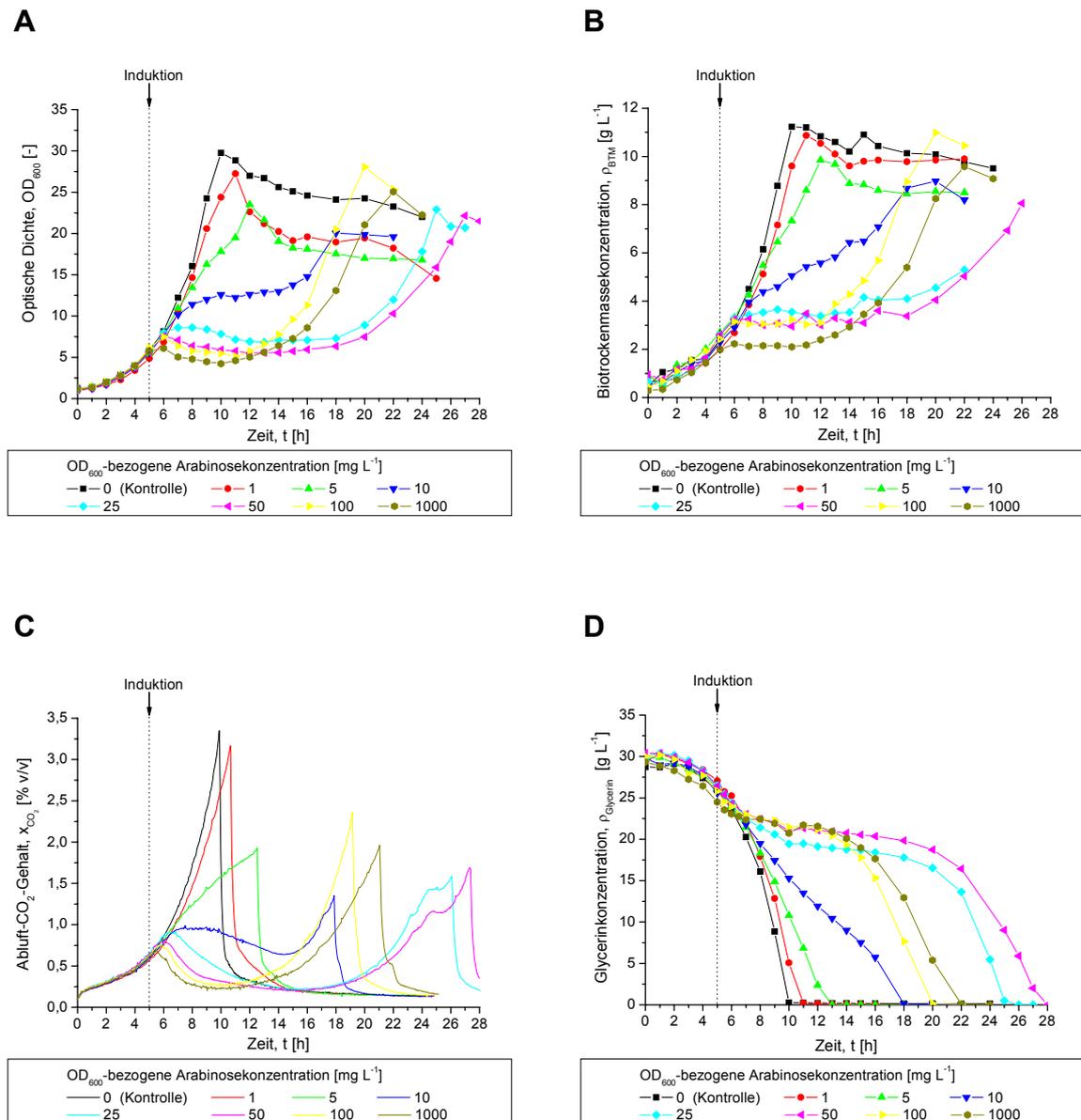
Schüttelkolbenkultivierungen wurde die BRP-Expression durch Addition OD<sub>600</sub>-normierter Arabinosekonzentrationen während der exponentiellen Wachstumsphase induziert. Da entsprechend höhere Biomassekonzentrationen erwartet werden konnten, wurde die Induktion angepasst und erfolgte bei optischen Dichten von OD<sub>600</sub> = 5-6.

In Schüttelkolbenkultivierungen zeigten sich OD<sub>600</sub>-bezogene Induktorkonzentrationen von 5 und 10 mg L<sup>-1</sup> Arabinose als besonders geeignet, da sie eine AP-Sekretion in das Medium erlaubten ohne zu einer vollständigen Stagnation des Wachstums zu führen, welche nach Zugabe von mindestens 50 mg L<sup>-1</sup> Arabinose pro OD<sub>600</sub>-Einheit beobachtet wurde. Die Übertragbarkeit dieser Induktionsstärken auf die Bedingungen im Bioreaktor konnte jedoch, insbesondere aufgrund der Induktion bei höheren Zelldichten, nicht ohne weiteres vorausgesetzt werden, so dass erneut auch höhere Induktorkonzentrationen untersucht wurden. Der bis dahin als optimal ermittelte Induktorkonzentrationsbereich von 5-10 mg L<sup>-1</sup> Arabinose pro OD<sub>600</sub>-Einheit wurde durch Konzentrationen von 1 und 25 mg L<sup>-1</sup> ergänzt.

### ***Wachstum und Energieverbrauch***

Die in Abb. 5.15 dargestellten Verläufe der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) und Biotrockenmassekonzentration dokumentieren das Wachstumsverhalten in Abhängigkeit von der Induktionsstärke. Ebenfalls dargestellt sind die Verläufe des Abluft-CO<sub>2</sub>-Gehalts und der Substratkonzentration (Glycerin), welche charakteristisch für den Energieverbrauch der Kulturen waren. Tabelle 5.4 fasst die spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten der Kulturen zusammen. Diese wiesen vor Induktion der BRP-Expression nur minimale Differenzen auf ( $\mu = 0,36 \text{ h}^{-1} \pm 3,1\%$ ) und belegten dadurch die Reproduzierbarkeit der Kultivierungsbedingungen. Entsprechend zeigten alle Fermentationen vor der Induktion annähernd identische Wachstumsverläufe (Abb. 5.15).

Die Verläufe der CO<sub>2</sub>-Produktion und des Glycerinverbrauchs bei der induktionsfreien Kontrollfermentation bestätigten die ausschließliche Limitierung des Prozesses durch das Substrat Glycerin. Aufgrund des kontinuierlichen Anstieges des Abluft-CO<sub>2</sub>-Gehalts während der Wachstumsphase und dessen abrupter Abnahme nach Erschöpfung des Glycerins konnten mögliche alternative Limitierungen ausgeschlossen und die Kultivierungsbedingungen unter ausreichender Glycerinpräsenz als quasi-statisch betrachtet werden.



**Abb. 5.15** Wachstum und Energieverbrauch bei unterschiedlich starker BRP-Expression durch *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla. Die Induktion der BRP-Expression erfolgte mit den angegebenen OD<sub>600</sub>-bezogenen Arabinosekonzentrationen. Die Abbildung basiert auf Satzfermentationen in einem 7 L-Rührkesselreaktor (vgl. Abschnitt 4.1.5) mit 5 L chemisch definiertem SGA-Medium. Wachstum und Energieverbrauch sind anhand der charakteristischen Größen OD<sub>600</sub> (A), BTM-Konzentration (B) und Abluft-CO<sub>2</sub>-Gehalt (C), sowie der Glycerinkonzentration (D) dargestellt.

**Tabelle 5.4 Spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten  $\mu$  bei Bioreaktorkultivierungen von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla in SGA-Medium.** Die Bestimmung erfolgte während der exponentiellen Phase vor Induktion der BRP-Expression durch Arabinosezugabe. Bei der induktionsfreien Kontrollkultur wurde die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit über die gesamte exponentielle Phase ermittelt. ( $\rho_{Ara}$ , OD<sub>600</sub>-bezogene Arabinosekonzentration;  $\mu$ , spezifische Wachstumsgeschwindigkeit)

| $\rho_{Ara}$<br>[mg L <sup>-1</sup> ] | $\mu$<br>[h <sup>-1</sup> ] |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| 0 (Kontrolle)                         | 0,35                        |
| 1                                     | 0,36                        |
| 5                                     | 0,34                        |
| 10                                    | 0,37                        |
| 25                                    | 0,35                        |
| 50                                    | 0,37                        |
| 100                                   | 0,35                        |
| 1000                                  | 0,36                        |
| Mittelwert                            | 0,36 ± 0,011                |

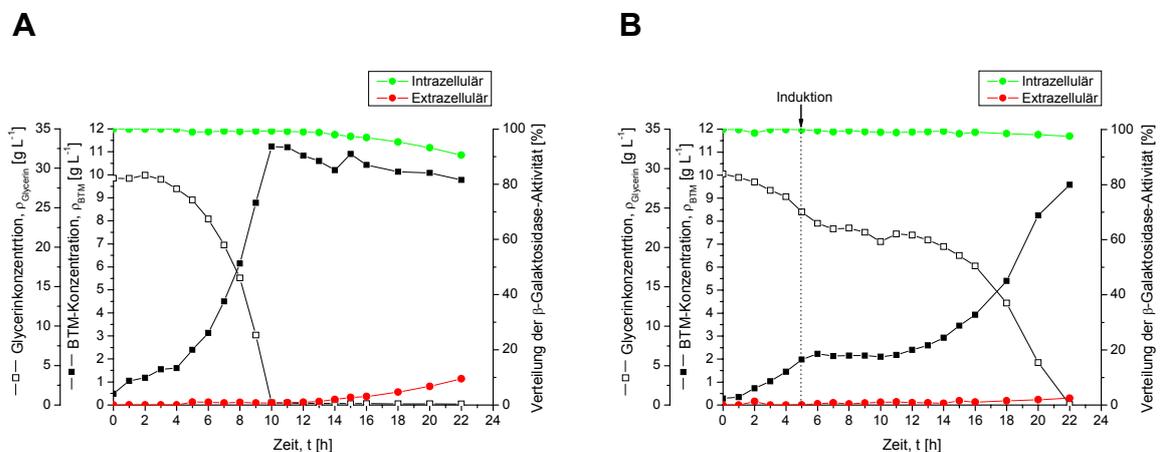
Nach Zugabe des Induktors Arabinose wurden, analog zu den Schüttelkolbenexperimenten, von den Induktorkonzentrationen abhängige Beeinflussungen des Wachstums beobachtet. Dabei zeigten die mit OD<sub>600</sub>-bezogenen Arabinosekonzentrationen von mindestens 25 mg L<sup>-1</sup> induzierten Kulturen temporär stagnierende Biomassekonzentrationen (Abb. 5.15 A), sodass die zuvor ermittelten wachstumspermissiven Arabinosekonzentrationen von maximal 10 mg L<sup>-1</sup> pro OD<sub>600</sub>-Einheit für den Bioreaktormaßstab bestätigt werden konnten. Durchgängig exponentielles Wachstum war bei keiner Induktorkonzentration möglich, d.h. die BRP-Expression resultierte in einer grundsätzlichen Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit und einer Verlängerung der Wachstumsphase. Selbst die Zugabe einer OD<sub>600</sub>-bezogenen Arabinosekonzentration von 1 mg L<sup>-1</sup> führte zu einer geringen Verlangsamung von CO<sub>2</sub>-Produktion und Wachstum und verlängerte die Wachstumsphase um ca. 1 h.

Bei Einsatz wachstumshindernder Induktionsstärken waren, insbesondere in den anfänglichen Zeiträumen statischer BTM-Konzentration, langsame Rückgänge der CO<sub>2</sub>-Produktion anstelle von abrupten Abnahmen, wie nach vollständiger Glycerinerschöpfung, zu beobachten (Abb. 5.15 A und C). Darüber hinaus zeigte sich in denselben Phasen ein anhaltender, allerdings deutlich reduzierter Glycerinverbrauch (Abb. 5.15 D). So wiesen die mit OD<sub>600</sub>-normierten Arabinosekonzentration von 50 und 100 mg L<sup>-1</sup> induzierten Kulturen im Zeitraum zwischen 1 h und 7 h nach Induktion (t = 6-12 h) statische BTM-Konzentrationen auf. Im selben Zeitraum sanken die Glycerinkonzentrationen stetig von 24,3 bzw. 23,9 g L<sup>-1</sup> auf 21,1 bzw. 21,2 g L<sup>-1</sup>. Demzufolge war der Energieverbrauch der statischen Kulturen zwar reduziert, jedoch nicht vollständig aufgehoben. In anderen Arbeiten wurde für *E. coli*-Kulturen, die

einer starken BRP-Expression unterlagen, ebenfalls eine starke Hemmung der Proteinbiosynthese berichtet (Stegehuis *et al.*, 1995). Obwohl die Ursachen noch unbekannt sind, stört die BRP-Aktivität bezüglich der Zellatmung und der Proteinsynthese offenbar elementare Mechanismen des zellulären Stoffwechsels. Dieser Zustand ist jedoch reversibel, da die Zellen revitalisiert werden können, und das Wachstum im Anschluss an die statischen Phasen wieder Einsetzen kann.

### Zellyse und Quasi-Lyse

Die BRP-Expression führte zu Diskrepanzen in den Verläufen der optischen Dichte und der BTM-Konzentration, bei denen die optische Dichte der Kulturen stärker beeinflusst wurde als die BTM-Konzentration. Besonders deutlich wurde dies bei starker BRP-Expression ( $OD_{600}$ -bezogene Arabinosekonzentrationen von mindestens  $25 \text{ mg L}^{-1}$ ), welche in einer Abnahme der optischen Dichte resultierte, während die BTM-Konzentration im gleichen Zeitraum konstant blieb (vgl. Abb. 5.15 A und B). Zur Beurteilung dieser Diskrepanz wurde die Zellyse bei der induktionsfreien Kontrollkultur und der am stärksten induzierten Fermentation anhand der intra- und extrazellulären Aktivität des cytoplasmatischen Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 5.16 zu finden.



**Abb. 5.16 Zellyse bei starker BRP-Expression und ohne BRP-Expression.** Dargestellt ist die Verteilung des cytoplasmatischen Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase zwischen Zellen (grüne Symbole) und Medium (rote Symbole) einer Bioreaktorkultur von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla in synthetischem SGA-Medium **(A)** ohne Induktion und **(B)** mit Induktion der BRP-Expression durch  $OD_{600}$ -normierte Arabinosekonzentrationen von  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ .

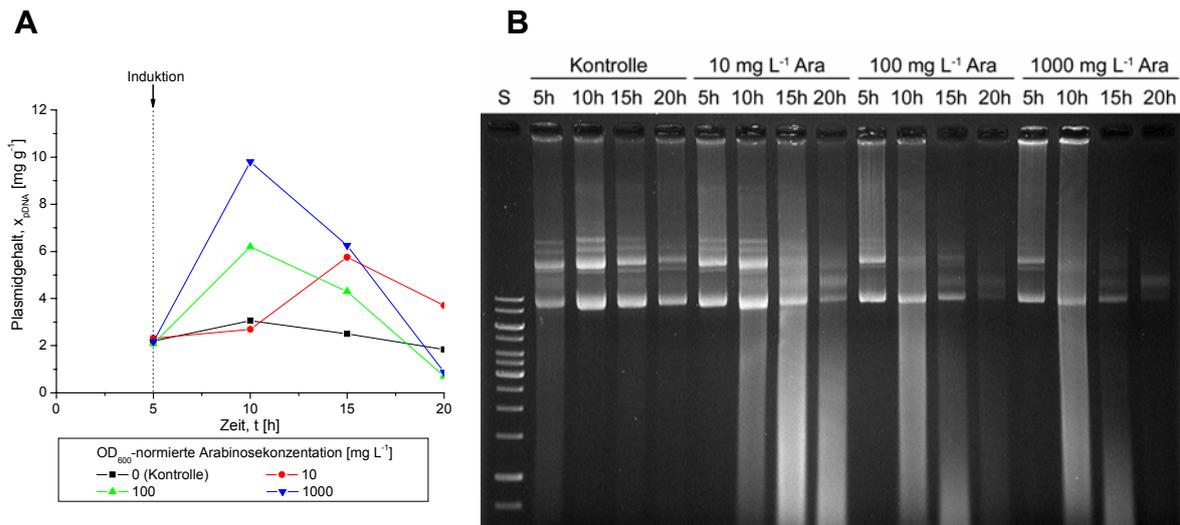
Abgesehen von einem geringen Anstieg des extrazellulären  $\beta$ -Galaktosidase-Anteils auf maximal 10% während der Stationärphase der induktionsfreien Kultur (Abb. 5.16 A) war das cytoplasmatische Enzym strikt intrazellulär lokalisiert. Der Anstieg dokumentierte eine gering-

ge Zellyse nach Wachstumsende und erklärte die ebenfalls geringe Abnahme der BTM-Konzentration im gleichen Zeitraum. Insbesondere nach Induktion konnte, trotz stagnierenden Wachstums, keine Verschiebung der Aktivität in Richtung des Mediums beobachtet werden. Dies dokumentiert eine vernachlässigbare Zellyse durch BRP-Expression und zeigt, dass die beobachteten Diskrepanzen zwischen Biotrockenmassekonzentrationen und OD<sub>600</sub> durch „Quasi-Lyse“ bedingt waren. Im Gegensatz zu vollständiger Zellyse, welche zu einem Verlust der Teilungsfähigkeit führt und mit einer Abnahme der BTM-Konzentration einhergeht, blieb die Viabilität der Zellen in Flüssigkultur unter Quasi-Lyse erhalten. Dies erklärte die Revitalisierbarkeit der Kultur und die Fähigkeit zu erneutem Wachstum auch nach starker Induktion.

### **Plasmidstabilität**

Wachstumshemmend induzierte Fermentationen und Schüttelkolbenkultivierungen wiesen nach temporärer Stagnation der BTM-Konzentrationen stets erneute Wachstumsphasen auf. Aufgrund der Unfähigkeit des verwendeten *E. coli* Stammes Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla zur Arabinosedegradation wurde eine andauernde BRP-Expression und somit eine kontinuierliche Wachstumsrepression erwartet. Als Ursache für das wieder Einsetzen des Wachstums wurde daher ein Erliegen der BRP-Expression durch Plasmidverlust bei gleichzeitiger Inaktivierung des zugesetzten Antibiotikums Kanamycin in Betracht gezogen. Der Einsatz unterschiedlicher Kanamycinkonzentrationen bei den Fermentationen sowie Untersuchungen zur Plasmidstabilität bestätigten diese Theorie.

Bestimmungen der Plasmidstabilität werden üblicherweise durch vergleichendes Ausplattieren der Zellen auf plasmidselektierendem (antibiotikahaltigem) und antibiotikafreiem Festmedium durchgeführt. Da *E. coli* unter BRP-Expression die Fähigkeit zum Wachstum auf Festmedium verliert (van der Wal *et al.*, 1995b), konnte diese Methode nicht eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurde der Plasmidgehalt (Anteil der Plasmidmasse an der Zelltrockenmasse), als indirektes Maß für die Plasmidstabilität zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei Fermentationen mit induzierter BRP-Expression sowie einer induktionslosen Kontrollfermentation herangezogen. Darüber hinaus wurden die isolierten Plasmide durch AGE qualitativ analysiert. Beide Untersuchungen erfolgten auf Basis der Fermentationen mit Induktion der BRP-Expression durch OD<sub>600</sub>-normierte Konzentrationen von 10, 100 und 1000 mg L<sup>-1</sup> Arabinose sowie ohne Induktion und sind in Abb. 5.17 zusammengefasst.



**Abb. 5.17 Indirekte Bestimmung der Plasmidstabilität** anhand des Plasmidgehalts (**A**) und durch elektrophoretische Untersuchung (**B**) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der mit 0 (Kontrolle), 10, 100 und 1000  $\text{mg L}^{-1}$  Arabinose pro  $\text{OD}_{600}$ -Einheit induzierten Satzfermentationen von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla in SGA-Medium. Der Plasmidgehalt  $x_{pDNA}$  beschreibt den Anteil der photometrisch bestimmten Plasmidmasse an der Zelltrockenmasse und kann dadurch indirekt zur Beurteilung der zellulären Plasmidkonzentration herangezogen werden. Zur Plasmidisolierung wurde jeweils die gleiche Biomasse eingesetzt. Das Agarosegel wurde mit identischen Volumina (5  $\mu\text{L}$ ) der isolierten DNA beladen und ermöglichte eine qualitative Beurteilung der Plasmidstabilität.

Gemäß Abb. 5.17 A konnte während der Kontrollfermentation keine grundlegende Änderung des Plasmidgehalts verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu wurden insbesondere bei den stark induzierten Kulturen (100 bzw. 1000  $\text{mg L}^{-1}$  Arabinose pro  $\text{OD}_{600}$ -Einheit) zwischenzeitlich deutlich erhöhte Plasmidgehalte bestimmt, die von Abnahmen bis unterhalb des Niveaus vor der Induktion gefolgt waren.

Ein Vergleich mit der in Abb. 5.17 B dargestellten elektrophoretischen DNA-Analyse zeigte jedoch, dass diese erhöhten Plasmidgehalte auf Artefakte bei der photometrischen DNA-Quantifizierung zurückzuführen waren, da die korrespondierenden Bandenintensitäten zu keinem Zeitpunkt entsprechend zunahmten. Dabei wurden für die induktionsfreie Kontrollfermentation zu allen betrachteten Zeitpunkten homogene Bandenmuster erhalten. Die induzierten Kulturen wiesen hingegen nach Induktion (Probenzeitpunkte 10, 15 und 20 h) eine zunehmende Degradation der Plasmide auf, die sich in Schlierenbildungen über die Spuren des Gels äußerte und vor Induktion ( $t = 5$  h) nicht beobachtbar war. Diese Degradationsprodukte führten möglicherweise zu einer erhöhten UV-Absorption und damit zu einer fälschlichen Bestimmung erhöhter Plasmidgehalte. Im Zuge der Induktion nahm die Degradation stetig zu, was sich durch eine verstärkte Schlierenbildung mit einer Verschiebung der Degradationsprodukte in Richtung kleinerer DNA-Fragmente manifestierte. Dabei verschwanden die Plasmidbanden letztlich fast vollständig, so dass bei den stark induzierten Kulturen ( $\text{OD}_{600}$ -normierte Arabinosekonzentration von 100 bzw. 1000  $\text{mg L}^{-1}$ ) in späten Kulturstadien

( $t = 20$  h) annähernd kein Plasmid mehr nachgewiesen werden konnte. Die Ursache der Plasmiddegradation wurde nicht näher untersucht. Eine mögliche Erklärung könnte in der BRP-induzierten Aktivierung zellulärer Nukleasen liegen.

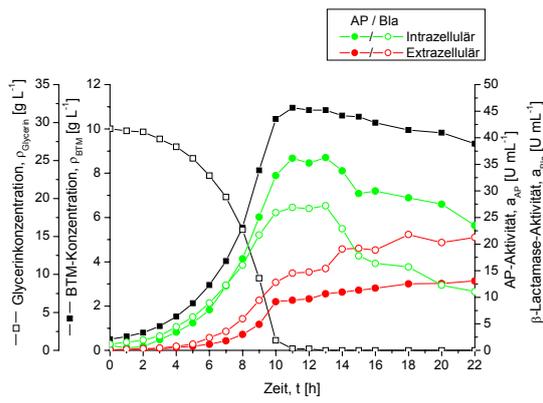
Dieser Plasmidverlust bedeutete eine Aufhebung toxischer LppBRP-Expression und konnte unter Voraussetzung einer gleichzeitigen vollständigen Inaktivierung des Antibiotikums Kanamycin die Fähigkeit zu erneutem Wachstum erklären. Zur Überprüfung der Kanamycininaktivierung sind den Kulturen unterschiedliche Konzentrationen des Antibiotikums zugesetzt worden. So enthielten die mit  $OD_{600}$ -bezogenen Arabinosekonzentrationen von 100 und 1000  $\text{mg L}^{-1}$  induzierten Fermentationen je 50  $\text{mg L}^{-1}$  Kanamycin, während den Kulturen mit Induktion durch 25 und 50  $\text{mg L}^{-1}$  Arabinose 200  $\text{mg L}^{-1}$  Kanamycin zugefügt war. Wie Abb. 5.15 A zeigt, setzte das erneute Wachstum bei den Fermentationen mit 50  $\text{mg L}^{-1}$  Kanamycin bereits 5-6 h nach Induktion der BRP-Expression wieder ein. Die Kulturen mit 200  $\text{mg L}^{-1}$  Kanamycin begannen hingegen erst etwa 13 h nach Induktion wieder zu wachsen. Obwohl die Kanamycinkonzentrationen nicht analytisch verfolgt wurden, konnten diese Differenzen anhand einer unterschiedlichen Dauer bis zur vollständigen Inaktivierung des Antibiotikums durch die Aminoglycosid-Phosphotransferase (Kanamycinresistenz) erklärt werden. Die uneingeschränkte Verträglichkeit des plasmidhaltigen Stammes gegenüber erhöhten Kanamycinkonzentrationen wurde im Vorfeld für einen Bereich von 50  $\text{mg L}^{-1}$  bis 1  $\text{g L}^{-1}$  überprüft (Daten nicht dargestellt).

### **Beurteilung der Sekretionseffizienz**

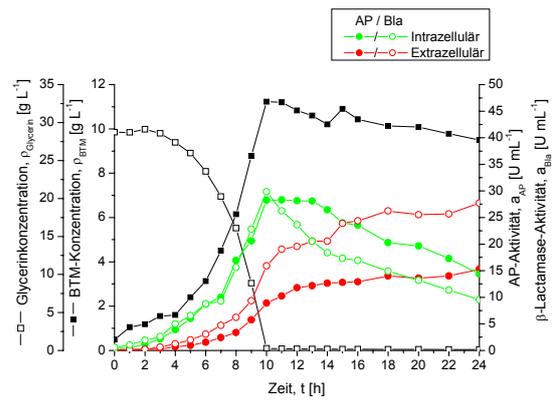
Zur Beurteilung der Sekretionseffizienz ist in Abb. 5.18 die Verteilung der beiden Modellproteine AP und  $\beta$ -Lactamase zwischen Zellen und Medium für die durchgeführten Fermentationen dargestellt. Tabelle 5.5 fasst die Sekretionseffizienzen und die extrazellulären Produktivitäten der Kultivierungen zum Zeitpunkt der Substraterschöpfung, d.h. des nominellen Kultivierungsendes, zusammen. Um eine mögliche Abhängigkeit des Freisetzungsgrades von der Natur des Zielproteins dokumentieren zu können, wurden bei diesen Untersuchungen sowohl AP als auch  $\beta$ -Lactamase zur Beschreibung der Sekretion eingesetzt.

Neben einer Fermentation ohne Induktion wurde als weitere Kontrolle auch die Fermentation eines *E. coli*-Stammes ohne BRP (Ara1655 pBAD18-KanPhoAbla) durchgeführt, deren Ergebnisse ebenfalls aufgeführt sind. Das Plasmid dieses Stammes ist genotypisch identisch zu pBAD-LppBRPphoAbla, enthält jedoch kein LppBRP-Gen stromabwärts des  $P_{BAD}$ -Promotors. Der Vergleich beider Kontrollen, sollte die basale BRP-Expression in Abwesenheit des Induktors bzw. die spontane Proteinsekretion herausstellen.

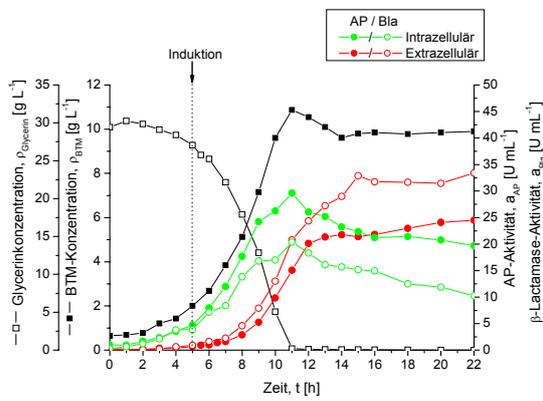
(a) ohne BRP (pBAD18-KanPhoAbla)



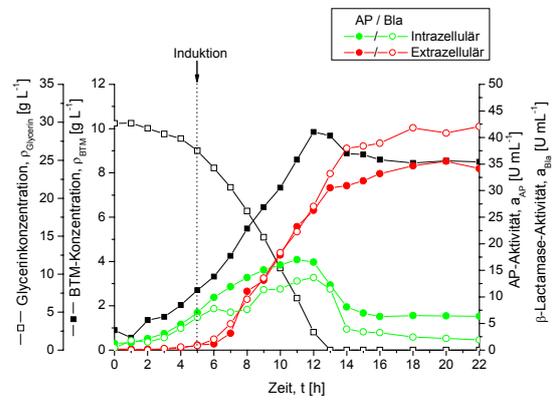
(b) 0 (Kontrolle ohne Induktion)



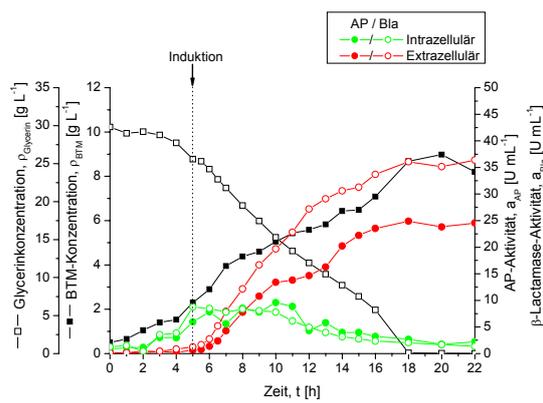
(c) 1



(d) 5



(e) 10



(f) 25

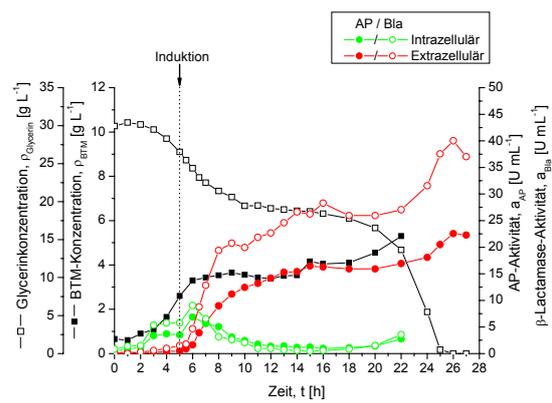
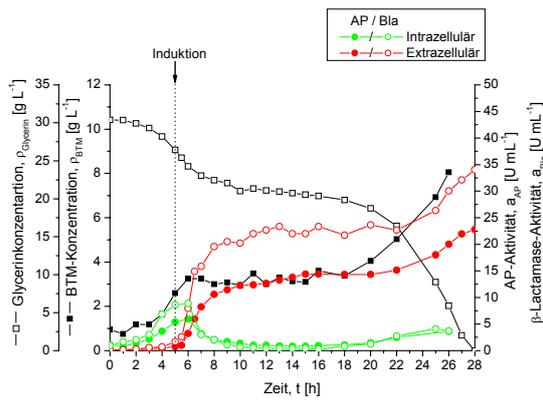
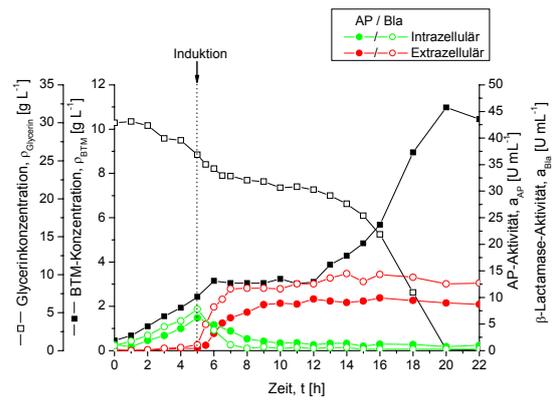


Abb. 5.18 (Legende auf der nachfolgenden Seite)

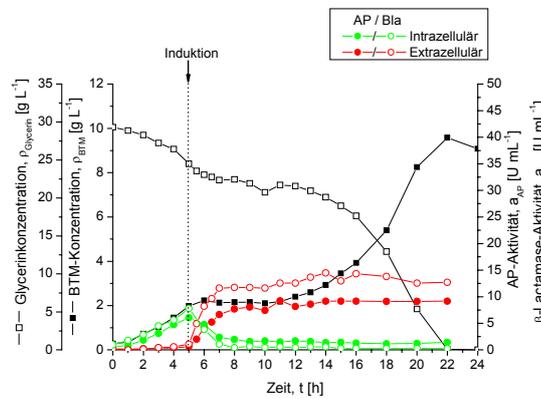
(g) 50



(h) 100



(i) 1000



**Abb. 5.18** (fortgesetzt) **Effektivität der BRP-vermittelten Sekretion in Abhängigkeit von der Expressionsstärke.** Dargestellt sind die Verläufe der intra- und extrazellulären AP-Aktivität (gefüllte Kreise) und  $\beta$ -Lactamase-Aktivität (offene Kreise) während Satzfermentationen von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla in SGA-Medium. Die BRP-Expression wurde durch Zugabe  $OD_{600}$ -bezogener Arabinosekonzentrationen von (c) 1; (d) 5; (e) 10; (f) 25; (g) 50; (h) 100 und (i) 1000  $mg\ L^{-1}$  induziert. Fermentationen ohne Arabinosezugabe (b) und ohne BRP (*E. coli* Ara1655 pBAD18-KanPhoAbla) (a) dienen als Kontrollen. Anhand der BTM-Konzentration (gefüllte Quadrate) und Glycerinkonzentration (offene Quadrate) werden die zugrunde liegenden Kultivierungsverläufe sowie die Zeitpunkte der Substraterschöpfung, d.h. des Prozessendes dokumentiert.

**Tabelle 5.5 Absolute und relative Verteilung der AP- und  $\beta$ -Lactamase-Aktivität auf Zellen und Medium bei Substraterschöpfung.** Die Fermentationen von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPpHoAbla in SGA-Medium mit Induktion durch OD<sub>600</sub>-bezogene Arabinosekonzentrationen von 25-1000 mg L<sup>-1</sup> sind nicht aufgeführt, da Wachstum und Produktbildung vorzeitig durch toxische BRP-Expression unterbrochen wurden. Maximal erzielte Werte sind fett hervorgehoben. ( $\rho_{Ara}$ , OD<sub>600</sub>-bezogene Arabinosekonzentration;  $t_K$ , Kultivierungsdauer bis zur Substraterschöpfung;  $a_{int}$ , intrazelluläre Aktivität;  $a_{ext}$ , extrazelluläre Aktivität;  $P_{ext}$ , extrazelluläre Produktivität [ $a_{ext}t / t_K$ ])

|                                       |              | alkalische Phosphatase             |                                    |  | $\beta$ -Lactamase                 |                                    |  |
|---------------------------------------|--------------|------------------------------------|------------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|--|
| $\rho_{Ara}$<br>[mg L <sup>-1</sup> ] | $t_K$<br>[h] | $a_{int}$<br>[U mL <sup>-1</sup> ] | $a_{ext}$<br>[U mL <sup>-1</sup> ] | $P_{ext}$<br>[U mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | $a_{int}$<br>[U mL <sup>-1</sup> ] | $a_{ext}$<br>[U mL <sup>-1</sup> ] | $P_{ext}$<br>[U mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] |
| ohne BRP                              | 11           | 36,1 (79%)                         | 9,4 (21%)                          | 0,85   | 26,9 (65%)                         | 14,5 (35%)                         | 1,32   |
| 0                                     | 10           | 32,8 (79%)                         | 8,9 (21%)                          | 0,89   | 29,8 (65%)                         | 15,9 (35%)                         | 1,59   |
| 1                                     | 11           | 29,6 (66%)                         | 15,1 (34%)                         | 1,37   | 20,8 (50%)                         | 20,4 (50%)                         | 1,89   |
| 5                                     | 13           | 12,3 (29%)                         | <b>30,5 (71%)</b>                  | <b>2,35</b>  | 11,5 (26%)                         | 33,2 (74%)                         | <b>2,55</b>  |
| 10                                    | 18           | 2,7 (10%)                          | 24,9 ( <b>90%</b> )                | 1,38   | 2,0 (5%)                           | <b>36,1 (95%)</b>                  | 2,05   |

Wie Abb. 5.18 (a) und (b) zeigen, wiesen die Verteilungen der beiden Reporterproteine zwischen Zellen und Medium während der Kontrollfermentationen ohne Induktion bzw. ohne BRP keine signifikanten Unterschiede auf. Bei beiden Kultivierungen waren die Reporterenzyme bis zum Erreichen der Stationärphase überwiegend intrazellulär lokalisiert. Mit einem extrazellulärem Anteil von 35% (vgl. Tabelle 5.5) fiel die spontane, BRP-unabhängige Freisetzung der  $\beta$ -Lactamase bei beiden Kontrollkulturen zum Zeitpunkt der Substraterschöpfung im Vergleich zur AP (21% extrazellulärer Anteil) stärker aus. Da diese Verteilungen für beide Reporter und beide Kontrollen gleichermaßen bestimmt wurden, konnte eine signifikante basale BRP-Expression ausgeschlossen werden. Während der Stationärphase war bei diesen Kulturen eine stetige Verschiebung der Lokalisation beider Proteine in Richtung des Mediums zu beobachten. Wie die Untersuchung der Zellyse bei der induktionsfreien Kultur (vgl. Abb. 5.16) zeigte, ließen sich die Anstiege der extrazellulären Anteile beider Proteine durch lytische Freisetzung erklären. Dadurch gelangten teilweise über 50% der Enzyme in das Medium. Da die Abnahme der intrazellulären Aktivität während der Stationärphase stärker ausfiel, als die Zunahme der extrazellulären Aktivität, lag neben der lytischen Freisetzung auch ein Aktivitätsverlust vor. Dieser konnte vermutlich auf Degradation der beiden Modellproteine durch intrazelluläre Proteasen zurückgeführt werden.

Bei den induzierten Kulturen (Abb. 5.18 (c) bis (i)) war mit zunehmender Induktionsstärke eine stärkere Verschiebung der Verteilung beider Enzyme auf die Seite des Mediums zu beobachten. So wurde bei Induktion mit OD<sub>600</sub>-bezogenen Arabinosekonzentrationen von mindestens 5-10 mg L<sup>-1</sup> letztlich eine annähernd vollständige Freisetzung der AP- und  $\beta$ -

Lactamase-Aktivität erreicht. Bei Einsatz von mindestens 25 mg L<sup>-1</sup> Arabinose pro OD<sub>600</sub>-Einheit führte die wachstumsinhibierende Induktion zu einer Stagnation der Produktbildung, so dass die extrazellulären Aktivitäten trotz vollständiger Sekretion konstant blieben. Aufgrund der rascheren Stagnation des Wachstums nach stärkerer Induktion waren die erzeugten extrazellulären Aktivitäten bei Induktion mit 1000 mg L<sup>-1</sup> Arabinose pro OD<sub>600</sub>-Einheit am geringsten. Dementsprechend wurden maximale extrazelluläre Aktivitäten bei Induktionsstärken erreicht, die eine ausreichende BRP-Expression für die effiziente Sekretion ermöglichen, ohne Produktbildung und Wachstum maßgeblich zu beeinflussen. Die optimale Induktionsstärke stellte somit einen Kompromiss aus Sekretionseffizienz und Vitalität der Kultur dar und wurde durch Zugabe OD<sub>600</sub>-bezogener Arabinosekonzentrationen zwischen 5 und 10 mg L<sup>-1</sup> erreicht. Dabei überwog die Freisetzung beider Proteine in das Medium gegenüber der intrazellulären Akkumulation. Wie Tabelle 5.5 dokumentiert, konnten dadurch maximale extrazelluläre Aktivitäten und Sekretionseffizienzen, d.h. annähernd vollständige Freisetzungen, erreicht werden. So wies die mit einer OD<sub>600</sub>-bezogenen Arabinosekonzentration von 5 mg L<sup>-1</sup> induzierten Fermentation bei Substraterschöpfung 30,5 U mL<sup>-1</sup> der alkalischen Phosphatase und 33,2 U mL<sup>-1</sup> der  $\beta$ -Lactamase im Medium auf. Bei den Kontrollkulturen ohne BRP sowie ohne Induktion lagen zum gleichen Zeitpunkt nur 8,9 bzw. 9,4 U mL<sup>-1</sup> (AP) sowie 14,5 bzw. 15,9 U mL<sup>-1</sup> ( $\beta$ -Lactamase) im Medium vor. Die Induktion mit 5 mg L<sup>-1</sup> Arabinose pro OD<sub>600</sub>-Einheit war jedoch für eine vollständige Sekretion während der Wachstumsphase nicht ausreichend. Bei Substraterschöpfung befanden sich nur 71% der AP und 74% der  $\beta$ -Lactamase im Medium, so dass intrazellulär verbliebenes Protein erst beim Übergang in die Stationärphase freigesetzt wurde. Aufgrund der vergleichsweise geringen Beeinflussung des Wachstums brachte diese Induktionsstärke dennoch eine maximale extrazelluläre Produktivität der Zielproteine von 2,4 U mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (AP) und 2,6 U mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Bla) hervor. Eine annähernd quantitative Freisetzung der Modellproteine bis zum Erreichen finaler BTM-Konzentrationen ermöglichte der Einsatz von 10 mg L<sup>-1</sup> Arabinose pro OD<sub>600</sub>-Einheit, durch den 89% der AP und 95% der  $\beta$ -Lactamase in das Medium gelangten. Die stärkere BRP-Expression bedingte jedoch eine verlängerte Kultivierungsdauer, so dass die extrazelluläre Produktivität dieses Prozesses vergleichsweise geringer ausfiel.

Im Gegensatz zu den mit OD<sub>600</sub>-bezogenen Arabinosekonzentrationen von 100 und 1000 mg L<sup>-1</sup> Arabinose induzierten Kulturen, bei denen während der zweiten Wachstumsphase aufgrund des Plasmidverlustes (vgl. Abb. 5.17) kein weiterer Anstieg der extrazellulären AP und  $\beta$ -Lactamase-Aktivität erfolgte, war bei den mit 25 und 50 mg L<sup>-1</sup> Arabinose pro OD<sub>600</sub>-Einheit induzierten Kulturen eine weitere Proteinsekretion zu beobachten. Da diesen Fermentationen vierfach erhöhte Antibiotikumskonzentrationen zugesetzt wurden, ging das Plasmid während des wieder einsetzenden Wachstums vermutlich nicht vollständig verloren.

Die Verläufe der AP- und Bla-Aktivität waren bei den verschiedenen Fermentationen stets vergleichbar, wobei eine geringfügig vereinfachte Sekretion der  $\beta$ -Lactamase unter BRP-Expression beobachtet werden konnte. Dies bestätigt die Eignung der beiden Modellproteine zur Dokumentation der Proteinsekretion und belegt die Signifikanz der Ergebnisse.

## 5.2.2 Steigerung der extrazellulären Proteinproduktion durch Hochzell-dichtekultivierung

Zur Steigerung der extrazellulären AP- bzw.  $\beta$ -Lactamase-Konzentration durch Sekretion aus *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla wurden Hochzelldichtekultivierungen (HZDK) im Zulaufverfahren durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine geeignete Zufütterungsstrategie etabliert, welche sich an eine Satzphase in SGA Medium anschloss und Kohlenstoff- sowie Stickstoffquelle bereitstellen sollte. Die Satzphase wurde analog zu den in Abschnitt 5.2.1 beschriebenen Fermentationen durchgeführt.

### **Etablierung einer geeigneten Zufütterungsstrategie**

Die Zufütterung sollte mit einem exponentiellen Profil anhand einer vorgegebenen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{\text{set}}$  gemäß dem Zusammenhang

$$F_F(t) = \left( \frac{\mu_{\text{set}}}{Y_{X/S}} + q \right) \frac{X_{t_F}}{S_F} V_{t_F} \times e^{\mu_{\text{set}} t} \quad (\text{Gleichung 3})$$

erfolgen (Korz *et al.*, 1995) und dadurch quasi-statische Bedingungen während der Zulaufphase realisieren. Dabei war  $F_F(t)$  [ $\text{L h}^{-1}$ ] der Volumenstrom der Zufütterungslösung zum Zeitpunkt  $t$  [h],  $\mu_{\text{set}}$  [ $\text{h}^{-1}$ ] die vorgegebene spezifische Wachstumsgeschwindigkeit,  $Y_{X/S}$  [ $\text{g g}^{-1}$ ] der Biomasseausbeutekoeffizient,  $q$  [ $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] der Koeffizient für den Erhaltungsstoffwechsel,  $X_{t_F}$ , [ $\text{g L}^{-1}$ ] bzw.  $V_{t_F}$  [L] die Biomassekonzentration bzw. das Kulturvolumen zu Beginn der Zufütterungsphase und  $S_F$  [ $\text{g L}^{-1}$ ] die Substratkonzentration in der Zufütterungslösung. Die verwendeten Werte für die Parameter aus Gleichung 3 sind in Tabelle 5.6 zusammengefasst.  $X_{t_F}$  wurde während der Kultivierungen anhand der optischen Dichte ermittelt, indem eine  $\text{OD}_{600}$ -Einheit als äquivalent zu  $0,35 \text{ g L}^{-1}$  BTM bestimmt werden konnte.  $V_{t_F}$  betrug 4 L, wobei das bis zum Beginn der Zufütterungsphase durch Probenahme ausgetragene Volumen (ca. 150 mL) vernachlässigt wurde. Das durch Zufütterung eingetragene Volumen wurde bei der Bestimmung des Zulaufvolumenstroms  $F_F$  ebenfalls nicht berücksichtigt.

**Tabelle 5.6 Parameter der exponentiellen Zufütterung.** Die Werte für  $\mu_{\text{set}}$ ,  $Y_{X/S}$  und  $q$  wurden aus der Literatur übernommen (Korz *et al.*, 1995).  $X_{\text{tF}}$  und  $S_{\text{F}}$  waren von der Zufütterungsstrategie abhängig und sind in Tabelle 5.7 aufgeführt. ( $\mu_{\text{set}}$ , vorgegebene spezifische Wachstumsgeschwindigkeit;  $Y_{X/S}$ , Biomasseausbeutekoeffizient;  $q$ , Koeffizient des Erhaltungsstoffwechsels;  $V_{\text{tF}}$ , Kulturvolumen zu Beginn der Zufütterungsphase;  $X_{\text{tF}}$ , Biomassekonzentration zu Beginn der Zufütterungsphase;  $S_{\text{F}}$ , Substratkonzentration in der Zufütterungslösung)

| Parameter | $\mu_{\text{set}}$<br>[h <sup>-1</sup> ] | $Y_{X/S}$<br>[g g <sup>-1</sup> ] | $q$<br>[g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | $V_{\text{tF}}$<br>[L] | $X_{\text{tF}}$<br>[L] | $S_{\text{F}}$<br>[g L <sup>-1</sup> ] |
|-----------|--|-----------------------------------|---|------------------------|------------------------|--|
| Wert      | 0,12                                     | 0,45                              | 0,025                                       | 4                      | s. Tabelle 5.7         | s. Tabelle 5.7                         |

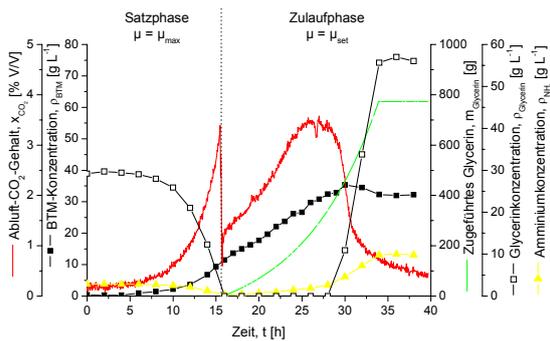
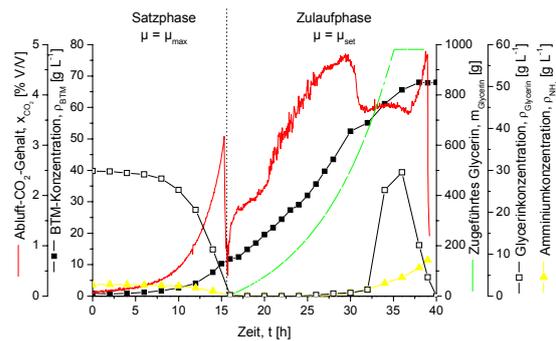
Zunächst wurden anhand zweier Strategien geeignete Bedingungen für die Zufütterung von C- und N-Quelle ermittelt. Der Unterschied beider Strategien belief sich primär auf die Bereitstellung von Stickstoff durch verschiedene Quellen und ist in Tabelle 5.7 aufgeführt.

**Tabelle 5.7 Strategien der Zufütterung von C- und N-Quelle.** ( $V_{\text{F}}$ , Volumen der Zufütterungslösung;  $S_{\text{F}}$ , Substratkonzentration (Glycerin) in der Zufütterungslösung;  $N_{\text{F}}$ , Stickstoffquellenkonzentration (Ammoniumsulfat) in der Zufütterungslösung;  $X_{\text{tF}}$ , Biomassekonzentration zu Beginn der Zufütterungsphase)

| Strategie | $V_{\text{F}}$<br>[L] | $S_{\text{F}}$<br>[g L <sup>-1</sup> ] | $N_{\text{F}}$<br>[g L <sup>-1</sup> ] | $X_{\text{tF}}$<br>[g L <sup>-1</sup> ] | pH-Statisierung              |
|-----------|-----------------------|--|--|---|------------------------------|
| I         | 1,6                   | 500                                    | 167                                    | 11,0                                    | 5 M NaOH                     |
| II        | 1                     | 1000                                   | -                                      | 10,6                                    | 25% (v/v) NH <sub>4</sub> OH |

Bei „Strategie I“ enthielt die Zufütterungslösung Glycerin (C-Quelle) und Ammoniumsulfat (N-Quelle) in gleichem Massenverhältnis (3:1) wie in SGA-Medium, welches für die Satzphase vorgelegt wurde. Aufgrund der begrenzten gemeinsamen Löslichkeit von Glycerin, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und MgSO<sub>4</sub>, das der Zufütterungslösung neben weiteren Komponenten beigefügt war (vgl. Tabelle 4.9; Abschnitt 4.1.6), konnte nur eine maximale Substratkonzentration von 500 g L<sup>-1</sup> Glycerin in der Zufütterungslösung erreicht werden. Um höhere Substratkonzentrationen im Zulaufmedium zu ermöglichen, erfolgte die Zudosierung der N-Quelle bei der alternativen „Strategie II“ durch pH-Statisierung mit 25% (v/v) Ammoniumhydroxid, so dass eine parallele Zufütterung von Ammoniumsulfat nicht erforderlich war. Dadurch konnten Substratkonzentration von 1000 g L<sup>-1</sup> Glycerin in der Zufütterungslösung eingesetzt werden.

Die Anwendung beider Strategien ist anhand der Kultivierungsverläufe in Abb. 5.19 dokumentiert. Tabelle 5.8 fasst die Biomasseproduktion und den Substratverbrauch in Satz- und Zulaufphase zusammen.

**(a) N-Quelle:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Strategie I)**

**(b) N-Quelle:  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Strategie II)**


**Abb. 5.19** Zulaufkultivierungen von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla. **(a)** Proportionale, exponentielle Zufütterung der C-Quelle Glycerin und der N-Quelle Ammoniumsulfat (Strategie I). **(b)** Exponentielle Zufütterung der C-Quelle Glycerin. Die Zugabe der N-Quelle erfolgte durch pH-Statisierung mit Ammoniumhydroxid (Strategie II). Die Zufütterung von 1-1,6 L Zulaufmedium (vgl. Abschnitt 4.1.6) wurde jeweils zum Ende der Satzphase in 4 L SGA-Medium nach 15,7 h gestartet.

Beide Strategien ermöglichten deutliche Erhöhungen der BTM-Konzentrationen im Vergleich zur Satzphase. Bei Strategie I stellten sich finale Zelldichten jedoch schon frühzeitig, d.h. deutlich vor Zufütterungsende nach 34 h ein (Abb. 5.19 (a)). Die Stagnation bzw. Abnahme der  $\text{CO}_2$ -Produktion nach 26 h Kultivierungsdauer zeigte einen Wachstumsstopp durch C- bzw. N-Quellen unabhängige Limitierung an, so dass nur eine maximale BTM-Konzentrationen von  $35,3 \text{ g L}^{-1}$  erzielt wurde. Infolgedessen wurde eine Akkumulation des zugeführten Glycerins bis auf eine Konzentration von  $56,2 \text{ g L}^{-1}$  und ein unvollständiger Substratverbrauch beobachtet. Gemäß der in Tabelle 5.8 aufgeführten Daten bedingte diese Limitierung eine Abnahme des Ausbeutekoeffizienten von  $Y_{X/S} = 0,37$  während der Satzphase auf  $Y_{X/S} = 0,28$  bis zum endgültigen Wachstumsstopp nach 30 h während der Zulaufphase. Bereits nach 26 h Kultivierungsdauer betrug  $Y_{X/S}$  nur noch 0,31 (Daten nicht dargestellt), so dass die Limitierung schon vor der Stagnation/Abnahme des Abluft- $\text{CO}_2$ -Gehalts einsetzte.

Wie der Verlauf der  $\text{CO}_2$ -Produktion in Abb. 5.19 (b) zeigt, wurde auch bei Strategie II ab ca. 30 h Kultivierungsdauer eine substratunabhängige Wachstumslimitierung beobachtet, während der zugeführtes Glycerin bis auf eine maximale Konzentration von  $29,5 \text{ g L}^{-1}$  akkumulierte. Dieser Effekt trat jedoch nur temporär auf und brachte das Wachstum nicht vollständig zum Erliegen, so dass die Biomasseproduktion gebremst fortlief. Während eines erneuten Anstiegs der  $\text{CO}_2$ -Produktion wurde das akkumulierte Substrat wieder verbraucht. Durch die Wachstumslimitierung wurde auch bei Strategie II eine Abnahme des Ausbeutekoeffizienten von  $Y_{X/S} = 0,37$  während der Satzphase auf  $Y_{X/S} = 0,28$  bis zum endgültigen Substratverbrauch nach 40 h Kultivierungsdauer bestimmt (Tabelle 5.8). Vor dem Einsetzen der Glycerinakkumulation nach 30 h Kultivierungsdauer war die Substratausbeute mit  $Y_{X/S} = 0,37$  im

Vergleich zur Satzphase unverändert (Daten nicht dargestellt), so dass bei Strategie II keine frühzeitige Limitierung erfolgte. Aufgrund der geringen Limitierung und des vollständigen Substratverbrauchs während dieses Prozesses konnten folglich bei Strategie II wesentlich höhere Zelldichten erreicht werden, so dass innerhalb der Zulaufphase eine Zunahme der BTM-Konzentration von 11,2 auf 68,0 g L<sup>-1</sup>, d.h. um einen Faktor von 6,1 erfolgte.

**Tabelle 5.8 Biomasseproduktion und Substratverbrauch während Satz- und Zulaufphase.** Die Daten basieren auf einer HZDK von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla in SGA-Medium. ( $\rho_{BTM}$ , gebildete Biotrockenmassekonzentration;  $\rho_{Gly}$ , verbrauchte Glycerinkonzentration;  $Y_{X/S}$ , Biomasseausbeutekoeffizient [ $\rho_{BTM}/\rho_{Gly}$ ])

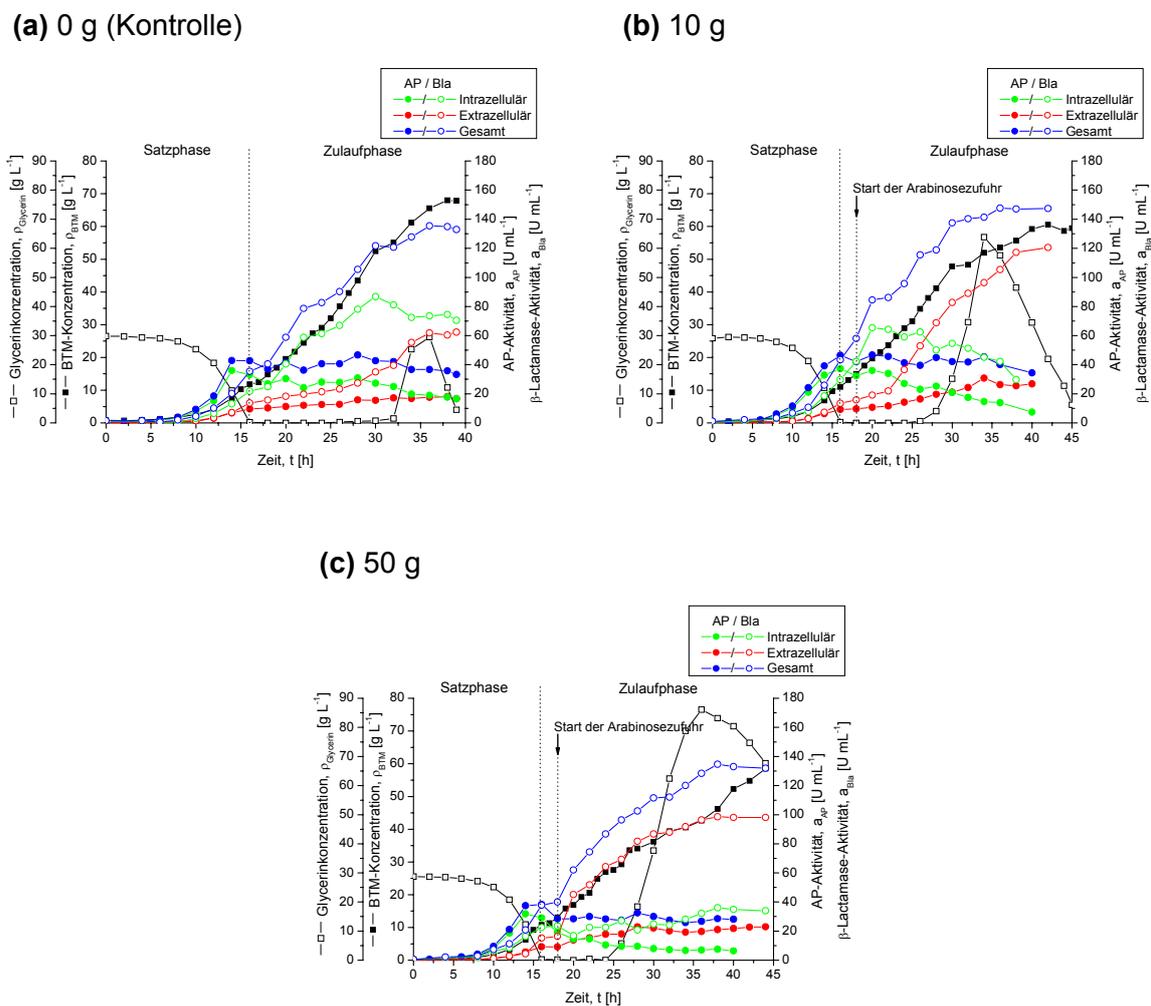
|           | Satzphase                            |                                      |                  | Zulaufphase                          |                                      |                  | Gesamt                               |                                      |                  |
|-----------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------|
| Strategie | $\rho_{BTM}$<br>[g L <sup>-1</sup> ] | $\rho_{Gly}$<br>[g L <sup>-1</sup> ] | $Y_{X/S}$<br>[-] | $\rho_{BTM}$<br>[g L <sup>-1</sup> ] | $\rho_{Gly}$<br>[g L <sup>-1</sup> ] | $Y_{X/S}$<br>[-] | $\rho_{BTM}$<br>[g L <sup>-1</sup> ] | $\rho_{Gly}$<br>[g L <sup>-1</sup> ] | $Y_{X/S}$<br>[-] |
| I         | 11,5                                 | 30,0                                 | 0,38             | 23,8                                 | 84,8                                 | 0,28             | 35,3                                 | 114,8                                | 0,31             |
| II        | 11,2                                 | 30,0                                 | 0,37             | 56,8                                 | 200,0                                | 0,28             | 68,0                                 | 230,0                                | 0,30             |

Da sich die Zulaufmedien beider Strategien ausschließlich in der verwendeten N-Quelle (Ammoniumsulfat bzw. Ammoniumhydroxid) unterschieden, wurde ein Eintrag toxischer Sulfatkonzentration durch das Ammoniumsulfat als Ursache für das frühzeitige Wachstumsende bei Strategie I vermutet. Demzufolge war Strategie II bevorzugt für die HZDK geeignet und wurde bei den im Folgenden beschriebenen Prozessen zur extrazellulären Produktion von AP und Bla angewendet.

### **Sekretorische Proteinproduktion**

Zur Steigerung der extrazellulären Produktion von AP und Bla durch HZDK wurde Arabinose während der Zulaufphase in die Zufütterungslösung gegeben und dadurch parallel zudosiert. Dieses Verfahren sollte die im Verlauf der Zulaufkultivierung zunehmende Zelldichte bezüglich der bereitgestellten Konzentration des Induktors der BRP-Expression berücksichtigen. Dabei wurden zwei unterschiedliche Induktionsstärken untersucht, welche sich an den in Abschnitt 5.2.1 ermittelten OD<sub>600</sub>-bezogenen Arabinosekonzentrationen von 10 mg L<sup>-1</sup> (wachstumsperrmissive Induktionsstärke) und 50 mg L<sup>-1</sup> (wachstumsinhibierende Induktionsstärke) orientierten. Die erwarteten maximalen BTM-Konzentrationen von ca. 70 g L<sup>-1</sup> entsprachen einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> ~ 200. Bei einem finalen Kulturvolumen von 5 L am Ende der Zulaufphase war demzufolge eine Zudosierung von 10 g Arabinose erforderlich, um eine OD<sub>600</sub>-bezogene Arabinosekonzentrationen von ca. 10 mg L<sup>-1</sup> zu erreichen. Die OD<sub>600</sub>-bezogene Arabinosekonzentration von ca. 50 mg L<sup>-1</sup> erforderte eine Zudosierung von

50 g Arabinose. Da die endgültigen Arabinosekonzentrationen erst bei vollständiger Zudosierung des Zulaufmediums erreicht wurden, konnte eine im Vergleich zur gepulsten Induktorgabe (vgl. Abschnitt 5.2.1) geringere Beeinflussung des Wachstums von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla während der Zulaufphase erwartet werden. Daher wurde mit der Zudosierung von 50 g Arabinose auch eine OD<sub>600</sub>-bezogene Arabinosekonzentration (50 mg L<sup>-1</sup>) gewählt, welche bei gepulster Zugabe zu einem Erliegen des Wachstums führte. Abb. 5.20 und Tabelle 5.9 zeigen die Ergebnisse dieser HZDK bezüglich der sekretorischen Proteinproduktion. Als Kontrolle ist die in Abb. 5.19 (b) dargestellte Kultivierung ohne Zugabe von Arabinose ebenfalls aufgeführt.



**Abb. 5.20** Zulaufkultivierungen von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla in SGA-Medium mit paralleler Zudosierung des Induktors der BRP-Expression. Die Zufütterung von 1 L Zulaufmedium wurde am Ende der Satzphasen in 4 L SGA-Medium zwischen 15,6 und 16,0 h gestartet. Die Arabinosezudosierung erfolgte ab 18 h Kultivierungsdauer. (a) Kontrolle ohne Arabinosezudosierung (0 g) sowie Zufuhr von 10 g (b) bzw. 50 g (c) Arabinose über die Zufütterungslösung.

Die erzeugten BTM-Konzentrationen lagen bei den Fermentationen mit unterschiedlicher Arabinosezudosierung leicht unter denen der Kontrollkultivierung und betragen  $60,5 \text{ g L}^{-1}$  (10 g Arabinose) bzw.  $58,6 \text{ g L}^{-1}$  (50 g Arabinose) gegenüber  $68,0 \text{ g L}^{-1}$  (Kontrolle). Die Zelldichten konnten somit gegenüber den in Abschnitt 5.2.1 dargestellten Satzfermentation in SGA-Medium mit gepulster Arabinosezugabe, bei denen durchschnittlich  $10 \text{ g L}^{-1}$  BTM erzeugt wurden, um einen Faktor von ca. 6 gesteigert werden. Der stetige Anstieg der BTM-Konzentrationen zeigte, dass auch unter erhöhter Zudosierung von 50 g Arabinose kein Wachstumsstopp eintrat. Wie die im Vergleich zur Kontrolle langsamere Zunahme der BTM-Konzentration bei den Kultivierungen mit Arabinosezufuhr belegt, blieb das Wachstum jedoch von der BRP-Expression nicht unbeeinflusst. Demzufolge setzte bei Zudosierung von 10 g Arabinose ab 26 h Kultivierungsdauer eine Akkumulation des Substrats Glycerin ein, bei Zudosierung von 50 g Arabinose bereits ab 24 h Kultivierungsdauer. Glycerinakkumulation und Wachstumsreduktion vielen bei der Fermentation mit erhöhter Arabinosezudosierung stärker aus, sodass bis zum Abbruch der Kultivierung kein vollständiger Substratverbrauch erfolgte und finale BTM-Konzentrationen möglicherweise nicht erreicht wurden.

Unabhängig von der zugeführten Arabinosekonzentration wurde während der Zulaufphase eine vergleichbare Steigerung der insgesamt erzeugten  $\beta$ -Lactamase-Aktivität erzielt. Lediglich zum Ende der Kultivierungen mit Arabinosezudosierung erfolgte, trotz anhaltenden Wachstums, nur noch eine geringe Zunahme der Bla-Gesamtaktivität, so dass bei erhöhter Arabinosezufuhr (50 g Arabinose) eine leicht reduzierte maximale Bla-Aktivität erhalten wurde ( $132,0$  gegenüber ca.  $147 \text{ U mL}^{-1}$ ; siehe Tabelle 5.9). Dies konnte möglicherweise durch Plasmidinstabilität erklärt werden (vgl. Abschnitt 5.2.1). Bei der Kontrollkultivierung betrug die Bla-Gesamtaktivität nach der Satzphase  $39,4 \text{ U mL}^{-1}$ , so dass während der Zulaufphase eine Aktivitätssteigerung um einen Faktor von 3,7 erreicht wurde. Diese fiel jedoch im Vergleich zur Biomassezunahme, welche während der Zulaufphase mit einem Faktor von 6 anstieg, geringer aus.

Bei der Kontrollfermentation war die  $\beta$ -Lactamase stets überwiegend intrazellulär lokalisiert. Lediglich in der Phase substratunabhängiger Wachstumslimitierung ab ca. 30 h Kultivierungsdauer war eine erhöhte Verschiebung der Bla-Aktivität auf die Seite des Mediums zu beobachten. Wie Tabelle 5.9 aufführt, wurden dabei maximal 47% der erzeugten Bla freigesetzt. Vor dem Einsetzen der Limitierung betrug der extrazelluläre Anteil 29% (in Tabelle 5.9 nicht dargestellt), so dass möglicherweise Lyseeffekte für die BRP-unabhängige Bla-Freisetzung verantwortlich waren.

Die Zudosierung von 10 g Arabinose erbrachte die vergleichsweise höchste extrazelluläre Bla-Aktivität, wobei  $a_{\text{Bla}} = 120,1 \text{ U mL}^{-1}$  bzw. 82% der insgesamt erzeugten Bla-Aktivität im Medium vorlagen. Im Vergleich zur der Satzfermentation aus Abschnitt 5.2.1 mit optimaler

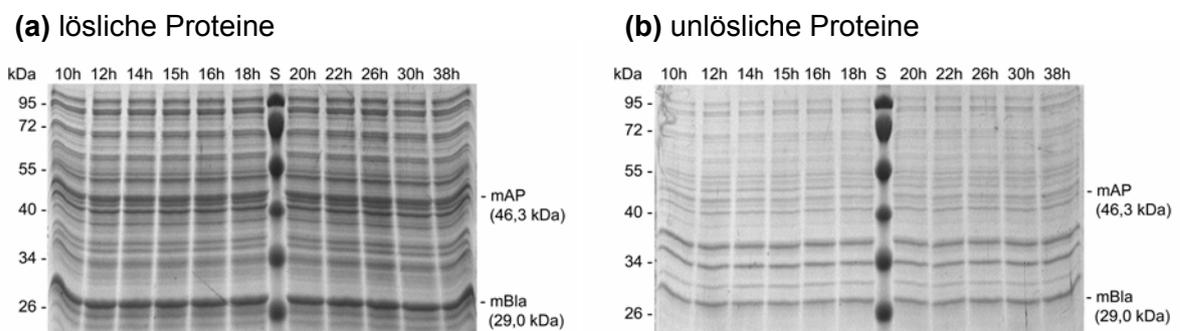
Induktionsstrategie ( $OD_{600}$ -bezogene Arabinosekonzentration von  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) bei der  $a_{\text{Bla}} = 36,1 \text{ U mL}^{-1}$  in das Medium gelangten (vgl. Tabelle 5.5), war demnach eine Steigerung der extrazellulären Bla-Aktivität um einen Faktor von 3,3 möglich. Da die zugrunde liegende Bla-Gesamtaktivität ebenfalls nur um einen Faktor von 3,7 anstieg, konnte keine der Biomassezunahme äquivalente Erhöhung der extrazellulären Bla-Aktivität erreicht werden.

**Tabelle 5.9 Ergebnisse der Biomasse- und  $\beta$ -Lactamase-Produktion durch HZDK von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla mit Arabinosezudosierung für die BRP-Coexpression.** ( $m_{\text{Ara}}$ , zugeführte Arabinosemasse;  $\rho_{\text{BTM}}$ , Biotrockenmassekonzentration;  $a_{\text{ext}}$ , extrazelluläre Aktivität und  $a_{\text{tot}}$ , Gesamtaktivität der  $\beta$ -Lactamase)

| $m_{\text{Ara}}$<br>[g] | $\rho_{\text{BTM}}$<br>[g L <sup>-1</sup> ] | $a_{\text{ext}}$<br>[U ml <sup>-1</sup> ] | $a_{\text{tot}}$<br>[U ml <sup>-1</sup> ] |
|-------------------------|---|---|---|
| 0                       | 68,0  | 69,3 (47%)                                | 147,6                                     |
| 10                      | 60,5  | <b>120,1 (82%)</b>                        | 147,3                                     |
| 50                      | 58,6  | 98,0 (74%)                                | 132,0                                     |

Wie Abb. 5.20 weiterhin zeigt, war bei den HZDK noch vor Beginn der Zulaufphase und somit unabhängig von der Arabinosezudosierung eine Stagnation der Gesamtaktivität alkalischer Phosphatase zu verzeichnen. Ab ca. 14 h Kultivierungsdauer betrug die AP-Gesamtaktivität bei den Kultivierungen etwa  $40 \text{ U mL}^{-1}$  und blieb darauffolgend über den Prozessverlauf konstant. Aus diesem Grund wird in Tabelle 5.9 auf eine Darstellung der Ergebnisse zur extrazellulären AP-Produktion verzichtet.

Als Ursache für die stagnierende AP-Gesamtaktivität kamen sowohl ein Expressionsstopp, als auch die Inaktivität *de novo* synthetisierter AP in Betracht. Aus diesem Grund wurde die AP-Synthese, wie in Abb. 5.21 dargestellt, über den Kulturverlauf elektrophoretisch untersucht.



**Abb. 5.21 Elektrophoretische Untersuchung der AP- und Bla-Synthese während der HZDK von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla ohne Arabinosezudosierung.** Die Abbildung unterscheidet in (a) lösliche und (b) unlösliche Proteine. Die Molmassen des Standards S sind jeweils links angegeben. Der Nachweis erfolgte durch Coomassie-Färbung 12%iger SDS-Gele. Bei der Proteinpräparation wurden identische Biomassen (ca.  $5 \times 10^9$  Zellen) eingesetzt, sodass die Spuren jeweils vergleichbare Proteinkonzentrationen enthalten.

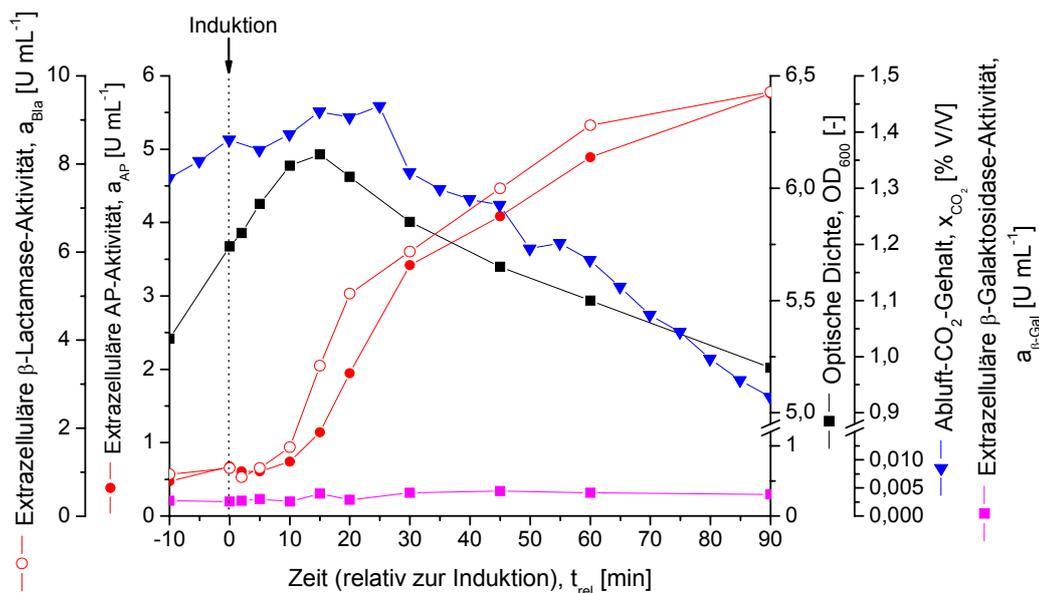
Abb. 5.21 (a) zeigt prominente Banden für AP und Bla, deren Intensitäten sich über den Kultivierungsverlauf nicht maßgeblich ändern. Da den Gelspuren jeweils vergleichbare Proteinkonzentrationen zugrunde lagen, hätte eine Expressionsstopp zu einer Abnahme der Bandenintensität führen müssen. Demzufolge blieb die Expression beider Proteine während der Kultivierung erhalten, so dass insbesondere *de novo* synthetisierte AP inaktiv vorlag und ein Erliegen der AP-Synthese als Ursache für die Stagnation der AP-Gesamtaktivität ausgeschlossen werden konnte. Eine mögliche Inaktivität durch Aggregation in unlöslichen *inclusion bodies*, wurde durch Abb. 5.21 (b) ebenfalls widerlegt.

Die weitere Untersuchung der AP-Inaktivität erfolgte durch Zulaufkultivierung, bei der während der Zulaufphase Pulse verschiedener Substanzen zugegeben wurden. Neben einer separaten Zugabe sämtlicher Komponenten des SGA-Medium wurden die beiden AP-Cofaktoren  $Mg^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  in Form ihrer Sulfate sowie Komplexe Medienbestandteile (Hefeextrakt/Caseinpepton) hinzugefügt, ermöglichten jedoch keine Wiederherstellung der AP-Aktivität. Auch während einer Satzfermentation von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla in SGA-Medium mit verdoppelten Konzentrationen sämtlicher Komponenten des Mediums, trat eine vergleichbare Stagnation der AP-Gesamtaktivität ein. Da die Ursache der AP-Inaktivität nicht ermittelt werden konnte, wird auf eine Darstellung dieser Untersuchungen verzichtet.

Schlussfolgernd dokumentieren die vorliegenden Ergebnisse der HZDK von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla eine deutliche Erhöhung der BTM-Konzentration auf bis zu  $70 \text{ g L}^{-1}$ , d.h. um einen Faktor von ca. 6 im Vergleich zu SGA-Satzkultivierungen. Dies bedeutete jedoch keine zwangsläufig äquivalente Steigerung der Enzymaktivitäten, so dass die insgesamt und extrazellulär erzeugten Bla-Aktivitäten nur um einen Faktor von 3,3 bzw. 3,7 zunahmen. Die AP-Aktivität stagnierte bereits vor dem Beginn der Zulaufphase und konnte demzufolge durch HZDK nicht gesteigert werden. Qualitative, elektrophoretische Untersuchungen zur Proteinexpression zeigten jedoch, dass die Synthese beider Enzyme über den Kultivierungsverlauf keiner maßgeblichen Veränderung unterlag. Demzufolge bestand insbesondere bei der AP eine Diskrepanz zwischen ermittelter Aktivität und Konzentration der Enzyme.

### 5.2.3 Kinetik der BRP-Expression und Proteinsekretion

Zur Beschreibung der Zusammenhänge zwischen Arabinoseaddition, BRP-Expression und Proteinsekretion wurden die Verläufe der Transkription des BRP-Gens, der BRP-Synthese und der Freisetzung der beiden Modellproteine AP und Bla nach Arabinosezugabe in hoher zeitlicher Auflösung bestimmt. Dazu wurde eine Fermentation des *E. coli*-Stammes Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla analog zu dem in Abschnitt 5.2.1 beschriebenen Verfahren durchgeführt und mit einer  $OD_{600}$ -bezogenen Arabinosekonzentration von  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  induziert. Die Expression des LppBRP-His<sub>6</sub>, anstelle des LppBRP, ermöglichte einen immunologischen BRP-Nachweis (vgl. Abschnitt 5.1.4). Abb. 5.22 zeigt den Sekretionsverlauf für AP und Bla im Zeitraum unmittelbar nach Induktion und dokumentiert die Zellyse bzw. Quasi-Lyse anhand der optischen Dichte und  $\beta$ -Galaktosidase-Freisetzung.



**Abb. 5.22 Sekretion, Zellyse und Quasi-Lyse in hoher zeitlicher Auflösung.** Die Abbildung basiert auf einer Satzfermentation von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla in chemisch definiertem SGA-Medium. Dargestellt sind die Verläufe der extrazellulären AP-,  $\beta$ -Lactamase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, sowie der optischen Dichte und der Abluft- $\text{CO}_2$ -Konzentration innerhalb von 90 Minuten nach Induktion mit  $1 \text{ g L}^{-1}$  Arabinose. Die Aussagekraft des extrazellulären  $\beta$ -Galaktosidase-Nachweises war durch eine vergleichsweise Bestimmung der intrazellulären Aktivität für den Zeitpunkt 60 min nach Induktion gegeben, welche  $a_{\beta\text{-Gal}} = 0,35 \text{ U mL}^{-1}$  betrug.

5 min nach Arabinosezugabe setzte ein geringer und nach 10 min ein rascher Anstieg der sekretorischen AP- und Bla-Aktivität ein. Demnach vergingen zwischen Addition des Induktors und beginnender Sekretion nicht mehr als 5 min. Etwa 15 min nach Induktion traten

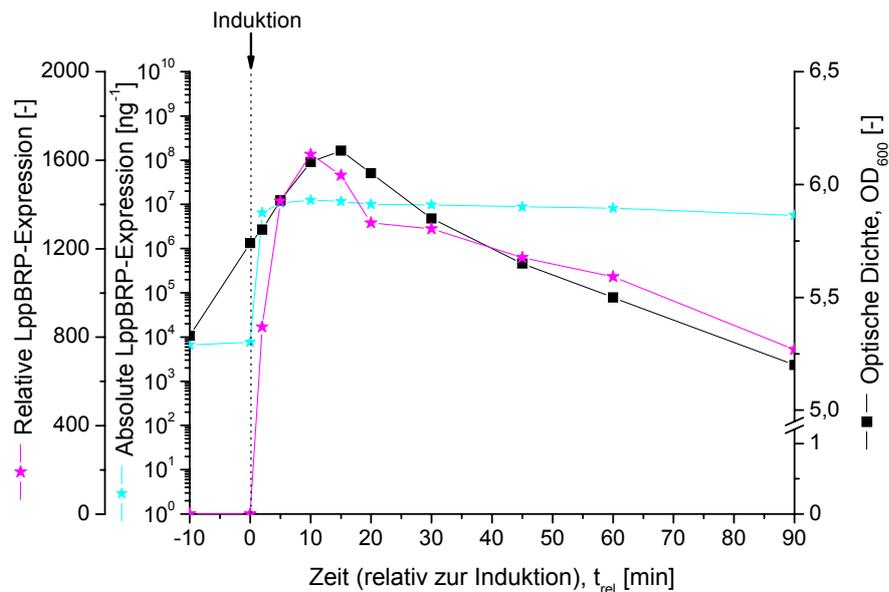
Wachstumsstillstand bzw. Quasi-Lyse ein, was durch ein Maximum der optischen Dichte mit anschließendem Rückgang dokumentiert wurde. Die Abluft-CO<sub>2</sub>-Konzentration erreichte etwa 25 min nach Induktion ein Maximum und zeigte die Reduktion der Zellatmung bzw. des Energieverbrauchs. Im gleichen Zeitraum (20-30 min nach Induktion) wurde die Geschwindigkeit der Sekretion zunehmend geringer. Vermutlich konnte die intrazelluläre Proteinkonzentration aufgrund des Erliegens der Proteinsynthese durch BRP-Aktivität (Stegehuis *et al.*, 1995) nicht aufrechterhalten werden, sodass ausschließlich intrazellulär verbliebenes Reporterprotein sekretiert wurde. Da die BRP-vermittelte Sekretion diffusiv abläuft, war eine stetige Abnahme der Freisetzung zu erkennen. Die beobachtete leicht vereinfachte Freisetzung der  $\beta$ -Lactamase gegenüber der AP ist möglicherweise in der geringeren Größe dieses Proteins (29 kDa gegenüber 46 kDa) begründet.

Anhand der konstanten extrazellulären  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde die, trotz maximaler BRP-Expression, strikt periplasmatische Proteinfreisetzung dokumentiert. 60 min nach Induktion betrug die extrazelluläre  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nur ca. 1% der bestimmten Gesamtaktivität und bestätigte die in Abschnitt 5.2.1 ermittelte geringe Zelllyse durch toxische BRP-Expression.

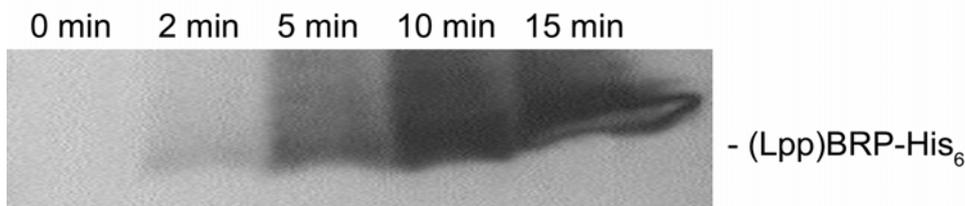
Abb. 5.23 beschreibt die LppBRP-His<sub>6</sub>-Expression, welche der Proteinsekretion zugrunde liegt, durch Quantifizierung des LppBRP-His<sub>6</sub>-Transkriptes. Ein immunologischer Nachweis des BRP in membranhaltigen Zelltrümmern ist Abb. 5.24 dargestellt.

Bereits innerhalb von zwei Minuten nach Induktion konnte eine drastische Erhöhung der relativen LppBRP-His<sub>6</sub>-Expression um fast drei Zehnerpotenzen (ca. Faktor 850) bestimmt werden (Abb. 5.23). Vermutlich setzte die Expression noch früher ein; kürzere Untersuchungsintervalle waren jedoch technisch nicht möglich. Der Anstieg setzte sich bis etwa 10 min nach Induktion fort und erreichte eine maximale Verstärkung der Transkription um einen Faktor von ca. 1600 im Vergleich zum basalen Niveau in Abwesenheit von Arabinose. Dies entsprach einer absoluten Erhöhung der LppBRP-His<sub>6</sub>-Expression von ca.  $8 \times 10^3$  LppBRP-mRNA-Molekülen ng<sup>-1</sup> RNA vor Induktion auf maximal etwa  $1 \times 10^7$  Molekülen ng<sup>-1</sup> RNA nach Induktion. Anschließend war eine stetige Abnahme der Expression zu beobachten, die mit dem Verlauf der optischen Dichte korrelierte. Es wurde vermutet, dass die Transkription im Zusammenhang mit der BRP-Aktivität zum Erliegen kam und sich der beobachtete Expressionsrückgang durch eine stetige Degradation bereits vorliegender BRP-Transkripte erklärte. Stegehuis *et al.* berichteten eine Stagnation der Proteinsynthese unter BRP-Expression (Stegehuis *et al.*, 1995), der auch für die Expression der Modellproteine AP und Bla beobachtet wurde (vgl. Abschnitt 5.2.1). Der Nachweis des LppBRP-His<sub>6</sub>-Transkriptes zeigte, dass auch die Transkription von der BRP-Aktivität betroffen ist und möglicherweise die Ursache für den Stopp der Proteinsynthese darstellte.

Zeitgleich zum Anstieg der Transkription war auch das (Lpp)BRP-His<sub>6</sub>-Protein 2 min nach Induktion in geringem Maße immunologisch detektierbar (Abb. 5.24). Dessen Konzentration nahm innerhalb der darauf folgenden 15 min weiter zu, wie der dargestellte Western-Blot qualitativ dokumentiert. Eine andauernde (Lpp)BRP-His<sub>6</sub>-Präsenz über mehrere Stunden nach Induktion dokumentieren Untersuchungen zur BRP-Expression in Abschnitt 5.2.5.



**Abb. 5.23 Relative und absolute Quantifizierung der LppBRP-His<sub>6</sub>-Transkription nach starker Induktion.** Die Bestimmung erfolgte durch qRT-PCR innerhalb von 90 min nach Induktion der SGA-Satzfermentation von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His<sub>6</sub>phoAbla mit 1000 mg L<sup>-1</sup> Arabinose pro OD<sub>600</sub>-Einheit. Die absolute LppBRP-Expression gibt die Anzahl der LppBRP-mRNA-Moleküle pro Nanogramm Gesamt-RNA an. Die relative Expression ist dimensionslos und auf den Zeitpunkt unmittelbar vor der Induktion ( $t_{rel} = 0$  min) bezogen.



**Abb. 5.24 Nachweis des LppBRP-His<sub>6</sub> in Zellmembranen nach maximaler Induktion.** Dargestellt ist der Zeitraum von 15 min nach Zugabe von 1000 mg L<sup>-1</sup> Arabinose pro OD<sub>600</sub>-Einheit. Der Nachweis des LppBRP-His<sub>6</sub> erfolgte durch Western-Blot (16% Tricin-SDS-Gel) anhand eines Penta-His-Antikörpers. Die Proben wurden zuvor 5fach durch Fällung mit 5 Volumen Aceton konzentriert.

Die vorliegenden Daten zeigen eine rasche Synthese des für die Proteinsekretion verantwortlichen LppBRP-His<sub>6</sub> nach Induktion. So konnte neben einer forcierten LppBRP-His<sub>6</sub>-

Transkription auch das Protein selbst bereits 2 min nach Induktion detektiert werden. Dies belegte zudem einen schnellen Transport des BRP zur äußeren Membran und erklärte das nahezu unmittelbare Einsetzen der Reportersekretion nach Induktion (ca. 5 min). Die Geschwindigkeit der Sekretion erreichte innerhalb von ca. 15-20 min nach Induktion der BRP-Expression ein Maximum, zeitgleich mit dem Einsetzen der Quasi-Lyse und dem Erreichen der maximalen Transkription. Demzufolge ermöglichte die starke BRP-Expression eine schnelle Sekretion der verwendeten Modellproteine in das Medium, welche möglicherweise zur raschen Proteinfreisetzung am Ende von Fermentationsprozessen genutzt werden kann und in Abschnitt 5.3.3 untersucht wird.

#### **5.2.4 Analyse der Genexpression unter BRP-Aktivität**

Die dargestellten Untersuchungen zur BRP-vermittelten Proteinsekretion dokumentieren eine intensive Beeinflussung des zellulären Geschehens durch BRP-Aktivität. Neben einer Stagnation des bakteriellen Wachstums und der Proteinexpression konnte eine Reduktion der Zellatmung und des Energieverbrauchs beobachtet werden. Derartige Effekte ließen eine Reaktion der Zelle auf die toxische Wirkung des BRP erwarten. Durch Einsatz der DNA-Chiptechnologie (*Microarrays*) wurde die Genexpression unter BRP-Aktivität analysiert. Dies sollte die zelluläre Reaktion auf die BRP-Toxizität beschreiben und Optimierungsansätze für die Stammentwicklung aufdecken.

Die verwendeten *Microarrays* repräsentierten sämtliche bekannte bzw. vorhergesagte Gene (ORFs) des *E. coli* K12-Stammes MG1655. Als Grundlage für die Analysen dienten die in Abschnitt 5.2.1 beschriebenen Fermentationen von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPphoAbla mit Induktion der BRP-Expression durch OD<sub>600</sub>-bezogene Arabinosekonzentrationen von 5, 25 und 1000 mg L<sup>-1</sup> Arabinose. Dabei wurde die Genexpression 30 min und 60 min nach Induktion in Vergleich zum Zeitpunkt unmittelbar vor Induktion gestellt, so dass letztlich 6 Regulationszustände betrachtet werden konnten. Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 5.10 und Tabelle 5.11 aufgeführt. Da den Analysen keine biologischen Replikate zugrunde lagen, enthalten die Tabellen ausschließlich Gene, welche bei mindestens zwei der drei unterschiedlichen Induktionsstärken differentiell reguliert vorlagen.

Keines der 4086 *E. coli* Gene/ORFs zeigte unter LppBRP-Expression eine signifikant reprimierte Expression. Insgesamt wurden 14 Gene identifiziert, die nach Induktion dereprimiert vorlagen. Diese sind in Tabelle 5.11 noch einmal funktionell aufgegliedert.

**Tabelle 5.10 Übersicht der unter BRP-Expression differentiell regulierten Gene/ORFs.** Die Tabelle fasst die Ergebnisse für drei unterschiedliche Induktionsstärken zusammen. Zur Analyse wurden *Microarrays* verwendet, welche alle 4086 bekannten oder prognostizierten Gene/ORFs von *E. coli* MG1655 repräsentierten.

| Gen/ORF                                | Produkt <sup>a</sup>   | Regulation <sup>b</sup> | Summe     |
|--|--|-------------------------|-----------|
| <b>Dereprimiert (hochreguliert)</b>    |  |                         | <b>14</b> |
| <i>araE</i>                            | Arabinose MFS Transporter  | 3,15                    |           |
| <i>araF</i>                            | AraF-Untereinheit des Arabinose ABC Transporters                 | 2,83                    |           |
| <i>araH</i>                            | hochaffines <i>L</i> -Arabinose Transporterprotein (ABC Familie) | 2,81                    |           |
| <i>araG</i>                            | AraG-Untereinheit des Arabinose ABC Transporters                 | 2,53                    |           |
| <i>ygeA</i>                            | <i>vorhergesagte Racemase (ORF)</i>                              | 2,42                    |           |
| <i>pgaD</i>                            | <i>putatives Protein der inneren Membran</i>                     | 2,39                    |           |
| <i>yiiX</i>                            | <i>hypothetische Peptidase</i>                                   | 2,35                    |           |
| <i>araJ</i>                            | MFS Transporter  | 2,27                    |           |
| <i>ftnB</i>                            | <i>vorhergesagtes Ferritin-ähnliches Protein (ORF)</i>           | 2,20                    |           |
| <i>ygeQ</i>                            | <i>vorhergesagtes Protein (ORF)</i>                              | 1,91                    |           |
| <i>osmB</i>                            | osmotisch induziertes Lipoprotein der äußeren Membran            | 1,63                    |           |
| <i>galM</i>                            | Aldose-Epimerase   | 1,57                    |           |
| <i>soxS</i>                            | Transkriptionsregulator der oxidativen Stressantwort             | 1,45                    |           |
| <i>vacJ</i>                            | <i>vorhergesagtes Lipoprotein (ORF)</i>                          | 1,36                    |           |
| <b>Reprimiert (herrunterreguliert)</b> |  |                         | <b>0</b>  |

<sup>a</sup> Gemäß der EcoCyc-Datenbank (<http://www.ecocyc.org>). Putative/hypothetische Produkte sind kursiv dargestellt.

<sup>b</sup>  $\log_2[\text{Expression}_{\text{nach Induktion}}/\text{Expression}_{\text{vor Induktion}}]$ . Mittlere Regulation aus mindestens zwei Vergleichszuständen.

**Tabelle 5.11 Klassifizierung der unter BRP-Expression dereprimierten Gene/ORFs** (vgl. Tabelle 5.10).

| Klassifizierung          | Anzahl | Bezeichnung                               |
|--------------------------|--------|---|
| Gesamt                   | 14     | siehe Tabelle 5.10                        |
| Arabinose induziert      | 5      | <i>araE, araF, araG, araH, araJ</i>       |
| Putative / hypothetische | 6      | <i>ygeA, pgaD, yiiX, ftnB, ygeQ, vacJ</i> |
| Charakterisierte         | 3      | <i>osmB, galM, soxS</i>                   |

Die fünf Gene *araE, araF, araG, araH* und *araJ* unterliegen einer Induktion durch Arabinose (Hendrickson *et al.*, 1990; Stoner & Schleif, 1983), wobei die Produkte der Gene *araEFGH* für die zelluläre Arabinoseaufnahme verantwortlich sind. Ihre Derepression erklärt sich durch die Zugabe des Induktors Arabinose und ist unabhängig von der BRP-Aktivität zu sehen. Diese Gene wiesen im Vergleich zu den übrigen dereprimierten Genen die stärkste durchschnittliche Regulation auf ( $2,27 \leq \text{Regulation} \leq 3,15$ ). Werden die sechs hypothetischen Gene/ORFs (*ygeA, pgaD, yiiX, ftnB, ygeQ* und *vacJ*), die mangels ausreichender Charakterisierung keine Rückschlüsse auf die zelluläre Reaktion erlauben, außer Betracht gelassen, so blieben mit den Genen *osmB, galM* und *soxS* lediglich drei übrig, deren differentielle Regula-

tion nicht unmittelbar auf die Arabinosezugabe zurückgeführt werden konnte. Die Derepression dieser Gene fiel jedoch im Vergleich zu den *ara*-Genen gering aus ( $1,45 \leq \text{Regulation} \leq 1,63$ ).

Die geringe Anzahl differentiell regulierter Gene wurde als starkes Anzeichen für die Unfähigkeit der Zelle zur Reaktion auf die BRP-Toxizität gesehen. Untersuchungen zur LppBRP-Expression (vgl. Abschnitt 5.2.3) zeigten, dass wachstumsinhibierende BRP-Aktivität zu einem Erliegen der Transkription des LppBRP-Gens führt. Da auch die Synthese der Modellproteine AP und Bla unter toxischer BRP-Expression gehemmt ist, muss eine globale Inhibition der Genexpression als mögliche Ursache für die ermittelte geringe Anzahl differentiell regulierter Gene in Betracht gezogen werden. Mechanismen der zellulären Stressantwort, wie sie beispielsweise für drastische Temperaturveränderungen und osmotischen oder oxidativen Stress bekannt sind, wurden demnach nicht aktiviert. Dies könnte zwar die BRP-Toxizität selbst bei geringen Expressionsstärken erklären, gab jedoch wenig Hinweise für Optimierungsansätze auf zellulärer Ebene. Mit dem *osmB*-Gen zeigte sich ein osmotisch induziertes Lipoprotein der äußeren Membran differentiell reguliert, welches durch seine identische Lokalisation möglicherweise in Zusammenhang mit der BRP-Aktivität stehen könnte, dessen Funktion jedoch unbekannt ist (Jung *et al.*, 1989). Eine alleinige, maßgebliche Beteiligung des OsmB-Proteins an der BRP-Toxizität bzw. der Korrektur BRP-verursachter Membranschäden erscheint jedoch aufgrund der vergleichsweise geringen Regulation unwahrscheinlich.

### 5.2.5 Optimierung der extrazellulären Proteinproduktion durch starke BRP-Expression bei maximalen Zelldichten

Die Untersuchungen zur Optimierung der Sekretion durch submaximale Induktion der BRP-Expression (vgl. Abschnitt 5.2.1) erbrachten maximale sekretorische Konzentrationen der Modellproteine AP und  $\beta$ -Lactamase bei wachstumsperriger BRP-Expression. Diese verlief jedoch nicht gänzlich ohne Beeinflussung des Wachstums und resultierte in einer verlängerten Prozessdauer. Kinetische Bestimmungen der LppBRP-Expression und Proteinsekretion nach maximaler Induktion zeigten eine rasche Freisetzung von AP und  $\beta$ -Lactamase (vgl. Abschnitt 5.2.3) und legten die Möglichkeit einer kurzfristigen Sekretion intrazellulärer Proteine nahe. Auf dieser Basis wurde untersucht, ob die Induktion der Sekretion bei maximalen Zelldichten nach zunächst unlimitiertem Wachstum eine geeignete alternative zur submaximalen Expression darstellt und vergleichbare oder sogar erhöhte extrazelluläre Aktivitäten bzw. Produktivitäten ermöglicht. Dazu wurde die Sekretion bei einer Fermentation von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla zum Zeitpunkt finaler Zelldichten maximal induziert.

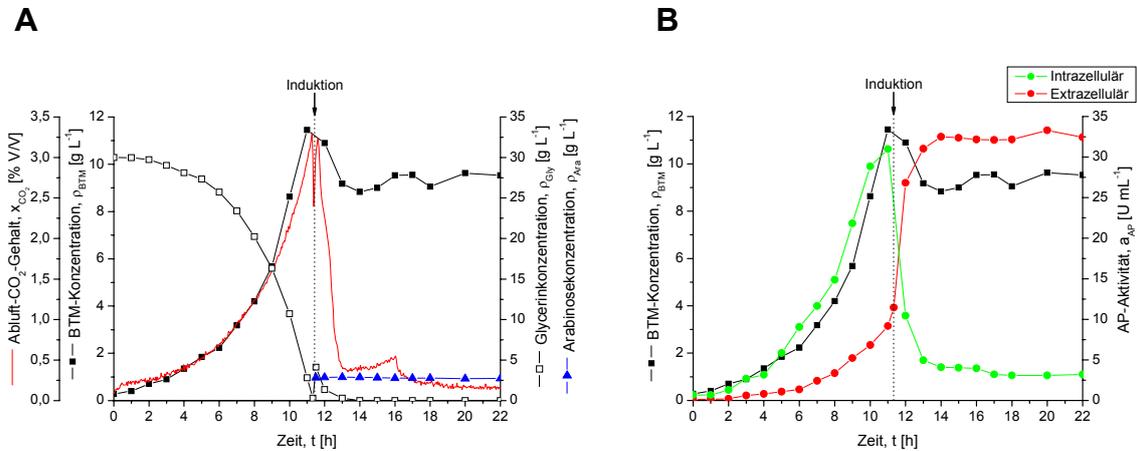
Alternativ wurde versucht, die Katabolitrepression des Arabinosepromotors für eine autoregulatorische Induktion der Sekretion bei Substraterschöpfung zu nutzen. Die starke BRP-Expression bei maximalen Biomassekonzentrationen würde, im Falle vergleichbarer Sekretionseffizienz, eine vereinfachte Prozessführung erlauben, da die submaximale BRP-Expression einer extensiven Optimierung bezüglich geeigneter Induktionsstärken bedurfte.

Gemäß den in Abschnitt 5.2.1 dargestellten Untersuchungen wurde die Sekretion anhand von Modellproteinen überwacht. Da sich die Effizienz BRP-vermittelte Sekretion alkalischer Phosphatase und  $\beta$ -Lactamase vergleichbar zeigte, wurde bei den nachfolgend dargestellten Analysen ein Verzicht des  $\beta$ -Lactamase-Nachweises zur Beschreibung der Sekretion legitimiert. Dementsprechend erfolgte die Sekretionsbewertung ausschließlich durch AP.

#### ***Manuelle Induktion der Proteinsekretion bei maximalen Zelldichten***

Zunächst wurde die Effizienz der Proteinsekretion durch Induktion bei maximalen Zelldichten, d.h. nach Ende der Wachstumsphase, untersucht. Da sich das Ende der Wachstumsphase in Bioreaktorkultivierungen anhand der Abluft-CO<sub>2</sub>-Konzentration *online* bestimmen lässt, konnte die Induktion unmittelbar nach Erschöpfung des limitierenden Substrats erfolgen. Dabei wurden einer Kultur von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla eine Sättigungskonzentration des Induktors Arabinose (3 g L<sup>-1</sup>) zugegeben. Durch gleichzeitige Bereitstellung geringer Konzentration des Substrats Glycerin (5 g L<sup>-1</sup>) sollte eine möglicherweise unzureichende BRP-Expression aufgrund Energiemangels verhindert werden. Abb. 5.25

zeigt den Verlauf dieser Fermentation und die Lokalisation des Modellproteins AP während der Kultivierung. Tabelle 5.12 fasst die Ergebnisse der sekretorischen AP-Produktion zusammen.



**Abb. 5.25 Kultivierungsverlauf und Proteinsekretion bei manueller Induktion der BRP-Expression am Ende der Wachstumsphase.** Verläufe der wachstumsassoziierten Größen BTM-, Glycerin-, Arabinosekonzentration und Abluft-CO<sub>2</sub>-Konzentration (**A**) sowie der intra- und extrazellulären AP-Aktivitäten (**B**) während einer Satzfermentation von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla in SGA-Medium. Bei Erschöpfung der C-Quelle Glycerin nach 11,3 h Kultivierungsdauer erfolgte die Induktion der LppBRP-His<sub>6</sub>-Expression durch Zugabe von 3 g L<sup>-1</sup> Arabinose sowie 5 g L<sup>-1</sup> Glycerin (zur Energiebereitstellung). Zum Vergleich ist der Verlauf der extrazellulären AP-Aktivität der induktionsfreien Kontrollfermentation aus Abschnitt 5.2.1 dargestellt.

Nach 11,3 h Kultivierungsdauer trat ein rascher Abfall der Abluft-CO<sub>2</sub>-Konzentration ein, welcher durch vollständige Substraterschöpfung verursacht wurde und das Ende des Wachstumsprozesses markierte. Zu diesem Zeitpunkt wurde die BRP-Expression mit einer OD<sub>600</sub>-bezogenen Konzentration von ca. 100 mg L<sup>-1</sup> Arabinose induziert, die nach den Ergebnissen aus Abschnitt 5.2.1 eine vollständige Induktion gewährleisten sollte. Durch die gleichzeitige Bereitstellung der C-Quelle Glycerin war nach Induktion ein zwischenzeitlicher erneuter Anstieg der Zellatmung zu beobachten. Im gleichen Zeitraum fand eine weitgehende Verlagerung intrazellulärer AP in das Medium statt. Während vor Induktion (t = 11 h) der überwiegende AP-Anteil (77%) intrazellulär lokalisiert war (Tabelle 5.12), konnte nach 12 h bereits eine Umkehrung der Verteilung auf die Seite des Mediums beobachtet werden (70% extrazelluläre Lokalisation). In den folgenden zwei Stunden stellte sich ein endgültiges Verteilungsgleichgewicht ein, nachdem ein Anstieg der extrazellulären AP-Aktivität von 9,2 U mL<sup>-1</sup> (vor Induktion) auf ca. 32,5 U mL<sup>-1</sup> als Endwert nach 14 h konstatiert wurde. Dies entsprach einem Freisetzungsgrad von 89% und einer extrazellulären AP-Produktivität von 2,3 U mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Sowohl die freigesetzte AP-Aktivität, als auch die extrazelluläre AP-Produktivität war damit vergleichbar zu der in Abschnitt 5.2.1 dargestellten Fermentation mit Induktion der

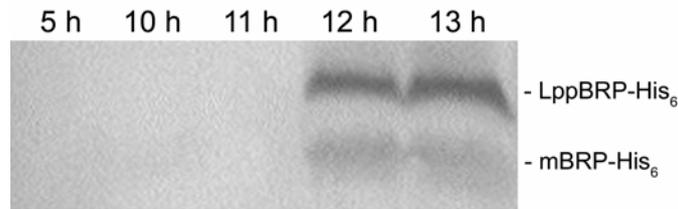
BRP-Expression durch eine  $OD_{600}$ -bezogene Arabinosekonzentration von  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , welche die besten Ergebnisse lieferte (vgl. Tabelle 5.5). Tatsächlich wurde bei dieser Fermentation sogar eine leicht erhöhte extrazelluläre AP-Aktivität ( $32,5 \text{ U mL}^{-1}$  gegenüber  $30,5 \text{ U mL}^{-1}$ ) erzielt, was durch die zusätzliche Bereitstellung des Substrats Glycerin bei der Induktion erklärt werden konnte.

**Tabelle 5.12 Absolute und relative Verteilung der AP-Aktivität zwischen Zellen und Medium.** Aufgeführt ist die Verteilung unmittelbar vor Substraterschöpfung ( $t = 11 \text{ h}$ ) und bei Erreichen maximaler extrazellulärer AP-Aktivität ( $t = 14 \text{ h}$ ). ( $t$ , Zeit;  $a_{\text{int}}$ , intrazelluläre Aktivität;  $a_{\text{ext}}$ , extrazelluläre Aktivität;  $P_{\text{ext}}$ , extrazelluläre Produktivität [ $a_{\text{ext}}t / t$ ])

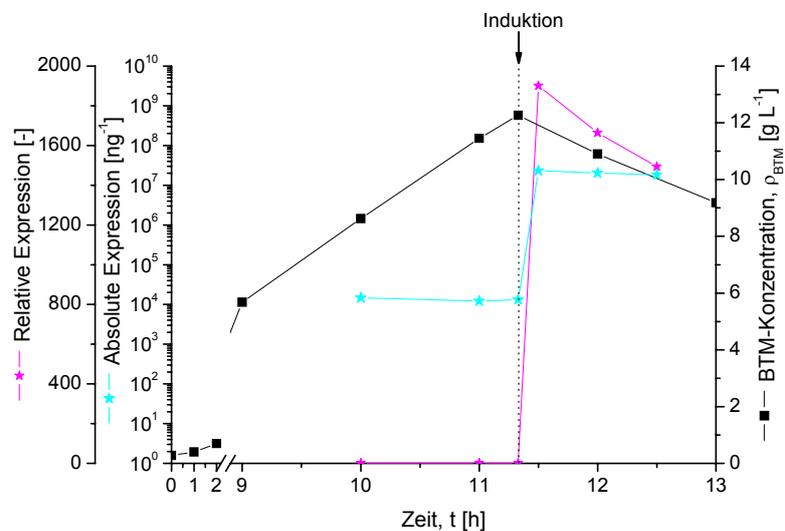
| $t$<br>[h] | $a_{\text{int}}$<br>[U mL <sup>-1</sup> ] | $a_{\text{ext}}$<br>[U mL <sup>-1</sup> ] | $P_{\text{ext}}$<br>[U mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] |
|------------|---|---|---|
| 11         | 31,0 (77%)                                | 9,2 (23%)                                 | 0,84  |
| 14         | 4,1 (11%)                                 | 32,5 (89%)                                | 2,32  |

Zur Verifikation des Zusammenhanges zwischen Proteinsekretion und BRP-Aktivität wurde die BRP-Expression qualitativ anhand der C-terminalen His<sub>6</sub>-Erweiterung des LppBRP durch immunologischen Nachweis und quantitativ durch qRT-PCR bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 5.26 und Abb. 5.27 dargestellt.

Demnach war das BRP durch Western-Blot vor Induktion ( $t = 5-11 \text{ h}$ ) nicht nachweisbar und konnte erst unter induzierter Expression immunologisch detektiert werden ( $t = 12/13 \text{ h}$ ). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Western-Blots zeigte die Quantifizierung der LppBRP-His<sub>6</sub>-mRNA vor Induktion ein konstant niedriges Transkriptionsniveau. Durch Induktion erfolgte ein Anstieg der relativen Expression um einen Faktor von ca. 1800, der von einer Abnahme der relativen Transkriptpräsenz auf das ca. 1500fache des basalen Zustandes gefolgt war. Dies entsprach einer Erhöhung der absoluten Expression von ca.  $1 \times 10^4$  LppBRP-His<sub>6</sub>-mRNA Molekülen pro Nanogramm Gesamt-RNA auf ca.  $2 \times 10^7$  Kopien ng<sup>-1</sup> RNA und bestätigte die in Abschnitt 5.2.3 ermittelte Expressionsverstärkung. Das Expressionsprofil zeigte sich demzufolge vergleichbar wie bei früher Induktion während der exponentiellen Phase. Die basale Transkription lag analog zu den kinetischen Untersuchungen der BRP-Expression (Abschnitt 5.2.3) im Bereich von ca.  $10^4$  LppBRP-His<sub>6</sub>-mRNA Molekülen ng<sup>-1</sup> Gesamt-RNA und war auch bei finalen Biomassekonzentrationen von ca.  $10 \text{ g L}^{-1}$  nicht ausreichend, um basal exprimiertes LppBRP-His<sub>6</sub> durch Western-Blot nachweisen zu können. Dies bestätigte die Repression des  $P_{BAD}$ -Promotors in Abwesenheit von Arabinose. Die Analyse der LppBRP-Expression belegte somit den Zusammenhang zwischen erhöhter Freisetzung alkalischer Phosphatase und BRP-Expression.



**Abb. 5.26 Expression des LppBRP-His<sub>6</sub>** in der SGA-Bioreaktorkultur von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His<sub>6</sub>phoAbla mit manueller Induktion der BRP-Expression nach Wachstumsende (11,3 h). Der dargestellte Western-Blot (16% Tricin-SDS-Gel) basiert auf cytoplasmatischen Proben, so dass überwiegend die unprozessierte Form des LppBRP-His<sub>6</sub> detektiert wurde.



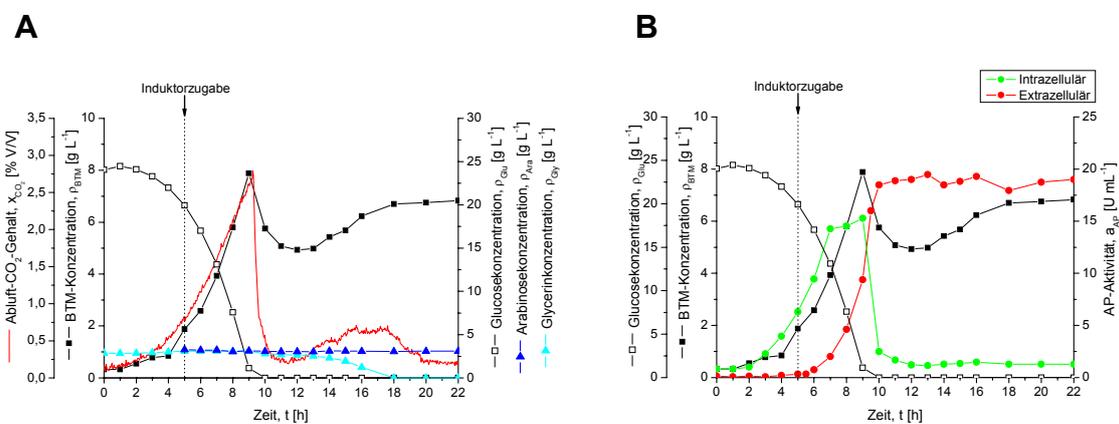
**Abb. 5.27 Relative und absolute Quantifizierung der LppBRP-His<sub>6</sub>-Transkription.** Verlauf der relativen und absoluten BRP-Transkription während der Satzfermentation von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His<sub>6</sub>phoAbla in SGA-Medium bei Induktion mit Arabinose nach Wachstumsende (11,3 h). Die absolute LppBRP-Expression gibt die Anzahl der LppBRP-mRNA-Moleküle pro Nanogramm Gesamt-RNA an. Die relative Expression ist dimensionslos und auf den Zeitpunkt unmittelbar vor Induktion ( $t = 11,3$  h) bezogen.

### **Autoregulatorische Induktion der Proteinsekretion bei Substraterschöpfung**

Unter Glucosepräsenz ist der  $P_{BAD}$ -Promotor auch bei gleichzeitiger Anwesenheit von Arabinose weitgehend reprimiert (Katabolitrepression) (Schleif, 2003). Im ursprünglichen Kontext des chromosomalen *araBAD*-Operons wird dadurch die unnötige Synthese der AraBAD-Proteine verhindert und eine bevorzugte Verwertung des energetisch günstigeren Substrats Glucose garantiert.

Bezüglich der  $P_{BAD}$ -regulierten BRP-Expression wurde untersucht, ob die Katabolitrepression zur autoregulatorischen BRP-Synthese bei Glucoseerschöpfung genutzt werden kann, wenn

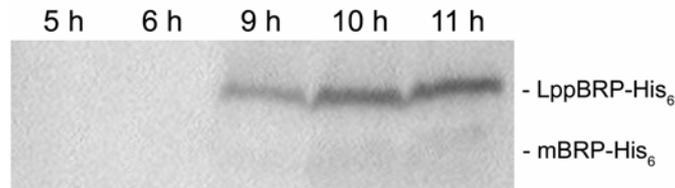
Glucose als primäres Substrat angeboten wird. Dazu wurde eine Fermentation mit *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla durchgeführt, bei der das Medium  $25 \text{ g L}^{-1}$  Glucose anstelle von  $30 \text{ g L}^{-1}$  Glycerin enthielt (Abb. 5.28). Obwohl ein Konsum der Arabinose aufgrund des  $\Delta araBA$ -Genotyps von *E. coli* Ara1655 ausgeschlossen werden konnte, erfolgte die Zugabe des Induktors erst während der Kultivierung. Dies sollte eine mögliche Induktion der BRP-Expression trotz Katabolitrepresion beschreibbar machen. Um die Energiebereitstellung für die BRP-Expression auch nach Erschöpfung der Glucose zu gewährleisten, wurde das Medium zusätzlich mit  $3 \text{ g L}^{-1}$  Glycerin supplementiert. Die Zugabe der Arabinose erfolgte nach 5 h mit einer Konzentration von  $3 \text{ g L}^{-1}$ , was einer  $OD_{600}$ -normierten Konzentration von mindestens  $100 \text{ mg L}^{-1}$  bei einer erwarteten finalen optischen Dichte von  $OD_{600} \sim 25$  entsprach.



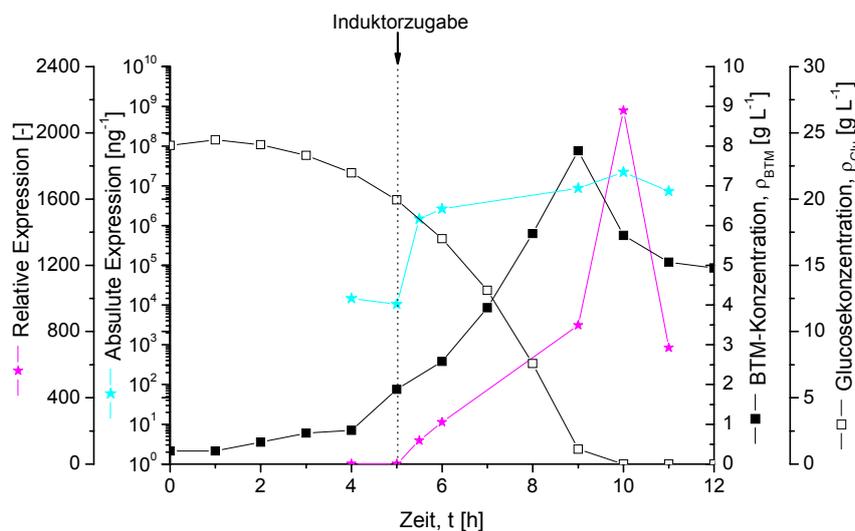
**Abb. 5.28 Kultivierungsverlauf und Proteinsekretion bei autoregulatorischer Induktion der BRP-Expression durch Katabolitrepresion.** Verlauf der wachstumsassoziierten Größen BTM-, Glucose-, Glycerin-, Arabinosekonzentration und Abluft-CO<sub>2</sub>-Konzentration (**A**) sowie der intra- und extrazellulären AP-Aktivitäten (**B**) innerhalb einer Kultur von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla in SGA-Medium mit  $25 \text{ g L}^{-1}$  Glucose anstelle von  $30 \text{ g L}^{-1}$  Glycerin als C-Quelle. Die Erschöpfung der Glucose tritt nach ca. 9,3 h ein. Zum Vergleich ist der Verlauf der extrazellulären AP-Aktivität einer nicht-induzierten Referenzkultur dargestellt.

Wie Abb. 5.28 zeigt, war trotz ausreichender Arabinosekonzentration für eine starke BRP-Expression (vgl. Kapitel 5.2.1) nach Zugabe des Induktors weder eine grundlegende Beeinflussung des Wachstums bzw. der Zellatmung (CO<sub>2</sub>-Produktion) noch eine verstärkte Proteinsekretion zu beobachten. Demzufolge verhinderte die Katabolitrepresion des  $P_{BAD}$ -Promotors zunächst eine verstärkte BRP-Expression. Ab ca. 7 h wurde jedoch sowohl eine Verlangsamung des Wachstums als auch eine zunehmende Verschiebung der AP-Aktivität in Richtung des Mediums beobachtet. Daher wurde eine ansteigende BRP-Expression bzw. eine Induktion des Arabinosepromotors vor der endgültigen Glucoseerschöpfung vermutet.

Durch die in den Abb. 5.29 und Abb. 5.30 dargestellten Untersuchungen zur BRP-Expression konnte die Theorie einer stetig ansteigenden Expression nach Arabinosezugabe bestätigt werden.



**Abb. 5.29 Expression des LppBRP-His<sub>6</sub> in Anwesenheit von Glucose.** Dargestellt ist die BRP-Expression in einer *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla Kultur in SGA-Medium mit Glucose anstelle von Glycerin. Die Erschöpfung der Glucose trat nach ca. 9,3 h ein. Der dargestellte Western-Blot (16% Tricin-SDS-Gel) basiert auf cytoplasmatischen Proben, so dass überwiegend des LppBRP-His<sub>6</sub> detektiert wurde.



**Abb. 5.30 Relative und absolute Quantifizierung der LppBRP-His<sub>6</sub>-Transkription.** Verlauf der relativen und absoluten LppBRP-Transkription während der Satzfermentation von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla in SGA-Medium mit Glucose anstatt Glycerin als C-Quelle bei Zugabe von 3 g L<sup>-1</sup> Arabinose nach 5 h. Die Erschöpfung der Glucose trat nach ca. 9,3 h ein Die absolute LppBRP-Expression gibt die Anzahl der LppBRP-mRNA-Moleküle pro Nanogramm Gesamt-RNA an. Die relative Expression ist dimensionslos und auf den Zeitpunkt unmittelbar vor Arabinosezugabe (t = 5 h) bezogen.

So war eine Stunde nach Arabinosezugabe (t = 6 h) durch Western-Blot noch kein LppBRP-His<sub>6</sub> nachweisbar, obwohl bereits ein Anstieg der relativen Expression (ca. Faktor 250) durch Quantifizierung des LppBRP-His<sub>6</sub>-Transkriptes bestimmt wurde. Nach 9 h (ca. 0,3 h vor Glucoseerschöpfung) hatte sich das LppBRP-His<sub>6</sub>-Transkriptlevel auf mehr als das 800fache des basalen Niveaus erhöht und erlaubte auch eine Detektion des Proteins in signifikantem

Maße. Anstelle einer abrupten Erhöhung der BRP-Expression, wie sie für glycerinhaltiges Medium nach Arabinosezugabe beobachtet wurde, zeigte sich demnach bis zur Erschöpfung der Glucose ( $t = 9,3$  h) ein kontinuierlicher Anstieg der Expression, so dass die Katabolitrepression des  $P_{BAD}$ -Promotors mit abnehmenden Glucosekonzentrationen zunehmend weniger aktiv war.

Nachdem sämtliche Glucose verbraucht war, setzte ein sprunghafter Anstieg der BRP-Expression mit einem Faktor von ca. 2100 der basalen Expression ein, welcher sich durch intensive LppBRP-His<sub>6</sub>-Banden im Western-Blot manifestierte. Auch bei dieser Kultivierung war nach Erreichen einer maximalen Expressionsstärke ein Rückgang des BRP-Transkriptlevels zu bestimmen. Vor Arabinosezugabe lag die basale LppBRP-His<sub>6</sub>-Transkription im Bereich von ca.  $10^4$  mRNA Molekülen  $ng^{-1}$  Gesamt-RNA und war damit den Kultivierungen auf Glycerinbasis vergleichbar. Folglich bestanden in der basalen BRP-Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen Kultivierungen mit Glucose und Glycerin.

Wie Abb. 5.28 bestätigt, blieb die Glycerinkonzentration über die gesamte Phase des Glucoseverbrauchs unverändert, so dass dieses Substrat nicht verstoffwechselt wurde. Auch nach Erschöpfung der Glucose war kein unmittelbarer erneuter Anstieg des Abluft-CO<sub>2</sub>-Gehalts, der auf eine diauxische Verstoffwechselung beider Substrate hätte hindeuten können, zu erkennen. Erst später setzte eine zweite Wachstumsphase ein, während der das vorgelegte Glycerin verwertet wurde. Demzufolge war die alternative C-Quelle für eine effiziente BRP-Synthese nicht erforderlich.

Die Befunde der LppBRP-His<sub>6</sub>-Expression korrelierten mit der in Tabelle 5.13 aufgeführten Verteilung der alkalischen Phosphatase innerhalb der Kultur. So war der überwiegende AP-Anteil vor Substraterschöpfung nach 9 h Kultivierungsdauer trotz nachweisbarer BRP-Präsenz noch intrazellulär lokalisiert (vgl. auch Abb. 5.28 B).

**Tabelle 5.13 Absolute und relative Verteilung der AP-Aktivität zwischen Zellen und Medium.** Aufgeführt ist die Verteilung unmittelbar vor Substraterschöpfung ( $t = 9$  h) und bei Erreichen maximaler extrazellulärer AP-Aktivität ( $t = 11$  h) einer Satzfermentation von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla in SGA-Medium mit Glucose anstatt Glycerin. (t, Zeit;  $a_{int}$ , intrazelluläre Aktivität;  $a_{ext}$ , extrazelluläre Aktivität;  $P_{ext}$ , extrazelluläre Produktivität [ $a_{ext} / t$ ])

| t<br>[h] | $a_{int}$<br>[U mL <sup>-1</sup> ] | $a_{ext}$<br>[U mL <sup>-1</sup> ] | $P_{ext}$<br>[U mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|--|
| 9        | 15,3 (62%)                         | 9,4 (38%)                          | 1,04   |
| 11       | 1,2 (6%)                           | 19,0 (94%)                         | 1,58   |

Mit einem extrazellulären Anteil von 38% bei Wachstumsende zeigte sich die Proteinsekretion jedoch im Vergleich zu der manuell induzierten Fermentation (vgl. Tabelle 5.12) erhöht, was durch die bereits vor Glucoseerschöpfung einsetzende BRP-Expression erklärt werden konnte. Innerhalb von zwei Stunden nach Wachstumsende kehrten sich die Verteilungsverhältnisse um, wobei die intrazelluläre AP-Aktivität von 14,3 auf 1,2 U mL<sup>-1</sup> abnahm, während die Aktivität im Medium von 9,4 auf 19,0 U mL<sup>-1</sup> anstieg. Dabei wurden 94% der erzeugten AP in das Medium sekretiert. Die erzeugte extrazelluläre AP-Aktivität war mit 19 U mL<sup>-1</sup> im Vergleich zu der Glycerin-basierten Fermentation, bei der letztlich 32,5 U mL<sup>-1</sup> im Medium vorlagen, geringer. Auch unter Berücksichtigung der geringeren Substratkonzentration (25 g L<sup>-1</sup> Glucose gegenüber 30 g L<sup>-1</sup> Glycerin) wurden demnach mit Glucose geringere extrazelluläre AP-Ausbeuten erzielt.

### 5.2.6 Schlussfolgerungen zur Optimierung der extrazellulären Proteinproduktion durch regulierte BRP-Coexpression

Fermentationen mit unterschiedlich starker BRP-Expression lieferten wichtige Erkenntnisse zur BRP-vermittelten Proteinsekretion. Durch angepasste Konzentrationen des P<sub>BAD</sub>-Induktors Arabinose konnten submaximale Induktionsstärken ermittelt werden, die eine kontinuierliche, wachstumsbegleitende und effiziente Sekretion der Modellproteine AP und  $\beta$ -Lactamase in das Kulturmedium ermöglichten (bis zu 95% extrazellulärer Anteil). OD<sub>600</sub>-bezogene Arabinosekonzentrationen im Bereich von 5-10 mg L<sup>-1</sup> erlaubten eine annähernd quantitative Sekretion beider Proteine und brachten aufgrund der vergleichsweise geringen Störung des bakteriellen Wachstums maximale extrazelluläre Produktivitäten hervor. Induktionsstärken, die eine effiziente Proteinsekretion ohne gleichzeitige Beeinflussung des Wachstums ermöglichten, konnten jedoch nicht ermittelt werden, so dass die optimale BRP-Expression immer einen Kompromiss zwischen Sekretions- und Produktionseffizienz darstellte.

Hochzelldichtekultivierungen im Zulaufverfahren erlaubten eine deutliche Erhöhung der Biomassekonzentration um einen Faktor von ca. 6 im Vergleich zu Satzkultivierungen. Durch Arabinosezudosierung über die Zufütterungslösung konnte eine weitgehende Sekretion der  $\beta$ -Lactamase in das Medium erreicht werden (82% extrazellulärer Anteil), ohne das Wachstum durch toxische BRP-Expression zum Erlegen zu bringen. Obwohl die Synthese der Modellproteine AP und Bla während der HZDK nicht grundlegend variierte, wurden deren Aktivitäten, insbesondere die der AP, nicht in gleichem Maße wie die BTM-Konzentration gesteigert. Die Inaktivität *de novo* synthetisierter AP konnte trotz verschiedener Untersuchungen nicht geklärt werden.

Starke BRP-Expression erlaubte eine rasche Sekretion von AP und  $\beta$ -Lactamase, ging jedoch stets mit einer Wachstumsstagnation einher. Der Großteil der diffusiven Sekretion durch die BRP-verursachten Poren lief dabei innerhalb von 1-2 h nach Induktion ab. Obwohl Zellyse in Verbindung mit toxischer BRP-Expression nicht beobachtet wurde, kamen durch die BRP-Toxizität neben dem bakteriellen Wachstum auch elementare zelluläre Prozesse wie Transkription, Translation und Zellatmung zum Erliegen oder liefen stark reduziert ab. Untersuchungen zur zellulären Antwort auf die BRP-Toxizität durch Einsatz der DNA-Chiptechnologie brachten nur sehr wenige differentiell regulierter Gene hervor, weshalb auf einen Mangel entsprechender zellulärer Mechanismen zur Reaktion auf die BRP-Aktivität geschlossen wurde.

Aus unbekanntem Gründen führte die starke BRP-Expression zu einer Degradation und zu einem Verlust des codierenden Plasmides. Durch Nivellierung der BRP-Expression und vollständige Inaktivierung des zugesetzten Antibiotikums ermöglichte dies eine Revitalisierung der Zellen, was den reversiblen/cytostatischen Charakter der BRP-Toxizität zeigte.

Die starke BRP-Expression erwies sich insbesondere für eine rasche Proteinssekretion am Ende von Kultivierungen, d.h. bei maximalen Biomassekonzentrationen als geeignet, wobei vergleichbare Sekretionsgrade und Ausbeuten erzielt werden konnten, wie nach angepasster BRP-Expression unter Aufrechterhaltung des Wachstums. Der Nachteil einer maximalen BRP-Expression bei hohen Zelldichten gegenüber einer wachstumsbegleitenden submaximalen Expression ist in dem vergleichsweise hohen Bedarf an Induktor zu sehen. Die submaximale Expression kommt aufgrund der frühen Induktion mit verhältnismäßig geringen Induktorkonzentrationen aus, erfordert aber eine extensive Optimierung zur Ermittlung geeigneter Induktionsstärken, so dass die starke BRP-Expression bei maximalen Zelldichten vereinfacht umsetzbar ist. Darüber hinaus kann nicht garantiert werden, dass die als optimal ermittelten  $OD_{600}$ -bezogenen Arabinosekonzentrationen auf alle Zelldichten übertragbar sind. Weiterhin bedeutet die im Verlauf der Kultivierung zunehmende Biomassekonzentration eine faktische Verdünnung der Induktorkonzentration, so dass die Expressionsbedingungen während des Prozesses nicht stationär sind. Daher wurde der Induktor bei Hochzelldichtekultivierungen mit langen Wachstumsphasen gemeinsam mit dem Zulaufmedium bereitgestellt.

Tabelle 5.14 fasst noch einmal die wichtigsten Ergebnisse bezüglich der extrazellulären Produktion alkalischer Phosphatase, welche durch angepasste BRP-Expression mit Aufrechterhaltung des Wachstums sowie durch starke BRP-Expression bei maximalen Zelldichten erreicht wurden, zusammen. Beide Strategien erlaubten die Freisetzung vergleichbarer AP-Aktivitäten von 30,5-32,5 U mL. Dabei wurden hohe Sekretionsgrade mit extrazellulären AP-Anteilen von ca. 90% erzielt. Anhand der spezifischen AP-Aktivität konnte ergänzend eine Einschätzung der extrazellulär erzeugten Produktkonzentrationen vorgenommen werden.

Die spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase beträgt unter den Bedingungen des Verfahrens zur Aktivitätsbestimmung etwa  $60 \text{ U mg}^{-1}$  (Janeway *et al.*, 1993; Mandecki *et al.*, 1991). Demzufolge wurden unter optimalen Bedingungen extrazelluläre AP-Konzentration von ca.  $500\text{-}550 \text{ mg L}^{-1}$  erreicht. Unter Berücksichtigung der zugrunde liegenden BTM-Konzentrationen lag die Selektivität (extrazelluläre AP-Konzentration bezogen auf die zugrunde liegende BTM-Konzentration) des Prozesses im Bereich von  $50 \text{ mg g}^{-1}$ . Da die Expression der Modellproteine durch den vergleichsweise schwachen  $P_{bla}$ -Promotor erfolgte, sollte allein durch Austausch des Promotors eine deutliche Steigerung der Selektivität und somit der extrazellulären Konzentrationen bis in den Gramm-pro-Liter-Bereich möglich sein.

**Tabelle 5.14 Vergleichende Übersicht der extrazellulären AP-Produktion durch angepasste und starke (manuelle/autoregulatorische) BRP-Expression bei maximalen Zelldichten.** Die Daten basieren auf Satzfermentationen von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRP-His6phoAbla. ( $\rho_{Ara}$ ,  $OD_{600}$ -bezogene Arabinosekonzentration;  $\rho_{BTM}$ , Biotrockenmassekonzentration;  $a_{ext}$ , extrazelluläre AP-Aktivität;  $\rho_{ext}$ , extrazelluläre AP-Konzentration;  $P_{ext}$ , extrazelluläre AP-Produktivität;  $S_{ext}$ , extrazelluläre Selektivität)

| Induktionsmodus                   | $\rho_{Ara}$<br>[mg L <sup>-1</sup> ] | $\rho_{BTM}$<br>[g L <sup>-1</sup> ] | $a_{ext}$<br>[U mL <sup>-1</sup> ] | $a_{ext}$<br>[%] | $\rho_{ext}$<br>[mg L <sup>-1</sup> ] | $P_{ext}$<br>[mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | $S_{ext}$<br>[mg g <sup>-1</sup> ] |
|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------|---------------------------------------|--|------------------------------------|
| Angepasst<br>(vgl. 5.2.1)         | 0                                     | 11,2                                 | 8,9                                | 21               | 148,3                                 | 14,8   | 13,2                               |
|                                   | 1                                     | 10,9                                 | 15,1                               | 34               | 251,7                                 | 22,9   | 23,1                               |
|                                   | 5                                     | 9,7                                  | 30,5                               | 71               | 508,3                                 | 39,1   | 52,4                               |
|                                   | 10                                    | 8,7                                  | 24,9                               | 90               | 415,0                                 | 23,1   | 47,7                               |
| Manuell<br>(vgl. 5.2.5)           | ~ 100                                 | 11,5                                 | 32,5                               | 89               | 541,7                                 | 38,7   | 47,1                               |
| Autoregulatorisch<br>(vgl. 5.2.5) | ≥ 100                                 | 7,9                                  | 19,0                               | 94               | 316,7                                 | 28,8   | 40,1                               |

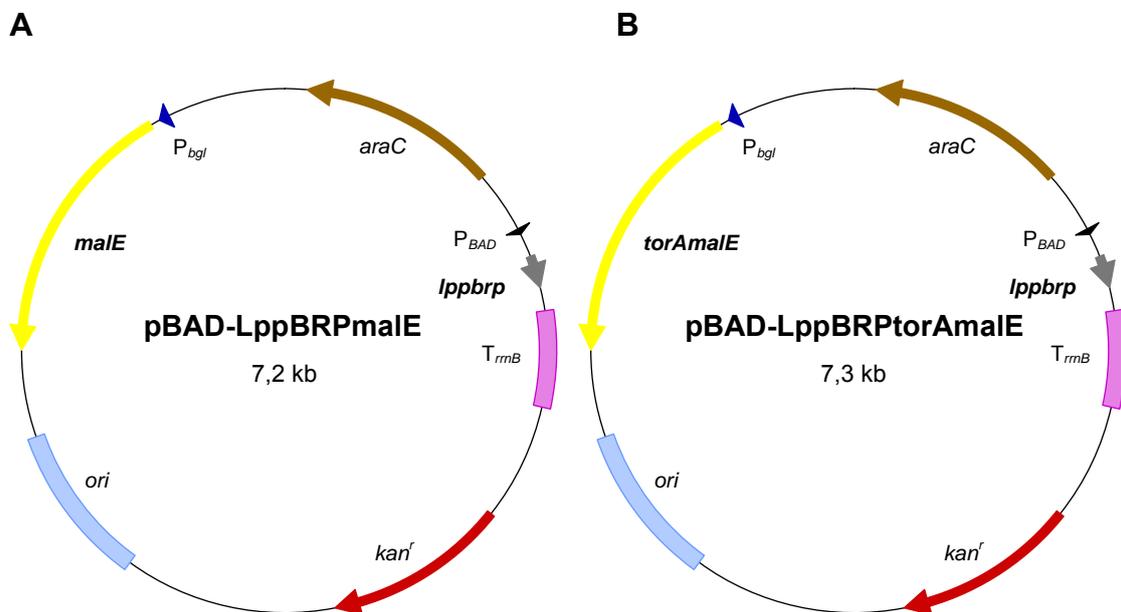
### 5.3 Extrazelluläre Produktion und Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine durch Nutzung des Maltosebindeproteins

Das Maltosebindeprotein (MBP) aus *E. coli* kann aufgrund seiner Affinität zu  $\alpha$ -1,4-Glucanen als Fusionspartner für die Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine eingesetzt werden (Ferenci & Klotz, 1978). Die Affinitätsreinigung von Proteinen ist in der Regel kostenintensiv, da die erforderlichen Affinitätsmatrices teuer in der Herstellung sind. Eine großtechnische Nutzung affinitätsbasierter Reinigungsschritte ist daher oft ausgeschlossen oder nur bei sehr hochwertigen Produkten rentabel. Die zur Reinigung von MBP-Fusionsproteinen erforderlichen Amylosematrices sind hingegen kostengünstig herstellbar und können das Reinigungsverfahren auch für den größeren Maßstab interessant machen.

Natives MBP wird über den *Sec*-Pfad in das Periplasma transportiert, so dass sich dessen Nutzung auf Proteine beschränkt, die eine biologisch aktive Faltung im Periplasma erlauben. Als eines der wenigen bekannten Proteine, gelangt MBP auch über den *Tat*-Pfad in das Periplasma, wenn das native Signalpeptid durch ein geeignetes *Tat*-abhängiges Signalpeptid substituiert wird (Blaudeck *et al.*, 2003). Durch diese Modifikation ist eine Verwendung von MBP als Affinitätspartner grundsätzlich auch im Zusammenhang mit Proteinen denkbar, die eine cytoplasmatische Assemblierung vor dem Transport in das Periplasma erfordern. Obwohl in der Literatur gegenwärtig keine Ansätze zu Gewinnung und Reinigung *Tat*-translozierter MBP-Fusionsproteine beschrieben sind, können *Sec*- und *Tat*-abhängige MBP demzufolge als universelle Fusionspartner für die periplasmatische Produktion und Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine dienen. Aufgrund der subzellulären Lokalisation ist die Bereitstellung von MBP-Hybridproteinen für die Aufreinigung stets mit einer Präparation des Periplasmas bzw. einem Zellaufschluss verbunden. Die Sekretion solcher Proteine in das Medium würde hingegen eine deutliche Vereinfachung bei der Gewinnung der Proteine durch deren unmittelbare Zugänglichkeit für die Aufreinigung bedeuten und ist Gegenstand der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen. Dazu wurde zunächst überprüft, ob *Sec*- und *Tat*-abhängiges MBP ohne Fusionsanteil unabhängig vom gewählten Translokationspfad in das Periplasma gelangt und unter BRP-Aktivität in das Medium sekretiert wird. Im Anschluss sollten weiterführende Untersuchungen zur extrazellulären Produktion von Fusionskonstrukten aus MBP und verschiedenen Modellproteinen durchgeführt werden, bei denen auch affinitätschromatographische Reinigungen der Proteine aus dem Kulturmedium zum Einsatz kommen sollten.

### 5.3.1 MBP-Sekretion nach Export über Sec- und Tat-Pfad

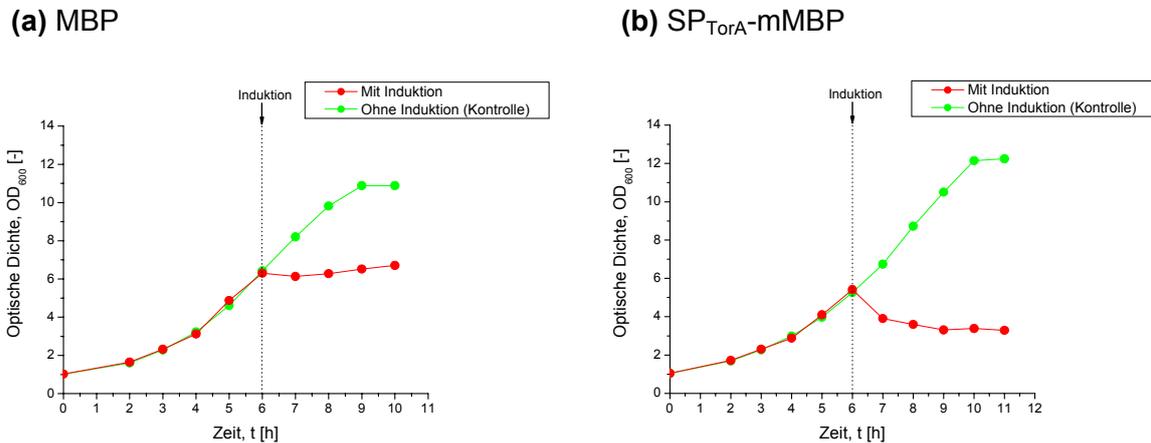
Die Untersuchung der Sekretion Sec- bzw. Tat-abhängigen MBPs erforderte plasmidbasierte Expressionssysteme, welche alternativ das native MBP mit Sec-Signalpeptid bzw. ein signalpeptidmodifiziertes, Tat-abhängiges MBP codierten. Dazu wurden die in Abb. 5.31 gezeigten Plasmide konstruiert, welche einen zu pBAD-LppBRPphoAbla (vgl. Abb. 5.1) analogen Aufbau aufwiesen, wobei der *phoA-bla*-Bereich durch das *malE*-Gen (natives Sec-abhängiges MBP) bzw. das *torAmalE*-Gen (Tat-abhängiges SP<sub>TorA</sub>-mMBP) substituiert war. SP<sub>TorA</sub>-mMBP führt das TorA-Signalpeptid (SP<sub>TorA</sub>) der periplasmatischen Trimethylamin-N-Oxid(TMAO)-Reduktase (TorA) aus *E. coli*. Beide MBP-Varianten wurden konstitutiv durch den P<sub>bgl</sub>-Promotor der  $\beta$ -Glucanase aus *Bacillus amyloliquefaciens* (Borriss *et al.*, 1989) exprimiert.



**Abb. 5.31 Schematische Karten der Plasmide pBAD-LppBRPmalE (A) und pBAD-LppBRPtorAmalE (B).** Die Plasmide dienen der konstitutiven Expression von *malE* (MBP) bzw. *torAmalE* (SP<sub>TorA</sub>-mMBP) und induzierbaren Expression des LppBRP. P<sub>bgl</sub>,  $\beta$ -Glucanase-Promotor (konstitutiv); *lppbrp*, signalsequenzmodifiziertes Cloacin DF13 BRP (LppBRP); P<sub>BAD</sub>, *araBAD*-Promotor (Arabinose-induzierbar); T<sub>rmB</sub>, *rmB*-Transkriptionsterminator; *araC*, Regulatorprotein für P<sub>BAD</sub>; *kan<sup>r</sup>*, Kanamycinresistenzgen; *ori*, Replikationsursprung. Zentrale Bestandteile sind hervorgehoben. Die Konstruktion der Plasmide ist dem Anhang (Abschnitt 9.5) zu entnehmen.

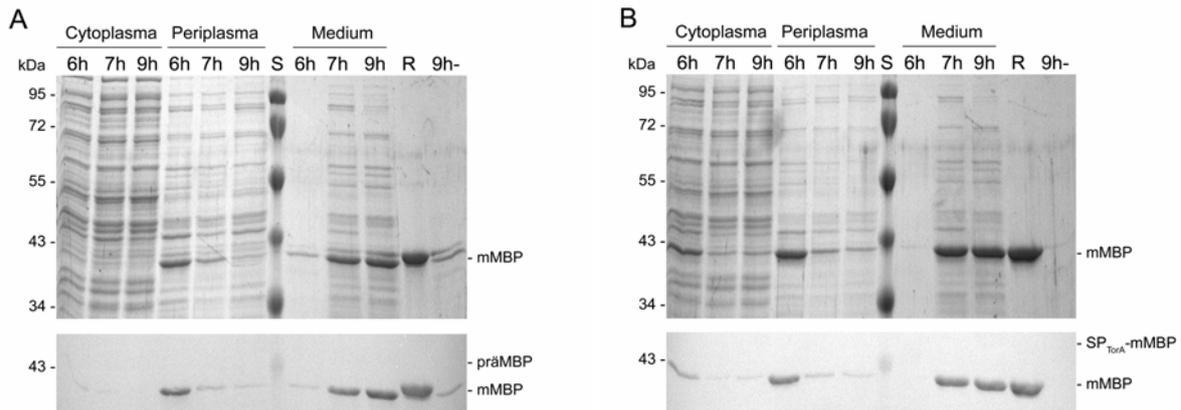
Zur Beurteilung der Sekretion von MBP und SP<sub>TorA</sub>-mMBP unter LppBRP-Coexpression wurden die Plasmide pBAD-LppBRPmalE und pBAD-LppBRPtorAmalE in *E. coli* Ara1655 eingebracht und in 1 L-Schüttelkolben mit 150 mL SGA-Medium kultiviert. Dabei wurde die LppBRP-Expression während der exponentiellen Phase (OD<sub>600</sub> = 5-6) durch Zugabe einer OD<sub>600</sub>-bezogenen Arabinosekonzentration von 1 g L<sup>-1</sup> vollständig induziert. Diese Induktions-

stärke sollte eine maximale Freisetzung beider MBPs erlauben und wurde trotz eines erwarteten Wachstumsstillstands durch BRP-Toxizität gewählt. Induktionsfreie Kulturen dienten als Kontrollen zur vergleichenden Beurteilung der basalen, BRP-unabhängigen Sekretion beider Proteine. Wie die Abb. 5.32 zeigt, kam das Wachstum durch die starke BRP-Expression erwartungsgemäß zum Erliegen, während die Kontrollkulturen unlimitiert wuchsen.



**Abb. 5.32** Wachstumsverläufe von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPmaIE (a) und Ara1655 pBAD-LppBRPtorAmalE (a). Die Kultivierungen erfolgten in Schüttelkolben mit definiertem SGA-Medium bei starker LppBRP-Expression durch OD<sub>600</sub>-bezogene Arabinosekonzentration von 1 g L<sup>-1</sup>, sowie ohne Induktion als Kontrolle.

Da MBP mangels entsprechender Eigenschaften nicht direkt quantifizierbar ist, musste dessen Lokalisationsbestimmung qualitativ durch SDS-PAGE bzw. Western-Blot erfolgen. Abb. 5.33 zeigt dazu die Präsenz von MBP bzw. SP<sub>TorA</sub>-mMBP vor und nach Induktion in Cytoplasma, Periplasma und Medium. Eine mögliche Interferenz des immunologischen MBP-Nachweises durch chromosomal codiertes MBP konnte bereits im Zusammenhang mit der Lokalisationsbestimmung des LppBRP-MBP-Hybridproteins (vgl. Abschnitt 5.1.5) ausgeschlossen werden.



**Abb. 5.33 Verteilung von MBP (A) und SP<sub>TorA</sub>-mMBP (B) vor und nach Induktion der Sekretion.** Dargestellt sind die Kulturfraktionen Cytoplasma, Periplasma und Medium gemäß Nachweis durch 12% SDS-Gele (oben) und Western-Blot (unten). Die Induktion erfolgte nach 6 h Kultivierungsdauer. Dargestellt sind die Zeitpunkte 6 h, 7 h und 9 h. Spur 9 h- zeigt das Medium der nicht induzierten Kontrollkultur nach 9 h. Spur R enthält gereinigtes reifes MBP (mMBP). Die Molmassen des Standards S sind links angegeben. Die theoretische Bandierung der signalpeptidführenden Vorläuferproteine (präMBP und SP<sub>TorA</sub>-mMBP) sind für die Western-Blots ebenfalls aufgeführt. Der Nachweis in PAA-Gelen erfolgte durch Coomassie-Färbung und in Western-Blots durch einen Anti-MBP-Antikörper. Die BRP-Expression wurde bei *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPmalE (A) und Ara1655 pBAD-LppBRPtorAmalE (B) durch OD<sub>600</sub>-bezogene Arabinosekonzentration von 1 g L<sup>-1</sup> induziert.

Beide MBP-Varianten traten unter reprimierter BRP-Expression ( $t = 6$  h) vorwiegend im Periplasma auf (Spuren Periplasma 6h). Das native, Sec-translozierte MBP war jedoch sowohl vor Induktion (Spur Medium 6h) als auch im späten Stadium ( $t = 9$  h) der induktionsfreien Kontrollkultur (Spur 9h-) auch gering im Medium nachweisbar, so dass dieses offenbar vereinfacht spontan freigesetzt wurde. Nach Induktion ( $t = 7-9$  h) verlagerte sich die Lokalisation beider MBPs in Richtung des Mediums. Dabei verschwanden die mMBP-Banden im Periplasma zunehmend (Spuren Periplasma 7h/9h), während die Proteine im Medium verstärkt vorzufinden waren (Spuren Medium 7h/9h). In den Cytoplasmafraktionen der Kultur mit nativem MBP waren zu keinem Zeitpunkt prominente MBP-Banden erkennbar, was einen effizienten Sec-Transport des MBP in das Periplasma belegte (Spuren Cytoplasma 6h-9h). Das SP<sub>TorA</sub>-mMBP wurde hingegen vor Induktion auch in der Cytoplasmafraktion nachgewiesen (Spur Cytoplasma 6h). Wie der Größenvergleich mit gereinigtem reifen mMBP (Spur R) bzw. mit dem Größenstandard (Spur S) beweist, handelte es sich auch dabei um die bereits prozessierte, periplasmatische mMBP-Form mit einer Molmasse von 40,7 kDa anstelle des erwarteten 45,6 kDa großen cytoplasmatischen Vorläuferproteins. Die Ursache für die verstärkte Präsenz der prozessierten Form des SP<sub>TorA</sub>-mMBP in der Cytoplasmafraktion kann anhand der durchgeführten Analysen nicht benannt werden. Zwei Gründe sind jedoch denkbar: (i) Trotz theoretischer Identität der reifen Anteile von MBP und SP<sub>TorA</sub>-mMBP wiesen diese eine unterschiedliche Lokalisation innerhalb des Periplasmas auf. Diese führte bei der

SP<sub>TorA</sub>-Variante zu einer erhöhten Verschleppung in die Cytoplasmafraktion während des fraktionierten Zellaufschlusses (unvollständige Abtrennung des Periplasmas). (ii) Die bereits prozessierte Form der SP<sub>TorA</sub>-Variante verblieb aufgrund der vergleichsweise schwachen Energetisierung des *Tat*-Translokons verstärkt membranintegral in der *TatA*-Pore und war dadurch von der Periplasmafraktion separiert. Beide Theorien können darüber hinaus die im Vergleich zum nativen MBP geringere spontane Sekretion des *Tat*-Substrats erklären.

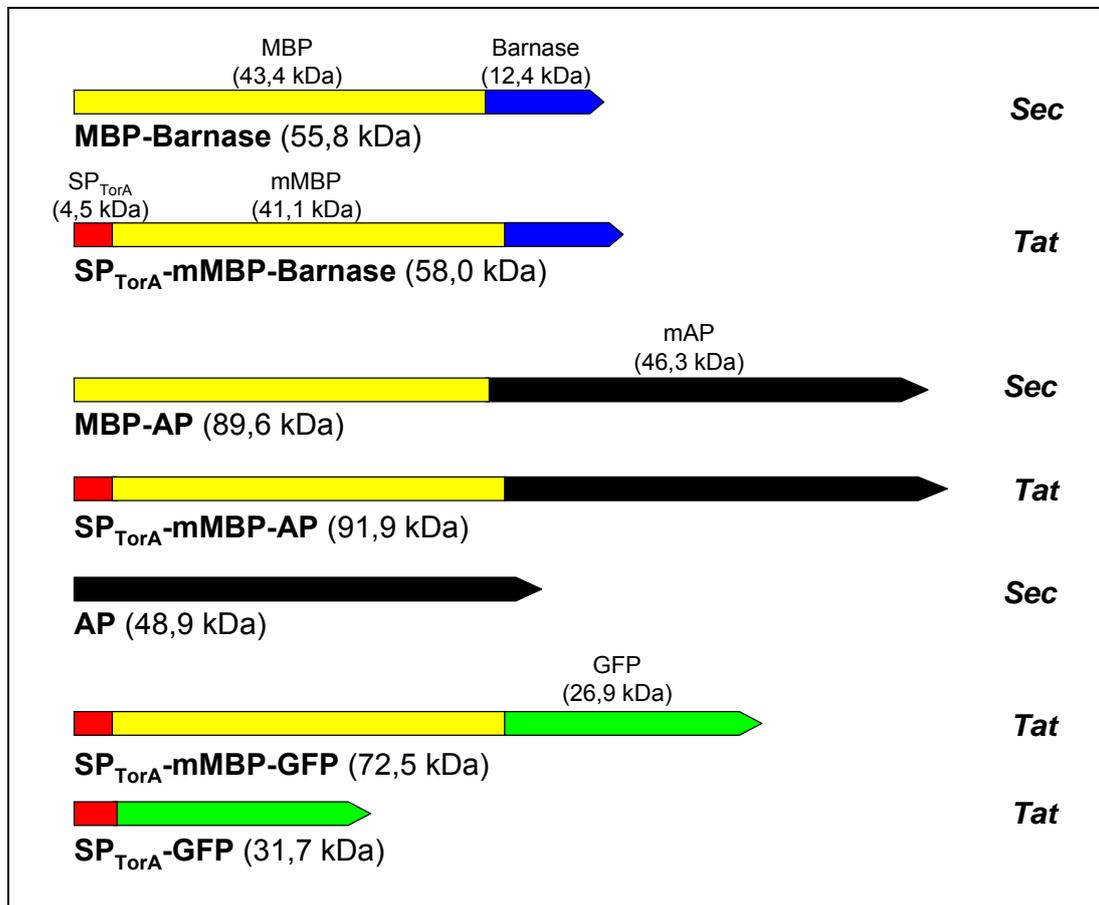
Abb. 5.33 beweist die Möglichkeit einer extrazellulären Produktion, sowohl *Sec*- als auch *Tat*-abhängigen MBPs, unter Zuhilfenahme von BRP und liefert darüber hinaus weitere wichtige Erkenntnisse zur sekretorischen Produktion rekombinanter Proteine: (i) *Sec*- und *Tat*-dirigiertes MBP unterschieden sich bezüglich der spontanen, BRP-unabhängigen Freisetzung in das Kulturmedium, wie ein Vergleich der Lokalisation vor/ohne Induktion zeigt. Dabei wird *Tat*-abhängiges MBP auch nach Prozessierung verstärkt in der Cytoplasmafraktion gefunden, so dass die Lokalisation beider MBP-Varianten möglicherweise nicht identisch ist. (ii) Sowohl die Periplasma- als auch die Mediumsfraktionen wiesen im Vergleich zu den Cytoplasmafraktionen wesentlich geringere Anteile kontaminierender Wirtsproteine auf. Dies dokumentiert das Potential der Proteinsekretion im Sinne eines initialen Reinigungsschrittes durch Separation des Produktes von Wirtsproteinen. (iii) Die weitgehende Übereinstimmung des Bandenmusters in Periplasma und Medium zeigt eine geringe Proteinfreisetzung aus dem Cytoplasma und bestätigte dadurch die in Abschnitt 5.2.1 dargestellte vernachlässigbare Zellyse.

### 5.3.2 Extrazelluläre Produktion von MBP-Hybridproteinen

Nachdem die Sekretion des Maltosebindoproteins auf Basis des *Sec*- und des *Tat*-Pfades erfolgreich nachgewiesen werden konnte, wurde die Eignung des Systems für Hybridproteine aus MBP und verschiedenen Modellproteinen untersucht. Dazu wurden Fusionsproteine aus MBP bzw. SP<sub>TorA</sub>-mMBP sowie der Barnase (Bar) aus *B. amyloliquefaciens* (MBP-Bar und SP<sub>TorA</sub>-mMBP-Bar), der alkalischen Phosphatase aus *E. coli* (MBP-AP und SP<sub>TorA</sub>-mMBP-AP) und dem grünfluoreszierenden Protein aus *Aequorea victoria* (SP<sub>TorA</sub>-mMBP-GFP) konstruiert. Abb. 5.34 zeigt schematisch den Aufbau dieser MBP-Fusionsproteine. Frühere Arbeiten berichten, dass Fusionsproteine aus nativem MBP und GFP nicht aktiv in das Periplasma gelangen (Feilmeier *et al.*, 2000). Die *Sec*-basierte Sekretion von MBP-GFP war demnach nicht möglich.

AP und Barnase wurden als Fusionspartner ausgewählt, da diese Proteine native Substrate des *Sec*-Pfades sind. Diese Eigenschaft ließ den Export der resultierenden MBP-Hybridproteine zumindest durch den *Sec*-Pfad möglich erscheinen. Im Gegensatz dazu ist

GFP eines der wenigen bekannten und einfach nachweisbaren Proteine die über den *Tat*-Pfad in das Periplasma gelangen können (Santini *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001). Das Protein wurde zur Untersuchung der Sekretion periplasmatischer MBP-Hybridproteinen nach *Tat*-Translokation herangezogen.



**Abb. 5.34 Schematischer Aufbau der konstruierten MBP-Fusionsproteine und ausgewählter Vergleichsproteine ohne MBP-Anteil.** Die Molmassen und die Translokationspfade der Proteine in das Periplasma sind jeweils aufgeführt. Bei MBP-Barnase und SP<sub>TorA</sub>-mMBP-Barnase wird zusätzlich der Inhibitor Barstar exprimiert, um die cytoplasmatische Aktivität der Barnase zu verhindern.

Die erforderlichen Plasmide wurden analog zu pBAD-LppBRPmalE bzw. pBAD-LppBRPtorAmalE (vgl. Abb. 5.31) konstruiert und enthielten die Gene der Modellproteine C-terminal an *malE* bzw. *torAmalE* fusioniert. Bei den MBP-Hybridproteinen mit Barnase-Anteil erfolgte zusätzlich die Expression des Barnase-Inhibitors Barstar vom gleichen Plasmid (vgl. Abschnitt 9.5; Abb. 9.1). Diese sollte die cytoplasmatische Aktivität der Barnase, d.h. die Einführung eines möglichen weiteren Toxins verhindern. Tabelle 5.15 fasst die wichtigsten Eigenschaften der Expressionssysteme zusammen und benennt die zugrunde liegenden Plasmide.

**Tabelle 5.15 Übersicht der konstruierten MBP-Fusionsproteine.** Zum Vergleich herangezogenen Reporter ohne MBP-Anteil und ihre zugrunde liegenden Plasmide sind ebenfalls aufgeführt. Die Konstruktion der Plasmide ist dem Anhang (Abschnitt 9.5) zu entnehmen.

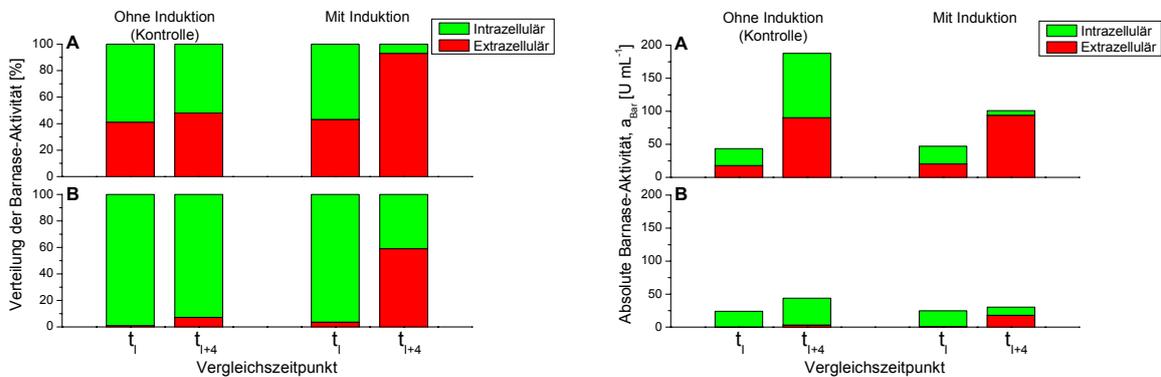
| Protein                      | Fusionsanteil/<br>Reporter | Signal-<br>peptid | Pfad       | Promotor  | Plasmid                 |
|------------------------------|----------------------------|-------------------|------------|-----------|-------------------------|
| MBP-Bar                      | Barnase                    | MBP               | <i>Sec</i> | $P_{bgl}$ | pBAD-LppBRPmalEbar      |
| SP <sub>TorA</sub> -mMBP-Bar | Barnase                    | TorA              | <i>Tat</i> | $P_{bgl}$ | pBAD-LppBRPtorAmalEbar  |
| MBP-AP                       | AP                         | MBP               | <i>Sec</i> | $P_{bgl}$ | pBAD-LppBRPmalEphoA     |
| SP <sub>TorA</sub> -mMBP-AP  | AP                         | TorA              | <i>Tat</i> | $P_{bgl}$ | pBAD-LppBRPtorAmalEphoA |
| AP (nativ)                   | AP                         | AP                | <i>Sec</i> | $P_{bla}$ | pBAD-LppBRPphoA         |
| SP <sub>TorA</sub> -mMBP-GFP | GFP                        | TorA              | <i>Tat</i> | $P_{bgl}$ | pBAD-LppBRPtorAmalEgfp  |
| SP <sub>TorA</sub> -GFP      | GFP                        | TorA              | <i>Tat</i> | $P_{bgl}$ | pBAD-LppBRPtorAgfp      |

Die Untersuchungen zur sekretorischen Produktion dieser MBP-Fusionsproteine erfolgten gemäß dem im vorausgehenden Abschnitt (5.3.1) beschriebenen Verfahren durch Schüttelkolbenkultivierung (150 mL SGA-Medium in 1 L-Schüttelkolben). Dazu wurde *E. coli* Ara1655 mit den in Tabelle 5.15 beschriebenen Plasmiden ausgestattet. Für die BRP-Expression wurden wie zuvor beschrieben OD<sub>600</sub>-abhängige Induktorkonzentrationen von 1 g L<sup>-1</sup> Arabinose bei optischen Dichten von OD<sub>600</sub> ~ 5-6 eingesetzt, was eine maximale Sekretion gewährleisten sollte. Die Kultivierungsverläufe waren vergleichbar zu den im vorigen Abschnitt für die *E. coli*-Stämme Ara1655 pBAD-LppBRPmalE und Ara1655 pBAD-LppBRPtorAmalE aufgeführten (vgl. Abb. 5.32), so dass auf eine Darstellung an dieser Stelle verzichtet wird. Die entsprechenden Daten sind dem Anhang (Abschnitt 9.7.1; Abb. 9.2) zu entnehmen.

Zur Beurteilung der Sekretion wurde die Verteilung der MBP-Hybridproteine zwischen Zellen und Medium anhand der Aktivität ihrer Fusionspartner vor und nach Induktion verglichen. Dazu wurden die Zeitpunkte unmittelbar vor Induktion und 3-4 h nach Induktion herangezogen. Gemäß der Erkenntnisse zum Sekretionsverlauf nach maximaler BRP-Expression (vgl. Abschnitte 5.2.3 und 5.2.5) sollte dieses Verfahren eine ausreichende Zeit für die Sekretion der MBP-Hybridproteine in das Medium gewährleisten. Kontrollkulturen dienen der Beschreibung spontaner, BRP-unabhängiger Sekretion. Um die Freisetzungseffizienz der MBP-Fusionsproteine in Vergleich zur Sekretion der ursprünglichen Modellproteine ohne MBP stellen zu können, wurde die Freilassungseffizienz der periplasmatischen Proteine AP und SP<sub>TorA</sub>-GFP ebenfalls exemplarisch untersucht. Die Ergebnisse der Aktivitätstests wurden zudem durch Western-Blot-Analysen der Cytoplasma-, Periplasma- und Mediumsfraktionen abgesichert. Aufgrund der Größenunterschiede zwischen den signalpeptidführenden Vorläuferproteinen und den reifen Formen erlaubten Western-Blot-Analysen darüber hinaus eine Bestimmung des Prozessierungszustands der MBP-Fusionsproteine.

### Sekretorische Produktion von MBP-Barnase und SP<sub>TorA</sub>-mMBP-Barnase

Abb. 5.35 stellt die intra- und extrazelluläre Aktivitätsverteilung für MBP-Bar (A) und SP<sub>TorA</sub>-mMBP-Bar (B) in einer induzierten und einer induktionsfreien Kultur dar.

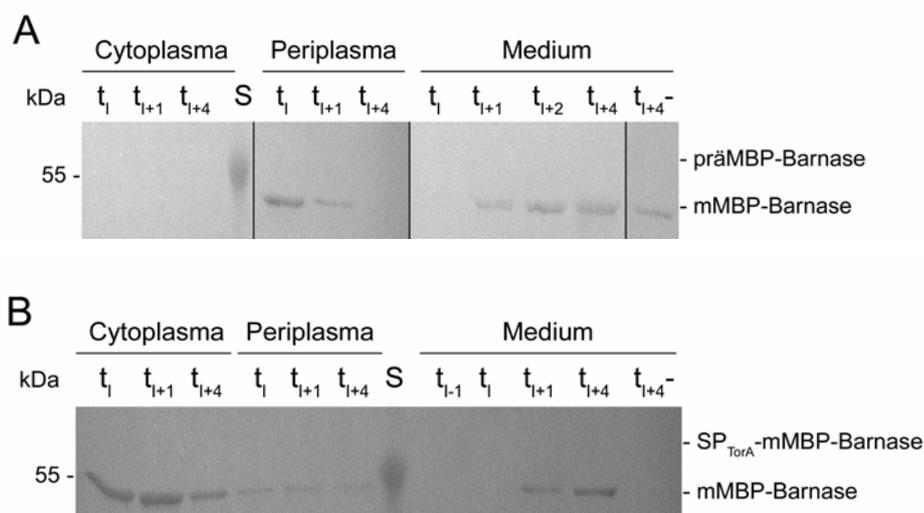


**Abb. 5.35** Verteilung der RNase-Aktivität von MBP-Barnase (A) und SP<sub>TorA</sub>-mMBP-Barnase (B) zwischen Zellen und Medium vor und nach Induktion der Sekretion. Dargestellt ist die relative (links) und absolute (rechts) Aktivitätsverteilung. Die intra- und extrazelluläre RNase-Aktivität wurde zum Induktionszeitpunkt ( $t_1$ ) sowie 4 h danach ( $t_{1+4}$ ) bestimmt. Die Abbildung basiert auf Schüttelkolbenkultivierungen von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPmalEbar und Ara1655 pBAD-LppBRPtorAmalEbar in SGA-Medium. Zur Induktion der BRP-Expression wurde ggf.  $1 \text{ g L}^{-1}$  Arabinose pro OD<sub>600</sub>-Einheit zugesetzt.

Bei beiden Proteinen zeigte sich trotz unterschiedlicher Signalsequenz unter BRP-Expression eine deutlich Verlagerung der Aktivitätsverteilung in Richtung der extrazellulären Umgebung (Abb. 5.35, linker Teil). MBP-Barnase-Fusionsproteine werden demzufolge durch BRP-Einwirkung unabhängig vom Exportpfad in das Periplasma sekretiert. Es bestanden jedoch einige grundlegende Unterschiede zwischen beiden Proteinen bezüglich der spontanen und der BRP-forcierten Sekretion. So war die spontane, BRP-unabhängige Sekretion des Sec-abhängigen Proteins mit 40-50% extrazellulärem Anteil wesentlich höher als die des *Tat*-Substrats, welches stets zu weniger als 10% im Medium vorlag. Analog zu den in Abschnitt 5.3.1 analysierten MBP-Varianten ohne Reporterfusion (MBP und SP<sub>TorA</sub>-mMBP), konnte demnach auch für die MBP-Barnase-Hybridproteine eine erhöhte spontane Freisetzung auf Basis der Sec-Translokation beobachtet werden. Nach Induktion erhöhte sich der extrazelluläre Anteil der Sec-dirigierten Barnase auf 93%. Die BRP-Expression erlaubte demzufolge eine annähernd quantitative Sekretion des Proteins. Der extrazelluläre Anteil des *Tat*-exportierten Hybridproteins wurde zwar ebenfalls deutlich gesteigert, der Freisetzungsgrad betrug bei diesem Protein jedoch nur ca. 60%.

Wie dem rechten Teil von Abb. 5.35 zu entnehmen ist, wurden in den induktionsfreien Kontrollkulturen, aufgrund des ungebremsten Wachstums, höhere absolute RNase-Aktivitäten erzeugt. Dabei war die in Summe erzeugte Aktivität der  $SP_{TorA}$ -mMBP-Barnase zu beiden Vergleichszeitpunkten deutlich geringer als die der MBP-Barnase mit nativem Signalpeptid. Die unter BRP-Aktivität bestimmte extrazelluläre Aktivität der *Sec*-MBP-Barnase betrug  $94 \text{ U mL}^{-1}$ , während bei der  $SP_{TorA}$ -Variante nur  $18 \text{ U mL}^{-1}$  im Medium erreicht wurden. Aufgrund der vergleichbaren optischen Dichten zu den Analysezeitpunkten konnten unterschiedliche Biomassekonzentrationen als Ursache für die differierende Aktivität beider Hybridproteine ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung für die Aktivitätsdifferenzen wurde in den unterschiedlichen Faltungsorten gesehen. Im Gegensatz zu MBP-Bar, dessen Assemblierung im Periplasma erfolgt, wird  $SP_{TorA}$ -mMBP-Bar vor dem Export cytoplasmatisch gefaltet. Obwohl das Protein keine Disulfidbrücken enthält ist eine veränderte Faltung des *Tat*-Substrats aufgrund abweichender Bedingungen im Vergleich zum Periplasma denkbar. Alternative cytoplasmatische Chaperone könnten möglicherweise eine fehlerhafte Faltung des Proteins hervorrufen. Diese Theorie wurde durch die Bestimmung einer deutlich reduzierten spezifischen Aktivität gereinigter  $SP_{TorA}$ -mMBP-Barnase gegenüber der *Sec*-abhängigen Variante bestätigt (vgl. Abschnitt 5.3.3, Tabelle 5.16).

In Abb. 5.36 ist die Lokalisation der beiden MBP-Barnase-Hybridproteine anhand immunologischer Nachweise des MBP-Fusionsanteils dargestellt.



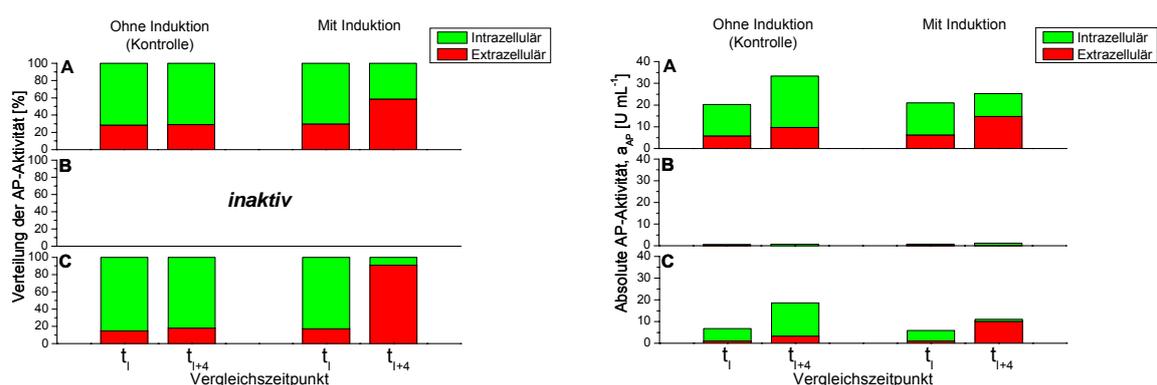
**Abb. 5.36 Lokalisation von MBP-Barnase (A) und  $SP_{TorA}$ -mMBP-Barnase (B).** Verteilung auf die Kulturfraktionen Cytoplasma, Periplasma und Medium zum Induktionszeitpunkt ( $t_i$ ) bzw. 1 h vor Induktionszeitpunkt ( $t_{i-1}$ ) und 1 h ( $t_{i+1}$ ), sowie 4 h ( $t_{i+4}$ ) nach Induktion. Zum Vergleich wurde das Medium der induktionsfreien Kontrollkultur 4 h nach dem Induktionszeitpunkt ( $t_{i+4}^-$ ) untersucht. Die Molmassen des Größenstandards S sind links aufgeführt. Nachweis durch Anti-MBP-Antikörper nach Western-Blot 12%iger SDS-Gele.

Für beide Proteine konnte die Sekretion unter BRP-Einwirkung bestätigt werden, da diese im Medium vor/ohne Induktion nicht oder nur schwach detektierbar waren. Bezüglich der intrazellulären Lokalisation beider Varianten vor Induktion zeigten sich darüber hinaus Parallelen zu den MBPs ohne Fusionsanteil (vgl. Abb. 5.33). Während die *Sec*-abhängige MBP-Barnase ausschließlich in der Periplasmafraktion nachweisbar war, wurde das *Tat*-Substrat sogar primär in der Cytoplasmafraktion gefunden. Dabei entsprach die ermittelte Molmasse der  $SP_{TorA}$ -mMBP-Barnase dem reifen Proteinanteil ohne SP (mMBP-Bar) von ca. 53,5 kDa. Demnach enthielt die Cytoplasmafraktion auch bei diesem *Tat*-exportierten Protein dessen reife Form, anstelle des erwarteten, signalpeptidführenden Präproteins (58,0 kDa). Mögliche Ursachen für die Präsenz prozessierter *Tat*-Substrate in der Cytoplasmafraktion wurden bereits in Abschnitt 5.3.1 diskutiert.

Festzuhalten bleibt eine erhöhte spontane Sekretion sowie eine unter BRP-Aktivität annähernd quantitative Freisetzung der *Sec*-dirigierten MBP-Barnase. Demzufolge ist dieses Protein für die extrazelluläre Produktion bevorzugt geeignet, da  $SP_{TorA}$ -mMBP-Barnase nur anteilig in das Medium gelangt und eine geringere Aktivität aufweist.

### Sekretorische Produktion von MBP-AP und $SP_{TorA}$ -mMBP-AP

Die Untersuchung der Sekretion *Sec*- und *Tat*-translozierter MBP-AP erfolgte durch intra- und extrazellulären Nachweis der AP-Aktivität und wurde in Vergleich zu nativer AP ohne MBP-Anteil gestellt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.37 aufgeführt.



**Abb. 5.37** Verteilung der AP-Aktivität von MBP-AP (A),  $SP_{TorA}$ -mMBP-AP (B) und nativer AP (C) zwischen Zellen und Medium vor und nach Induktion der Sekretion. Dargestellt ist die relative (links) und absolute (rechts) Aktivitätsverteilung. Die intra- und extrazelluläre AP-Aktivität wurde zum Induktionszeitpunkt ( $t_1$ ) sowie 4 h danach ( $t_{t+4}$ ) bestimmt. Da sich die  $SP_{TorA}$ -mMBP-AP enzymatisch nicht aktiv zeigte, ist für dieses Protein keine prozentuale Verteilung dargestellt. Die Abbildung basiert auf Schüttelkolbenkultivierungen von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPmalEphoA und Ara1655 pBAD-LppBRPtorAmalEphoA und Ara1655 pBAD-LppBRPphoA in SGA-Medium. Zur Induktion der BRP-Expression wurde ggf.  $1 \text{ g L}^{-1}$  Arabinose pro  $OD_{600}$ -Einheit zugesetzt.

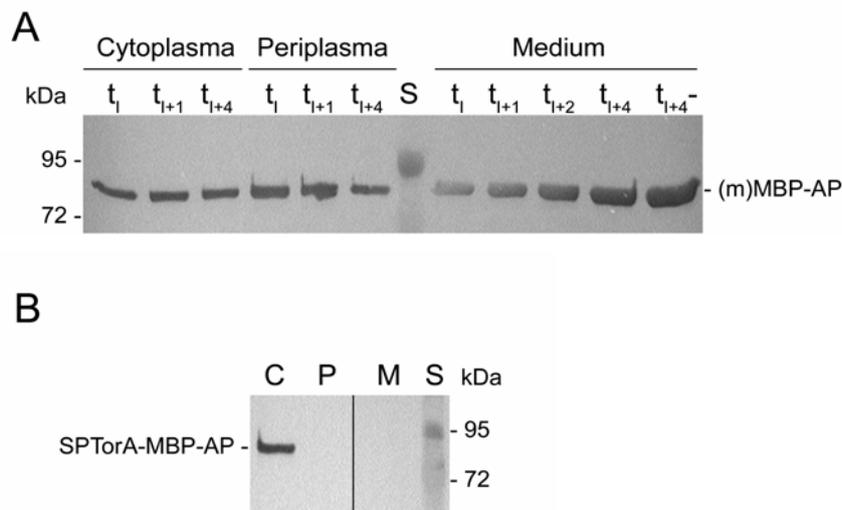
Bei dem *Sec*-exportierten MBP-AP-Hybridprotein erfolgte unter BRP-Expression nur eine geringe Verschiebung der Aktivität auf die Seite des Mediums (Abb. 5.37, linker Teil). Analog zu *Sec*-abhängiger MBP-Barnase (vgl. Abb. 5.36) wurde mit fast 30% extrazellulärem Anteil auch für dieses Protein eine recht hohe spontane Sekretion beobachtet. Diese konnte jedoch unter forcierter BRP-Aktivität nur auf ca. 60% gesteigert werden, so dass die Freisetzung unvollständig verlief. Das zum Vergleich herangezogene native AP-Protein ohne MBP-Fusionsanteil zeigte dagegen sowohl eine deutlich geringere spontane Sekretion (ca. 15% extrazellulärer Anteil) als auch eine annähernd quantitative Freilassung (90%) nach Induktion. Mit einer Molmasse von 87,0 kDa ist das mMBP-AP-Fusionsprotein relativ groß. Somit kamen sterische Hinderungen bei der Diffusion des Proteins durch die BRP-verursachten Poren der äußeren Membran als Begründung für die vergleichsweise geringe Sekretionseffizienz in Betracht. Diese Theorie wurde durch die effiziente Sekretion beider MBP-AP-Domänen, als eigenständiger Proteine gestützt (vgl. Abschnitt 5.2.1 für native AP und Abschnitt 5.3.1 für natives MBP). Darüber hinaus gab auch die Literatur indirekt Hinweise auf mögliche Obergrenzen bezüglich der Größe durch BRP sekretierbarer Proteine. Mit einer Molmasse von 75 kDa ist das heteromultimere Chaperon (FaeE)<sub>2</sub>-FaeG das größte gegenwärtig bekannte durch BRP-Coexpression sekretorisch produzierte Protein (van der Wal *et al.*, 1995d). Eine Abnahme der Effizienz BRP-vermittelter mit zunehmender Proteingröße erschien demnach möglich.

Wie Abb. 5.37 (rechter Teil) zeigt, war die absolut erzeugte Aktivität bei MBP-AP höher als bei AP. Die Ursache hierfür liegt entweder in den unterschiedlichen Promotern, welche bei der Expression beide Proteine Einsatz fanden ( $P_{bgl}$  und  $P_{bla}$ ) oder in einer offenbar erhöhten spezifischen Aktivität des MBP-AP-Proteins. Native AP weist unter den gewählten Bedingungen zur Aktivitätsbestimmung eine spezifische Aktivität von ca. 60 U mg<sup>-1</sup> auf (Janeway *et al.*, 1993; Mandrecki *et al.*, 1991). Für MBP AP wurde eine, aus unbekannter Ursache, erhöhte spezifische Aktivität von ca. 100-110 U mg<sup>-1</sup> bestimmt (vgl. Abschnitt 5.3.3, Tabelle 5.16).

Weiterhin dokumentiert Abb. 5.37 die enzymatische Inaktivität des *Tat*-abhängigen SP<sub>TorA</sub>-MBP-AP-Fusionsproteins. In anderen Arbeiten wurde berichtet, dass alkalische Phosphatase, welche anstelle des nativen über ein *Tat*-abhängiges Signalpeptid verfügt, unter physiologischen Bedingungen am *Tat*-Export gehindert wird und cytoplasmatisch in inaktiver Form akkumuliert (DeLisa *et al.*, 2003). Für eine Faltung in die enzymatisch aktive Form der AP sind Disulfidbrücken erforderlich, die aufgrund der reduzierenden Bedingungen im Cytoplasma nicht ausgebildet werden (Bessette *et al.*, 1999). Dabei hindert eine Qualitätskontrolle der *Tat*-Translokase fehlgefaltete *Tat*-Substrate am Export (DeLisa *et al.*, 2003). Wie der in Abb. 5.38 B dargestellte immunologische Nachweis zeigt, trafen diese Zusammen-

hänge auch auf die inaktive  $SP_{TorA}$ -mMBP-AP zu. So wurde in der Cytoplasmafraktion ein MBP-Fusionsprotein in der Größe von  $SP_{TorA}$ -mMBP-AP (92 kDa) identifiziert, für das die entsprechenden Banden in Periplasma und Medium ausblieben. Aufgrund des verhinderten *Tat*-Exports und der Inaktivität des Proteins war eine sekretorische Produktion *Tat*-abhängiger MBP-AP nicht möglich.

Ferner konnte durch Western-Blot-Analyse die Aktivitätsverteilung der *Sec*-abhängigen MBP-AP bestätigt werden (Abb. 5.38 A). So war dieses Protein aufgrund der hohen spontanen Sekretion auch vor/ohne Induktion im Medium verstärkt nachweisbar. Im Gegensatz zu den *Sec*-Substraten MBP und MBP-Bar wurde MBP-AP auch in der Cytoplasmafraktion detektiert. Aufgrund der Gesamtgröße von 89,6 (präMBP-AP) bzw. 87,0 kDa (mMBP-AP) war eine exakte Unterscheidung zwischen Vorläuferprotein und reifer Form nicht zweifelsfrei möglich, so dass die tatsächliche Lokalisation cytoplasmatisch detektierter MBP-AP nicht aufgeklärt werden konnte.

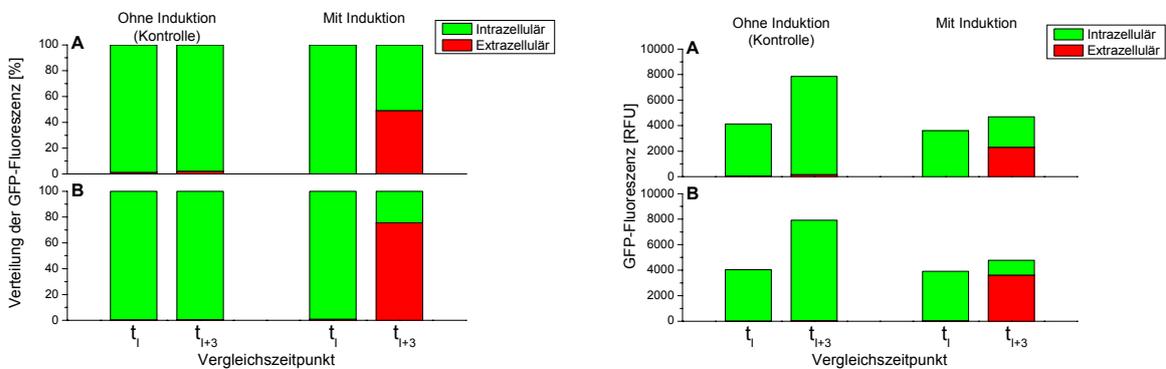


**Abb. 5.38 Lokalisation von MBP-AP und  $SP_{TorA}$ -mMBP-AP.** Verteilung auf die Kulturfraktionen Cytoplasma, Periplasma und Medium. Für MBP-AP (**A**) ist die Lokalisation zum Induktionszeitpunkt ( $t_i$ ), und innerhalb von 4 h ( $t_{i+1}$ ;  $t_{i+2}$ ;  $t_{i+4}$ ) nach Induktion dargestellt. Zum Vergleich wurde das Medium der induktionsfreien Kontrollkultur 4 h nach dem Induktionszeitpunkt ( $t_{i+4}^-$ ) untersucht. Die Lokalisation von  $SP_{TorA}$ -mMBP-AP (**B**) wurde zur Klärung der Inaktivität 4 h nach Induktion überprüft. C, Cytoplasma; P, Periplasma; M, Medium. Die Molmassen des Größenstandards S sind jeweils seitlich aufgeführt. Nachweis durch Anti-MBP-Antikörper nach Western-Blot 12%iger SDS-Gele.

Gemäß den vorliegenden Ergebnissen ist die sekretorische Produktion von MBP-AP nach *Sec*-Export zwar möglich, die BRP-Expression erlaubt jedoch nur eine weitere Steigerung der bereits relativ hohen basalen Sekretion. Die Sekretion von  $SP_{TorA}$ -mMBP-AP auf Basis der *Tat*-Translokation ist hingegen nicht möglich, da dieses Protein am Transport in das Periplasma gehindert wird.

### Sekretorische Produktion von $SP_{TorA}$ -mMBP-GFP

Zur Untersuchung der Sekretion von  $SP_{TorA}$ -mMBP-GFP wurde die intra- und extrazelluläre GFP-Fluoreszenz bestimmt. Dabei konnten im Medium GFP-freier Kontrollkulturen stets Fluoreszenzanstiege bei GFP-spezifischen Wellenlängen gemessen werden, die auf eine unspezifische Hintergrundfluoreszenz zurückzuführen waren. Um die effektiv durch GFP hervorgerufene Fluoreszenz, wie in Abb. 5.39 dargestellt, zu ermitteln, wurde die gemessene Gesamtfluoreszenz gegen die Hintergrundfluoreszenz einer GFP-freien Kontrolle korrigiert. Die ursprünglichen Daten der Gesamtfluoreszenz sind im Anhang (Abschnitt 9.7; Abb. 9.3) aufgeführt. Das  $SP_{TorA}$ -GFP (ohne MBP-Anteil) diente zur vergleichenden Bewertung der Sekretionseffizienz von  $SP_{TorA}$ -mMBP-GFP.



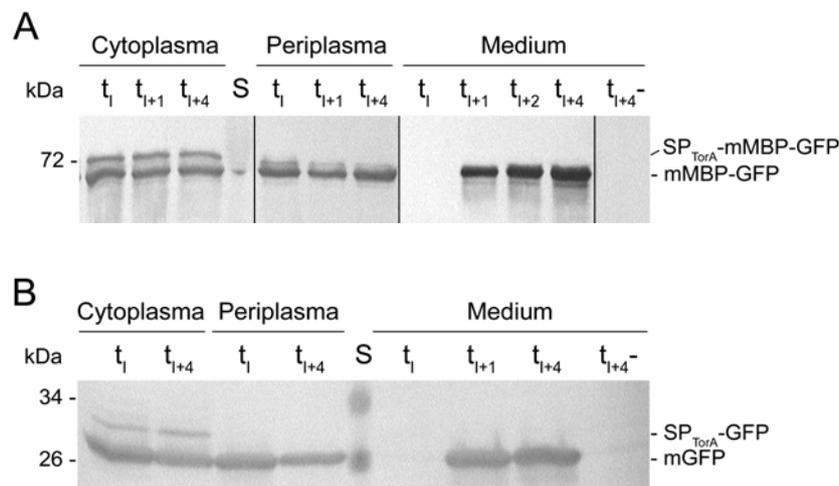
**Abb. 5.39** Verteilung der hintergrundkorrigierten GFP-Fluoreszenz von  $SP_{TorA}$ -mMBP-GFP (A) und  $SP_{TorA}$ -GFP (B) zwischen Zellen und Medium vor und nach Induktion der Sekretion. Dargestellt ist die relative (links) und absolute (rechts) GFP-Fluoreszenz. Die intra- und extrazelluläre GFP-Fluoreszenz wurde zum Induktionszeitpunkt ( $t_1$ ) sowie 3 h danach ( $t_{1+3}$ ) bestimmt. Die Abbildung basiert auf Schüttelkolbenkultivierungen von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPtorAmalEgfp und Ara1655 pBAD-LppBRPtorAgfp in SGA-Medium. Zur Induktion der BRP-Expression wurde ggf.  $1\text{ g L}^{-1}$  Arabinose pro  $OD_{600}$ -Einheit zugesetzt.

Die effektive GFP-Fluoreszenz war mit einem Anteil von über 98% sowohl bei  $SP_{TorA}$ -mMBP-GFP als auch  $SP_{TorA}$ -GFP vor/ohne Induktion fast ausschließlich intrazellulär lokalisiert (Abb. 5.39, linker Teil). Unter BRP-Expression wurde der extrazelluläre Anteil des  $SP_{TorA}$ -mMBP-GFP zwar deutlich gesteigert, betrug jedoch nur ca. 50%, so dass die Freisetzung dieses Proteins unvollständig verlief. Auch bei dem zum Vergleich herangezogenen  $SP_{TorA}$ -GFP lag der extrazelluläre Anteil nur bei ca. 75%. Der vergleichsweise höhere extrazelluläre Anteil des MBP-freien Proteins ließ eine vereinfachte Freisetzung aufgrund der geringeren Größe (27,2 kDa gegenüber 68,0 kDa) möglich erscheinen. Analog zur *Tat*-abhängigen  $SP_{TorA}$ -mMBP-Barnase (vgl. Abb. 5.35) war demnach auch die sekretorische Produktion von  $SP_{TorA}$ -mMBP-GFP durch BRP-Coexpression möglich. Die Sekretion erfolgte jedoch in beiden Fällen nicht quantitativ, so dass die ermittelten Freisetzungsgrade deutlich unter denen einiger

Sec-Substrate (MBP-Bar; native AP;  $\beta$ -Lactamase) lagen, welche unter BRP-Einwirkung zu über 90% in das Medium gelangen.

Eine vergleichende Betrachtung der absoluten Fluoreszenz (Abb. 5.39, rechter Teil) zeigte zu den betrachteten Zeitpunkten annähernd keine Unterschiede für beide Proteine ( $SP_{TorA}$ -mMBP-GFP und  $SP_{TorA}$ -GFP). Dies belegte einen vernachlässigbaren Einfluss der MBP-Domäne auf die fluorophore Eigenschaft des  $SP_{TorA}$ -mMBP-GFP.

Die Lokalisationsbestimmung von  $SP_{TorA}$ -mMBP-GFP und  $SP_{TorA}$ -GFP durch die in Abb. 5.40 gezeigten Western-Blots bestätigte die Abwesenheit beider Proteine im Medium vor/ohne Induktion.



**Abb. 5.40 Lokalisation von  $SP_{TorA}$ -mMBP-GFP (A) und  $SP_{TorA}$ -GFP (B).** Verteilung auf die Kulturfraktionen Cytoplasma, Periplasma und Medium zum Induktionszeitpunkt ( $t_i$ ), und 1 h, (2h) und 4 h ( $t_{i+1}$ ; (+2); +4) nach Induktion. Zum Vergleich ist das Medium der induktionsfreien Kontrollkultur 4 h nach Induktionszeitpunkt ( $t_{i+4}^-$ ) dargestellt. Die Molmassen des Größenstandards S sind seitlich aufgeführt. Nachweis durch Anti-MBP-Antikörper ( $SP_{TorA}$ -mMBP-GFP), bzw. Anti-GFP-Antikörper ( $SP_{TorA}$ -GFP) nach Western-Blot 12%iger SDS-Gele. Die Detektion von  $SP_{TorA}$ -mMBP-GFP durch den Anti-GFP-Antikörper lieferte identische Ergebnisse (nicht dargestellt).

Analog zu den *Tat*-Substraten  $SP_{TorA}$ -mMBP und  $SP_{TorA}$ -mMBP-Bar waren auch diese beiden Proteine prominent in der Cytoplasmafraktion vertreten. Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten *Tat*-dirigierten Proteinen wurden für  $SP_{TorA}$ -mMBP-GFP und  $SP_{TorA}$ -GFP in den Cytoplasmafraktionen auch die signalpeptidführenden Präproteine nachgewiesen, welche jedoch im Vergleich zu den prozessierten Formen (mMBP-GFP und mGFP) unterrepräsentiert waren. Diese Beobachtung wurde als Beleg für die in Abschnitt 5.3.1 aufgestellte Hypo-

these einer Verunreinigung der Cytoplasmafraktionen mit periplasmatischen oder membran-integralen prozessierten *Tat*-Substraten betrachtet.

Da die Präproteine weder in den Periplasmafraktionen noch im Medium nachweisbar waren, belegten die Western-Blot-Analysen eine ausschließliche Sekretion des prozessierten mMBP-GFPs bzw. mGFPs. Die lytische Freisetzung der cytoplasmatischen Präproteine durch BRP-Coexpression konnte daher als vernachlässigbar eingestuft werden.

Diese Ergebnisse zeigen die grundsätzliche Möglichkeit einer sekretorischen Produktion *Tat*-abhängiger MBP-Fusionsproteine am Beispiel des SP<sub>TorA</sub>-mMBP-GFP. Da auch MBP-freies SP<sub>TorA</sub>-GFP und SP<sub>TorA</sub>-mMBP-Barnase nur anteilig in das Medium gelangten, wurden Engpässe im Zusammenhang mit dem *Tat*-Pfad für die unvollständige Sekretion von SP<sub>TorA</sub>-mMBP-GFP verantwortlich gemacht.

### **Schlussfolgerungen**

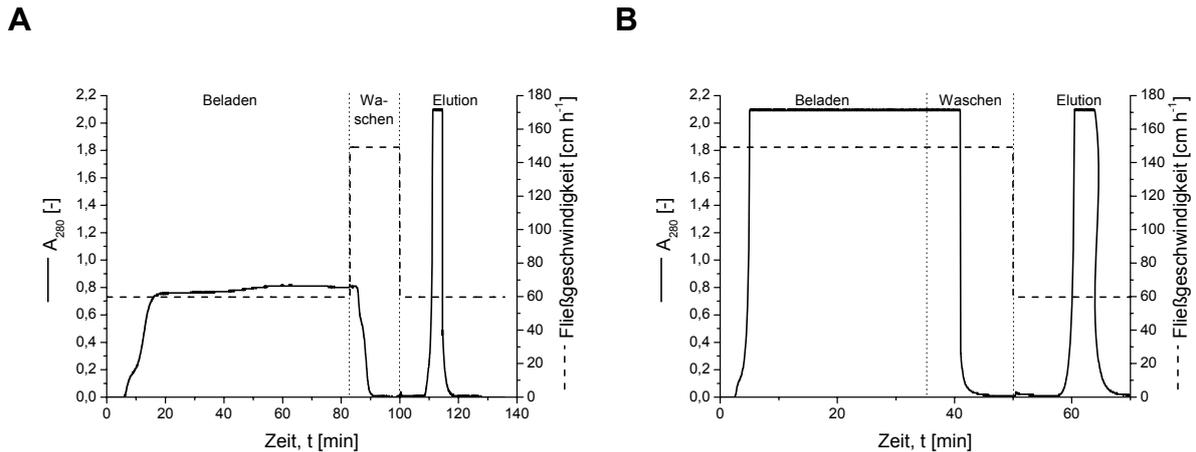
Die Untersuchungen zur extrazellulären Produktion von MBP und MBP-Hybridproteinen zeigen die grundsätzliche Möglichkeit zur BRP-vermittelten Sekretion solcher Proteine sowohl auf Basis des *Sec*- als auch des *Tat*-Pfades. Sie dokumentieren damit die Eignung des Maltosebindeproteins als Fusionspartner für die extrazelluläre Proteinproduktion unabhängig vom Exportpfad in das Periplasma. Aus den Ergebnissen lassen sich darüber hinaus weitere Erkenntnisse ableiten: (i) Die *Sec*-dirigierten Proteine MBP, MBP-Barnase und MBP-AP unterlagen, im Gegensatz zu allen untersuchten *Tat*-abhängigen Proteinen (SP<sub>TorA</sub>-mMBP, SP<sub>TorA</sub>-mMBP-Bar und SP<sub>TorA</sub>-mMBP-GFP), einer erhöhten spontanen, BRP-unabhängigen Sekretion. Demzufolge scheinen MBP-Hybridproteine nach *Sec*-Export vereinfacht in das Medium zu gelangen. (ii) Die *Tat*-abhängigen Proteine (SP<sub>TorA</sub>-mMBP-Bar, SP<sub>TorA</sub>-mMBP-GFP und SP<sub>TorA</sub>-GFP) zeigten unter BRP-Expression ausnahmslos eine unvollständige Freisetzung mit einem extrazellulären Anteil von maximal 75% (SP<sub>TorA</sub>-GFP). Dies dokumentiert eine vergleichsweise geringere Sekretionseffizienz nach *Tat*-Translokation. (iii) Die beiden größten untersuchten Hybridproteine MBP-AP (90 kDa) und SP<sub>TorA</sub>-mMBP-GFP (73 kDa) wurden im Vergleich zur ihren wesentlich kleineren Pendants ohne MBP Anteil (native AP [49 kDa] und SP<sub>TorA</sub>-GFP [32 kDa]) mit geringerer Effizienz sekretiert, so dass bei der BRP-vermittelten Sekretion möglicherweise eine Abhängigkeit von der Proteinmasse besteht. (iv) Insbesondere bei den *Tat*-Substraten konnten im Medium ausschließlich die reifen Proteine ohne Signalpeptid nachgewiesen werden. Demzufolge stammten die extrazellulären Proteine aus dem Periplasma, so dass die lytische Freisetzung vernachlässigbar war.

### 5.3.3 Affinitätsreinigung extrazellulärer MBP-Fusionsproteine

Nachdem die extrazelluläre Produktion verschiedener MBP-Hybridproteine erfolgreich etabliert werden konnte, galt es die Proteine anhand ihrer MBP-Domäne affinitätschromatographisch aus dem Medium zu reinigen. MBP-Fusionsproteine können an  $\alpha$ -1,4-Glucane wie z.B. Amylose immobilisiert und im Anschluss durch Maltose wieder verdrängt werden (Ferenci & Klotz, 1978). Zur Affinitätsreinigung wurden Schüttelkolbenkulturen mit größeren Volumina (300 mL) eingesetzt. Bei diesen erfolgte die Induktion in späterem Stadium ( $OD_{600} \sim 9$ ), um einen frühzeitigen Wachstumseinbruch durch BRP-Expression zu vermeiden und dadurch die extrazelluläre Produktkonzentration zu erhöhen. Dabei verlief das Kulturwachstum analog zu den in Abschnitt 5.3.1 und 9.7 dargestellten Kultivierungen und kam nach Induktion zum Erliegen. Auf eine erneute Dokumentation der Kultivierungsprozesse wird daher verzichtet. SP<sub>TorA</sub>-mMBP-AP wurde aufgrund der inaktiven, cytoplasmatischen Akkumulation nicht in die Untersuchungen einbezogen. Nach Abtrennung der Biomasse wurden die Proteine der zellfreien Kulturüberstände durch Diafiltration in den Säulenpuffer der Affinitätschromatographie überführt, um optimale Bedingungen für die Chromatographie zu gewährleisten. Das Suspensionsvolumen blieb dabei unverändert.

Die MBP-Adsorption an Amylose-Matrices basiert auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken unter physiologischen Bedingungen und weist ein pH-Optimum bei 7,0 auf (Kellermann & Ferenci, 1982; NewEnglandBioLabs, 2006). Da der pH im Kulturmedium auf pH 7,0 gepuffert war, erschien auch eine direkte Aufreinigung aus dem Medium ohne vorherige Diafiltration möglich. Diese wurde anhand des MBP-AP-Proteins exemplarisch untersucht und in Vergleich zur Aufreinigung mit vorheriger Diafiltration gestellt. Die Beladung der Säule wurde mit 10 Säulenvolumina (SV) des (diafiltrierten) Mediums (150 mL) durchgeführt. Um die Bindestellen der Affinitätsmatrix möglichst vollständig zu nutzen, wurden bei der Beladung eine Überschreitung der dynamischen Säulenkapazität und damit verbundene Produktverluste akzeptiert.

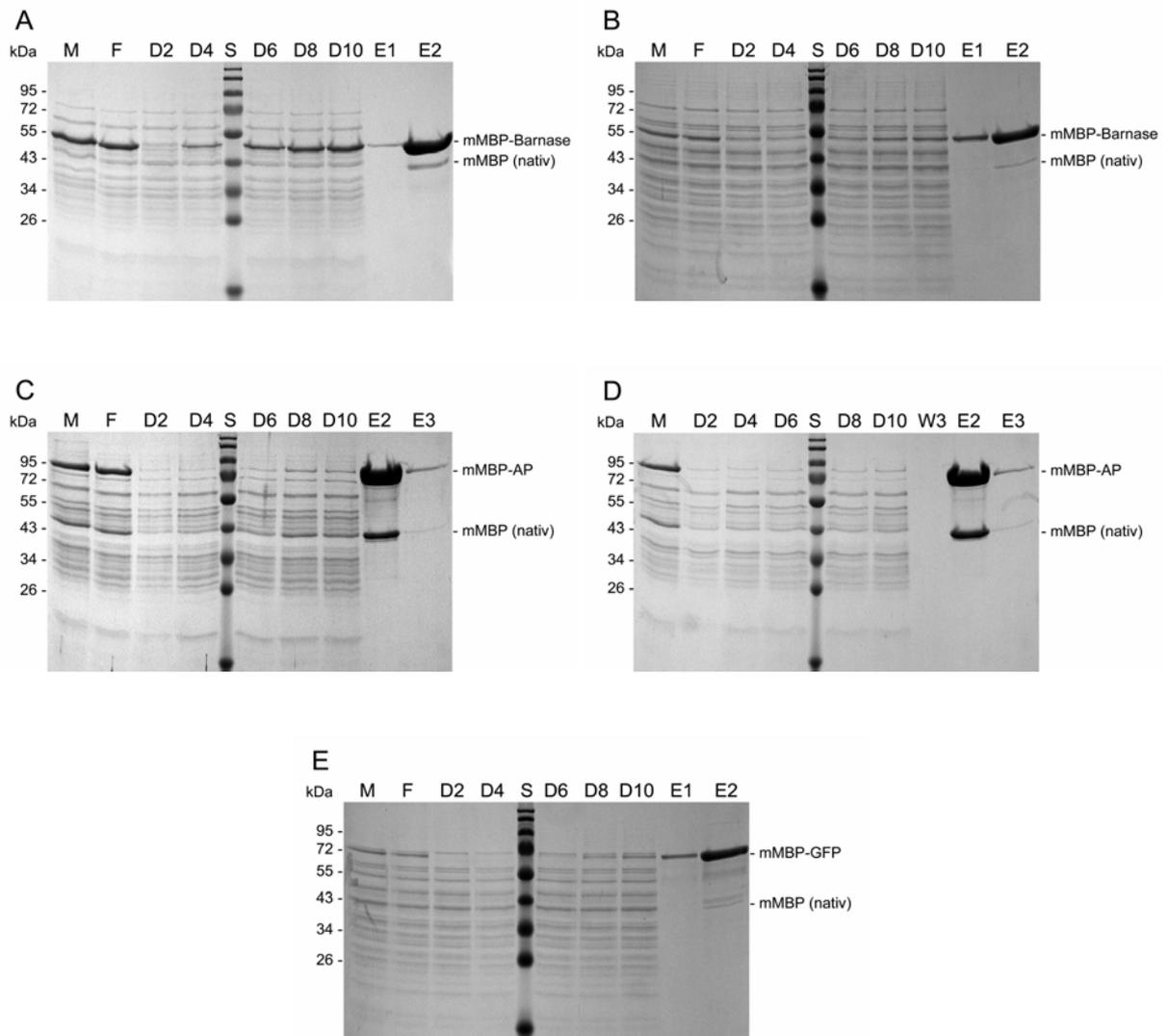
In Abb. 5.41 sind die Chromatographieverläufe des MBP-AP-Proteins mit und ohne vorheriger Diafiltration exemplarisch dargestellt. Die Reinigungen der übrigen MBP-Hybridproteine ergaben vergleichbare Chromatogramme und sind im Anhang (Abschnitt 9.7.3) aufgeführt.



**Abb. 5.41 Chromatogramme der Affinitätsreinigung von MBP-AP.** Die Reinigung erfolgte mit **(A)** und ohne **(B)** vorheriger Diafiltration bei zwei unterschiedlichen Beladungsgeschwindigkeiten ( $v_{\text{lin}} = 60 \text{ cm h}^{-1}$  und  $v_{\text{lin}} = 150 \text{ cm h}^{-1}$ ). Nachdem sich durch Spülen mit Säulenpuffer ein stabiles UV-Signal einstellte, wurden die Proteine durch Einsatz von Maltose eluiert.

Die Diafiltration führte zu einer Entfernung kleiner Proteine/Peptide ( $< 5 \text{ kDa}$ ) und niedermolekularer Verunreinigungen, was sich in einem geringeren UV-Signal während des Beladens äußerte. Da die Beladung bei der Chromatographie ohne vorherige Diafiltration mit höherer Geschwindigkeit ( $v_{\text{lin}} = 150 \text{ cm h}^{-1}$  gegenüber  $v_{\text{lin}} = 60 \text{ cm h}^{-1}$ ) durchgeführt wurde, war der in Abb. 5.41 B dargestellte Chromatographieprozess kürzer. In beiden Fällen resultierte die Elution in scharfen *Peaks*, was auf eine erfolgreiche Desorption und Konzentrierung der Fusionsproteine hindeutete.

Zur qualitativen Beurteilung des Reinigungserfolgs, d.h. der Adsorption der MBP-Hybridproteine an die Säule und der Abreicherung kontaminierender Proteine, wurden ausgewählte Chromatographiefraktionen durch SDS-PAGE analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.42 für alle MBP-Hybridproteine zusammengefasst dargestellt.



**Abb. 5.42** Analyse des Reinigungserfolges der Hybridproteine MBP-Bar (A) und  $SP_{TorA}$ -mMBP-Bar (B) MBP-AP mit (C) und ohne (D) vorheriger Diafiltration, sowie  $SP_{TorA}$ -mMBP-GFP (E). M, Medium; F, Diafiltrat; D2-D10, Durchlauf nach 2-10 SV; W3, Waschen nach 3 SV; E1, 1. Elutionsfraktion (*Peakfronting*); E2, 2. Elutionsfraktion (*Peak*); E3, 3. Elutionsfraktion (*Peaktailing*). Molmassen des Standards S sind seitlich angegeben. Die Abbildung zeigt Coomassie-gefärbte 12%ige SDS-Gele.

Im Ausgangsmaterial der Chromatographie (zellfreier Kulturüberstand bzw. diafiltriertes Medium) waren die MBP-Hybridproteine stets dominant vertreten, wurden jedoch aufgrund der semi-spezifischen Freisetzung in das Kulturmedium durch weitere Proteine begleitet bzw. verunreinigt (Spuren M und F). Die geringe Präsenz der Fusionsproteine in den frühen Durchlaufaktionen dokumentierte deren Bindung an die Säule (Spuren D2-D10). Lediglich für MBP-Barnase waren in den späteren Durchlaufaktionen ausgeprägte Banden zu identifizieren. Die Elution resultierte in intensiven Banden für die jeweiligen MBP-Fusionen (Spuren E2), was die erfolgreiche Desorption und Konzentrierung der Proteine qualitativ belegte. Diese Fraktionen enthielten erwartungsgemäß auch natives MBP, welches durch den verwendeten *E. coli*-Stamm ebenfalls basal exprimiert wurde und an die Säule adsorbierte, je-

doch im Vergleich zu MBP-Barnase von untergeordneter Prominenz war. Übrige Proteine des Ausgangsmaterials konnten durch diese Einschrittreinigung entfernt werden, wie das Ausbleiben weiterer Banden in den Elutionsfraktionen bewies.

Zur quantitativen Dokumentation der Reinigung wurden die Aktivitäten der MBP-Fusionsproteine sowie die Proteinkonzentrationen in den zellfreien Kulturüberständen und Elutionsfraktionen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.16 zusammengefasst.

**Tabelle 5.16 Ergebnisse der affinitätschromatographischen Reinigung von MBP-Hybridproteinen.**  $\rho_P$ , Proteinkonzentration;  $W_a$ , Aktivitätswiederfindungsrate.

| Protein                          | Fraktion                                 | Volumen [mL] | Aktivität <sup>a</sup> | $\rho_P$ [mg L <sup>-1</sup> ] | Spez. Aktivität <sup>b</sup> | $W_a^d$ [%] |
|----------------------------------|--|--------------|------------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------|
| MBP-Barnase                      | Medium                                   | 150          | 120                    | 539,4                          | 222,5                        | <b>89,6</b> |
|                                  | Elutionsfraktion                         | 15           | 1075                   | 1089,9                         | 986,3                        |             |
|                                  | <b>Konzentrierungsfaktor<sup>c</sup></b> | <b>10,0</b>  | <b>9,0</b>             | <b>2,0</b>                     | <b>4,4</b>                   |             |
| SP <sub>TorA</sub> -mMBP-Barnase | Medium                                   | 150          | 13,5                   | 597,6                          | 22,6                         | <b>66,3</b> |
|                                  | Elutionsfraktion                         | 12           | 111,8                  | 549,0                          | 203,6                        |             |
|                                  | <b>Konzentrierungsfaktor<sup>c</sup></b> | <b>12,5</b>  | <b>8,3</b>             | <b>0,9</b>                     | <b>9,0</b>                   |             |
| MBP-AP (mit Diafiltration)       | Medium                                   | 150          | 20,6                   | 611,2                          | 33,7                         | <b>83,6</b> |
|                                  | Elutionsfraktion                         | 15           | 172,3                  | 1572,2                         | 109,6                        |             |
|                                  | <b>Konzentrierungsfaktor<sup>c</sup></b> | <b>10,0</b>  | <b>8,4</b>             | <b>2,6</b>                     | <b>3,3</b>                   |             |
| MBP-AP (ohne Diafiltration)      | Medium                                   | 150          | 20,6                   | 611,2                          | 33,7                         | <b>84,1</b> |
|                                  | Elutionsfraktion                         | 15           | 173,3                  | 1745,7                         | 99,3                         |             |
|                                  | <b>Konzentrierungsfaktor<sup>c</sup></b> | <b>10,0</b>  | <b>8,4</b>             | <b>2,9</b>                     | <b>2,9</b>                   |             |
| SP <sub>TorA</sub> -mMBP-GFP     | Medium                                   | 150          | 2420                   | 315,8                          | 7663,1                       | <b>66,7</b> |
|                                  | Elutionsfraktion                         | 10           | 24200                  | 466,3                          | 51897,9                      |             |
|                                  | <b>Konzentrierungsfaktor<sup>c</sup></b> | <b>15</b>    | <b>10</b>              | <b>1,5</b>                     | <b>6,8</b>                   |             |

<sup>a</sup> MBP-Barnase und SP<sub>TorA</sub>-mMBP-Barnase: RNase-Aktivität [U mL<sup>-1</sup>]; MBP-AP: AP-Aktivität [U mL<sup>-1</sup>]; SP<sub>TorA</sub>-MBP-GFP: Fluoreszenz [RFU].

<sup>b</sup> Auf die Proteinkonzentration bezogene Aktivität. MBP-Barnase und SP<sub>TorA</sub>-mMBP-Barnase: spezifische RNase-Aktivität [U mg<sup>-1</sup>]; MBP-AP: spezifische AP-Aktivität [U mg<sup>-1</sup>]; SP<sub>TorA</sub>-mMBP-GFP: Spezifische Fluoreszenz [RFU mg<sup>-1</sup> mL].

<sup>c</sup> der Elutionsfraktion bezogen auf das Medium.

<sup>d</sup> Quotient der zurück gewonnenen (Elutionsfraktion) und eingesetzten (Medium) Aktivität.

Die Reinigung der MBP-Barnase ermöglichte demnach einen Aktivitätsanstieg von 120 U mL<sup>-1</sup> im diafiltrierten Medium auf 1075 U mL<sup>-1</sup> in der Elutionsfraktion, was einer Konzentrierung um den Faktor 9,0 entspricht. Auf Basis der ermittelten Proteinkonzentrationen ergab sich eine Konzentrierung der spezifischen, auf die Proteinkonzentration bezogenen Aktivität um einen Faktor von 4,4 (Anstieg von 222,5 U mg<sup>-1</sup> auf 986,3 U mg<sup>-1</sup>). Bei der SP<sub>TorA</sub>-mMBP-Barnase war die Aktivitätskonzentrierung mit einem Faktor von 8,3 zwar vergleichbar, die zugrunde liegende Aktivität nahm jedoch nur von 13,5 U mL<sup>-1</sup> auf 111,8 U mL<sup>-1</sup> zu. Die spezifische Aktivität stieg mit einem Faktor von 9,0 (von 22,6 U mg<sup>-1</sup> auf 203,6 U mg<sup>-1</sup>) wesentlich stärker als bei der MBP-Barnase, betrug jedoch mit 203,7 U mg<sup>-1</sup> für das gereinigte Protein

nur ca. 20% der spezifischen Aktivität gereinigter MBP-Barnase ( $986,3 \text{ U mg}^{-1}$ ). Diese geringere spezifische Aktivität ist möglicherweise durch eine fehlerhafte Faltung des Proteins begründet, da die  $\text{SP}_{\text{TorA}}$ -mMBP-Barnase aufgrund des *Tat*-Exports eine cytoplasmatische Assemblierung erfährt.

Die Aktivität der MBP-AP ließ sich durch die Affinitätschromatographie von  $20,6 \text{ U mL}^{-1}$  auf  $172,3 \text{ U mL}^{-1}$  (mit Diafiltration) bzw. von  $20,6 \text{ U mL}^{-1}$  auf  $173,3 \text{ U mL}^{-1}$  (ohne Diafiltration) konzentrieren. Dies entsprach einer Konzentrierung um den Faktor 8,4 bei gleichzeitiger Volumenreduktion um den Faktor 10. Die spezifischen Aktivitäten nahmen mit den Faktoren 3,3 und 2,9 in vergleichbarem Maße zu und waren bei beiden gereinigten Proteinen mit  $109,6 \text{ U mg}^{-1}$  bzw.  $99,3 \text{ U mg}^{-1}$  ebenfalls vergleichbar.

Für  $\text{SP}_{\text{TorA}}$ -mMBP-GFP konnte eine Reduktion des Volumens um den Faktor 15 bei gleichzeitiger Steigerung der Fluoreszenz von 2420 RFU auf 24200 RFU (Faktor 10) erreicht werden. Die spezifische Fluoreszenz wurde dabei um den Faktor 6,8 gesteigert.

Insgesamt lieferten die chromatographischen Reinigungen der verschiedenen MBP-Hybridproteine recht vergleichbare Erfolge bezüglich der Aktivitätskonzentrierung und der Volumenreduktion. So wurden die Volumina während der Aufreinigung um einen Faktor von ca. 10-15 reduziert, was in einer Konzentrierung der Aktivität um einen Faktor von ca. 8-10 resultierte. Die für alle MBP-Hybridproteine beobachtete Steigerung der spezifischen Aktivität begründete sich durch Abreicherung kontaminierender Proteine. Dabei war die Konzentrierung jedoch für die Fusionsproteine mit nativem und  $\text{SP}_{\text{TorA}}$ -modifiziertem Signalpeptid recht unterschiedlich. So wurden die spezifischen Aktivitäten der *Sec*-abhängigen Fusionsproteine mit den Faktoren 2,9-4,4 deutlich geringer konzentriert als die der *Tat*-Substrate (Faktor 6,8-9,0). Dies ließ sich durch die größere Dominanz der Proteine im Medium aufgrund der effizienteren Freisetzung nach *Sec*-Export erklären (vgl. Abb. 5.42 und Abschnitt 5.3.2) und stellte einen weiteren Beleg für die bevorzugte Eignung des *Sec*-Transports in Verbindung mit der BRP-vermittelten Proteinsekretion dar. Die vergleichsweise geringe spezifische Aktivitätssteigerung bei den *Sec*-abhängigen Fusionsproteinen MBP-Barnase und MBP-AP dokumentierte darüber hinaus die bereits relativ hohe Reinheit der Proteine im Medium und hob das Potenzial der sekretorischen Produktion im Sinne einer initialen Abreicherung von Wirtsproteinen hervor.

Bei der Affinitätschromatographie wurden mögliche Produktverluste durch Überladung der Säule bewusst akzeptiert, da es zunächst galt die generelle Anwendbarkeit des Verfahrens zu untersuchen. Die Ergebnisse aus Abschnitt 5.3.2 belegen eine geringere Effizienz BRP-vermittelte Proteinsekretion auf Basis der *Tat*-Translokation als nach *Sec*-Transport in das Periplasma. Demzufolge wurden vergleichsweise geringere extrazelluläre Konzentrationen

der *Tat*-dirigierten Proteine erwartet und durch die in Abb. 5.42 dargestellten SDS-Gele durch schwächer ausgeprägte Banden in den Mediumsfraktionen bestätigt. Dementsprechend konnten bei den *Tat*-abhängigen MBP-Fusionsproteinen geringere Reinigungsverluste durch Überschreitung der Säulenkapazität erwarten werden. Abb. 5.42 bestätigte diese Theorie, in dem sie für die *Sec*-abhängige MBP-Barnase eine im Vergleich zur SP<sub>TorA</sub>-mMBP-Barnase unvollständigere Adsorption dokumentierte.

Verluste während der Aufreinigung können durch Wiederfindungsraten, die das Verhältnis aus zurück gewonnener und eingesetzter Masse des Produkts darstellen, ausgedrückt werden. Da die Massenkonzentrationen der MBP-Fusionsproteine in den komplexen Proteingemischen der Ausgangsmaterialien nicht direkt bestimmbar waren, wurde die Rückgewinnung der Proteine stellvertretend anhand ihrer Aktivitäten (Aktivitätswiederfindungsraten) ermittelt. Diese sind ebenfalls in Tabelle 5.16 aufgeführt. Für die beiden *Sec*-dirigierten Proteine MBP-Bar und MBP-AP konnten mit 84-90% höhere Aktivitätswiederfindungsraten erzielt werden als für die *Tat*-Substrate SP<sub>TorA</sub>-mMBP-Bar und SP<sub>TorA</sub>-mMBP-GFP (66%, bzw. 67%). Dies widersprach der Beobachtung eines geringeren Verlustes *Tat*-exportierter Proteine. So lag beispielsweise die Aktivitätswiederfindungsrate der SP<sub>TorA</sub>-mMBP-Barnase fast 25% unterhalb der des Fusionsproteins mit nativem MBP-Anteil.

Bei der MBP-AP-Reinigung zeigten sich mit und ohne vorherige Diafiltration keine signifikanten Unterschiede. Weder das Auslassen der Diafiltration noch die Erhöhung der Beladungsgeschwindigkeit führten zu erhöhten Reinigungsverlusten. Durch diese Maßnahmen konnte somit Zeit und Material (Puffer) eingespart und die Möglichkeit einer direkten, verlustarmen Reinigung aus dem Kulturmedium gezeigt werden.

Tabelle 5.17 zeigt die Selektivität des Produktionsverfahrens für alle untersuchten MBP-Hybridproteine.

**Tabelle 5.17 Selektivität der Gewinnung (sekretorische Produktion und Affinitätsreinigung) von MBP-Hybridproteinen.** ( $\rho_P$ , Proteinkonzentration in der Elutionsfraktion;  $\rho_{BTM}$ , Bio-trockenmassekonzentration;  $m_P$ , Eluierte Proteinmasse;  $m_{BTM}$ , Bezugsbiomasse des sekretierten Proteins;  $S_{P/X}$ , Selektivität)

| Protein                          | $\rho_P$<br>[g L <sup>-1</sup> ] | $\rho_{BTM}$<br>[g L <sup>-1</sup> ] | $m_P$<br>[mg] | $m_{BTM}$<br>[g] | $S_{P/X}$<br>[mg g <sup>-1</sup> ] |
|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------|------------------|------------------------------------|
| MBP-Barnase                      | 1,09                             | 2,98                                 | 16,35         | 0,48             | <b>36,6</b>                        |
| SP <sub>TorA</sub> -mMBP-Barnase | 0,55                             | 2,91                                 | 6,59          | 0,44             | <b>15,1</b>                        |
| MBP-AP<br>(mit Diafiltration)    | 1,57                             | 3,28                                 | 23,58         | 0,49             | <b>47,9</b>                        |
| MBP-AP<br>(ohne Diafiltration)   | 1,75                             | 3,28                                 | 26,19         | 0,49             | <b>53,2</b>                        |
| SP <sub>TorA</sub> -mMBP-GFP     | 0,47                             | 2,8                                  | 4,66          | 0,42             | <b>11,1</b>                        |

Da die Kultivierungen im Schüttelkolben erfolgten und das Wachstum nach Induktion der BRP-Expression zum Erliegen kam, lagen die erzielten Biomassekonzentrationen nur bei ca.  $3 \text{ g L}^{-1}$ . Bei Einsatz von 150 mL zellfreiem Kulturüberstand für die Aufreinigung stammte das sekretierte Protein entsprechend aus ca. 0,5 g Biotrockenmasse. Daraus resultierend lag die Selektivität des Verfahrens, welche die aus einem Gramm Biotrockenmasse sekretierte und gereinigte Produktmasse angibt, bei den *Sec*-abhängigen MBP-Hybridproteinen im Bereich von 40-50 mg. Bei den *Tat*-abhängigen Proteinen war die Selektivität aufgrund der unvollständigen Sekretion und der vergleichsweise höheren Reinigungsverluste deutlich geringer und lag zwischen 10 und 15 mg pro Gramm BTM. Dabei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die eluierten MBP-Hybridproteine noch gering durch natives MBP kontaminiert und die ermittelten Selektivitäten somit nicht ganz exakt sind. Die Selektivität des Verfahrens für *Sec*-MBP-Hybridproteine entsprach jedoch der in Abschnitt 5.2.1 bestimmten Selektivität der sekretorischen Proteinproduktion für native AP, welche zu etwa  $50 \text{ mg g}^{-1}$  bestimmt wurde.

### 5.3.4 Schlussfolgerungen zur extrazellulären Produktion und Affinitätsreinigung von MBP-Hybridproteinen

Die Coexpression von LppBRP erlaubte bei allen untersuchten MBP-Fusionsproteinen eine Steigerung der extrazellulären Anteile, mit Ausnahme des Beispiels SP<sub>TorA</sub>-mMBP-AP. Dieses Protein war enzymatisch nicht aktiv und akkumulierte im Cytoplasma. Bei MBP-AP konnte lediglich eine weitere Steigerung der bereits recht hohen spontanen (BRP-unabhängigen) Sekretion erreicht werden. Alle MBP-Hybridproteine wurden zu 50-95% der insgesamt erzeugten Aktivität in das Medium entlassen. Dabei wiesen die *Sec*-abhängigen Fusionsproteine im Vergleich zu den *Tat*-Konstrukten eine erhöhte spontane Sekretion auf und gelangten unter BRP-Expression effizienter in das Kulturmedium. Anhand der Proteine MBP-AP und SP<sub>TorA</sub>-mMBP-GFP, deren Sekretionseffizienz in Vergleich zu ihren kleineren, originären Pendants ohne MBP-Anteil gestellt wurde, deckte eine mögliche Abhängigkeit der BRP-vermittelten Sekretion von der Proteingröße auf. Immunologische Untersuchungen nach Größentrennung zeigten weiterhin die strikt periplasmatischen Ursprünge der sekretierten MBP-Hybridproteine.

Bislang konnten MBP-Hybridproteine ausschließlich intrazellulär aus dem Periplasma nach *Sec*-Translokation gewonnen werden. Ein Periplasmaexport auf Basis der *Tat*-Translokation war zunächst nur für originäres MBP ohne Fusionsanteile bekannt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen erstmalig auch den Export von MBP-Hybridproteinen durch den *Tat*-Pfad. Unter BRP-Coexpression konnten die periplasmatischen MBP-Hybridproteine sowohl nach Export über den *Sec*- als auch *Tat*-Pfad in das Medium entlassen werden. Die Ergebnisse wiesen

aber eine vergleichsweise höhere Effizienz der sekretorischen Produktion Sec-abhängiger Proteine auf.

Durch Affinitätschromatographie konnte bei allen untersuchten MBP-Hybridproteinen eine fast vollständige Abreicherung kontaminierender Proteine in einem singulären Reinigungsschritt erzielt werden. Einzig natives, chromosomal codiertes MBP konnte durch die Affinitätsreinigung nicht entfernt werden, war jedoch aufgrund der geringen Expression in den Elutionsfraktionen stets untergeordnet vertreten. Die Reduktion des Suspensionsvolumens führte zu einer deutlichen Konzentrierung der Proteine. Da diese im Medium bereits dominant vertreten waren, fiel die Steigerung der spezifischen Aktivität vergleichsweise gering aus. Diese Beobachtung stellte das Potential der Proteinsekretion in Sinne eines ersten Reinigungsschrittes heraus. Durch die Reinigung kam es insbesondere bei den Sec-transolzierten Proteinen nur zu geringen Verlusten, so dass über 80% der eingesetzten Proteinaktivität zurück gewonnen werden konnten. Da die MBP-Hybridproteine nach Sekretion in einem physiologischen Milieu vorlagen, führte auch eine direkte Aufreinigung aus dem Medium, selbst unter forcierten Bedingungen (schnelle Säulenbeladung), nicht zu erhöhten Verlusten.

Folglich erlaubte die sekretorische Proteinproduktion eine schnelle, aufwands- und verlustarme Affinitätsreinigung, bei der ca. 40-50 mg (annähernd) reinen Proteins aus einem Gramm Zelltrockenmasse gewonnen werden konnten. Bei fiktiver Übertragung der Ergebnisse auf Hochzelldichteverfahren erscheint somit die Gewinnung homogenen Proteins im Gramm-Maßstab aus einem Liter Kulturmedium möglich.

## 6 Zusammenfassung

Bestimmte *Escherichia coli*-Stämme produzieren antibiotisch wirkende Bacteriocine, welche unter Beteiligung sog. Bacteriocin freisetzender Proteine (BRP) in die extrazelluläre Umgebung sekretiert werden. Die Nutzbarkeit dieser BRP für die Sekretion periplasmatischer Proteine in das Kulturmedium von *Escherichia coli* ist seit langem bekannt und konnte bereits für eine Vielzahl rekombinanter Proteine gezeigt werden. Dennoch existieren bislang vergleichsweise wenige Untersuchungen zur Vermeidung oder Verringerung des toxischen Charakters von BRP, der das bakterielle Wachstum negativ beeinflusst und ein inhärentes Problem der BRP-Coexpression bei der sekretorischen Produktion heterologer Proteine darstellt. In dieser Arbeit wurde auf verschiedene Weise und mit unterschiedlichem Erfolg versucht die BRP-Toxizität zu vermeiden bzw. zu verringern. Neben Untersuchungen zur Optimierung von BRP auf molekularer Ebene wurden zur Verbesserung der Proteinsekretion insbesondere prozesstechnische Ansätze verfolgt, welche sich auf die Steuerung der BRP-Coexpression durch entsprechende Induktionsstrategien fokussierten.

Vergleiche der beiden häufig verwendeten BRP des Colicins E1 und des Cloacins DF13 sowie zweier C- und N-terminal modifizierter Varianten des Cloacin DF13 BRPs (LppBRP und LppBRP-His<sub>6</sub>) ergaben geringe Differenzen dieser BRP bezüglich ihrer Toxizität. Da die extrazellulär erzeugten Konzentrationen einer alkalischen Phosphatase (AP) nur um maximal 14% variierten, zeigte sich auch die Funktionalität, d.h. die sekretionsfördernde Eigenschaft dieser vier BRP vergleichbar. Artifiziiell konstruierte Hybridproteine aus LppBRP und vier verschiedenen Fusionsanteilen wiesen, bei teilweisem Funktionsverlust, eine unveränderte Toxizität auf. Als Fusionsdomänen fanden dabei mit einer bakteriellen RNase (Bar), einer  $\beta$ -Lactamase (Bla), einem Maltosebindeprotein (MBP) und einer AP, Proteine unterschiedlicher Molmassen zwischen 12,4 und 46,3 kDa Verwendung. Demzufolge war eine Reduktion der BRP-Toxizität durch Fusion mit heterologen Proteinen nicht möglich.

Der Einsatz des Arabinose-regulierbaren P<sub>BAD</sub>-Promotors erwies sich hingegen als geeignetes Mittel zur Steuerung der LppBRP-Expression. Durch entsprechend angepasste Induktorkonzentrationen, bei denen die Zelldichte zum Induktionszeitpunkt berücksichtigt wurde, konnten submaximale BRP-Expressionsstärken realisiert werden, welche eine kontinuierliche und effiziente Proteinsekretion in das Kulturmedium erlaubten ohne das bakterielle Wachstum zum Erliegen zu bringen. Dabei wurden extrazelluläre Anteile der verwendeten Modellproteine AP und  $\beta$ -Lactamase (Bla) von 90-95% und Selektivitäten von 50 mg extrazellulärer AP pro Gramm Zelltrockenmasse erzielt. Eine effiziente Sekretion war jedoch stets

mit einer Reduktion des Wachstums verbunden, so dass die optimale Produktionsstrategie einen Kompromiss aus Sekretionseffizienz und Wachstumsgeschwindigkeit darstellte.

Alternativ konnte durch Induktion mit hohen Arabinosekonzentrationen eine starke BRP-Expression erreicht werden. Dies erlaubte eine schnelle Sekretion der gebildeten Proteine bei maximalen Biomassekonzentrationen nach unlimitiertem Wachstum. Mit einem extrazellulären AP-Anteil von 89% wurden dabei vergleichbare Sekretionseffizienzen und extrazelluläre Produktivitäten erzielt, wie bei angepasster, wachstumspersmissiver BRP-Expression.

Die Katabolitrepression des  $P_{BAD}$ -Promotors durch Glucose ermöglichte eine autoregulatorischen Induktion der BRP-Expression bei Substraterschöpfung. Indem Glucose bei Kultivierungen als primäres Substrat eingesetzt wurde, verliefen BRP-Expression und Proteinsekretion umgekehrt proportional zur Substratkonzentration. Dies erlaubte eine zeitliche Entkopplung von Produktbildung und -sekretion sowie eine ebenfalls effiziente Proteinfreisetzung (94% extrazellulärer AP-Anteil).

Trotz der BRP-Toxizität wurde selbst bei starker Expression keine Zellyse beobachtet. Die strikte Freisetzung periplasmatischer Proteine bedeutete eine Trennung extrazellulärer Proteine, von cytoplasmatischen Proteinen, welche den Großteil der Wirtspoteine ausmachen. In Verbindung mit Analysen zur Proteinreinheit wurde dadurch das Potential der sekretorischen Proteinproduktion im Sinne einer Abreicherung zellulärer Verunreinigungen belegt.

Die Fähigkeit der Zellen zur Revitalisierung bei Erliegen der BRP-Expression zeigte den cytostatischen Charakter der BRP-Toxizität. Durch BRP-Aktivität kamen elementare zelluläre Vorgänge wie Zellatmung und Proteinsynthese zum Erliegen oder liefen stark reduziert ab. Genexpressionsanalysen machten die Unfähigkeit von *E. coli* zur Reaktion auf die toxische Wirkung des BRP deutlich.

Als weiterer Bestandteil dieser Arbeit wurde ein Expressionssystem etabliert, welches neben der sekretorischen Produktion auch eine direkte Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine aus dem Medium ermöglichte und dadurch die Vorzüge der extrazellulären Proteinproduktion herausstellte. Dies konnte durch Anwendung des Maltosebindepoteins (MBP), das als Fusionspartner eine Affinität zu  $\alpha$ -1,4-Glucanen vermittelte realisiert werden. Varianten des MBP mit zwei unterschiedlichen Signalpeptiden erlaubten den Export heterologer Proteine in das Periplasma sowohl über den *Sec*- als auch den *Tat*-Pfad. Als Modellproteine wurden dabei AP, Bar und das grünfluoreszierende Protein eingesetzt. Unter BRP-Coexpression konnte erstmalig die Sekretion von MBP-Hybridproteinen in das Kulturmedium gezeigt werden, nach der bis zu 95% der erzeugten Proteine extrazellulär vorlagen. Die Sekretionseffektivität war dabei von der Wahl des Translokationspfades in das Periplasma und von der Proteingröße abhängig, so dass die Freisetzung einiger Proteine mit geringerer Effizienz erfolgte. Der Sekretionsgrad betrug jedoch bei allen untersuchten Proteinen mindestens 50%. Die Arbeiten zeigten zugleich eine erstmalige, erfolgreiche Anwendung der BRP-vermittelten Sekretion für

Proteine, welche über den *Tat*-Pfad in das Periplasma gelangen. Insbesondere für MBP-Hybridproteine war bislang nur ein Export über den *Sec*-Pfad bekannt. Dies eröffnet neue Möglichkeiten für die extrazelluläre Produktion rekombinanter Proteine bei denen ein Export über den *Sec*-Pfad ausgeschlossen ist.

Die sekretierten Proteine konnten aufgrund der Affinitätsfunktion des MBP chromatographisch in einem einzigen Schritt bis zu annähernder Homogenität gereinigt werden. Da das physiologische Milieu des Kulturmediums bereits geeignete Bedingungen für die Affinitätsreinigung bereitstellte, war eine Isolierung des Modellproteins MBP-AP ohne vorherige Konditionierung des Mediums möglich, so dass ein effizientes, schnelles und verlustarmes Produktionsverfahren entwickelt werden konnte. Das etablierte Sekretionssystem und die Affinitätsreinigung erlaubten dabei relativ hohe Selektivitäten von bis zu 50 mg annähernd reinem Zielprotein pro Gramm Zelltrockenmasse.

## 7 Ausblick

Durch die Untersuchungen zur Optimierung der BRP-vermittelten Proteinsekretion konnten geeignete Prozessstrategien für eine effiziente Sekretion verschiedener Modellproteine etabliert werden. Darauf basierend ergeben sich einige weitere Optimierungsmöglichkeiten für die extrazelluläre Proteinproduktion mit *E. coli*.

So erfolgte die Expression der Modellproteine AP und Bla durch den relativ schwachen  $P_{bla}$ -Promotor. Die Verwendung eines starken Promotors sollte demnach deutlich höhere Produktkonzentrationen ermöglichen. Anhand des  $P_{BAD}$ -Promotors konnte die BRP-Toxizität auf wachstumspermissivem Niveau gehalten werden. Demzufolge könnten schwache konstitutive Promotoren eine geeignete Alternative für die BRP-Expression darstellen. Das etablierte Verfahren erlaubte die extrazelluläre Produktion von ca. 50 mg AP pro Gramm BTM durch Satzkultivierung bei denen BTM-Konzentrationen bis zu  $10 \text{ g L}^{-1}$  vorlagen. In Hochzelldichtekultivierungen (HZDK) konnten trotz Wachstumslimitierungen BTM-Konzentrationen von ca.  $70 \text{ g L}^{-1}$  ohne größeren Aufwand (Sauerstoffbegasung, starke Drucküberlagerung) erreicht werden. Obwohl die Produkttiter für AP und Bla, gemessen an der Aktivität beider Enzyme, nicht in gleichem Maße gesteigert werden konnten, sind in limitierungsfreien HZDK extrazelluläre Produktkonzentrationen von bis zu  $5 \text{ g L}^{-1}$  denkbar. Bei Einsatz eines stärkeren Promotors zur Expression des Zielproteins sollten noch deutlich höhere Konzentrationen möglich sein.

Die Verwendung des MBP als Fusionspartner erlaubte eine einfache, aufwands- und verlustarme Gewinnung gereinigter, rekombinanter Proteine aus dem Kulturmedium. Auch in diesem Zusammenhang bieten sich einige Möglichkeiten zur Weiterentwicklung.

So sollte die Produktion von MBP-Hybridproteinen zukünftig in einem *E. coli*-Stamm mit chromosomal deletiertem MBP ( $\Delta malE$ -Genotyp) erfolgen, um die Co-Sekretion und Co-Purifikation des nativen MBP zu vermeiden. Die sekretorische Produktion auf Basis des *Tat*-Pfades ermöglichte im Vergleich zur *Sec*-basierten Sekretion geringere Freisetzungsgrade, welche möglicherweise auf die geringere Transporteffizienz dieser Translokase zurückzuführen sind. Dabei könnte eine Überexpression der am Transport beteiligten *TatABC*-Proteine, insbesondere des zentralen Porenbestandteils *TatA*, Abhilfe schaffen. Weiterhin würde die Insertion von Protease-Schnittstellen in den Übergangsbereich zwischen MBP und Fusionsanteil eine Trennung beider Domänen nach der Reinigung und somit eine Gewinnung des reinen Zielproteins erlauben.

Die Affinitätschromatographie ermöglichte eine effiziente Gewinnung der MBP-Hybridproteine direkt aus dem Medium. Aufgrund der Spezifität der verwendeten Affinitätsmatrix könnte die Reinigung durch Satzadsorption eine interessante Alternative darstellen. Diese würde eine grundlegende Beschleunigung und Vereinfachung des Reinigungsprozesses bedeuten.

Abschließend könnten die bei der Optimierung der BRP-vermittelten Proteinsekretion gewonnenen Erkenntnisse bezüglich geeigneter Prozessstrategien für eine extrazelluläre Produktion von MBP-Hybridproteinen im Bioreaktormaßstab Anwendung finden.

## 8 Literaturverzeichnis

- Alami, M., Trescher, D., Wu, L. F. & Muller, M. (2002). Separate analysis of twin-arginine translocation (Tat)-specific membrane binding and translocation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**(23), 20499-503.
- Andersen, J. B., Sternberg, C., Poulsen, L. K., Bjorn, S. P., Givskov, M. & Molin, S. (1998). New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol* **64**(6), 2240-6.
- Angelini, S., Moreno, R., Gouffi, K., Santini, C., Yamagishi, A., Berenguer, J. & Wu, L. (2001). Export of *Thermus thermophilus* alkaline phosphatase via the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **506**(2), 103-7.
- Aono, R. (1989a). Release of Penicillinase by *Escherichia coli* Hb101 (Peap31) Accompanying the Simultaneous Release of Outer-Membrane Components by Kil Peptide. *Biochem J* **263**(1), 65-71.
- Aono, R. (1989b). Subcellular Distribution of Alkalophilic *Bacillus* Penicillinase Produced by *Escherichia coli* Hb101 Carrying Peap31. *Appl Microbiol Biotechnol* **31**(4), 397-400.
- Badyakina, A. O. & Nesmeyanova, M. A. (2005). Biogenesis and secretion of overproduced protein in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Process Biochem* **40**(2), 509-518.
- Barrett, C. M., Ray, N., Thomas, J. D., Robinson, C. & Bolhuis, A. (2003). Quantitative export of a reporter protein, GFP, by the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **304**(2), 279-84.
- Baty, D., Lloubes, R., Geli, V., Lazdunski, C. & Howard, S. P. (1987). Extracellular Release of Colicin A Is Nonspecific. *Embo J* **6**(8), 2463-2468.
- Beck, K., Wu, L. F., Brunner, J. & Muller, M. (2000). Discrimination between SRP- and SecA/SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor. *Embo J* **19**(1), 134-43.
- Bedouelle, H. & Duplay, P. (1988). Production in *Escherichia coli* and one-step purification of bifunctional hybrid proteins which bind maltose. Export of the Klenow polymerase into the periplasmic space. *Eur J Biochem* **171**(3), 541-9.
- Beha, D. (2003). In vitro-Untersuchungen zum Sekretionsmechanismus der beta-Lactamase in *Escherichia coli*. *Dissertation*. Universitätsklinikum Freiburg.
- Beha, D., Deitermann, S., Muller, M. & Koch, H. G. (2003). Export of beta-lactamase is independent of the signal recognition particle. *J Biol Chem* **278**(24), 22161-7.
- Berks, B. C. (1996). A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* **22**(3), 393-404.
- Berks, B. C., Palmer, T. & Sargent, F. (2003). The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology. *Adv Microb Physiol* **47**, 187-254.

- Berks, B. C., Sargent, F. & Palmer, T. (2000). The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* **35**(2), 260-74.
- Bessette, P. H., Aslund, F., Beckwith, J. & Georgiou, G. (1999). Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(24), 13703-8.
- Bettenworth, F. (2005). Bibliotheken von Stationärphasen-Promotoren in gramnegativen Bakterien: Erzeugung, Screening und verfahrenstechnische Analyse. *Dissertation*. Universität Bielefeld.
- Binet, R., Letoffe, S., Ghigo, J. M., Delepelaire, P. & Wandersman, C. (1997). Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters - A review. *Gene* **192**(1), 7-11.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6), 1513-23.
- Blaesen, M. (2006). Untersuchungen zur Lyse und Rückführung bakterieller Biomasse als Medienbestandteil in den Fermentationsprozess. *Dissertation*. Universität Bielefeld.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**(5331), 1453-74.
- Blaudeck, N., Kreutzenbeck, P., Freudl, R. & Sprenger, G. A. (2003). Genetic analysis of pathway specificity during posttranslational protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Bacteriol* **185**(9), 2811-9.
- Blocker, A., Komoriya, K. & Aizawa, S. (2003). Type III secretion systems and bacterial flagella: Insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6), 3027-3030.
- Bokranz, M., Gutmann, M., Kortner, C., Kojro, E., Fahrenholz, F., Lauterbach, F. & Kroger, A. (1991). Cloning and nucleotide sequence of the structural genes encoding the formate dehydrogenase of *Wolinella succinogenes*. *Arch Microbiol* **156**(2), 119-28.
- Bolhuis, A., Mathers, J. E., Thomas, J. D., Barrett, C. M. L. & Robinson, C. (2001). TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**(23), 20213-20219.
- Borriss, R., Olsen, O., Thomsen, K. K. & von Wettstein, D. (1989). Hybrid *Bacillus* endo-(1-3,1-4)-beta-glucanases: construction of recombinant genes and molecular properties of the gene products. *Carlsberg Res Commun* **54**(2), 41-54.
- Bost, S. & Belin, D. (1997). *prl* mutations in the *Escherichia coli* *secG* gene. *J Biol Chem* **272**(7), 4087-93.
- Bowden, G. A., Paredes, A. M. & Georgiou, G. (1991). Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* **9**(8), 725-30.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brandis, H. (1975). Die Natur der Bacteriocine. *Naturwissenschaften* **62**(1), 22-8.

- Brejč, K., Sixma, T. K., Kitts, P. A., Kain, S. R., Tsien, R. Y., Ormo, M. & Remington, S. J. (1997). Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6), 2306-11.
- Buchanan, G., Leeuw, E., Stanley, N. R., Wexler, M., Berks, B. C., Sargent, F. & Palmer, T. (2002). Functional complexity of the twin-arginine translocase TatC component revealed by site-directed mutagenesis. *Mol Microbiol* **43**(6), 1457-70.
- Casadaban, M. J. (1975). Fusion of the *Escherichia coli lac* genes to the *ara* promoter: a general technique using bacteriophage Mu-1 insertions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(3), 809-13.
- Casadaban, M. J. & Cohen, S. N. (1980). Analysis of Gene-Control Signals by DNA-Fusion and Cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **138**(2), 179-207.
- Cascales, E., Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J. C. & Lloubes, R. (2002). Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *J Bacteriol* **184**(3), 754-9.
- Cavard, D. (1991). Synthesis and functioning of the colicin E1 lysis protein: comparison with the colicin A lysis protein. *J Bacteriol* **173**(1), 191-6.
- Cavard, D., Howard, S. P., Lloubes, R. & Lazdunski, C. (1989). High-level expression of the colicin A lysis protein. *Mol Gen Genet* **217**(2-3), 511-9.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**(5148), 802-5.
- Choi, J. H., Jeong, K. J., Kim, S. C. & Lee, S. Y. (2000). Efficient secretory production of alkaline phosphatase by high cell density culture of recombinant *Escherichia coli* using the *Bacillus* sp. endoxylanase signal sequence. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**(6), 640-5.
- Choi, J. H. & Lee, S. Y. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**(5), 625-35.
- Cohen, S. N. & Chang, A. C. (1977). Revised interpretation of the origin of the pSC101 plasmid. *J Bacteriol* **132**(2), 734-7.
- Collier, D. N., Strobel, S. M. & Bassford, P. J., Jr. (1990). SecB-independent export of *Escherichia coli* ribose-binding protein (RBP): some comparisons with export of maltose-binding protein (MBP) and studies with RBP-MBP hybrid proteins. *J Bacteriol* **172**(12), 6875-84.
- Condon, C. & Putzer, H. (2002). The phylogenetic distribution of bacterial ribonucleases. *Nucleic Acids Res* **30**(24), 5339-46.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. & Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**(1 Spec No), 33-8.
- Cramer, A., Whitehorn, E. A., Tate, E. & Stemmer, W. P. (1996). Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol* **14**(3), 315-9.
- Cristobal, S., de Gier, J. W., Nielsen, H. & von Heijne, G. (1999a). Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *Embo J* **18**(11), 2982-90.

- Cristobal, S., Scotti, P., Luirink, J., von Heijne, G. & de Gier, J. W. (1999b). The signal recognition particle-targeting pathway does not necessarily deliver proteins to the sec-translocase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**(29), 20068-70.
- Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A. & Tsien, R. Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **20**(11), 448-55.
- Dabora, R. L. & Cooney, C. L. (1990). Intracellular lytic enzyme systems and their use for disruption of *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **43**, 11-30.
- Danese, P. N. & Silhavy, T. J. (1998). Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **32**, 59-94.
- de Graaf, F. K. & Klaasen-Boor, P. (1977). Purification and characterization of a complex between cloacin and its immunity protein isolated from *Enterobacter cloacae* (Clo DF13). Dissociation and reconstitution of the complex. *Eur J Biochem* **73**(1), 107-14.
- de Graaf, F. K. & Oudega, B. (1986). Production and release of cloacin DF13 and related colicins. *Curr Top Microbiol Immunol* **125**, 183-205.
- de Leeuw, E., Granjon, T., Porcelli, I., Alami, M., Carr, S. B., Muller, M., Sargent, F., Palmer, T. & Berks, B. C. (2002). Oligomeric properties and signal peptide binding by *Escherichia coli* Tat protein transport complexes. *J Mol Biol* **322**(5), 1135-1146.
- DECHEMA. (1991). Standardisierungs- und Ausrüstungsempfehlungen für Bioreaktoren und periphere Einrichtungen. Schön & Wetzels GmbH, Frankfurt/M.
- Dekker, N. (2000). Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function. *Mol Microbiol* **35**(4), 711-7.
- Dekker, N., Tommassen, J., Lustig, A., Rosenbusch, J. P. & Verheij, H. M. (1997). Dimerization regulates the enzymatic activity of *Escherichia coli* outer membrane phospholipase A. *J Biol Chem* **272**(6), 3179-84.
- Dekker, N., Tommassen, J. & Verheij, H. M. (1999). Bacteriocin release protein triggers dimerization of outer membrane phospholipase A in vivo. *J Bacteriol* **181**(10), 3281-3.
- DeLisa, M. P., Tullman, D. & Georgiou, G. (2003). Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10), 6115-20.
- Derman, A. I. & Beckwith, J. (1991). *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J Bacteriol* **173**(23), 7719-22.
- Desvaux, M., Parham, N. J., Scott-Tucker, A. & Henderson, I. R. (2004). The general secretory pathway: a general misnomer? *Trends Microbiol* **12**(7), 306-9.
- Deyev, S. M., Waibel, R., Lebedenko, E. N., Schubiger, A. P. & Pluckthun, A. (2003). Design of multivalent complexes using the barnase-barstar module. *Nat Biotechnol* **21**(12), 1486-92.
- Duong, F., Eichler, J., Price, A., Leonard, M. R. & Wickner, W. (1997). Biogenesis of the gram-negative bacterial envelope. *Cell* **91**(5), 567-73.

- Duong, F. & Wickner, W. (1997). The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *Embo J* **16**(16), 4871-9.
- Economou, A. (1999). Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol* **7**(8), 315-320.
- Economou, A., Pogliano, J. A., Beckwith, J., Oliver, D. B. & Wickner, W. (1995). SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell* **83**(7), 1171-81.
- Economou, A. & Wickner, W. (1994). SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* **78**(5), 835-43.
- Englesberg, E., Anderson, R. L., Weinberg, R., Lee, N., Hoffee, P., Huttenhauer, G. & Boyer, H. (1962). *L*-Arabinose-sensitive, *L*-ribulose 5-phosphate 4-epimerase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **84**, 137-46.
- Englesberg, E., Irr, J., Power, J. & Lee, N. (1965). Positive control of enzyme synthesis by gene C in the *L*-arabinose system. *J Bacteriol* **90**(4), 946-57.
- Englesberg, E., Sheppard, D., Squires, C. & Meronk, F., Jr. (1969a). An analysis of "revertants" of a deletion mutant in the C gene of the *L*-arabinose gene complex in *Escherichia coli* B-r: isolation of initiator constitutive mutants (lc). *J Mol Biol* **43**(2), 281-98.
- Englesberg, E., Squires, C. & Meronk, F., Jr. (1969b). The *L*-arabinose operon in *Escherichia coli* B-r: a genetic demonstration of two functional states of the product of a regulator gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **62**(4), 1100-7.
- Feilmeier, B. J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H. & Phillips, G. J. (2000). Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**(14), 4068-76.
- Fekkes, P., de Wit, J. G., van der Wolk, J. P., Kimsey, H. H., Kumamoto, C. A. & Driessen, A. J. (1998). Preprotein transfer to the *Escherichia coli* translocase requires the cooperative binding of SecB and the signal sequence to SecA. *Mol Microbiol* **29**(5), 1179-90.
- Fekkes, P., van der Does, C. & Driessen, A. J. (1997). The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *Embo J* **16**(20), 6105-13.
- Fellay, R., Frey, J. & Krisch, H. (1987). Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of gram-negative bacteria. *Gene* **52**(2-3), 147-54.
- Ferenci, T. & Klotz, U. (1978). Affinity Chromatographic Isolation of Periplasmic Maltose Binding-Protein of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **94**(2), 213-217.
- Fernandez, L. A., Sola, I., Enjuanes, L. & de Lorenzo, V. (2000). Specific secretion of active single-chain Fv antibodies into the supernatants of *Escherichia coli* cultures by use of the hemolysin system. *Appl Environ Microbiol* **66**(11), 5024-9.
- Fu, Z., Hamid, S. B., Razak, C. N., Basri, M., Salleh, A. B. & Rahman, R. N. (2003). Secretory expression in *Escherichia coli* and single-step purification of a heat-stable alkaline protease. *Protein Expr Purif* **28**(1), 63-8.

- Geller, B., Zhu, H. Y., Cheng, S., Kuhn, A. & Dalbey, R. E. (1993). Charged residues render pro-OmpA potential dependent for initiation of membrane translocation. *J Biol Chem* **268**(13), 9442-7.
- Gentschev, I., Hess, J. & Goebel, W. (1990). Change in the cellular localization of alkaline phosphatase by alteration of its carboxy-terminal sequence. *Mol Gen Genet* **222**(2-3), 211-6.
- Georgiou, G., Shuler, M. L. & Wilson, D. B. (1988). Release of Periplasmic Enzymes and Other Physiological-Effects of Beta-Lactamase Overproduction in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **32**(6), 741-748.
- Gerard, F., Angelini, S. & Wu, L. F. (2002). Export of *Thermus thermophilus* cytoplasmic beta-glycosidase via the *E. coli* Tat pathway. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**(6), 533-8.
- Gill, D. R. & Salmond, G. P. (1990). The identification of the *Escherichia coli* ftsY gene product: an unusual protein. *Mol Microbiol* **4**(4), 575-83.
- Gottesman, S. (1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **30**, 465-506.
- Gross, J. & Englesberg, E. (1959). Determination of the order of mutational sites governing L-arabinose utilization in *Escherichia coli* B/r by transduction with phage Plbt. *Virology* **9**, 314-31.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P<sub>BAD</sub> promoter. *J Bacteriol* **177**(14), 4121-30.
- Hahnen, E., Znamenskaya, L., Koczan, D., Leshchinskaya, I. & Hobom, G. (2000). A novel secreted ribonuclease from *Bacillus intermedius*: gene structure and regulatory control. *Mol Gen Genet* **263**(4), 571-80.
- Hakkaart, M. J., Veltkamp, E. & Nijkamp, H. J. (1981). Protein H encoded by plasmid Clo DF13 involved in lysis of the bacterial host. I. Localisation of the gene and identification and subcellular localisation of the gene H product. *Mol Gen Genet* **183**(2), 318-25.
- Halfmann, G., Brailly, H., Bernadac, A., Montero-Julian, F. A., Lazdunski, C. & Baty, D. (1993). Targeting of interleukin-2 to the periplasm of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **139**(10), 2465-73.
- Hamilton, C. M., Aldea, M., Washburn, B. K., Babitzke, P. & Kushner, S. R. (1989). New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**(9), 4617-22.
- Hartley, R. W. (1977). Complementation of peptides of barnase, extracellular ribonuclease of *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Biol Chem* **252**(10), 3252-4.
- Hartley, R. W. (1988). Barnase and Barstar - Expression of Its Cloned Inhibitor Permits Expression of a Cloned Ribonuclease. *J Mol Biol* **202**(4), 913-915.
- Hartley, R. W. (1989). Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together. *Trends Biochem Sci* **14**(11), 450-4.

- Hartley, R. W., Both, V., Hebert, E. J., Homerova, D., Jucovic, M., Nazarov, V., Rybajlak, I. & Sevcik, J. (1996). Barstar inhibits extracellular ribonucleases of *Streptomyces* and allows their production from recombinant genes. *Protein and Peptide Letters* **3**(4), 225-231.
- Hatzixanthis, K., Clarke, T. A., Oubrie, A., Richardson, D. J., Turner, R. J. & Sargent, F. (2005). Signal peptide-chaperone interactions on the twin-arginine protein transport pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(24), 8460-8465.
- Hayashi, S. & Wu, H. C. (1985). Accumulation of prolipoprotein in *Escherichia coli* mutants defective in protein secretion. *J Bacteriol* **161**(3), 949-54.
- Heim, R., Prasher, D. C. & Tsien, R. Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26), 12501-4.
- Hendrickson, W., Stoner, C. & Schleif, R. (1990). Characterization of the *Escherichia coli* *araFGH* and *araJ* promoters. *J Mol Biol* **215**(4), 497-510.
- Hesterkamp, T., Hauser, S., Lutcke, H. & Bukau, B. (1996). *Escherichia coli* trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(9), 4437-41.
- Hill, C., Dodson, G., Heinemann, U., Saenger, W., Mitsui, Y., Nakamura, K., Borisov, S., Tischenko, G., Polyakov, K. & Pavlovsky, S. (1983). The Structural and Sequence Homology of a Family of Microbial Ribonucleases. *Trends Biochem Sci* **8**(10), 364-369.
- Hirashima, A., Wang, S. & Inouye, M. (1974). Cell-free synthesis of a specific lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane directed by purified messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**(10), 4149-53.
- Hoffman, C. S. & Wright, A. (1985). Fusions of secreted proteins to alkaline phosphatase: an approach for studying protein secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(15), 5107-11.
- Holland, I. B., Kenny, B., Steipe, B. & Pluckthun, A. (1990). Secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **182**, 132-43.
- Horazdovsky, B. F. & Hogg, R. W. (1989). Genetic reconstitution of the high-affinity *L*-arabinose transport system. *J Bacteriol* **171**(6), 3053-9.
- Hsiung, H. M., Cantrell, A., Luirink, J., Oudega, B., Veros, A. J. & Becker, G. W. (1989). Use of Bacteriocin Release Protein in *E. coli* for Excretion of Human Growth-Hormone into the Culture-Medium. *Bio-Technology* **7**(3), 267-271.
- Huang, S., Ratliff, K. S., Schwartz, M. P., Spenner, J. M. & Matouschek, A. (1999). Mitochondria unfold precursor proteins by unraveling them from their N-termini. *Nat Struct Biol* **6**(12), 1132-8.
- Hynds, P. J., Robinson, D. & Robinson, C. (1998). The sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malfolded proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* **273**(52), 34868-74.
- Izard, J. W. & Kendall, D. A. (1994). Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol Microbiol* **13**(5), 765-73.

- Jack, R. L., Buchanan, G., Dubini, A., Hatzixanthis, K., Palmer, T. & Sargent, F. (2004). Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins. *Embo J* **23**(20), 3962-72.
- Jack, R. L., Sargent, F., Berks, B. C., Sawers, G. & Palmer, T. (2001). Constitutive expression of *Escherichia coli* *tat* genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth. *J Bacteriol* **183**(5), 1801-4.
- Janeway, C. M., Xu, X., Murphy, J. E., Chaidaroglou, A. & Kantrowitz, E. R. (1993). Magnesium in the active site of *Escherichia coli* alkaline phosphatase is important for both structural stabilization and catalysis. *Biochemistry* **32**(6), 1601-9.
- Johnson, C. M. & Schleif, R. F. (1995). In vivo induction kinetics of the arabinose promoters in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**(12), 3438-42.
- Joly, J. C. & Wickner, W. (1993). The SecA and SecY subunits of translocase are the nearest neighbors of a translocating preprotein, shielding it from phospholipids. *Embo J* **12**(1), 255-63.
- Jones, R. N., Wilson, H. W. & Novick, W. J., Jr. (1982a). In vitro evaluation of pyridine-2-azop-dimethylaniline cephalosporin, a new diagnostic chromogenic reagent, and comparison with nitrocefin, cephacetrile, and other beta-lactam compounds. *J Clin Microbiol* **15**(4), 677-83.
- Jones, R. N., Wilson, H. W., Novick, W. J., Jr., Barry, A. L. & Thornsberry, C. (1982b). In vitro evaluation of CENTA, a new beta-lactamase-susceptible chromogenic cephalosporin reagent. *J Clin Microbiol* **15**(5), 954-8.
- Jongbloed, J. D., Martin, U., Antelmann, H., Hecker, M., Tjalsma, H., Venema, G., Bron, S., van Dijl, J. M. & Muller, J. (2000). TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway. *J Biol Chem* **275**(52), 41350-7.
- Jung, J. U., Gutierrez, C. & Villarejo, M. R. (1989). Sequence of an osmotically inducible lipoprotein gene. *J Bacteriol* **171**(1), 511-20.
- Kaderbhai, M. A., Ugochukwu, C. C., Lamb, D. C. & Kelly, S. L. (2000). Targeting of active human cytochrome P4501A1 (CYP1A1) to the periplasmic space of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **279**(3), 803-7.
- Kapust, R. B. & Waugh, D. S. (1999). *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* **8**(8), 1668-74.
- Kellermann, O. & Szmelcman, S. (1974). Active-Transport of Maltose in *Escherichia coli* K12 - Involvement of a Periplasmic Maltose Binding-Protein. *Eur J Biochem* **47**(1), 139-149.
- Kellermann, O. K. & Ferenci, T. (1982). Maltose-binding protein from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **90 Pt E**, 459-63.
- Kenny, B., Haigh, R. & Holland, I. B. (1991). Analysis of the haemolysin transport process through the secretion from *Escherichia coli* of PCM, CAT or beta-galactosidase fused to the Hly C-terminal signal domain. *Mol Microbiol* **5**(10), 2557-68.
- Kerr, M. K. & Churchill, G. A. (2001a). Experimental design for gene expression microarrays. *Biostatistics* **2**(2), 183-201.

- Kerr, M. K. & Churchill, G. A. (2001b). Statistical design and the analysis of gene expression microarray data. *Genet Res* **77**(2), 123-128.
- Kleist, S., Miksch, G., Hitzmann, B., Arndt, M., Friehs, K. & Flaschel, E. (2003). Optimization of the extracellular production of a bacterial phytase with *Escherichia coli* by using different fed-batch fermentation strategies. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**(5-6), 456-62.
- Korz, D. J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E. A. & Deckwer, W. D. (1995). Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **39**(1), 59-65.
- Laccetti, P., Spalletti-Cernia, D., Portella, G., De Corato, P., D'Alessio, G. & Vecchio, G. (1994). Seminal ribonuclease inhibits tumor growth and reduces the metastatic potential of Lewis lung carcinoma. *Cancer Res* **54**(16), 4253-6.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-5.
- Lazzaroni, J. C. & Portalier, R. C. (1981). Genetic and Biochemical Characterization of Periplasmic Leaky Mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **145**(3), 1351-1358.
- Lee, L. P. & Tidor, B. (2001). Barstar is electrostatically optimized for tight binding to barnase. *Nat Struct Biol* **8**(1), 73-6.
- Lee, N., Gielow, W., Martin, R., Hamilton, E. & Fowler, A. (1986). The organization of the *araBAD* operon of *Escherichia coli*. *Gene* **47**(2-3), 231-44.
- Li, Y., Chen, C. X., von Specht, B. U. & Hahn, H. P. (2002). Cloning and hemolysin-mediated secretory expression of a codon-optimized synthetic human interleukin-6 gene in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **25**(3), 437-47.
- Little, J. W. & Mount, D. W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* **29**(1), 11-22.
- Luirink, J., Clark, D. M., Ras, J., Verschoor, E. J., Stegehuis, F., de Graaf, F. K. & Oudega, B. (1989). pCloDF13-encoded bacteriocin release proteins with shortened carboxyl-terminal segments are lipid modified and processed and function in release of cloacin DF13 and apparent host cell lysis. *J Bacteriol* **171**(5), 2673-9.
- Luirink, J., de Graaf, F. K. & Oudega, B. (1987). Uncoupling of synthesis and release of cloacin DF13 and its immunity protein by *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **206**(1), 126-32.
- Luirink, J., Duim, B., de Gier, J. W. & Oudega, B. (1991). Functioning of the stable signal peptide of the pCloDF13-encoded bacteriocin release protein. *Mol Microbiol* **5**(2), 393-9.
- Luirink, J., Hayashi, S., Wu, H. C., Kater, M. M., de Graaf, F. K. & Oudega, B. (1988). Effect of a mutation preventing lipid modification on localization of the pCloDF13-encoded bacteriocin release protein and on release of cloacin DF13. *J Bacteriol* **170**(9), 4153-60.
- Luirink, J. & Sinning, I. (2004). SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3), 17-35.

- MacIntyre, S., Mutschler, B. & Henning, U. (1991). Requirement of the SecB chaperone for export of a non-secretory polypeptide in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **227**(2), 224-8.
- Maina, C. V., Riggs, P. D., Grandea, A. G., 3rd, Slatko, B. E., Moran, L. S., Tagliamonte, J. A., McReynolds, L. A. & Guan, C. D. (1988). An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* **74**(2), 365-73.
- Majander, K., Anton, L., Antikainen, J., Lang, H., Brummer, M., Korhonen, T. K. & Westerlund-Wikstrom, B. (2005). Extracellular secretion of polypeptides using a modified *Escherichia coli* flagellar secretion apparatus. *Nat Biotechnol* **23**(4), 475-81.
- Mandecki, W., Shallcross, M. A., Sowadski, J. & Tomazic-Allen, S. (1991). Mutagenesis of conserved residues within the active site of *Escherichia coli* alkaline phosphatase yields enzymes with increased kcat. *Protein Eng* **4**(7), 801-4.
- Martin, C., Richard, V., Salem, M., Hartley, R. & Mauguen, Y. (1999). Refinement and structural analysis of barnase at 1.5 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**(Pt 2), 386-98.
- Matsumoto, G., Mori, H. & Ito, K. (1998). Roles of SecG in ATP- and SecA-dependent protein translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23), 13567-72.
- Matsumoto, G., Yoshihisa, T. & Ito, K. (1997). SecY and SecA interact to allow SecA insertion and protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Embo J* **16**(21), 6384-93.
- Matsuyama, S., Yokota, N. & Tokuda, H. (1997). A novel outer membrane lipoprotein, LolB (HemM), involved in the LolA (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Embo J* **16**(23), 6947-55.
- McCracken, S. & Meighen, E. (1980). Functional and structural properties of immobilized subunits of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *J Biol Chem* **255**(6), 2396-404.
- Medintz, I. L. & Deschamps, J. R. (2006). Maltose-binding protein: a versatile platform for prototyping biosensing. *Curr Opin Biotechnol* **17**(1), 17-27.
- Meißner, D. (2005). Vergleichende Analyse der Sec- und Tat-abhängigen sekretorischen Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien als Wirtsorganismen. *Dissertation*. Heinrich Heine Universität Düsseldorf.
- Mergulhao, F. J., Monteiro, G. A., Larsson, G., Sanden, A. M., Farewell, A., Nystrom, T., Cabral, J. M. & Taipa, M. A. (2003). Medium and copy number effects on the secretion of human proinsulin in *Escherichia coli* using the universal stress promoters uspA and uspB. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**(5-6), 495-501.
- Miksch, G., Fiedler, E., Dobrowolski, P. & Friehs, K. (1997a). The *kil* gene of the ColE1 plasmid of *Escherichia coli* controlled by a growth-phase-dependent promoter mediates the secretion of a heterologous periplasmic protein during the stationary phase. *Arch Microbiol* **167**(2-3), 143-50.
- Miksch, G., Neitzel, R., Fiedler, E., Friehs, K. & Flaschel, E. (1997b). Extracellular production of a hybrid beta-glucanase from *Bacillus* by *Escherichia coli* under different cultivation conditions in shaking cultures and bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol* **47**(2), 120-6.

- Miller, A., Wang, L. & Kendall, D. A. (1998). Synthetic signal peptides specifically recognize SecA and stimulate ATPase activity in the absence of preprotein. *J Biol Chem* **273**(19), 11409-12.
- Miller, J. H. (1972). Assay of beta-Galactosidase. In "Experiments in Molecular Genetics" (J. H. Miller, ed.), pp. 352–355. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Minamino, T. & Namba, K. (2004). Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**(1-2), 5-17.
- Mori, H. & Cline, K. (2002). A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid Delta pH/Tat translocase. *J Cell Biol* **157**(2), 205-210.
- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H. & Winant, J. (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* **13**(12), 2656-62.
- Mould, R. M. & Robinson, C. (1991). A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* **266**(19), 12189-93.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
- Naglak, T. J., Hettwer, D. J. & Wang, H. Y. (1990). Chemical permeabilization of cells for intracellular product release. *Bioprocess Technol* **9**, 177-205.
- Neitzel, R. (1999). Verfahren zur extrazellulären Produktion rekombinanter Proteine mit Gram-negativen Bakterien. *Dissertation*. Universität Bielefeld.
- Neu, H. C. & Heppel, L. A. (1965). Release of Enzymes from *Escherichia coli* by Osmotic Shock and During Formation of Spheroplasts. *J Biol Chem* **240**(9), 3685-3692.
- NewEnglandBioLabs. (2006). pMAL™ Protein Fusion and Purification System Instruction Manual.
- Nikaido, H. (1992). Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol Microbiol* **6**(4), 435-42.
- Nikaido, H. (1993). Transport across the bacterial outer membrane. *J Bioenerg Biomembr* **25**(6), 581-9.
- Nishimura, S. & Nomura, M. (1958). Ribonuclease of *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta* **30**(2), 430-1.
- Nishiyama, K., Fukuda, A., Morita, K. & Tokuda, H. (1999). Membrane deinsertion of SecA underlying proton motive force-dependent stimulation of protein translocation. *Embo J* **18**(4), 1049-58.
- Nishiyama, K., Suzuki, T. & Tokuda, H. (1996). Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell* **85**(1), 71-81.
- O'Callaghan, C. H., Morris, A., Kirby, S. M. & Shingler, A. H. (1972). Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother* **1**(4), 283-8.

- Oresnik, I. J., Ladner, C. L. & Turner, R. J. (2001). Identification of a twin-arginine leader-binding protein. *Mol Microbiol* **40**(2), 323-31.
- Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. & Remington, S. J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**(5280), 1392-5.
- Oudega, B., Stegehuis, F., van Tiel-Menkveld, G. J. & de Graaf, F. K. (1982). Protein H encoded by plasmid CloDF13 is involved in excretion of cloacin DF13. *J Bacteriol* **150**(3), 1115-21.
- Oudega, B., Ykema, A., Stegehuis, F. & Degraaf, F. K. (1984). Detection and Subcellular-Localization of Mature Protein-H, Involved in Excretion of Cloacin-Df13. *Fems Microbiology Letters* **22**(2), 101-108.
- Paddon, C. J. & Hartley, R. W. (1987). Expression of *Bacillus amyloliquefaciens* extracellular ribonuclease (barnase) in *Escherichia coli* following an inactivating mutation. *Gene* **53**(1), 11-9.
- Paddon, C. J., Vasantha, N. & Hartley, R. W. (1989). Translation and processing of *Bacillus amyloliquefaciens* extracellular RNase. *J Bacteriol* **171**(2), 1185-7.
- Paetzel, M., Dalbey, R. E. & Strynadka, N. C. (1998). Crystal structure of a bacterial signal peptidase in complex with a beta-lactam inhibitor. *Nature* **396**(6707), 186-90.
- Pages, J. M., Anba, J. & Lazdunski, C. (1987). Conditions Leading to Secretion of a Normally Periplasmic Protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**(4), 1386-1390.
- Palmer, T., Sargent, F. & Berks, B. C. (2005). Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol* **13**(4), 175-80.
- Park, S. J., Georgiou, G. & Lee, S. Y. (1999). Secretory production of recombinant protein by a high cell density culture of a protease negative mutant *Escherichia coli* strain. *Biotechnol Prog* **15**(2), 164-167.
- Pommier, J., Mejean, V., Giordano, G. & Iobbi-Nivol, C. (1998). TorD, a cytoplasmic chaperone that interacts with the unfolded trimethylamine N-oxide reductase enzyme (TorA) in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **273**(26), 16615-20.
- Poritz, M. A., Bernstein, H. D., Strub, K., Zopf, D., Wilhelm, H. & Walter, P. (1990). An *E. coli* ribonucleoprotein containing 4.5S RNA resembles mammalian signal recognition particle. *Science* **250**(4984), 1111-7.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**(2), 229-33.
- Pugsley, A. P. (1984). The Ins and Outs of Colicins .1. Production, and Translocation across Membranes. *Microbiological Sciences* **1**(7), 168-175.
- Pugsley, A. P. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**(1), 50-108.
- Pugsley, A. P. & Cole, S. T. (1987). An unmodified form of the ColE2 lysis protein, an envelope lipoprotein, retains reduced ability to promote colicin E2 release and lysis of producing cells. *J Gen Microbiol* **133**(9), 2411-20.

- Pugsley, A. P., Francetic, O., Possot, O. M., Sauvonnet, N. & Hardie, K. R. (1997). Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria -a review. *Gene* **192**(1), 13-9.
- Pugsley, A. P. & Schwartz, M. (1983). A genetic approach to the study of mitomycin-induced lysis of *Escherichia coli* K-12 strains which produce colicin E2. *Mol Gen Genet* **190**(3), 366-72.
- Qiu, J., Swartz, J. R. & Georgiou, G. (1998). Expression of active human tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **64**(12), 4891-6.
- Randall, L. L., Topping, T. B., Hardy, S. J., Pavlov, M. Y., Freistroffer, D. V. & Ehrenberg, M. (1997). Binding of SecB to ribosome-bound polypeptides has the same characteristics as binding to full-length, denatured proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(3), 802-7.
- Ray, M. V., Meenan, C. P., Consalvo, A. P., Smith, C. A., Parton, D. P., Sturmer, A. M., Shields, P. P. & Mehta, N. M. (2002). Production of salmon calcitonin by direct expression of a glycine-extended precursor in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **26**(2), 249-59.
- Reeves, P. (1965). The Bacteriocins. *Bacteriol Rev* **29**, 24-45.
- Richmond, M. H. & Sykes, R. B. (1973). The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol* **9**, 31-88.
- Riggs, P. (2000). Expression and purification of recombinant proteins by fusion to maltose-binding protein. *Mol Biotechnol* **15**(1), 51-63.
- Rodrigue, A., Chanal, A., Beck, K., Muller, M. & Wu, L. F. (1999). Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. *J Biol Chem* **274**(19), 13223-8.
- Ruiz, N., Kahne, D. & Silhavy, T. J. (2006). Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat Rev Micro* **4**(1), 57-66.
- Rushizky, G. W., Greco, A. E., Sober, H. A. & Hartley, R. W. (1964). Studies on Characterization of Ribonucleases. *J Biol Chem* **239**(7), 2165-2169.
- Sabik, J. F., Suit, J. L. & Luria, S. E. (1983). cea-kil operon of the ColE1 plasmid. *J Bacteriol* **153**(3), 1479-85.
- Sandkvist, M. & Bagdasarian, M. (1996). Secretion of recombinant proteins by Gram-negative bacteria. *Curr Opin Biotechnol* **7**(5), 505-11.
- Sankaran, K. & Wu, H. C. (1994). Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* **269**(31), 19701-6.
- Santini, C. L., Bernadac, A., Zhang, M., Chanal, A., Ize, B., Blanco, C. & Wu, L. F. (2001). Translocation of jellyfish green fluorescent protein via the Tat system of *Escherichia coli* and change of its periplasmic localization in response to osmotic up-shock. *J Biol Chem* **276**(11), 8159-64.
- Santini, C. L., Ize, B., Chanal, A., Muller, M., Giordano, G. & Wu, L. F. (1998). A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *Embo J* **17**(1), 101-12.

- Sargent, F., Berks, B. C. & Palmer, T. (2002). Assembly of membrane-bound respiratory complexes by the Tat protein-transport system. *Arch Microbiol* **178**(2), 77-84.
- Sargent, F., Bogsch, E. G., Stanley, N. R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B. C. & Palmer, T. (1998). Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *Embo J* **17**(13), 3640-50.
- Sargent, F., Gohlke, U., De Leeuw, E., Stanley, N. R., Palmer, T., Saibil, H. R. & Berks, B. C. (2001). Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure. *Eur J Biochem* **268**(12), 3361-7.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**(2), 368-79.
- Schlegel, A., Bohm, A., Lee, S. J., Peist, R., Decker, K. & Boos, W. (2002). Network regulation of the *Escherichia coli* maltose system. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**(3), 301-7.
- Schleif, R. (1969). An *L*-arabinose binding protein and arabinose permeation in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **46**(1), 185-96.
- Schleif, R. (1992). DNA Looping. *Annual Review of Biochemistry* **61**, 199-223.
- Schleif, R. (2003). AraC protein: a love-hate relationship. *Bioessays* **25**(3), 274-82.
- Seabold, R. R. & Schleif, R. F. (1998). Apo-AraC actively seeks to loop. *J Mol Biol* **278**(3), 529-38.
- Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**, 223-39.
- Shokri, A., Sanden, A. M. & Larsson, G. (2003). Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**(6), 654-64.
- Shuman, H. A. (1982). Active transport of maltose in *Escherichia coli* K12. Role of the periplasmic maltose-binding protein and evidence for a substrate recognition site in the cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* **257**(10), 5455-61.
- Snijder, H. J. & Dijkstra, B. W. (2000). Bacterial phospholipase A: structure and function of an integral membrane phospholipase. *Biochim Biophys Acta* **1488**(1-2), 91-101.
- Snijder, H. J., Kingma, R. L., Kalk, K. H., Dekker, N., Egmond, M. R. & Dijkstra, B. W. (2001). Structural investigations of calcium binding and its role in activity and activation of outer membrane phospholipase A from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **309**(2), 477-89.
- Snijder, H. J., Ubarretxena-Belandia, I., Blaauw, M., Kalk, K. H., Verheij, H. M., Egmond, M. R., Dekker, N. & Dijkstra, B. W. (1999). Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. *Nature* **401**(6754), 717-21.
- Sone, M., Kishigami, S., Yoshihisa, T. & Ito, K. (1997). Roles of disulfide bonds in bacterial alkaline phosphatase. *J Biol Chem* **272**(10), 6174-8.

- Stanley, N. R., Palmer, T. & Berks, B. C. (2000). The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**(16), 11591-6.
- Stanley, N. R., Sargent, F., Buchanan, G., Shi, J., Stewart, V., Palmer, T. & Berks, B. C. (2002). Behaviour of topological marker proteins targeted to the Tat protein transport pathway. *Mol Microbiol* **43**(4), 1005-21.
- Stegehuis, F., van der Wal, F. J., Luirink, J. & Oudega, B. (1995). Expression of the pCloDF13 encoded bacteriocin release protein or its stable signal peptide causes early effects on protein biosynthesis and Mg<sup>2+</sup> transport. *Antonie Van Leeuwenhoek* **67**(3), 255-60.
- Stoner, C. & Schleif, R. (1983). The *araE* low affinity L-arabinose transport promoter. Cloning, sequence, transcription start site and DNA binding sites of regulatory proteins. *J Mol Biol* **171**(4), 369-81.
- Swartz, J. R. (2001). Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* **12**(2), 195-201.
- Telmer, P. G. & Shilton, B. H. (2003). Insights into the conformational equilibria of maltose-binding protein by analysis of high affinity mutants. *J Biol Chem* **278**(36), 34555-67.
- Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C. & Koronakis, V. (1998). Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *Embo J* **17**(22), 6487-6496.
- Thanassi, D. G. & Hultgren, S. J. (2000). Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* **12**(4), 420-430.
- Thomas, J. D., Daniel, R. A., Errington, J. & Robinson, C. (2001). Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **39**(1), 47-53.
- Tokugawa, K., Ishii, T., Nakamura, K., Masaki, H. & Uozumi, T. (1994a). A model system for the continuous production of a heterologous protein using a novel secretion promoting factor which operates in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **37**(1), 33-7.
- Tokugawa, K., Kakitani, M., Ishii, T., Nakamura, K., Masaki, H. & Uozumi, T. (1994b). A novel protein secretion factor from a *Vibrio* species which operates in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **35**(1), 69-76.
- Tokunaga, M., Loranger, J. M., Wolfe, P. B. & Wu, H. C. (1982). Prolipoprotein signal peptidase in *Escherichia coli* is distinct from the M13 procoat protein signal peptidase. *J Biol Chem* **257**(17), 9922-5.
- Torriani, A. (1968). Alkaline Phosphatase Subunits and Their Dimerization in Vivo. *J Bacteriol* **96**(4), 1200-1207.
- Torriani, A. & Rothman, F. (1961). Mutants of *Escherichia coli* Constitutive for Alkaline Phosphatase. *J Bacteriol* **81**(5), 835-836.
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509-44.

- Uchida, H., Naito, N., Asada, N., Wada, M., Ikeda, M., Kobayashi, H., Asanagi, M., Mori, K., Fujita, Y., Konda, K., Kusuhara, N., Kamioka, T., Nakashima, K. & Honjo, M. (1997). Secretion of authentic 20-kDa human growth hormone (20K hGH) in *Escherichia coli* and properties of the purified product. *J Biotechnol* **55**(2), 101-12.
- van den Elzen, P. J., Gaastra, W., Spelt, C. E., de Graaf, F. K., Veltkamp, E. & Nijkamp, H. J. (1980). Molecular structure of the immunity gene and immunity protein of the bacteriocinogenic plasmid Clo DF13. *Nucleic Acids Res* **8**(19), 4349-63.
- van der Wal, F., Tenhagen, C. M., Oudega, B. & Luirink, J. (1995a). Application of the pCloDF13 Bacteriocin Release Protein in the Release of Heterologous Proteins by *Escherichia coli* - Production of Plant Alpha-Galactosidase. *Biotechnol Lett* **17**(8), 815-820.
- van der Wal, F. J., Koningstein, G., ten Hagen, C. M., Oudega, B. & Luirink, J. (1998). Optimization of bacteriocin release protein (BRP)-mediated protein release by *Escherichia coli*: random mutagenesis of the pCloDF13-derived BRP gene to uncouple lethality and quasi-lysis from protein release. *Appl Environ Microbiol* **64**(2), 392-8.
- van der Wal, F. J., Luirink, J. & Oudega, B. (1995b). Bacteriocin release proteins: mode of action, structure, and biotechnological application. *FEMS Microbiol Rev* **17**(4), 381-99.
- van der Wal, F. J., Oudega, B., Kater, M. M., ten Hagen-Jongman, C. M., de Graaf, F. K. & Luirink, J. (1992). The stable BRP signal peptide causes lethality but is unable to provoke the translocation of cloacin DF13 across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **6**(16), 2309-18.
- van der Wal, F. J., ten Hagen, C. M., Oudega, B. & Luirink, J. (1995c). The stable bacteriocin release protein signal peptide, expressed as a separate entity, functions in the release of cloacin DF13. *FEMS Microbiol Lett* **131**(2), 173-7.
- van der Wal, F. J., ten Hagen-Jongman, C. M., Oudega, B. & Luirink, J. (1995d). Optimization of bacteriocin-release-protein-induced protein release by *Escherichia coli*: extracellular production of the periplasmic molecular chaperone FaeE. *Appl Microbiol Biotechnol* **44**(3-4), 459-65.
- van der Wal, F. J., Valent, Q. A., ten Hagen-Jongman, C. M., de Graaf, F. K., Oudega, B. & Luirink, J. (1994). Stability and function of the signal peptide of the pCloDF13-derived bacteriocin release protein. *Microbiology* **140** ( Pt 2), 369-78.
- van der Wolk, J. P., Fekkes, P., Boorsma, A., Huie, J. L., Silhavy, T. J. & Driessen, A. J. (1998). PriA4 prevents the rejection of signal sequence defective preproteins by stabilizing the SecA-SecY interaction during the initiation of translocation. *Embo J* **17**(13), 3631-9.
- Vieira, J. & Messing, J. (1991). New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene* **100**, 189-94.
- Voss, C. (2001). Neue Verfahren zur zur Produktion von Plasmid-DNA als Biopharmazeutikum. *Dissertation*. Universität Bielefeld.
- Voss, C., Lindau, D. & Flaschel, E. (2006). Production of recombinant RNase Ba and its application in downstream processing of plasmid DNA for pharmaceutical use. *Biotechnol Prog* **22**(3), 737-744.

- Wandersman, C. & Delepelaire, P. (1990). TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(12), 4776-80.
- Wang, Z. & Benkovic, S. J. (1998). Purification, characterization, and kinetic studies of a soluble *Bacteroides fragilis* metallo-beta-lactamase that provides multiple antibiotic resistance. *J Biol Chem* **273**(35), 22402-8.
- Watanabe, M. & Blobel, G. (1989). Cytosolic factor purified from *Escherichia coli* is necessary and sufficient for the export of a preprotein and is a homotetramer of SecB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(8), 2728-32.
- Weikert, C., Sauer, U. & Bailey, J. E. (1998). An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of secreted recombinant protein. *Biotechnol Bioeng* **59**(3), 386-391.
- Wexler, M., Bogsch, E. G., Klosgen, R. B., Palmer, T., Robinson, C. & Berks, B. C. (1998). Targeting signals for a bacterial Sec-independent export system direct plant thylakoid import by the delta pH pathway. *FEBS Lett* **431**(3), 339-42.
- Wexler, M., Sargent, F., Jack, R. L., Stanley, N. R., Bogsch, E. G., Robinson, C., Berks, B. C. & Palmer, T. (2000). TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export. *J Biol Chem* **275**(22), 16717-22.
- Wu, H. C. & Tokunaga, M. (1986). Biogenesis of lipoproteins in bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* **125**, 127-57.
- Xu, R., Du, P., Fan, J. J., Zhang, Q., Li, T. P. & Gan, R. B. (2002). High-level expression and secretion of recombinant mouse endostatin by *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **24**(3), 453-9.
- Yamada, M., Ebina, Y., Miyata, T., Nakazawa, T. & Nakazawa, A. (1982). Nucleotide-Sequence of the Structural Gene for Colicin-E1 and Predicted Structure of the Protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(9), 2827-2831.
- Yang, F., Moss, L. G. & Phillips, G. N., Jr. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **14**(10), 1246-51.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**(1), 103-19.
- Yu, P. & San, K. Y. (1992). Protein release in recombinant *Escherichia coli* using bacteriocin release protein. *Biotechnol Prog* **8**(1), 25-9.
- Zhang, G., Brokx, S. & Weiner, J. H. (2006). Extracellular accumulation of recombinant proteins fused to the carrier protein YebF in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **24**(1), 100-4.
- Zhang, X., Reeder, T. & Schleif, R. (1996). Transcription activation parameters at ara pBAD. *J Mol Biol* **258**(1), 14-24.
- Zor, T. & Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem* **236**(2), 302-8.

## 9 Anhang

### 9.1 Formelzeichen und Symbole

|                   |   |  |
|-------------------|---|--|
| a                 | (volumetrische) Aktivität                         | [U (mL <sup>-1</sup> )]                          |
| A <sub>x</sub>    | Absorption bei Wellenlänge x                      | [-]  |
| c                 | molare Konzentration                              | [M] / [mM] / [μM]                                |
| F <sub>F</sub>    | Volumenstrom der Zufütterungslösung               | [L h <sup>-1</sup> ]                             |
| g                 | Erdbeschleunigung (9,81)                          | [m s <sup>-2</sup> ]                             |
| m                 | Masse   | [g] / [mg]                                       |
| n                 | Drehfrequenz                                      | [min <sup>-1</sup> ]                             |
| N                 | Stickstoffquellenkonzentration                    | [g L <sup>-1</sup> ]                             |
| OD <sub>600</sub> | Optische Dichte bei 600 nm                        | [-]  |
| p                 | Absolutdruck                                      | [bar]  |
| P                 | aktivitätsbezogene Produktivität                  | [U mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]            |
| pO <sub>2</sub>   | relativer Sättigungsgrad des gelösten Sauerstoffs | [%]  |
| q                 | Koeffizient des Erhaltungsstoffwechsels           | [g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]             |
| RFU               | Relative Fluoreszenzeinheit                       | [-]  |
| S                 | Selektivität                                      | [mg g <sup>-1</sup> ]                            |
| S <sub>F</sub>    | Substratkonzentration in der Zufütterungslösung   | [g L <sup>-1</sup> ]                             |
| t                 | Zeit  | [h] / [min] / [s]                                |
| T                 | Temperatur  | [°C]   |
| t <sub>F</sub>    | Zeitpunkt des Zufütterungsbeginns                 | [h]  |
| t <sub>rel</sub>  | Zeit, relativ zu einem Bezugszeitpunkt            | [min]  |
| V                 | Volumen   | [L] / [mL] / [μL]                                |
| $\dot{V}$         | Volumenstrom                                      | [L min <sup>-1</sup> ] / [mL min <sup>-1</sup> ] |
| v <sub>lin</sub>  | lineare Fließgeschwindigkeit                      | [cm h <sup>-1</sup> ]                            |
| W <sub>a</sub>    | Aktivitätswiederfindungsrate                      | [%]  |
| X                 | Biotrockenmassekonzentration                      | [g L <sup>-1</sup> ]                             |
| x                 | Anteil/Gehalt                                     | [%] / [mg g <sup>-1</sup> ]                      |
| Y                 | Ausbeutekoeffizient                               | [-]  |
| ε <sub>x</sub>    | Absorptionskoeffizient bei Wellenlänge x          | [L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]          |
| λ                 | Wellenlänge                                       | [nm]   |
| μ                 | Spezifische Wachstumsgeschwindigkeit              | [h <sup>-1</sup> ]                               |
| ρ                 | Massenkonzentration                               | [g L <sup>-1</sup> ] / [mg L <sup>-1</sup> ]     |

## 9.2 Indices

|                 |   |
|-----------------|---|
| AP              | alkalische Phosphatase                    |
| Ara             | Arabinose                                 |
| B               | Satzkultivierung                          |
| Bla             | $\beta$ -Lactamase                        |
| BTM             | Biotrockenmasse                           |
| CO <sub>2</sub> | Kohlenstoffdioxid                         |
| Em              | Emission                                  |
| Ex              | Anregung                                  |
| ext             | extrazellulär                             |
| F               | Zufütterungslösung                        |
| Glu             | Glucose                                   |
| Gly             | Glycerin                                  |
| int             | intrazellulär                             |
| K               | Kultivierung                              |
| max             | maximal                                   |
| P               | Protein                                   |
| P/X             | Produktmasse bezogen auf Biomasse         |
| pDNA            | Plasmid-DNA                               |
| set             | voreingestellt                            |
| t <sub>F</sub>  | Zeitpunkt des Zufütterungsbeginns         |
| tot             | Gesamt                                    |
| X/S             | Biotrockenmasse bezogen auf Substratmasse |
| $\beta$ -Gal    | $\beta$ -Galaktosidase                    |

## 9.3 Abkürzungen

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| 4C1N                        | 4-Chlor-1-naphthol   |
| <i>A. victoria</i>          | <i>Aequorea victoria</i>   |
| AGE                         | Agarosegelelektrophorese   |
| AP                          | alkalische Phosphatase   |
| Ap                          | Ampicillin   |
| APS                         | Ammoniumpersulfat  |
| <i>ara</i>                  | Gene der Arabinoseverwertung /-aufnahme                                |
| ATP                         | Adenosintriphosphat  |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>                                      |
| Bar ( <i>bar</i> )          | Barnase(-Gen)  |
| Barnase                     | siehe RNase Ba   |
| BCIP                        | 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat                                       |
| Bla ( <i>bla</i> )          | $\beta$ -Lactamase(-Gen)   |
| bp                          | <i>base pairs</i> (Basenpaare)   |
| BPB                         | Bromphenolblau   |
| BRP                         | <i>bacteriocin release protein</i> (Bacteriocin freisetzendes Protein) |

|                      |  |
|----------------------|--|
| BTM                  | Biotrockenmasse  |
| CAT ( <i>cat</i> )   | Chloramphenicolacetyltransferase(-Gen)                                   |
| CIAP                 | <i>calf intestine alkaline phosphatase</i> (Kälberdarm alk. Phosphatase) |
| CloDF13              | Cloacin DF13   |
| Cm                   | Chloramphenicol  |
| ColE1                | Colicin E1   |
| ddH <sub>2</sub> O   | deionisiertes Wasser   |
| DEPC                 | Diethylpyrocarbonat  |
| DMF                  | Dimethylformamid   |
| DMSO                 | Dimethylsulfoxid   |
| DNA                  | <i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)                    |
| dNTP                 | Desoxyribonukleosidtriphosphat   |
| ds                   | doppelsträngig   |
| <i>E. coli</i>       | <i>Escherichia coli</i>  |
| EDTA                 | Ethylendinitrilotetraacetat  |
| <i>et al.</i>        | <i>et alii</i> (und andere)  |
| EtBr                 | Ethidiumbromid   |
| EtOH                 | Ethanol  |
| FPLC                 | <i>fast protein liquid chromatography</i>                                |
| GFP                  | grünfluoreszierendes Protein   |
| GFP <sub>uv</sub>    | GFP mit verstärkter Grünfluoreszenz                                      |
| GTP                  | Guanosintriphosphat  |
| HPLC                 | <i>high performance liquid chromatography</i>                            |
| HSG                  | Halbsynthetisches Glycerin(medium)                                       |
| HZDK                 | Hochzelldichtekultivierung   |
| IPTG                 | Isopropyl-β-D-Thiogalactosid   |
| kb                   | <i>kilo bases</i> (Kilobasen; 1000 Nukleotide)                           |
| kDa                  | Kilo Dalton; Molmasse  |
| LB                   | <i>lysogeny broth</i> ; bekannter als Luria-Bertani(-Medium)             |
| Lpp ( <i>lpp</i> )   | Mureinlipoprotein(-Gen)  |
| <i>malE</i>          | Gen des Maltosebindeprotein  |
| MBP                  | Maltosebindeprotein  |
| MCS                  | <i>multiple cloning site</i> (Multirestriktionsschnittstelle)            |
| mRNA                 | <i>messenger</i> (Boten-)RNA   |
| NBT                  | Nitroblau-Tetrazoliumchlorid   |
| OMPLA                | <i>outer membrane phospholipase A</i> (Phospholipase der äußeren         |
| p.a.                 | <i>per analysis</i> (zur Analyse)  |
| PAA                  | Polyacrylamid  |
| PAGE                 | Polyacrylamidgelelektrophorese   |
| PCR                  | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)              |
| pDNA                 | Plasmid-DNA  |
| PhoA ( <i>phoA</i> ) | alkalische Phosphatase(-Gen) aus <i>E. coli</i>                          |
| PID                  | Proportional-Integral-Differential(-Regelung)                            |
| pNP                  | para-Nitrophenol   |
| pNPP                 | para-Nitrophenylphosphat   |
| PVDF                 | Polyvinylidenfluorid   |
| r                    | resistent  |
| RFU                  | <i>relative fluorescence unit</i> , relative Fluoreszenzeinheit          |
| RNA                  | Ribonukleinsäure   |

|                       |  |
|-----------------------|--|
| RNase A               | Ribonuklease A aus Rinderpankreas  |
| RNase Ba <sup>s</sup> | Ribonuklease aus <i>B. amyloliquefaciens</i><br>sensitiv                 |
| SDS                   | <i>sodiumdodecylsulfat</i> , Natriumdodecylsulfat                        |
| Sec                   | <i>secretion (pathway)</i> ; genereller Sekretionspfad in <i>E. coli</i> |
| SGA                   | synthetisches Glycerin/Ammoniumsulfat(-Medium)                           |
| SP                    | Signalpeptid   |
| SRP                   | <i>signal recognition particle</i>                                       |
| ss                    | <i>single stranded</i> (einzelsträngig)                                  |
| SV                    | Säulenvolumen  |
| TAE                   | Tris-Acetat-EDTA(-Puffer)  |
| <i>Tat</i>            | <i>twin arginine translocation</i>                                       |
| TBS                   | <i>Tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)                 |
| TBS-T                 | TBS + Tween20  |
| Tc                    | Tetracyclin  |
| TEMED                 | N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin                                      |
| TMAO                  | Trimethylamin-N-Oxid   |
| Tris                  | Tris-(hydroxymethyl)-methylamin  |
| v/v                   | Volumen pro Volumen  |
| vvm                   | Volumen pro Volumen und Minute   |
| ZTM                   | Zelltrockenmasse   |

## 9.4 Präfixe

|        |  |
|--------|--|
| m...   | <i>mature</i> , reifes Protein nach Signalpeptidabspaltung (Bsp. mMBP) |
| prä... | Präprotein, Vorläuferprotein mit Signalpeptid (Bsp. präMBP)            |

## 9.5 Plasmide

Tabelle 9.1 führt die verwendeten Plasmide und deren zentrale Eigenschaften auf. Anhand von Tabelle 9.2 kann die Konstruktion der in Abschnitt 5 beschriebenen Plasmide nachvollzogen werden. Die zur Klonierung eingesetzten Primer sind in Abschnitt 9.6 aufgeführt. Abb. 9.1 zeigt schematische Karten der wichtigsten Plasmide dieser Arbeit.

Tabelle 9.1 Überblick aller verwendeten und konstruierten Plasmide.

| Plasmid <sup>a</sup>      | Basiert auf / Eigenschaften / Kommentar   | Quelle (Referenz)                                  |
|---------------------------|---|--|
| pHP45Ω-Cm                 | codiert Cm <sup>r</sup> ( <i>cat</i> ) flankiert von MCS  | Laborbestand (Fellay <i>et al.</i> , 1987)         |
| pUC19                     | P <sub>bla</sub> -Expression von β-Lactamase ( <i>bla</i> ) (GenBank™ Zugangs-Nr. L09137)   | Laborbestand (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985) |
| pMAK705                   | Temperamentsensitiver Replikationsursprung von pSC101 (Cohen & Chang, 1977) (GenBank™ Zugangs-Nr. AF519766)                       | Laborbestand (Hamilton <i>et al.</i> , 1989)       |
| pMAKbla                   | pMAK705; Cm <sup>r</sup> ( <i>cat</i> ) gegen Ap <sup>r</sup> ( <i>bla</i> ) substituiert   | Diese Arbeit                                       |
| pMAKblaAra                | pMAKbla; <i>araCBAD</i>   | Diese Arbeit                                       |
| <b>pAraKO</b>             | pMAKblaAra; <i>araBA</i> in <i>araCBAD</i> durch <i>cat</i> (Cm <sup>r</sup> ) substituiert ( <i>araC-ΔaraBA-cat-araD</i> )       | Diese Arbeit                                       |
| pBAD-GFPuv                | P <sub>BAD</sub> -Expression von <i>A. victoria</i> GFPuv ( <i>gfp</i> ) (GenBank™ Zugangs-Nr. U62637)                            | Fa. Clontech (Cramer <i>et al.</i> , 1996)         |
| pCH40                     | P <sub>bla</sub> -Expression von <i>E. coli</i> alkalischer Phosphatase ( <i>phoA</i> ); Tc <sup>r</sup>                          | Laborbestand (Hoffman & Wright, 1985)              |
| pMT1002                   | codiert <i>B. amyloliquefaciens</i> Barnase ( <i>bar</i> ) und Inhibitor Barstar ( <i>barstar</i> ) (GenBank™ Zugangs-Nr. M14442) | R. Hartley (Hartley <i>et al.</i> , 1996)          |
| pUK21                     | Km <sup>r</sup> (GenBank™ Zugangs-Nr. AF223640)   | Laborbestand (Vieira & Messing, 1991)              |
| p55                       | P <sub>bgf</sub> -Promotor (Borriss <i>et al.</i> , 1989) kloniert in pUC19 MCS ( <i>EcoRI/BamHI</i> )                            | G. Miksch (persönliche Kommunikation)              |
| p286                      | p55; SP <sub>torA</sub> kloniert hinter P <sub>bgf</sub> -Promotor in MCS ( <i>BamHI/XbaI</i> )                                   | G. Miksch (persönliche Kommunikation)              |
| pBS4                      | p286; Expression von <i>torAgfp</i> SP <sub>torA</sub> -GFP durch P <sub>bgf</sub>  | Diese Arbeit                                       |
| pBS13                     | pBS4; Ap <sup>r</sup> ( <i>bla</i> ) durch Km <sup>r</sup> von pUK21 substituiert   | Diese Arbeit                                       |
| pBS15                     | pBS13; P <sub>bgf</sub> -Promotor mit MCS   | Diese Arbeit                                       |
| pBS17                     | pBS13; P <sub>bgf</sub> -Promotor; Fusion an SP <sub>torA</sub> über MCS möglich  | Diese Arbeit                                       |
| pBS25                     | pBS15; P <sub>bgf</sub> -Expression von <i>malE</i> (MBP)   | Diese Arbeit                                       |
| pBS27                     | pBS17; P <sub>bgf</sub> -Expression von <i>torAmalE</i> (SP <sub>torA</sub> -MBP)   | Diese Arbeit                                       |
| pJL3                      | codiert Cloacin DF13 BRP ( <i>brp</i> )   | Fa. MoBiTec (Luirink <i>et al.</i> , 1987)         |
| pJL17lpp                  | codiert Cloacin DF13 LppBRP ( <i>lppbrp</i> )   | B. Oudega (van der Wal <i>et al.</i> , 1998)       |
| pColE1                    | codiert Colicin E1 BRP ( <i>kil</i> )   | Laborbestand (Sabik <i>et al.</i> , 1983)          |
| <b>pBAD18-Kan</b>         | P <sub>BAD</sub> -Promotor; Km <sup>r</sup> ;   | L. Guzman (Guzman <i>et al.</i> , 1995)            |
| pBAD18-KanLppBRP          | pBAD18-Kan; P <sub>BAD</sub> -Expression von CloDF13 LppBRP   | Diese Arbeit                                       |
| pBAD-LppBRPphoA           | pBAD18-KanLppBRP; P <sub>BAD</sub> -Expression von CloDF13 LppBRP; P <sub>bla</sub> -Expression von <i>phoA</i>                   | Diese Arbeit                                       |
| pBAD-LppBRPbla            | pBAD18-KanLppBRP; P <sub>BAD</sub> -Expression von CloDF13 LppBRP; P <sub>bla</sub> -Expression von <i>bla</i>                    | Diese Arbeit                                       |
| <b>pBAD-LppBRPphoAbla</b> | pBAD-LppBRPphoA; P <sub>BAD</sub> -Expression von CloDF13 LppBRP; P <sub>bla</sub> -Expression von <i>phoA</i> und <i>bla</i>     | Diese Arbeit                                       |

<sup>a</sup> In Abschnitt 5 beschriebene Plasmide sind fett dargestellt.

Tabelle 9.1 (fortgesetzt).

| Plasmid <sup>a</sup>           | Basiert auf / Eigenschaften / Kommentar  | Quelle (Referenz) |
|--------------------------------|--|-------------------|
| <b>pBAD-BRPphoAbla</b>         | pBAD-LppBRPphoAbla; P <sub>BAD</sub> -Expression von nativem CloDF13 BRP; P <sub>bla</sub> -Expression von <i>phoA</i> und <i>bla</i>                | Diese Arbeit      |
| <b>pBAD-KilE1phoAbla</b>       | pBAD-LppBRPphoAbla; P <sub>BAD</sub> -Expression von ColE1 BRP; P <sub>bla</sub> -Expression von <i>phoA</i> und <i>bla</i>                          | Diese Arbeit      |
| <b>pBAD-LppBRP-His6phoAbla</b> | pBAD-LppBRPphoA; P <sub>BAD</sub> -Expression von CloDF13 LppBRP-His <sub>6</sub> ; P <sub>bla</sub> -Expression von <i>phoA</i> und <i>bla</i>      | Diese Arbeit      |
| pBAD18-KanPhoA                 | pBAD18-Kan; P <sub>bla</sub> -Expression von <i>phoA</i>   | Diese Arbeit      |
| <b>pBAD18-KanPhoAbla</b>       | pBAD18-KanPhoA; P <sub>bla</sub> -Expression von <i>phoA</i> und <i>bla</i>  | Diese Arbeit      |
| <b>pLppBRP-AP</b>              | pBAD-LppBRPbla; P <sub>BAD</sub> -Expression von LppBRP-AP; P <sub>bla</sub> -Expression von <i>bla</i>  | Diese Arbeit      |
| <b>pLppBRP-Bla</b>             | pBAD-LppBRPphoA; P <sub>BAD</sub> -Expression von LppBRP-Bla; P <sub>bla</sub> -Expression von <i>phoA</i>   | Diese Arbeit      |
| <b>pLppBRP-Bar</b>             | pBAD-LppBRPphoAbla; P <sub>BAD</sub> -Expression von LppBRP-Barnase; P <sub>bla</sub> -Expression von <i>phoA</i> und <i>bla</i>                     | Diese Arbeit      |
| <b>pLppBRP-MBP</b>             | pBAD-LppBRPphoAbla; P <sub>BAD</sub> -Expression von LppBRP-MBP; P <sub>bla</sub> -Expression von <i>phoA</i> und <i>bla</i>                         | Diese Arbeit      |
| <b>pBAD-LppBRPmalE</b>         | pBAD18-KanLppBRP; P <sub>BAD</sub> -Expression von LppBRP; P <sub>bgf</sub> -Expression von <i>malE</i> (MBP)  | Diese Arbeit      |
| <b>pBAD-LppBRPtorAmalE</b>     | pBAD18-KanLppBRP; P <sub>BAD</sub> -Expression von LppBRP; P <sub>bgf</sub> -Expression von <i>torAmalE</i> (SP <sub>torA</sub> -MBP)                | Diese Arbeit      |
| <b>pBAD-LppBRPtorAgfp</b>      | pBAD18-KanLppBRP; P <sub>BAD</sub> -Expression von LppBRP; P <sub>bgf</sub> -Expression von <i>torAgfp</i> (SP <sub>torA</sub> -GFP)                 | Diese Arbeit      |
| <b>BAD-LppBRPmalEbar</b>       | pBAD18-KanLppBRPmalE; P <sub>BAD</sub> -Expression von LppBRP; P <sub>bgf</sub> -Expression von <i>malEbar</i> (MBP-Barnase)                         | Diese Arbeit      |
| <b>pBAD-LppBRPtorAmalEbar</b>  | pBAD18-KanLppBRPmalE; P <sub>BAD</sub> -Expression von LppBRP; P <sub>bgf</sub> -Expression von <i>torAmalEbar</i> (SP <sub>torA</sub> -MBP-Barnase) | Diese Arbeit      |
| <b>pBAD-LppBRPmalEphoA</b>     | pBAD18-KanLppBRPmalE; P <sub>BAD</sub> -Expression von LppBRP; P <sub>bgf</sub> -Expression von <i>malEphoA</i> (MBP-AP)                             | Diese Arbeit      |
| <b>pBAD-LppBRPtorAmalEphoA</b> | pBAD18-KanLppBRPmalE; P <sub>BAD</sub> -Expression von LppBRP; P <sub>bgf</sub> -Expression von <i>torAmalEphoA</i> (SP <sub>torA</sub> -MBP-AP)     | Diese Arbeit      |
| <b>pBAD-LppBRPtorAmalEgfp</b>  | pBAD18-KanLppBRPmalE; P <sub>BAD</sub> -Expression von LppBRP; P <sub>bgf</sub> -Expression von <i>torAmalEgfp</i> (SP <sub>torA</sub> -MBP-GFP)     | Diese Arbeit      |

<sup>a</sup> In Abschnitt 5 beschriebene Plasmide sind fett dargestellt.

Tabelle 9.2 Konstruktion der Plasmide.

| Plasmid                 | Vektor             | Insert <sup>a</sup>  | Schnittstellen <sup>b</sup> |
|-------------------------|--------------------|--|-----------------------------|
| pMAKbla                 | pMAK705            | <i>EcoRI-bla-EcoRI</i> -PCR-Fragment (Primer 1&2);<br>Template: pUC19                                  | <i>EcoRI</i>                |
| pMAKblaAra              | pMAKbla            | <i>XbaI-araCBAD-SacI</i> - PCR-Fragment (Primer 3&4);<br>Template: genom. DNA ( <i>E. coli</i> MG1655) | <i>XbaI/SacI</i>            |
| pAraKO                  | pMAKblaAra         | <i>BamHI-cat-BamHI</i> -Fragment aus pHP45Ω-Cm   | <i>BamHI</i>                |
| pBS4                    | p286               | <i>XbaI-gfp-PstI</i> -PCR-Fragment (Primer 5&6);<br>Template: pBAD-GFPuv                               | <i>XbaI/PstI</i>            |
| pBS13                   | pBS4               | <i>PsiI-kan<sup>r</sup>-SphI</i> -Fragment aus pUK21   | <i>SspI/SphI</i>            |
| pBS15                   | pBS13              | <i>EcoRI-P<sub>bgr</sub>-PstI</i> -Fragment aus p55  | <i>EcoRI/PstI</i>           |
| pBS17                   | pBS13              | <i>EcoRI-P<sub>bgr</sub>-SP<sub>TorA</sub>-PstI</i> -Fragment aus p286                                 | <i>EcoRI/PstI</i>           |
| pBS25                   | pBS15              | <i>BamHI-malE-PstI</i> -PCR-Fragment (Primer 7&9);<br>Template: genom. DNA ( <i>E. coli</i> MG1655)    | <i>BamHI/PstI</i>           |
| pBS27                   | pBS17              | <i>XbaI-malE-PstI</i> -PCR-Fragment (Primer 8&9);<br>Template: genom. DNA ( <i>E. coli</i> MG1655)     | <i>XbaI/PstI</i>            |
| pBAD18-KanLppBRP        | pBAD18-Kan         | <i>EcoRI-lppbrp-SalI</i> -PCR-Fragment (Primer 10&11);<br>Template: pJL17lpp                           | <i>EcoRI/SalI</i>           |
| pBAD-LppBRPphoA         | pBAD18-KanLppBRP   | <i>Eco47III-phoA-NdeI</i> -PCR-Fragment (Primer 12&13);<br>Template: pCH40                             | <i>Eco47III/NdeI</i>        |
| pBAD-LppBRPbla          | pBAD-LppBRPphoA    | <i>Eco47III-bla-NdeI</i> -PCR-Fragment (Primer 20&15);<br>Template: pUC19                              | <i>Eco47III/NdeI</i>        |
| pBAD-LppBRPphoAbla      | pBAD-LppBRPphoA    | <i>NdeI-bla-NdeI</i> -PCR-Fragment (Primer 14&15);<br>Template: pUC19                                  | <i>NdeI</i>                 |
| pBAD-BRPphoAbla         | pBAD-LppBRPphoAbla | <i>NheI-brp-SalI</i> -PCR-Fragment (Primer 16&11);<br>Template: pJL3                                   | <i>NheI/SalI</i>            |
| pBAD-KilCoIE1phoAbla    | pBAD-LppBRPphoAbla | <i>NheI-brp-SalI</i> -PCR-Fragment (Primer 17&18);<br>Template: pCoIE1                                 | <i>NheI/SalI</i>            |
| pBAD-LppBRP-His6phoAbla | pBAD-LppBRPphoAbla | <i>NheI-lppbrp-his6-SalI</i> -PCR-Fragment (Primer 16&19);<br>Template: pCoIE1                         | <i>NheI/SalI</i>            |
| pBAD18-KanPhoA          | pBAD18-Kan         | <i>Eco47III-phoA-NdeI</i> -Fragment aus pBAD-LppBRPphoA  | <i>Eco47III/NdeI</i>        |
| pBAD18-KanPhoAbla       | pBAD18-KanPhoA     | <i>NdeI-bla-NdeI</i> -PCR-Fragment (Primer 14&15);<br>Template: pUC19                                  | <i>NdeI</i>                 |
| pLppBRP-AP              | pBAD-LppBRPbla     | <i>HpaI-phoA-PstI</i> -PCR-Fragment (Primer 21&22);<br>Template: pCH40                                 | <i>HpaI/PstI</i>            |
| pLppBRP-Bla             | pBAD-LppBRPphoA    | <i>HpaI-bla-SalI</i> -PCR-Fragment (Primer 23&24);<br>Template: pUC19                                  | <i>HpaI/SalI</i>            |
| LppBRP-Bar              | pBAD-LppBRPphoAbla | <i>HpaI-bar-barstar-SalI</i> -PCR-Fragment (Primer 25&26);<br>Template: pMT1002                        | <i>HpaI/SalI</i>            |
| pLppBRP-MBP             | pBAD-LppBRPphoAbla | <i>HpaI-malE-SalI</i> -PCR-Fragment (Primer 27&28);<br>Template: genom. DNA ( <i>E. coli</i> MG1655)   | <i>HpaI/SalI</i>            |
| pBAD-LppBRPtorAgfp      | pBAD18-KanLppBRP   | <i>Eco47III-torAgfp-NdeI</i> -PCR-Fragment (Primer 29&30);<br>Template: pBS13                          | <i>Eco47III/NdeI</i>        |
| pBAD-LppBRPmalE         | pBAD18-KanLppBRP   | <i>Eco47III-malE-NdeI</i> -PCR-Fragment (Primer 29&30);<br>Template: pBS25                             | <i>Eco47III/NdeI</i>        |
| pBAD-LppBRPtorAmalE     | pBAD18-KanLppBRP   | <i>Eco47III-torAmalE-NdeI</i> -PCR-Fragment (Primer 29&30);<br>Template: pBS27                         | <i>Eco47III/NdeI</i>        |

<sup>a</sup> Auf den *Inserts* codierte Gene sind fett dargestellt.

<sup>b</sup> Schnittstellen des Vektors, die zur Klonierung genutzt wurden.

Tabelle 9.2 (fortgesetzt).

| Plasmid                 | Vektor          | Insert <sup>a</sup>  | Schnittstellen <sup>b</sup>    |
|-------------------------|-----------------|--|--------------------------------|
| pBAD-LppBRPmalEbar      | pBAD-LppBRPmalE | <i>Eco</i> 47III- <b>malE</b> - <i>Sal</i> I-PCR-Fragment (Primer 29&31); <i>Template</i> : pBS25<br>ligiert über <i>Sal</i> I mit<br><i>Sal</i> I- <b>bar-barstar</b> - <i>Spe</i> I-PCR-Fragment (Primer 32&33); <i>Template</i> : pBS25     | <i>Eco</i> 47III/ <i>Spe</i> I |
| pBAD-LppBRPtorAmalEbar  | pBAD-LppBRPmalE | <i>Eco</i> 47III- <b>torAmalE</b> - <i>Sal</i> I-PCR-Fragment (Primer 29&31); <i>Template</i> : pBS27<br>ligiert über <i>Sal</i> I mit<br><i>Sal</i> I- <b>bar-barstar</b> - <i>Spe</i> I-PCR-Fragment (Primer 32&33); <i>Template</i> : pBS25 | <i>Eco</i> 47III/ <i>Spe</i> I |
| pBAD-LppBRPmalEphoA     | pBAD-LppBRPmalE | <i>Eco</i> 47III- <b>malE</b> - <i>Sal</i> I-PCR-Fragment (Primer 29&31); <i>Template</i> : pBS25<br>ligiert über <i>Sal</i> I mit<br><i>Sal</i> I- <b>phoA</b> - <i>Spe</i> I-PCR-Fragment (Primer 34&35);<br><i>Template</i> : pCH40         | <i>Eco</i> 47III/ <i>Spe</i> I |
| pBAD-LppBRPtorAmalEphoA | pBAD-LppBRPmalE | <i>Eco</i> 47III- <b>torAmalE</b> - <i>Sal</i> I-PCR-Fragment (Primer 29&31); <i>Template</i> : pBS27<br>ligiert über <i>Sal</i> I mit<br><i>Sal</i> I- <b>phoA</b> - <i>Spe</i> I-PCR-Fragment (Primer 34&35);<br><i>Template</i> : pCH40     | <i>Eco</i> 47III/ <i>Spe</i> I |
| pBAD-LppBRPtorAmalEgfp  | pBAD-LppBRPmalE | <i>Eco</i> 47III- <b>torAmalE</b> - <i>Sal</i> I-PCR-Fragment (Primer 29&31); <i>Template</i> : pBS27<br>ligiert über <i>Sal</i> I mit<br><i>Sal</i> I- <b>gfp</b> - <i>Spe</i> I-PCR-Fragment (Primer 36&37);<br><i>Template</i> : pCH40      | <i>Eco</i> 47III/ <i>Spe</i> I |

<sup>a</sup> Auf den *Inserts* codierte Gene sind fett dargestellt.

<sup>b</sup> Schnittstellen des Vektors, die zur Klonierung genutzt wurden.

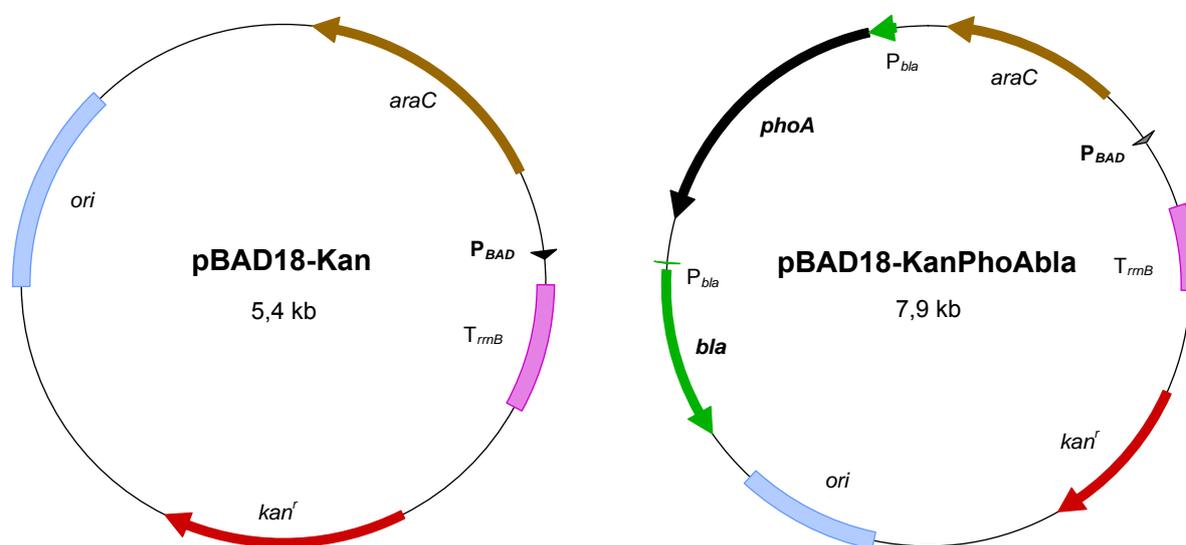


Abb. 9.1 (Legende auf Seite 171).

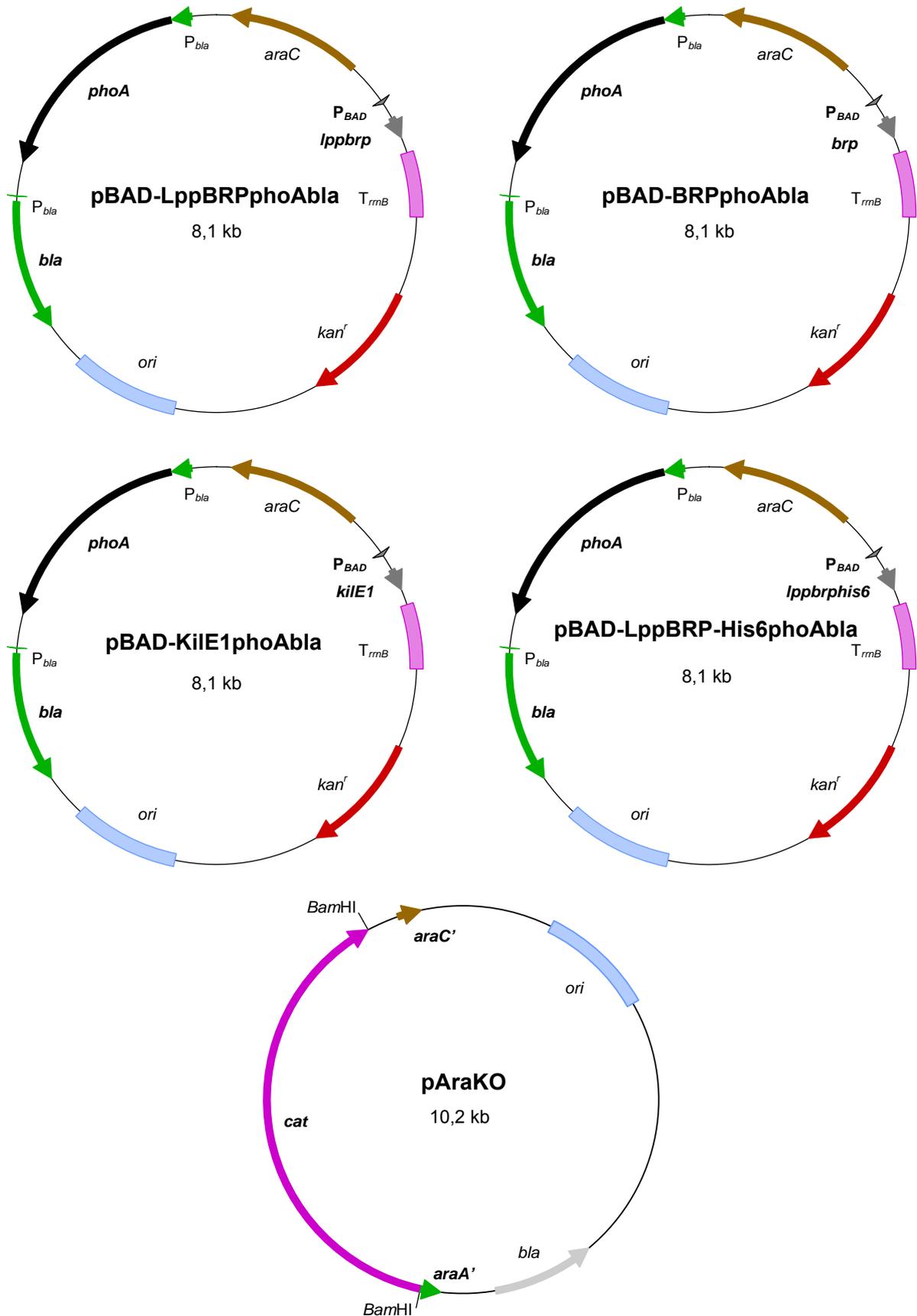


Abb. 9.1 (Legende auf Seite 171).

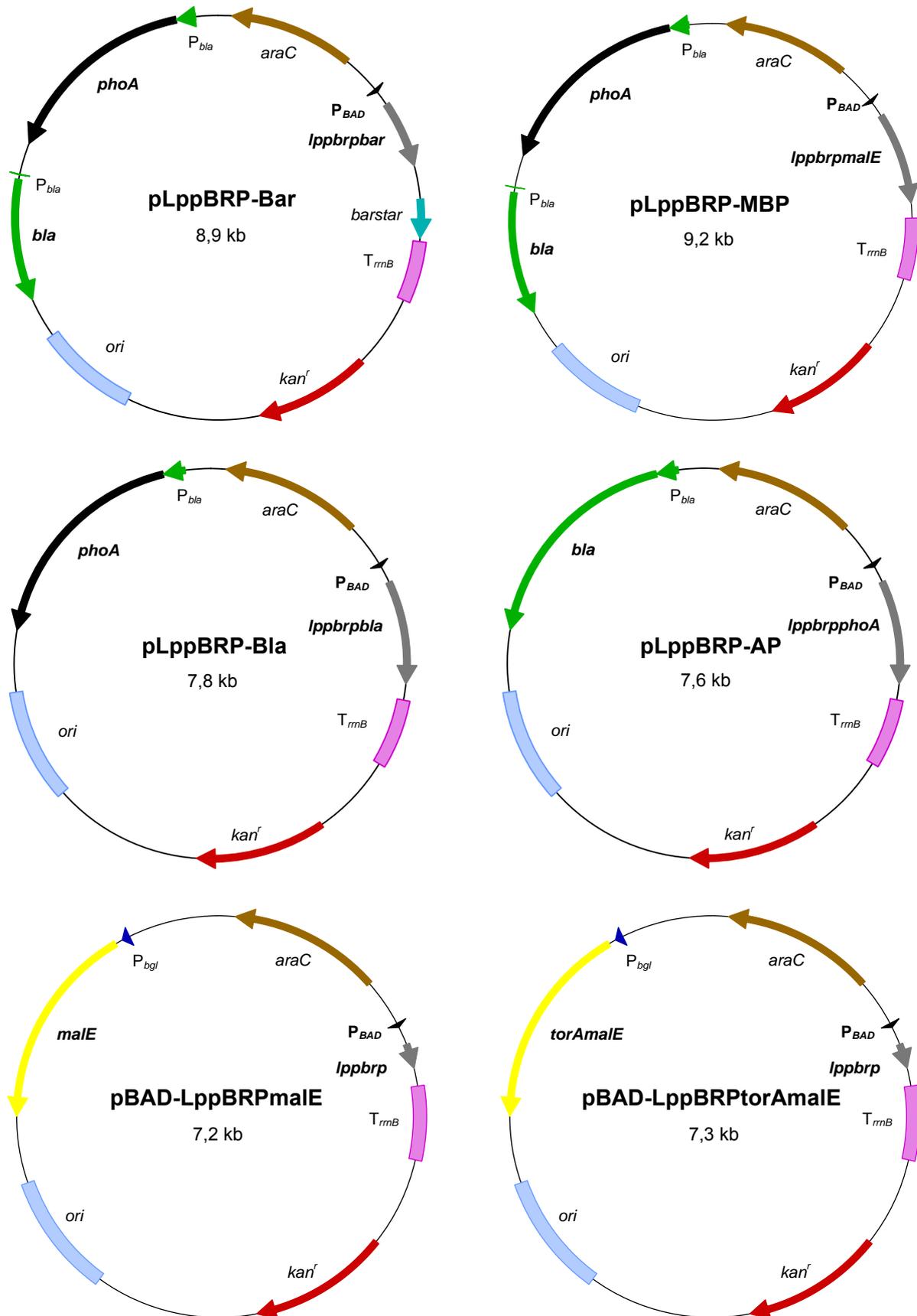


Abb. 9.1 (Legende auf Seite 171).

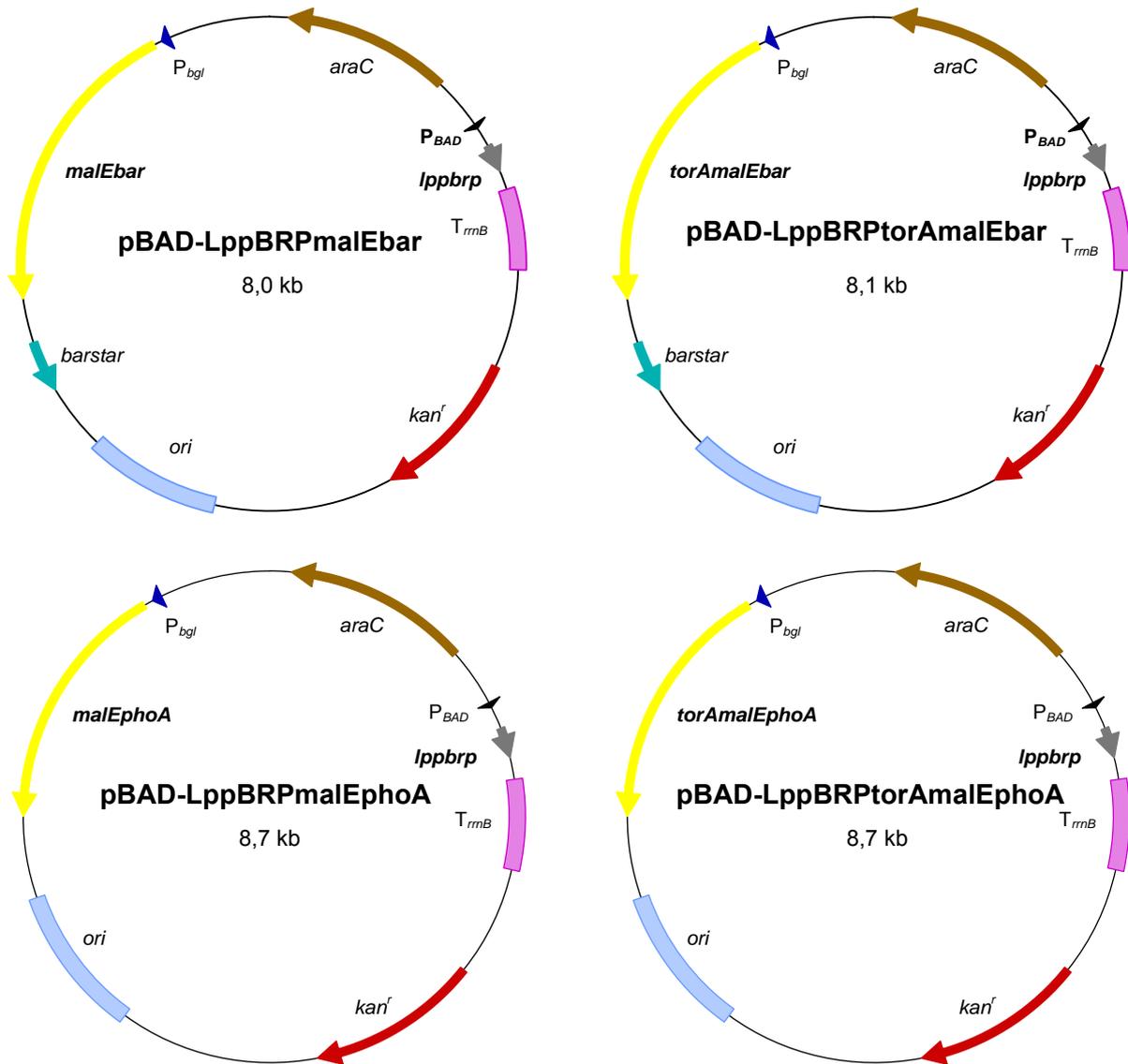
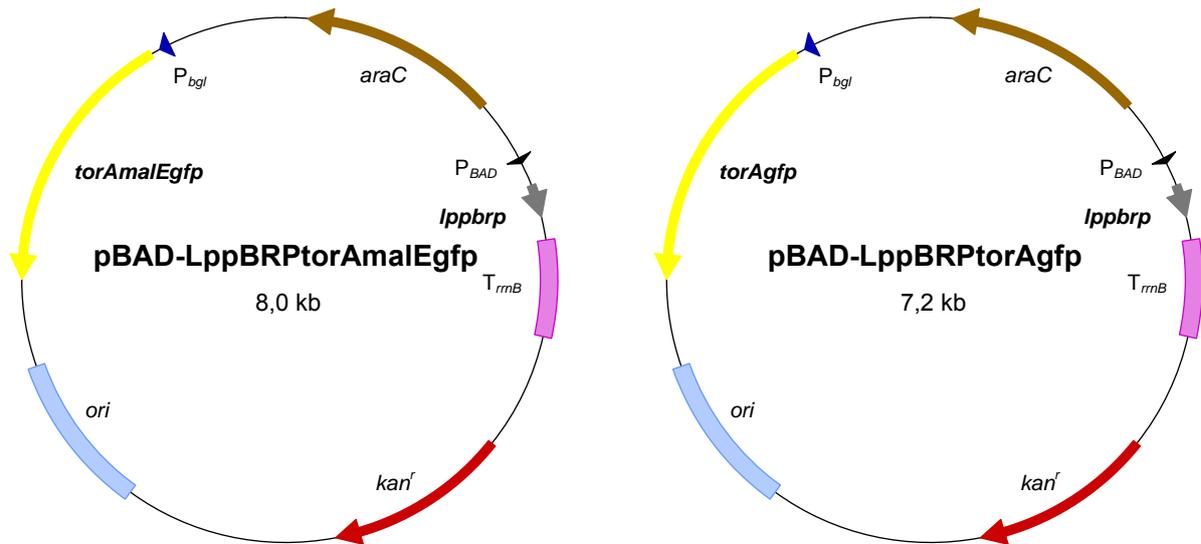


Abb. 9.1 (Legende auf Seite 171).



**Abb. 9.1** Schematische Karten der wichtigsten Plasmide dieser Arbeit (vgl. Tabelle 9.1).  $P_{BAD}$ , *araBAD*-Promotor (Arabinose-induzierbar);  $T_{rrnB}$ , *rrnB*-Transkriptionsterminator; *araC*, Regulatorprotein für  $P_{BAD}$ ; *kan<sup>r</sup>*, Kanamycinresistenzgen; *ori*, Replikationsursprung; *brp*, Cloacin DF13 BRP; *lppbrp*, signalpeptidmodifiziertes Cloacin DF13 BRP (LppBRP); *kilE1*, Colicin E1 BRP; *lppbrphis6*, LppBRP-His<sub>6</sub>; *lppbrpbar*, LppBRP-Bar; *lppbrpmaIE*, LppBRP-MBP; *lppbrpbla*, LppBRP-Bla; *lppbrpphoA*, LppBRP-AP;  $P_{bla}$ , konstitutiver Promotor der  $\beta$ -Lactamase;  $P_{bgl}$ , konstitutiver Promotor der  $\beta$ -Glucanase aus *B. amyloliquefaciens*; *phoA*, alkalische Phosphatase (AP); *bla*,  $\beta$ -Lactamase (Bla); *malE*, Maltosebindprotein (MBP); *torAmalE*,  $SP_{TorA}$ -modifiziertes MBP; *malEbar*, MBP-Bar-Hybridprotein; *torAmalEbar*,  $SP_{TorA}$ -modifiziertes MBP-Bar-Hybridprotein; *malEphoA*, MBP-AP-Hybridprotein; *torAmalEphoA*,  $SP_{TorA}$ -modifiziertes MBP-AP-Hybridprotein; *torAmalEgfp*,  $SP_{TorA}$ -modifiziertes MBP-GFP-Hybridprotein; *torAgfp*,  $SP_{TorA}$ -modifiziertes GFP. Zentrale Bestandteile der Plasmide sind fett hervorgehoben. Die Plasmidkarten sind nicht maßstabsgetreu.

## 9.6 Oligonukleotide (Primer)

Im den folgenden Tabellen sind die in der Arbeit verwendeten Primer aufgeführt, welche von den Firmen Invitrogen, Roth und Sigma bezogen wurden. Die Orientierung der Hybridisierung ist durch + (vorwärts) und - (rückwärts) gekennzeichnet.

**Tabelle 9.3 Primer für die molekulare Klonierung.**

| Nr. | Bezeichnung                   | Sequenz (5' → 3') <sup>a</sup>  | Orientierung |
|-----|-------------------------------|---|--------------|
| 1   | Bla up EcoRI                  | TTT <u>GAATTC</u> CGAAATGTGCGCGGAACCC                                 | +            |
| 2   | Bla down EcoRI                | TTT <u>GAATTC</u> CGGTCTGACGCTCAGTGGAACG                              | -            |
| 3   | Ara up XbaI                   | AAATCTAGACCCGGTCGGCAGACAAATTC   | +            |
| 4   | Ara down SacI                 | AAAGAGCTCCGCCAGGTTGGCTTCTAATAC  | -            |
| 5   | XbaI GFPuv -fMet Up           | AAATCTAGAGCTAGCAAAGGAGAAGAAC  | +            |
| 6   | BADGFP2                       | TAATACTGCAGTTATTTGTAGAGCTCATC   | -            |
| 7   | malE +ss up BamHI             | AAAGGATCCAAGGACCATAGATTATGAAAA  | +            |
| 8   | malE -ss up XbaI              | AAATCTAGAAAAATCGAAGAAGGTAAACTG  | +            |
| 9   | malE down PstI                | TTTCTGCAGCATTTCACAGCATTACTTGGT  | -            |
| 10  | CloDF13 up EcoRI              | AAA <u>GAATTC</u> GGATGAGTTGAAATACAGG                                 | +            |
| 11  | ColE1 BRP down Sall           | TTT <u>GTCGAC</u> GCCAGTTACCTTCGGAAAAA                                | -            |
| 12  | phoA+Pbla up (Eco47III)       | TTTTAGCGCITAAATGGTTTCTTAGACGTCA                                       | +            |
| 13  | phoA+Pbla down (NdeI)         | TTTAA <u>CATATG</u> AAAAAACCCAGACCGAAAAGC                             | -            |
| 14  | bla nativ+Pbla up (NdeI)      | TTTTT <u>CATATG</u> TTGTTTATTTTTCTAAATA                               | +            |
| 15  | bla nativ+Pbla down (NdeI)    | TTTTT <u>CATATG</u> GAAGTTTTAAATCAATCTA                               | -            |
| 16  | CloDF13 BRP up NheI           | ACTGAGCTAGCGGATGAGTTGAAATACAGGC                                       | +            |
| 17  | ColE1 BRP up NheI             | ACGTC <u>GCTAGC</u> TTTTATAAGGATCGAGTTATG                             | +            |
| 18  | ColE1 BRP down (Sall)         | TTT <u>GTCGAC</u> GCCAGTTACCTTCGGAAAAA                                | -            |
| 19  | CloDF13 LppBRP-His6 down Sall | ACTG <u>GTCGACTT</u> AGTGATGGTGATGGTGATGGT-<br>TAACCGCGATCCCCGTCAGTTC | -            |
| 20  | bla nativ+Pbla up (Eco47III)  | TTTTAGCGCITGTTTATTTTTCTAAATAC   | +            |
| 21  | mPhoA up (HpaI)               | TTTGTTAACCAGGGCGATATTACTGCACCC  | +            |
| 22  | PhoA down (PstI)              | TTTCTGCAGTTATTTTCAGCCCCAGAGCGG  | -            |
| 23  | mBla up (HpaI)                | CATGTTAACCACCCAGAAACGCTGGTGAAAG                                       | +            |
| 24  | Bla down (Sall)               | ACGGT <u>CGACTT</u> ACCAATGCTTAATCAGTG                                | -            |
| 25  | mBar up (HpaI)                | TGCAGTTAACCACAGGTTATCAACACGTTTG                                       | +            |
| 26  | Barstar Down (Sall)           | CATG <u>GTCGACTT</u> AAGAAAGTATGATGGTGATG                             | -            |
| 27  | mMalE Up (HpaI)               | TGCAGTTAACAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATC                                 | +            |

<sup>a</sup> Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Die fett dargestellten Basen von Primer Nr. 19 führen ein Hexahistidin an den C-Terminus des LppBRP ein.

**Tabelle 9.3** (fortgesetzt).

| Nr. | Bezeichnung             | Sequenz (5' → 3') <sup>a</sup>              | Orientierung |
|-----|-------------------------|---|--------------|
| 28  | MalE Down (Sall)        | CATG <u>GTCGAC</u> TTACTTGGTGATACGAGTCTG    | -            |
| 29  | Pbgla+MCS up (Eco47III) | TTTT <u>AGCGC</u> ICGCTGCACTATTATCGATTT     | +            |
| 30  | Pbgla+MCS down (NdeI)   | TTTTT <u>CATATG</u> CCAGGCTTTACTACTTTAT     | -            |
| 31  | MalE down2 Sall         | ACGT <u>GTCGAC</u> CTTGGTGATACGAGTCTGC      | -            |
| 32  | Barnase up Sall         | ACGT <u>GTCGAC</u> GCACAGGTTATCAACACGTTT    | +            |
| 33  | Barnase down NdeI Spel  | T <u>ACTAGTCATATG</u> GTATTAAGAAAGTATGATGG  | -            |
| 34  | mPhoA up Sall           | ACGT <u>GTCGAC</u> CAGGGCGATATTACTGCAC      | +            |
| 35  | mPhoA down NdeI Spel    | T <u>ACTAGTCATATG</u> CGCGGTTTTATTTTCAGCCCC | -            |
| 36  | GFPuv up (Sall)         | ACGT <u>GTCGAC</u> GCTAGCAAAGGAGAAGAACT     | +            |
| 37  | GFPuv Down (SpeI)       | ACGT <u>ACTAGT</u> TTTATTGTAGAGCTCATCCATG   | -            |

<sup>a</sup> Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

**Tabelle 9.4 Primer für die PCR-Analyse und DNA-Sequenzierung**

| Nr. | Bezeichnung               | Sequenz (5' → 3')    | Orientierung | Kommentar   |
|-----|---------------------------|----------------------|--------------|---|
| A   | Ara PCR-Test up           | TATTGACGGCCAGTTAAG   | +            | Zum Nachweis der $\Delta$ araBA-cat-Mutation in <i>E. coli</i> Ara1655                          |
| B   | Ara PCR-Test down         | ATGGTGCCGTAGAAATAG   | -            |   |
| C   | Seq Ara up 2 (SA2U)       | CTATAATCACGGCAGAAAAG | +            | Flankieren $\Delta$ araBA-cat-Mutation in <i>E. coli</i> Ara1655                                |
| D   | Seq Ara down 2 (SA2D)     | CAATCACCGTGATTTCAATG | -            |   |
| E   | pBAD Seq forward 1 (BSF1) | AGATTAGCGGATCCTACCTG | +            | Flankieren P <sub>BAD</sub> und MCS in pBAD18-Kan und seinen Derivaten                          |
| F   | pBAD Seq reverse          | ACTGCCGCCAGGCAAATTC  | -            |   |
| G   | Seq pBAD for (SBAF)       | CAGCGAGTCAGTGAGCGAGG | -            | Flankieren Bereich zwischen Eco47III und NdeI-Schnittstellen in pBAD18-Kan und seinen Derivaten |
| H   | Seq pBAD rev (SBAR)       | CACAGGTGCGGTTGCTGGCG | +            |   |

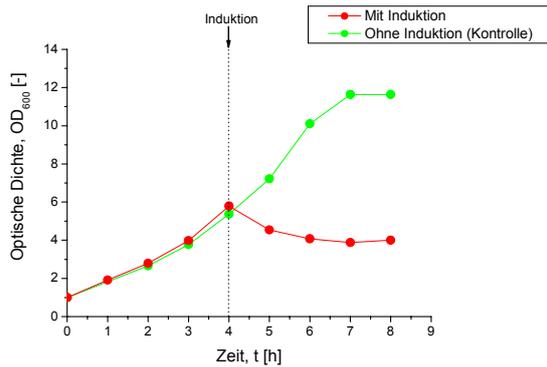
**Tabelle 9.5 Primer für die quantitative RT-PCR.** (T<sub>H</sub>, Hybridisierungstemperatur; L, Amplikonlänge)

| Nr. | Bezeichnung | Sequenz (5' → 3')   | Orientierung | T <sub>H</sub> | L      |
|-----|-------------|---------------------|--------------|----------------|--------|
| I   | LppBRP up   | AGCTACTAAACTGGTACTG | +            | 55 °C          | 142 bp |
| J   | LppBRP down | CTAGTTAACCGCGATCC   | -            |                |        |

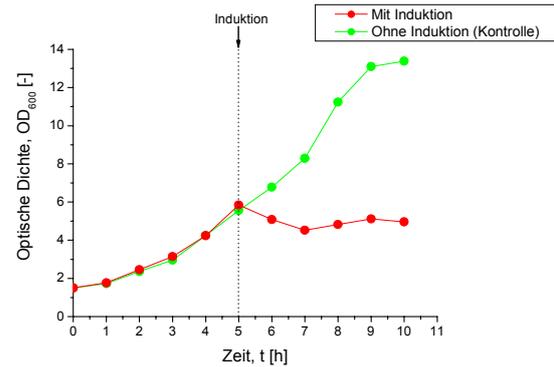
## 9.7 Ergänzende Daten

### 9.7.1 Kultivierungsverläufe zur sekretorischen Produktion von MBP-Hybridproteinen

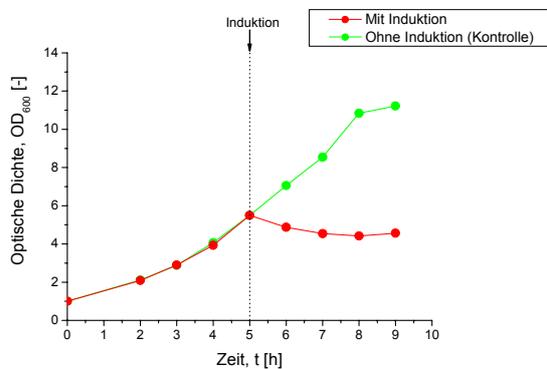
(a) MBP-Bar



(b) SP<sub>TorA</sub>-mMBP-Bar



(c) MBP-AP



(d) SP<sub>TorA</sub>-mMBP-AP

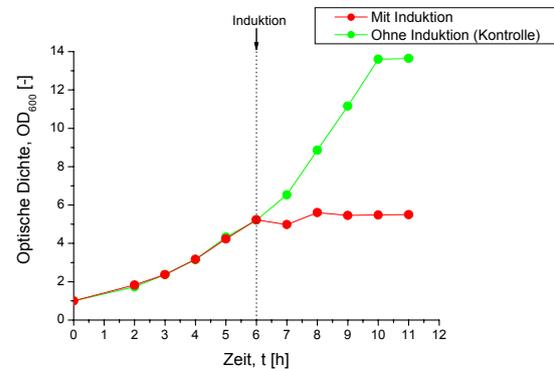
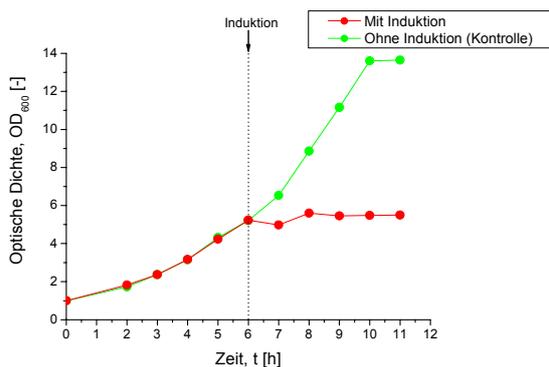
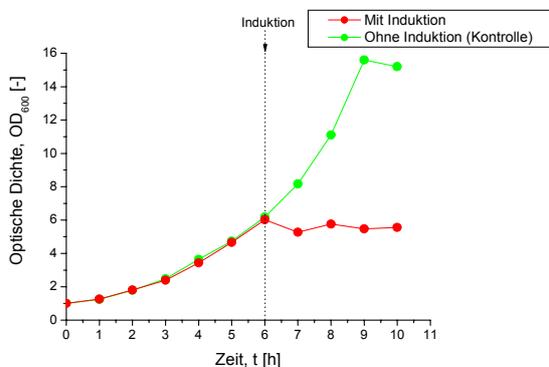
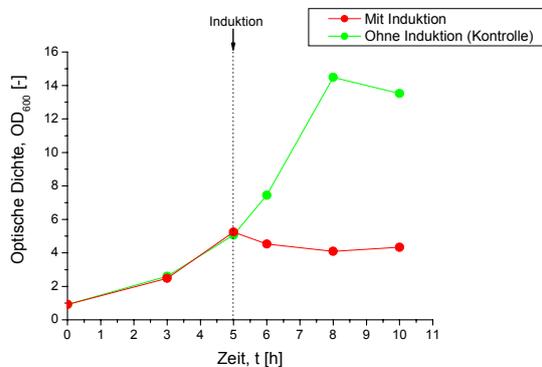
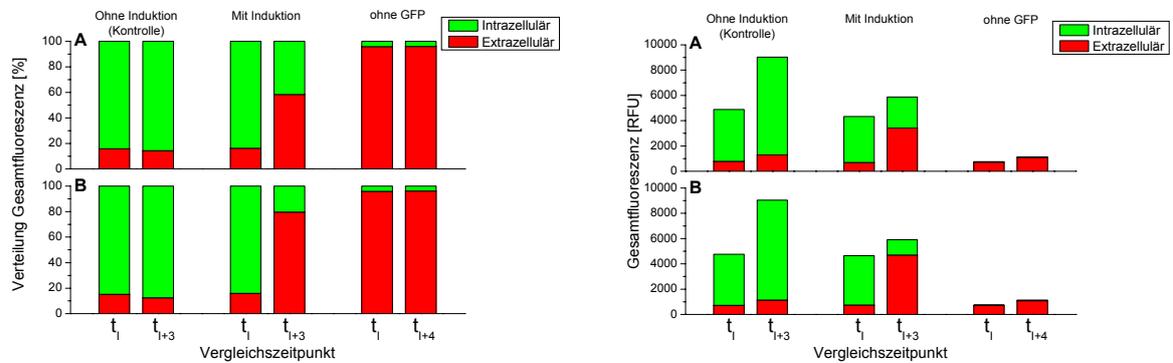


Abb. 9.2 (Legende auf der nachfolgenden Seite).

**(e) AP (nativ)****(f) SP<sub>TorA</sub>-mMBP-GFP****(g) SP<sub>TorA</sub>-GFP**

**Abb. 9.2** Wachstumsverläufe von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPmalEbar (a), pBAD-LppBRPtorAmalEbar (b) pBAD-LppBRPmalEphoA (c), pBAD-LppBRPtorAmalEphoA (d), pBAD-LppBRPmalEphoA (e), pBAD-LppBRPtorAmalEgfp (f), pBAD-LppBRPgf (g). Die Kultivierung erfolgte in Schüttelkolben mit definiertem SGA-Medium unter Induktion der LppBRP-Expression durch eine OD<sub>600</sub>-bezogene Arabinosekonzentration von 1 g L<sup>-1</sup> und ohne LppBRP-Expression.

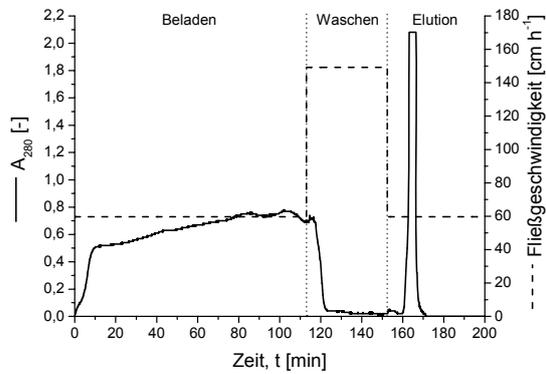
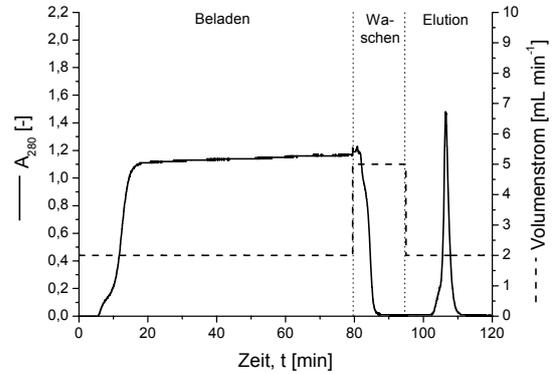
## 9.7.2 Korrektur der Hintergrundfluoreszenz GFP-exprimierender Kulturen



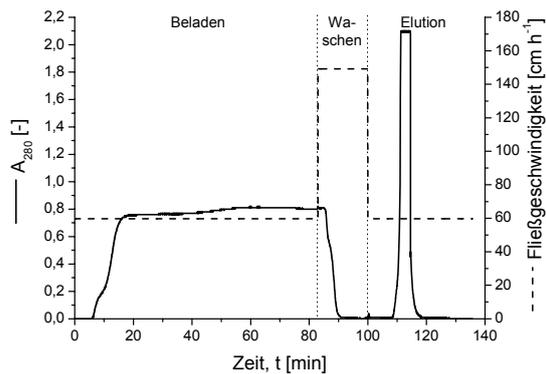
**Abb. 9.3** Verteilung der Gesamtfluoreszenz bei GFP-spezifischen Wellenlängen auf Zellen und Medium in Kulturen mit  $SP_{TorA}$ -mMBP-GFP (A) und  $SP_{TorA}$ -GFP (B) vor und nach Induktion der Sekretion in prozentualer (links) und absoluter (rechts) Darstellung. Zum Vergleich (ohne GFP) ist die unspezifische Hintergrundfluoreszenz einer Kultur von *E. coli* Ara1655 pBAD-LppBRPmalEbar dargestellt (vgl. Abb. 9.2) gegen die in Abb. 5.39 normalisiert wurde. Die intra- und extrazelluläre GFP-Fluoreszenz wurde zum Induktionszeitpunkt ( $t_i$ ) sowie 3 h bzw. 4 h danach ( $t_{i+3}$  bzw.  $t_{i+4}$ ) bestimmt.

### 9.7.3 Chromatogramme der Affinitätsreinigung verschiedener MBP-Hybridproteine

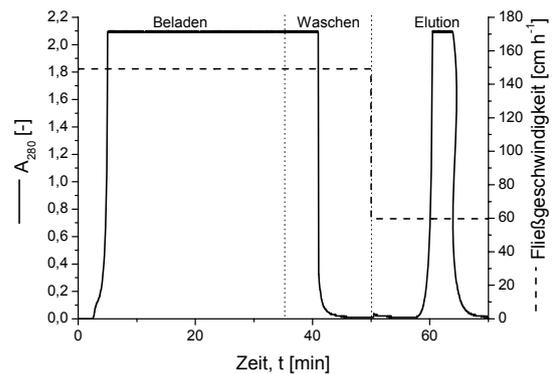
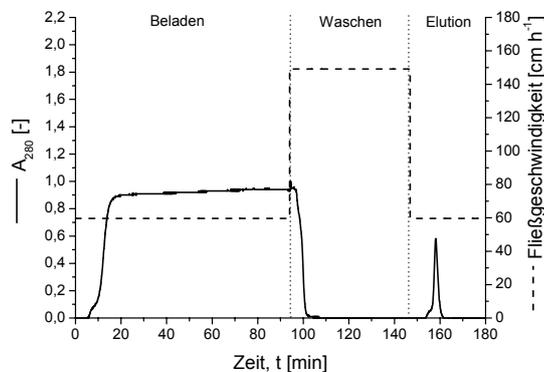
(a) MBP-Bar

(b)  $\text{SP}_{\text{TorA}}$ -MBP-Bar

(c) MBP-AP (mit Diafiltration)



(d) MBP-AP (ohne Diafiltration)

(e)  $\text{SP}_{\text{TorA}}$ -MBP-GFP

**Abb. 9.4** Chromatogramme der Affinitätsreinigung verschiedener MBP-Hybridproteine. (a) MBP-Bar. (b)  $\text{SP}_{\text{TorA}}$ -MBP-Bar. (c) MBP-AP (mit vorheriger Diafiltration). (d) MBP-AP (ohne vorherige Diafiltration). (e)  $\text{SP}_{\text{TorA}}$ -MBP-GFP.

## 9.8 Chemikalien

Gewöhnliche Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Sigma und J.T. Baker mit dem Reinheitsgrad p.A. bezogen. Spezialchemikalien sind in der folgenden Liste aufgeführt.

|                                  |                    |
|----------------------------------|--------------------|
| 2-Mercaptoethanol                | Merck              |
| 2-Propanol                       | J.T. Baker         |
| 4-Chloro-1-aphtol                | Sigma              |
| 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat | Roth               |
| Acrylamid/ Bis- (30%; 0,8%)      | Roth               |
| Agar-Agar                        | Roth               |
| Agarose                          | Roth               |
| Albumin Fraktion V (BSA)         | Roth               |
| Ammoniumpersulfat                | Roth               |
| Ampicillin Natriumsalz           | Roth               |
| Borsäure                         | J.T. Baker         |
| Bromphenol Blau                  | Merck              |
| Casein Pepton/Trypton            | Roth               |
| Chloramphenicol                  | Fluka              |
| Chloroform                       | Roth               |
| Citronensäure                    | Merck              |
| Coomassie Brillantblau G 250     | Merck              |
| D-Glucose                        | Roth               |
| di-Kaliumhydrogenphosphat        | VWR                |
| D-Maltose                        | Fluka              |
| EDTA                             | Roth               |
| Eisenchlorid                     | Merck              |
| Essigsäure (100%)                | Roth               |
| Ethanol                          | J.T. Baker         |
| Ethidiumbromid                   | Merck              |
| Glycerin (99,5%)                 | Roth               |
| Glycin                           | Roth               |
| Hefeextrakt                      | Deutsche Hefewerke |
| Hefe-RNA                         | VWR                |
| Kaliumhydrogenphosphat           | VWR                |
| Kanamycin                        | Roth               |
| Kanamycinsulfat                  | Roth               |

---

|                                      |            |
|--------------------------------------|------------|
| Kobaltsulfat                         | J.T. Baker |
| Kupferchlorid                        | J.T. Baker |
| L-Arabinose                          | Roth       |
| Magnesiumchlorid                     | J.T. Baker |
| Magnesiumsulfat                      | Roth       |
| Mangansulfat                         | J.T. Baker |
| Methanol                             | Merck      |
| Natriumcarbonat                      | Roth       |
| Natriumdodecylsulfat                 | Roth       |
| Natriumhydrogencarbonat              | Roth       |
| Natriummolybdat                      | J.T. Baker |
| Nitroblau-Tetrazoliumchlorid         | Roth       |
| Perchlorsäure                        | Merck      |
| Phenol                               | Roth       |
| Phosphorsäure (85%)                  | Roth       |
| Pluronic® PE-8100                    | BASF       |
| p-Nitrophenylphosphat                | Sigma      |
| RNaseA vom Rinderpankreas            | Sigma      |
| Saccharose                           | Roth       |
| Salzsäure                            | VWR        |
| Tetracyclin                          | Fluka      |
| Tris(hydroxymethyl)aminoethan (Tris) | Roth       |
| Tris-HCl                             | Roth       |
| Tween 20                             | Roth       |
| Uranylacetat                         | Merck      |
| Xylencyanol FF                       | Roth       |
| Zinksulfat                           | J.T. Baker |

## 9.9 Geräte

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| Autoklaven                         | Systemec V-150<br>Systemec D-65<br>Zirbus VST 60/70  |
| Bioreaktor und -Peripherie         | Rührkesselreaktor: MBP LAB 7L Laborreaktor<br>Abgasanalyse: Hartmann und Braun URAS10E<br>Probensammler: Gilson FC205<br>Zulaufpumpe: ISMATEC MV<br>Software: Advantech VisiDAQ 3.11   |
| Elektrophorese- und Blot-Einheiten | Eurogentec <i>i</i> -Mupid<br>Invitrogen XCell <i>SureLock</i> ™ Mini-Cell<br>Invitrogen XCell II™ Blot Module   |
| Elektroporation                    | Bio-Rad Gene Pulser II mit<br>Bio-Rad Pulse Controller Plus  |
| Fluoreszenzdetektor                | Shimadzu RF-551 Fluorescence HPLC Monitor  |
| FPLC-Anlage                        | Pumpe: Pharmacia Biotech PUMP P-50<br>Säule: Pharmacia Biotech XK16<br>Detektor: Applied Biosystems 757 Absorbance<br>Software: National Instruments Services DASyLab 6.0  |
| Geldokumentationssystem            | Herolab E.A.S.Y. mit<br>UVP White/UV Transilluminator  |
| HPLC-Anlage                        | Entgaser: ERMA CR. ERC-3612<br>Pumpe: IRICA PUMP Σ 871 Liquid Chromatograph<br>Säule: Macherey-Nagel Nucleogel ION 300 OA<br>Säulenofen: ERMA CR. ERC Gecko 2000<br>Detektor: ERMA CR. ERC-7515A-RI-Detektor<br>Software: SCPA ChromStar |
| Magnetrührer                       | IKA KM02   |
| Mikrowelle                         | Bauknecht MWT 1720 Rapid   |
| Mischgeräte                        | Heidolph Polymax 1040<br>Heidolph Polymax 1040<br>Bender & Hobein Vortex Genie 2<br>Neolab 7-2020  |
| pH-Meter                           | Metrohm 691  |
| Reinraumwerkbank                   | Heraus HeraSafe  |

---

|                      |  |
|----------------------|--|
| Reinstwasseranlage   | Seralpur Pro 90 CN   |
| Rotationsschüttler   | B. Braun Certomat R<br>Infors HT<br>IKA KS125 Basic<br>Heidolph Polymax 1040<br>Heidolph Polymax 1040<br>Bender & Hobein Vortex Genie 2<br>Neolab 7-2020 |
| Schüttelinkubator    | Infors HT  |
| Spannungsgeber       | Biometra Standard Powerpack P25  |
| Spektralphotometer   | Pharmacia Biochrom 4060,<br>Nanodrop Technologies NanoDrop®<br>Shimadzu UV-1202  |
| Thermocycler         | Thermo Px2 Thermal Cycler<br>Corbett Research Rotor-Gene 3000  |
| Thermostat           | Julabo F10<br>Eppendorf Thermostat 5320<br>Kleinfeld BT 100  |
| Ultrafiltration      | Millipore Pellicon XL® 5 kDa UF  |
| Vakuumtrockenschrank | Heraeus VT5042 EK  |
| Waagen               | Mettler PM34-K DeltaRange<br>Mettler AE 260 DeltaRange<br>Sartorius TE3102S<br>Precisa 12000G  |
| Zentrifugen          | Eppendorf 5415R<br>Sigma 1K15<br>Sigma 6K10  |

## 10 Publikationen

### 10.1 Forschungsarbeiten

**Sommer, B.**, Schmidt, B., Friehs, K. und Flaschel, E. (2008). Extrazelluläre Produktion und Affinitätsreinigung einer rekombinanten Ribonuklease mit *Escherichia coli*. *Chem Ing Tech*, **80**(6), 839-45.

### 10.2 Vorträge, Kurzfassungen und Poster

**Sommer, B.**, Schmidt, B., Friehs, K. und Flaschel, E. (2008). Extrazelluläre Produktion und Affinitätsreinigung einer rekombinanten Ribonuklease mit *Escherichia coli*, *Vortrag*, GVC/DECHEMA Vortrags- und Diskussionstagung 2008, Bremen.

**Sommer, B.**, Friehs, K. und Flaschel, E. (2006). Bacteriocin Release Proteine beeinflussen Sekretion und Wachstum bei *E. coli*. *Chem Ing Tech* **78**(9), 1432-33.

Stahl, F., Reck, M., Hitzmann, B., Scheper, T., **Sommer, B.**, Friehs, K., Flaschel, E. und Aster, S. (2006). Entwicklung spezifischer DNA-Chips zur Optimierung der Proteinsekretion aus *E. coli*. *Chem Ing Tech* **78**(9), 1402.

**Sommer, B.**, Friehs, K. und Flaschel, E. (2007). Use of Bacteriocin Release Proteins for the Extracellular Production of Recombinant Proteins with *Escherichia coli*, *Poster*, European BioPerspectives 2007, Köln.

## 11 Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit haben:

Beginnen möchte ich bei Herrn **Prof. Dr. Erwin Flaschel**. Ihm gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit an seinem Lehrstuhl, für seine ständige Gesprächsbereitschaft und wissenschaftliche Unterstützung sowie das Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn **Prof. Dr. Karl Friehs** gebührt Dank für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit. Ihm habe ich seit dem Studium der Molekularen Biotechnologie mein Interesse an der Thematik zu verdanken.

Herrn **Prof. Dr. Noll** danke ich für die, trotz unzähliger anderer Verpflichtungen, spontane Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit.

Bei der **Deutschen Forschungsgemeinschaft** bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung.

Herrn **Dr. Gerd Miksch** möchte ich meinen Dank für seine stetige Diskussionsbereitschaft, die angenehme Atmosphäre in unserem Labor und das Korrekturlesen aussprechen. In diesem Zusammenhang sollten auch **Dr. Joe-Max Risse** und **Dr. Markus Blaesen** nicht unerwähnt bleiben.

Dem **Lehrstuhl für Fermentationstechnik und seinen Mitarbeitern** gebührt ein besonderer Dank für das angenehme Arbeitsklima und für seine offensichtliche Affinität zu freundlichen Menschen. Insbesondere bei **Thomas Schäffer, Eberhard Wunsch, Boris Schmidt, Anja Herzig, Theresa Bednar, Julia Wolter, Martina Jokel, Kirsten Leiweg** und **Petra Widawka** bedanke ich mich für die exzellente technische Assistenz.

**Dr. Frank Stahl, Michael Reck** und **Cornelia Repenning** vom Institut für Technische Chemie der Universität Hannover danke ich für die Durchführung der *Microarray*-Analysen.

Meinen **Eltern** möchte ich einen großen Dank für die bedingungslose Unterstützung aussprechen und dafür, dass sie mir meinen Lebensweg ermöglicht haben bis ich „auf eigenen Beinen stand“.

**Nadine** danke ich für ihr Verständnis, ihre unendliche Geduld und für den manchmal erforderlichen Zwang zur Fokussierung auf das Leben außerhalb der Wissenschaft.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Wörtlich oder dem Sinn nach aus Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Bielefeld, 03.07.2008

---

Benjamin Sommer