

Struktur- und Funktionsanalyse der Protease RasP aus *Bacillus subtilis*¹

Susan Drechsel

Professur für Bio- und Umweltwissenschaften
sdrechsel@hszg.de

Abstract: *Bacillus subtilis* ist einer der bislang am besten untersuchten Organismen. Es gilt als Modellbakterium, an welchem stoffwechselphysiologische und genetische Phänomene grundlegend aufgeklärt wurden. Daneben gehört *B. subtilis* zu den generell unbedenklichen Mikroorganismen und wird von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) als ‚GRAS‘ (Generally Regarded As Safe) eingestuft. Dementsprechend wird *B. subtilis* in der biotechnologischen Industrie zur Herstellung vielfältiger Produkte, z.B. in der Lebensmittelindustrie, eingesetzt.

Als Gram-positives Bakterium eignet sich *B. subtilis* vor allem zur Produktion extrazellulärer Enzyme wie Proteasen und Amylasen. Die Untersuchung der Sekretion dieser Proteine ist sowohl für die grundlagen- als auch für die anwendungsorientierte Forschung von wichtiger Bedeutung.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Wiegert haben gezeigt, dass eine Deletionsmutante im Gen der Protease RasP einen vollständigen Defekt der Sekretion einer α -Amylase verursacht. In meiner Promotionsarbeit soll untersucht werden, welche Rolle RasP bei der Sekretion dieser α -Amylase spielt, und welchen Einfluss diese Protease auf die Proteinsekretion allgemein ausübt. Zudem soll, u.a. am Beispiel von Signalpeptiden, der Mechanismus der Substraterkennung durch RasP untersucht werden.

Ich erhoffe, mit dieser Arbeit einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Funktion der Protease RasP zu leisten und damit eine weitere gezieltere Optimierung von *B. subtilis* Produktionsstämmen in der biotechnologischen Industrie zu ermöglichen.

Problemstellung

In meiner Dissertation möchte ich den Einfluss der Protease RasP auf die Sekretion von verschiedenen Modellproteinen genauer untersuchen. Außerdem soll geklärt werden, ob eine Überproduktion von RasP die Effizienz der Sekretion biotechnologisch bedeutsamer Proteine verbessern kann. Des Weiteren sollen mögliche Interaktionspartner von RasP identifiziert und der Mechanismus der Substraterkennung analysiert werden, auch möchte ich untersuchen, wie die Aktivität der Protease RasP moduliert wird. Zum Schluss sollen Versuche zur Identifizierung weiterer Substrate durchgeführt werden.

¹Diese Arbeit wird aus Mitteln der Europäischen Union und des Freistaates Sachsen finanziert.

Zielsetzung

Die Erforschung der Funktion und Struktur der Protease RasP ist von Bedeutung für die Grundlagenforschung, denn RasP-ähnliche Proteasen sind essentiell für die Pathogenität bestimmter Bakterien, z. B. reguliert in *Mycobacterium tuberculosis* eine Protease der S2P-Familie den Aufbau der Zellwand und die Virulenz [MG05].

Zudem strebe ich eine Optimierung der Proteinsekretion an, was für biotechnologische Anwendungen nützlich wäre, da somit die industrielle Produktion von Vitaminen und sekretorischen Enzymen durch *B. subtilis* verbessert werden könnte.

Stand der Forschung

RasP aus *B. subtilis* zählt zur Gruppe der ‚Intramembranen Proteasen‘ der S2P-Familie, welche Substratproteine in der Membran schneiden. RasP wurde bislang vornehmlich eine Funktion bei der Prozessierung und dem Abbau eines genregulatorischen Proteins zugeschrieben [HW09]. Aufgrund eines genetischen Screens wurde festgestellt, dass RasP auch essentiell für die Sekretion einer α -Amylase aus *Bacillus amyloliquefaciens* ist [He+08]. Eine Erklärung für den beobachteten Sekretionsdefekt gibt es bislang noch nicht, ebenso ist nicht gezeigt worden, ob der Defekt in *rasP* auch die Sekretion anderer Proteine beeinflusst.

Der allgemeine Mechanismus der bakteriellen Proteinsekretion ist sehr detailliert bekannt. Sekretorische Proteine werden im Cytoplasma mit einem aminoterminalen Signalpeptid synthetisiert, welches als Erkennungssignal für den membranständigen Sekretionsapparat dient. Nach erfolgter Sekretion wird das Signalpeptid abgeschnitten, wodurch das reife Protein ins Medium entlassen wird [DN08]. Kürzlich wurde eine Arbeit publiziert, welche einer S2P-Protease aus *Escherichia coli* und RasP aus *B. subtilis* eine Funktion als Signalpeptid-Peptidase zuweist [Sa+11]. Signalpeptid-Peptidasen entfernen die Reste des Signalpeptids sekretorischer Proteine aus der Cytoplasmamembran und besitzen damit eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung der Funktionalität der Zellmembran. Im Gegensatz zu höheren Zellen war in Bakterien bislang wenig untersucht, welche Protease(n) tatsächlich für den Abbau von Signalpeptiden verantwortlich ist (sind). Der α -Amylase Sekretionsdefekt der *rasP*-Deletionsmutante von *B. subtilis* könnte damit auf eine generelle Hemmung der Proteinsekretion durch eine Blockierung des Sekretionsapparates mit Signalpeptiden zurückzuführen sein. Die Untersuchung dieses Sachverhalts soll Thema des ersten Abschnitts der Promotionsarbeit sein.

Die Struktur von S2P-Proteasen wurde röntgenkristallographisch aus dem Archaeobakterium *Methanocaldococcus jannaschii* bestimmt [Fe+07]. Ebenso liegt eine Reihe von Untersuchungen zur Substratspezifität der RasP-homologen Protease RseP aus *E. coli* vor [AKI04]. RasP weist einige deutliche Unterschiede in der Domänenstruktur zu diesen S2P-Proteasen auf, die einen grundsätzlich anderen Mechanismus der Substraterkennung vermuten lassen. Die Analyse der Struktur-Funktionsbeziehungen von RasP zur Substraterkennung und Regulation der Proteaseaktivität ist ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Rolle von S2P-Proteasen in Bakterien und wird Thema des zweiten Abschnitts der Dissertation.

Arbeitsprogramm mit Zeitplanung

Die Doktorarbeit gliedert sich in zwei Abschnitte. Zunächst soll der Sekretionsdefekt der α -Amylase in der *B. subtilis rasP*-Mutante genauer untersucht werden, um Rückschlüsse auf die Funktion der Intramembranen Protease RasP bei der Sekretion dieses Enzyms ziehen zu können. Auf diese Untersuchungen aufbauend soll der Einfluss von RasP auf andere sekretorische Proteine analysiert werden. Zudem soll bestimmt werden, ob eine gezielte Überproduktion von RasP die Effizienz der Sekretion biotechnologisch bedeutsamer Proteine verbessern kann. Im zweiten Abschnitt der Arbeit soll der Mechanismus der Substraterkennung durch RasP untersucht werden. Dazu sollen verschiedene Transmembrandomänen auf ihre Abbaubarkeit durch RasP getestet werden. Durch Herstellung von spezifischen Antikörpern gegen RasP sollen durch Co-Immunopräzipitations-Experimente Interaktionspartner von RasP identifiziert werden. Ebenso ist geplant, die Struktur-Funktionsbeziehung von RasP durch gerichtete Mutagenese zu untersuchen. Der zeitliche Ablauf sowie die geplanten Experimente der Arbeit werden im Folgenden zusammenfassend beschrieben:

- Monate 1-6: Klonierung eines Fusionsproteins der *B. amyloliquefaciens* α -Amylase AmyQ und des grün fluoreszierenden Proteins GFP als Reporter. Analyse der Sekretion dieses Fusionsproteins anhand der Fluoreszenz und der α -Amylase Aktivität in *B. subtilis* Wildtyp und einer *rasP* knockout Mutante. Untersuchung der Lokalisation des Fusionsproteins im Western Blot.
- Monate 3-9: Untersuchung der Sekretion anderer Proteine (Subtilisin, Levansucrase etc.) in der *rasP*-Deletionsmutante anhand der Bestimmung von Enzymaktivitäten und im Western Blot.
- Monate 6-12: Versuche zum spezifischen Nachweis von Signalpeptiden in der Cytoplasmamembran des *rasP*-Deletionsstammes über Massenspektrometrie.

- Monate 9-15: Etablierung eines Überexpressionssystems für *rasP* und Analyse der Proteinsekretion in einem Überexpressionstamm anhand eines Modellproteins. Versuche zur Reinigung von RasP und Generierung spezifischer Antikörper. Versuche zur Etablierung eines *in vitro* Assays zur Bestimmung der Proteolyse von Modellsubstraten durch RasP.
- Monate 12-18: Versuche zur Identifizierung von RasP-Interaktionspartnern durch *pull-down* Experimente. Untersuchungen zur Erkennung von Substraten durch RasP und zur Regulation der RasP-Aktivität.
- Monate 15-21: Gerichtete Mutagenese von RasP zur Bestimmung der Funktion bestimmter Proteindomänen.
- Monate 18-24: Versuche zur Identifizierung weiterer RasP-Substrate mittels Massenspektrometrie. Versuche zur Klonierung einer RasP ‚Trap-Mutante‘ zur Identifizierung weiterer RasP-Substrate.

Literaturverzeichnis

- [AKI04] Akiyama, Y; Kanehara, K; Ito, K. RseP (YaeL), an Escherichia coli RIP protease, cleaves transmembrane sequences. *The EMBO Journal*, 23(22):4434-4442, 2004.
- [DN08] Driessen, A J; Nouwen, N. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annual Review of Biochemistry*, 77:643-667, 2008.
- [Fe+07] Feng, L et. al. Structure of a site-2 protease family intramembrane metalloprotease. *Science*, 318(5856):1608-1612, 2007.
- [He+08] Heinrich, J et. al. The Bacillus subtilis ABC transporter EcsAB influences intramembrane proteolysis through RasP. *Microbiology*, 154(Pt 7):1989-1997, 2008.
- [HW09] Heinrich, J; Wiegert, T. Regulated intramembrane proteolysis in the control of extracytoplasmic function sigma factors. *Research in Microbiology*, 160(9):696-703, 2009.
- [MG05] Makinoshima, H; Glickman, M S. Regulation of Mycobacterium tuberculosis cell envelope composition and virulence by intramembrane proteolysis. *Nature*, 436(7049):406-409, 2005.
- [Sa+11] Saito, A et. al. Post-liberation cleavage of signal peptides is catalyzed by the site-2 protease (S2P) in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 108(33):13740-13745, 2011.



Susan Drechsel, M. Sc., wurde 1982 in Zschopau geboren. Sie schloss 2005 das Bachelorstudium der Biotechnologie an der Hochschule Zittau / Görlitz (FH) ab. Danach begann sie ein Masterstudium der Biotechnologie und Angewandten Ökologie am Internationalen Hochschulinstitut (IHI) Zittau, welches sie 2010 erfolgreich beendete. Seit Oktober 2012 ist sie Promotionsstudentin am IHI Zittau (Zentrale Wissenschaftliche Einrichtung der TU Dresden) mit dem Thema: „Struktur- und Funktionsanalyse der Protease RasP aus *Bacillus subtilis*“.

Dieser Beitrag ist erschienen in: Thorsten Claus und Niels Seidel (Hrsg.), *Werkstatt europäischen Denkens – 20 Jahre Internationales Hochschulinstitut Zittau*, TUDpress, Dresden, 2014. Online verfügbar: <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:14-qucosa-152245>.