

# Charakterisierung thylakoidärer TatBC-Rezeptorkomplexe

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Matthias Reimers

geb. am 01.06.1991 in Wolfen

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen
2. Gutachterin: Jun.-Prof. Dr. Carla Schmidt
3. Gutachter: Prof. Dr. Robert Tampé

Datum der Verteidigung: 26.05.2021

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs- und Begriffsverzeichnis .....	V
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Zum peroxisomalen Import gefalteter Proteine .....	1
1.1.1 PIM-Transportsignale .....	1
1.1.2 Die löslichen Rezeptorproteine .....	2
1.1.3 Der Andockkomplex .....	3
1.1.4 Re-Export der Rezeptoren .....	4
1.1.5 Zur Energetisierung und dem Wirkprinzip der PIM-Translokation .....	4
1.2 Das Tat-Translokationssystem.....	5
1.2.1 Das Tat-Signalpeptid.....	5
1.2.2 Transport gefalteter Proteine durch Tat .....	6
1.3 Die Komponenten des Tat-Systems .....	7
1.3.1 Die TatAB-Proteinfamilie .....	7
1.3.1.1 Aufbau der TatAB-Proteine.....	8
1.3.1.2 Membraninteraktionen von TatAB-Proteinen .....	10
1.3.2 Die TatC-Proteinfamilie .....	11
1.3.2.1 Die Struktur von TatC.....	12
1.3.2.2 Die TatC-Epitope .....	12
1.4 Zur Energiequelle – protonenmotorische Kraft .....	14
1.5 Interaktionen der Tat-Komponenten .....	15
1.5.1 Homooligomerisierung der Tat-Proteine .....	15
1.5.1.1 TatA-Komplexe.....	15
1.5.1.2 TatB-Komplexe.....	16
1.5.1.3 TatC-Oligomere.....	16
1.5.2 Aufbau von TatBC-Rezeptorkomplexen .....	17
1.5.2.1 Interaktionen von TatB und TatC.....	17
1.5.3 Substratbindung als Vorbereitung des TatBC-Komplexes auf die Translokation.....	20
1.5.4 Aktivierung der Translokase – Eintritt von TatA in den Substrat-Rezeptor-Komplex .....	21
1.5.4.1 Interaktion von TatA mit TatBC .....	22
1.5.4.2 Interaktion von TatA und Substrat.....	23
1.5.4.3 TatA-Homooligomere an der aktivierten Translokase .....	23
1.5.5 Der Translokationsvorgang.....	23
1.5.5.1 Modelle zum Mechanismus der Tat-Translokation .....	24
1.6 Zielstellung .....	27
<b>2. Material.....</b>	<b>28</b>
2.1 Chemikalien .....	28
2.1.1 Styrol-Maleinsäure-Copolymer .....	28
2.2 Größenstandards.....	28
2.3 Enzyme .....	29
2.4 Reaktionskits .....	29
2.5 Oligonukleotide .....	29
2.6 Plasmide .....	30
2.7 Bakterienstämme .....	31

2.8	Kulturmedien.....	31
2.9	Antibiotika .....	32
2.10	Verwendete Proteine .....	32
2.11	Antikörper.....	34
2.12	Affinitätschromatographie .....	34
2.13	Pflanzenmaterial.....	34
<b>3.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>35</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden .....	35
3.1.1	Molekularbiologische Standardmethoden.....	35
3.1.2	Konstruktion von pET30a-tQTP .....	35
3.1.3	Erzeugung von pET30a-tQTP <sup>C</sup> , -tQTP <sup>F</sup> und -tQTP <sup>CF</sup> durch ortsspezifische Mutagenese .....	35
3.1.4	Konstruktion von pBAT-tQTP <sup>CF</sup> .....	36
3.1.5	Sequenzierung von DNA.....	36
3.2	Arbeit mit <i>Escherichia coli</i> .....	37
3.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	37
3.2.2	Dauerhafte Lagerung von <i>E. coli</i> -Zellen.....	37
3.2.3	Elektroporation.....	37
3.2.4	Heterologe Überproduktion von Proteinen .....	37
3.3	Methoden mit Pflanzenmaterial .....	38
3.3.1	Isolierung von Chloroplasten.....	38
3.3.2	Bestimmung des Chlorophyllgehalts .....	38
3.3.3	Isolierung von Thylakoiden.....	38
3.3.4	Behandlung von Thylakoiden oder solubilisierten TatBC-Komplexen mit Metallsalz- oder EDTA-haltigen Puffern .....	39
3.3.5	Bindung thylakoidärer TatBC-Komplexe mit (radioaktiv markierten) Signalpeptid-Derivaten (tPTP und tQTP-Varianten) .....	39
3.3.6	Solubilisierung von Thylakoiden.....	40
3.3.7	<i>in thylakoido</i> -Transportversuche.....	41
3.3.8	Präparation von TatBC-Komplexen mit radioaktiv markiertem TatC.....	42
3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	43
3.4.1	Präparation einer Einschlusskörperchen-Rohfraktion aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	43
3.4.2	Anreicherung und Isolierung von Proteinen durch IMAC .....	44
3.4.2.1	Reinigung von Signalpeptid-Derivaten (tPTP und tQTP-Varianten).....	44
3.4.2.2	TatBC-Komplexanreicherung .....	45
3.4.3	Pufferaustausch durch Dialyse .....	46
3.4.4	Elektrophoretische Methoden .....	46
3.4.4.1	SDS-PAGE .....	47
3.4.4.2	Blue-Native-PAGE und CN-PAGE.....	48
3.4.5	Coomassie-Colloidal-Färbung von Proteinen .....	50
3.4.6	<i>Western Blotting</i> .....	50
3.4.7	Immobilisierung von Proteinen zur Immunodetektion ohne Elektrophorese .....	51
3.4.8	Immunodetektion von Proteinepitopen .....	52
3.4.8.1	Antikörperbehandlung.....	52
3.4.8.2	<i>enhanced chemiluminescence</i> (ECL)-Detektionsreaktion .....	53
3.4.9	Herstellung radioaktiv markierter Proteine .....	53
3.4.10	Visualisierung radioaktiver Signale .....	54
3.4.11	Massenspektrometrische Analyse .....	54
3.5	Rekonstitution von Membranproteinen .....	54
3.5.1	Herstellung von Liposomen.....	54

3.5.2	Erzeugung von Thylakoidvesikeln mit Ultraschall .....	55
3.5.3	Detergensvermittelte Destabilisierung von Liposomen und Thylakoidvesikeln .....	55
3.5.4	Gradientenrekonstitution (GRecon) von Membranproteinen .....	56
3.5.5	Einfache Rekonstitution von Membranproteinen.....	57
3.6	Regressionsanalysen .....	57
3.6.1	Ermittlung der apparenten Molekülmasse von Proteinkomplexen aus der BN-PAGE und der Proteinmenge aus der SDS-PAGE .....	57
3.6.2	Abschätzung der Protomerzahl von TatBC-Komplexen .....	58
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>60</b>
4.1	Einführung .....	60
4.2	Die Dissoziation von TatB verändert die Stöchiometrie von TatBC-Rezeptorkomplexen.....	61
4.3	Optimierung der Solubilisierung von TatBC-Rezeptorkomplexen mit Detergenzien.....	67
4.3.1	Nichtionische Detergenzien .....	68
4.3.2	Ionische Detergenzien .....	71
4.4	TatBC-Komplexe werden durch Calciumionen oder Substratbindung stabilisiert.....	74
4.4.1	Ca <sup>2+</sup> hemmt die Dissoziation von solubilierten TatBC-Komplexen, aber auch die Aktivität der Translokase .....	74
4.4.2	Die Bindung von tQTP <sup>CF</sup> stabilisiert solubilierte TatBC-Komplexe .....	80
4.5	Die Interaktion von TatBC-Komplexen mit Styrol-Maleinsäure-Copolymer (SMA)-Varianten führt zur Dissoziation von TatB .....	81
4.6	Anreicherung und Isolierung thylakoidärer TatBC-Komplexe.....	87
4.6.1	Das Konzept der TatBC-Komplexanreicherung .....	87
4.6.2	Entwicklung eines Protokolls für die effiziente TatBC-Komplexanreicherung .....	89
4.7	Zur Rekonstitution von TatBC-Komplexen in künstliche Membransysteme.....	95
4.7.1	TatB und TatC können in Liposomen rekonstituiert werden .....	95
4.7.2	Nachweis der Rekonstitution des TatC-Oligomers in einem Thylakoid-Modellsystem .....	99
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>102</b>
5.1	Charakterisierung der Dissoziation von TatBC-Komplexen.....	102
5.1.1	Zur Relevanz der Komplexdissoziation .....	102
5.1.2	Die Relevanz des pflanzlichen TatC-Oligomers .....	105
5.1.3	Der Einfluss von Detergenzien auf die Komplexdissoziation.....	105
5.1.3.1	Der gehemmte Solubilisierungsmechanismus von Digitonin .....	106
5.1.4	SMA-solubilierte TatBC-Komplexe dissoziieren zu TatC-Oligomeren.....	107
5.1.4.1	Optimierung der Solubilisierung mit SMA .....	109
5.1.4.2	Wird TatB selektiv aus Tat-SMA-nanodiscs ausgeschlossen? .....	109
5.1.5	Zur Stabilisierung solubiliertes TatBC-Komplexe durch bivalente Metallkationen.....	112
5.1.5.1	Einfluss von membrangebundenen Ca <sup>2+</sup> -Ionen .....	113
5.1.5.2	Zur thylakoidären Lokalisierung von Tat.....	113
5.1.5.3	Sind die Tat-Proteine selbst in der Lage Metallionen zu binden?.....	114
5.2	Zum Mechanismus der TatB-Dissoziation .....	118
5.2.1	Schlüsselpositionen der Tat-Proteine, die die Komplexdissoziation fördern.....	118
5.2.2	Die TatB-TatC-Bindung ist eher niedrig affin und dynamisch .....	119
5.2.3	Sind gleiche TatB-Moleküle eines TatBC-Komplexes ungleich gebunden?.....	121
5.2.4	Zur Rolle von Lipiden im TatBC-Komplex .....	122
5.3	Die Bindung von Substrat ändert die Eigenschaften des TatBC-Komplexes .....	123
5.3.1	Solubilierte TatBC-Komplexe tragen anscheinend nur wenig Substratmoleküle .....	123
5.3.2	Das Substrat tQTP <sup>CF</sup> gelangt möglicherweise besonders leicht in den fortgeschrittenen Bindemodus.....	125

5.3.3	Hinweise auf eine Stabilisierung von TatBC-Komplexen durch Substratbindung .....	127
5.3.4	Die Substratbindung führt zu Konformationsänderungen im TatBC-Komplex, wodurch TatB stabiler gebunden wird .....	128
5.3.5	Vermutungen zu einem zusätzlichen TatBC-Komplex oberhalb des TatB <sub>3</sub> C-Komplexes .....	129
5.4	Gewinnung und Rekonstitution von TatBC-Komplexen .....	132
5.4.1	Die effiziente Präparation von thylakoidären Rezeptorkomplexen .....	132
5.4.2	Alternative Ansätze zur Komplexanreicherung .....	133
5.4.3	Zur Rekonstitution von TatBC-Komplexen – Etappenziel TatC-Oligomer .....	134
5.5	Schlussfolgerungen aus dem Konzept der Komplexdissoziation – Eine Abschätzung der TatBC-Protomerzahl .....	135
<b>Danksagung .....</b>		<b>145</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>		<b>147</b>
<b>Anhang .....</b>		<b>172</b>
Anhang Abschnitt 1 - Kritische Aspekte bei der Analyse von TatBC-Komplexen .....		172
Eine denaturierende Behandlung von BN-PA-Gelen vor dem <i>Western Blotting</i> führt zur Abschwächung TatC-spezifischer Signale .....		172
Weitere Probleme beim <i>Western Blotting</i> -Nachweis von TatC .....		174
Der thylakoidäre Cytochrom-b <sub>6</sub> f-Komplex kann falsch positive Ergebnisse bei der BN-PAGE- und <i>Western Blotting</i> -Analyse hervorrufen .....		176
Anhang Abschnitt 2 - Bildteil .....		178
<b>Publikationsliste .....</b>		<b>186</b>
<b>Lebenslauf .....</b>		<b>187</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>		<b>188</b>

## Abkürzungs- und Begriffsverzeichnis

% v/v	Prozentangabe Volumen pro Volumen
% w/v	Prozentangabe Masse pro Volumen
16/23	chimäres Tat-Substratprotein bestehend aus der stromadrigierenden Domäne und dem Tat-Signalpeptid von PsbQ und dem reifen Anteil von PsbP
APH	$\alpha$ -helikale amphipathische Domäne, „amphipathische Helix“
$\alpha$ -TatB	Erbsen-TatB-reaktives Antiserum aus Kaninchen
$\alpha$ -TatC	Erbsen-TatC-reaktives Antiserum aus Kaninchen
ATP	Adenosintriphosphat
BN-PAGE	<i>Blue Native PAGE</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidpropyl)-Dimethylammonium]-1-propan sulfonat
<i>cis</i> (Membrantranslokation)	Seite, von der ein Translokationsvorgang ausgeht
CL	Cardiolipin-Lipide
CN-PAGE	<i>Colorless Native PAGE</i>
CoCo	Coomassie-Colloidal (-Färbung)
C-Terminus	Carboxyterminus von Polypeptiden
CTR	C-terminale Region
DDM	n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fig.	engl. <i>figure</i> - Abbildung, hier verwendet zur ausdrücklichen Kennzeichnung von Abbildungen aus Publikationen
GRecon	Gradientenrekonstitution, eine Rekonstitutionsmethode für digitoninsolubilisierete Membranproteine nach Althoff et al. (2012)
HMC	HM-Puffer mit CaCl <sub>2</sub>
HME	HM-Puffer mit EDTA
HM-Puffer	Hepes-Magnesiumchlorid-Puffer (Methoden Abschnitt 3.3.3)
hydrophiler Rest "E8"	hydrophile Aminosäure vor der Transmembranhelix von Proteinen der TatAB-Familie, zur Vereinfachung einheitlich mit dem Rest E8 von <i>Escherichia coli</i> TatB bezeichnet
Knick-1	Übergangsbereich von Transmembranhelix zu amphipathischer Helix in Proteinen der TatAB-Familie
Knick-2	Bereich um einen helixstörenden Glycinrest in der amphipathischen Helix von Proteinen der TatAB-Familie
MW	Molekulargewicht
NaDDSar	Natriumdodecylsarcosinat, auch Natriumlauroylsarkosin
<i>nanodisc</i>	SMA-solubilisierter kreisförmiger Membranpartikel
NMR	Kernspinresonanz
N-Terminus	Aminoterminal von Polypeptiden
NTF	N-terminaler Fortsatz

PA(GE)	Polyacrylamid(gelelektrophorese)
PE	Phosphatidylethanolamin-Lipide
PG	Phosphatidylglycerol-Lipide
PIM	peroxisomale Importmaschinerie für gefaltete Proteine
PMK	protonenmotorische Kraft
polare Gruppe	Region relativ hydrophiler Aminosäuren in der <i>trans</i> -Brücke-3 von TatC
PsbP	23 kDa Untereinheit des chloroplastidären Wasserspaltungsapparates, auch OEC23
PsbQ	16 kDa Untereinheit des chloroplastidären Wasserspaltungsapparates, auch OEC16
PTS-1 / 2	peroxisomales Importsignal Typ 1 bzw. 2
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RR-BD	RR-Motiv-(Tat-Signalpeptid)-Bindedomäne von TatC um <i>cis</i> -Brücke-1, lösliche N-terminale Region und ggf. lösliche C-terminale Region
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMA	Styrol-Maleinsäure-Copolymer
SP	Signalpeptid
(Digi) sT	(digitonin-) solubilierte Thylakoide
TatB <sub>3</sub> C, TatB <sub>2</sub> C, TatB <sub>1</sub> C	größter (3) und nächstkleinere (2, 1) solubilierte TatBC-Rezeptorkomplexe
TatB-BD	TatB-Bindedomäne von TatC an TMH-5, TMH-6 und <i>trans</i> -Brücke-3
TatC-Grube	konkave Seite der TatC-Oberfläche mit einer Häufung hydrophober Aminosäuren
TatC-Oli	TatC-Oligomer
Ti	Translokationsintermediat
TMH	α-helikale Transmembrandomäne von Proteinen, „Transmembranhelix“
tPTP	wie tQTP, aber mit PsbP-Signalpeptid
tQTP / tQTP <sup>CF</sup>	Fusionsprotein bestehend aus einer <i>tag</i> -Region mit His <sub>6</sub> -Epitop und dem chloroplastidären Importsignal & Tat-Signalpeptid von PsbQ. Varianten enthalten die Aminosäureaustausche S54C und M64F
<i>trans</i> (Membrantranslokation)	Seite, zu der der Translokationsvorgang erfolgt
<i>trans</i> -Kappe	vorgewölbter <i>trans</i> -Randbereich von TatC
TX-100	Triton X-100
TX-114	Triton X-114

## Zusammenfassung

Zelluläre Sortierungs- und Transportvorgänge von Proteinen sind essentiell für alle lebenden Organismen. Um Proteine zwischen verschiedenen Kompartimenten durch biologische Membranen zu transportieren, existieren sogenannte Translokasen. Besonderes Interesse verdienen die Vertreter dieser Gruppe, welche gefaltete Proteine, die in diesem Zusammenhang auch als Substrate bezeichnet werden, transportieren. Die Vielgestaltigkeit dieser Substrate stellt eine große Herausforderung für die Translokation durch Membranen dar. Während des gesamten Transportvorgangs muss sichergestellt sein, dass es nicht zu einem unkontrollierten Membranübergang von Ionen und damit einem Zusammenbrechen des Membranpotenzials kommt.

Die in Bakterien, Archaeen, den Mitochondrien vieler Eukaryoten und den Chloroplasten der Pflanzen vorkommende Tat-Translokase ist ein solches System. Sie setzt sich in der Regel aus zwei Vertretern der TatAB-Familie, TatA und TatB, und einem TatC-Protein zusammen. Den Kern der Translokase bilden multimerer Komplexe aus TatB und TatC, die als Rezeptoren in der Lage sind, die zu transportierenden Proteine zunächst zu binden. Für die anschließende Translokation tritt TatA in den Komplex ein und dissoziiert anschließend wieder.

Um den Mechanismus der Translokation unter kontrollierten Bedingungen untersuchen zu können, sollte die Tat-Translokase in künstliche Membransysteme rekonstituiert werden. Als Ausgangspunkt dafür können TatBC-Rezeptorkomplexe genutzt werden, die eine ruhende, stabile Form des Systems darstellen. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich daher mit der Solubilisierung, Charakterisierung, Gewinnung und schließlich Rekonstitution von TatBC-Komplexen aus den Thylakoiden von Erbsenpflanzen. Es zeigte sich, dass es nach der Solubilisierung der thylakoidären TatBC-Komplexe mit dem milden Detergens Digitonin zum schrittweisen Verlust von TatB kommt, so dass schließlich ein reines TatC-Oligomer verbleibt. Bei der Suche nach alternativen Stoffen zur Solubilisierung wurde festgestellt, dass auch viele andere Detergenzien sowie Styrol-Maleinsäure-Copolymer zu dieser Dissoziation von TatB und dem Auftreten von TatC-Oligomeren führen. Des Weiteren kann die Anwesenheit divalenter Metallkationen wie auch die Bindung des Modellsubstrates tQTP<sup>CF</sup> an den Rezeptorkomplex diesen Prozess hemmen.

Anschließend wurde ein Verfahren zur Anreicherung und Isolierung der thylakoidären TatBC-Komplexe etabliert. Dabei gelang es, die nur in geringer Menge vorkommenden Tat-Proteine im Vergleich zu den hochabundanten Proteinen bspw. der Photosysteme erheblich anzureichern, wie durch massenspektrometrische Analysen gezeigt wurde. Im Anschluss konnte bei Rekonstitutionsversuchen mit den präparierten TatBC-Komplexen bereits die erfolgreiche Membraninsertion von TatC-Oligomeren nachgewiesen werden. Damit könnte die entscheidende Hürde auf dem Weg zu einer Rekonstitution der Tat-Translokase bereits überwunden sein.



# 1. Einleitung

Zelluläre Sortierungs- und Transportprozesse sind essentiell zum Erhalt der inneren Ordnung von Zellen. Durch das Phänomen der Kompartimentierung stellen Membranen ein Hindernis dar, welches durch Transportmaschinen überwunden werden muss. Unter den Proteintransportern zeichnen sich dabei jene besonders aus, die in der Lage sind, gefaltete Proteine unterschiedlichster Form unter Erhalt der Membranhomöostase zu translozieren. Neben sehr komplexen Transportmaschinerien, wie dem Kernporenkomplex oder dem bakteriellen Typ II Sekretionssystem, die hierzu große stabilisierte Poren ausbilden (M. Beck & Hurt, 2017; Korotkov & Sandkvist, 2019), existieren dynamischere Systeme, die nur sehr kurzlebige Membrandurchgänge schaffen. Von diesen sind bislang die peroxisomale Importmaschinerie PIM und das im Fokus dieser Arbeit stehende Zwillingsarginin-abhängige Translokationssystem Tat bekannt.

## 1.1 Zum peroxisomalen Import gefalteter Proteine

Die peroxisomale Importmaschinerie für gefaltete Proteine (PIM) ist in Eukaryoten ubiquitär verbreitet (Gould et al., 1990). Je nach Organismus sind über ein Dutzend Proteine beteiligt (siehe auch Distel et al., 1996). An dieser Stelle soll vor allem auf die Komponenten eingegangen werden, die vermutlich unmittelbar am Translokationsereignis beteiligt sind.

Die PIM vermittelt den posttranslationalen Transport von cytosolisch synthetisierten Proteinen in die peroxisomale Matrix (Lazarow & Fujiki, 1985). Sie kann nachweislich gefaltete Proteine (Ype Elgersma et al., 1996; Glover et al., 1994; McNew & Goodman, 1994; Nair et al., 2004; Walton et al., 1995) transportieren. Es wurden auch Fälle beschrieben, in denen Proteine ohne eigenes Transportsignal, die einen Transportsignalträger gebunden haben, quasi „Huckepack“ transportiert werden (Häusler et al., 1996; Islinger et al., 2009; M. S. Lee et al., 1997; Romano et al., 2019).

### 1.1.1 PIM-Transportsignale

Für den Transport bestimmte Proteine (sog. Substrate) tragen Transportsignale, die die Interaktion mit der PIM vermitteln. Hiervon sind drei Typen bekannt: Die peroxisomalen Transportsignale Typ I (PTS-1) sind Carboxy- (C-) terminale Tripeptide, die auf eine Region folgen, die mit dem Rezeptor Pex5p interagieren kann (Brocard & Hartig, 2006; Ype Elgersma et al., 1996; Gould et al., 1987, 1989; Neuberger et al., 2003). Die PTS-2 hingegen liegen Amino- (N-) terminal und weisen eine Länge von elf Aminosäuren auf. Sie ähneln den Importsignalen der Mitochondrien und Chloroplasten (Osumi et al., 1991; Petriv et al., 2004; Swinkels et al., 1991; Tsukamoto et al.,

1994). Die dritte Gruppe umfasst Transportsignale, die nicht PTS-1 oder -2 entsprechen und oft innerhalb des Proteins liegen (Klein et al., 2002; Kragler et al., 1993; Small et al., 1988).

### 1.1.2 Die löslichen Rezeptorproteine

Die Erkennung von PTS-1-tragenden Substraten erfolgt im Cytoplasma durch den löslichen Rezeptor Pex5p, das wahrscheinlich am besten charakterisierte Protein der PIM (siehe Abb. N1; Dodt et al., 1995; McCollum et al., 1993; Romano et al., 2019; van der Leij et al., 1993; Wang et al., 2003). Als initialer Bindschritt umschließt die C-terminale Substratbindedomäne von Pex5p die PTS-1 (Fodor et al., 2012; Gatto et al., 2000; Hagen et al., 2015; W. A. Stanley et al., 2006). Anschließend bildet der N-terminale Anteil von Pex5p zusätzliche Kontakte mit der Oberfläche des Substrates aus, weshalb die korrekte Faltung des Substrates entscheidend ist (A. Schäfer et al., 2004).

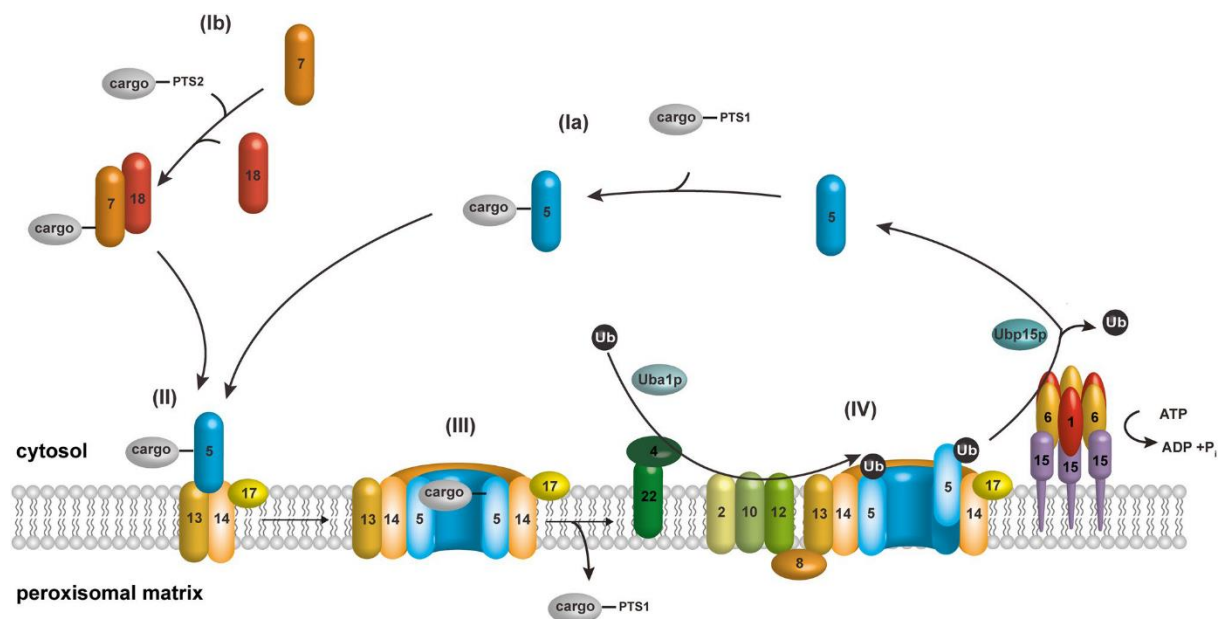
Obwohl Pex5p keine Transmembrandomäne aufweist, kann es spontan in die peroxisomale Membran inserieren, wobei der zuvor unstrukturierte N-terminale Anteil amphipatische Helices ausbildet (Braverman et al., 1998; Carvalho et al., 2006; Dammai & Subramani, 2001; Kerksen et al., 2006; Meinecke et al., 2010; Salomons et al., 2000). Dieser Abschnitt vermittelt auch die Interaktion mit den Membranproteinen Pex13p und Pex14p des sog. Andockkomplexes (Dodt et al., 1995; A. M. M. Gouveia et al., 2000; Kerksen et al., 2006; Saidowsky et al., 2001; A. Schäfer et al., 2004). Die Tatsache, dass Pex5p sein Substrat bis zur Innenseite der peroxisomalen Membran begleitet, wird durch das *extended shuttle*-Modell beschrieben (Dammai & Subramani, 2001; Dodt & Gould, 1996; Rehling et al., 1996, 1996). Demnach wird Pex5p nach der Translokation wieder exportiert (siehe Abschnitt 1.1.4) und ist bereit für den nächsten Transportzyklus.

Die Bindung PTS-2 tragender Substrate wird von mehreren Proteinen zusammen ausgeführt (*Review*: Schliebs & Kunau, 2006). Dabei vollführt Pex7p die analoge Funktion zum PTS-bindenden C-terminalen Anteil von Pex5p (Braverman et al., 1997; Y. Elgersma et al., 1998; Marzioch et al., 1994; Pan et al., 2013; Rehling et al., 1996; J. W. Zhang & Lazarow, 1995, 1996). Die der Funktion des N-terminalen Anteils von Pex5p entsprechende erweiterte Substratbindung und Interaktion mit dem Andockkomplex wird, je nach Organismus, von den sog. PTS-2-Corezeptoren Pex18p, Pex20p, Pex21p oder einer verlängerten Pex5p-L Isoform ausgeführt (Braverman et al., 1998; Dodt et al., 1995, 2001; Einwächter et al., 2001; Matsumura et al., 2000; Mukai et al., 2002; Nair et al., 2004; Neufeld et al., 2009; Purdue et al., 1998; A. Schäfer et al., 2004; Titorenko et al., 1998; Woodward & Bartel, 2005).

### 1.1.3 Der Andockkomplex

Am Andockkomplex aus Pex13p und Pex14p (Albertini et al., 1997; Barros-Barbosa et al., 2019; Bottger et al., 2000; Brocard et al., 1997; Schell-Steven et al., 2005) konvergieren die PTS-1- und PTS-2-abhängigen Wege (Albertini et al., 1997; Erdmann & Blobel, 1996). Pex13p ist ein integrales Membranprotein, das entgegen Vorhersagen auf Sequenzebene drei Transmembranhelices enthält. Über eine cytoplasmatische lösliche Domäne interagiert es mit Pex5p bzw. den PTS-2-Corezeptoren (Barros-Barbosa et al., 2019; Bottger et al., 2000; Einwächter et al., 2001; Y. Elgersma et al., 1996; Erdmann & Blobel, 1996; Girzalsky et al., 1999; Gould et al., 1996; Pires et al., 2003). Es könnte auch die Interaktion mit dem Matrixprotein Pex8p vermitteln, welches bspw. in Hefen für die Bindung des Komplexes an die Ubiquitinylierungsmaschinerie entscheidend ist (Agne et al., 2003).

Im Gegensatz zu Pex13p bindet Pex14p Pex5p ausgesprochen intensiv und hilft vmtl. bei der Membraninsertion (Agne et al., 2003; Niederhoff et al., 2005; Nito et al., 2002; Oliveira et al., 2003;



**Abbildung N1: Übersicht über die peroxisomale Importmaschinerie von *Saccharomyces cerevisiae*.** Diese Abbildung wurde zur repräsentativen Darstellung der PIM aller Organismen ausgewählt. Die Proteine Pex18p, Pex17p und Pex8p sind spezifisch für *S. cerevisiae* und sind in vielen anderen Organismen nicht zu finden. Die Stadien des Transportzyklus sind mit römischen Ziffern bezeichnet: Cytosolisch synthetisierte Substratproteine mit PTS-1 werden durch Pex5p (Ia) bzw. mit PTS-2 durch Pex7p und PTS-2-Corezeptoren (hier Pex18p) gebunden (Ib). Anschließend erfolgt die Bindung dieser Rezeptor-Substrat-Komplexe an den Andockkomplex aus Pex13p, Pex14p und Pex17p (II, hier nur für den Pex5p-Substrat-Komplex dargestellt). Diese Proteine vermitteln vermutlich den Translokationsschritt, dessen Mechanismus noch unklar ist (III, hier als Pore dargestellt). Für den folgenden Re-Export werden die Rezeptorproteine ubiquitinyliert. Hierbei interagiert der Pex5p-Andockkomplex mit dem RING-Finger-Komplex (Pex2p, Pex10p, Pex12p), was möglicherweise über Pex8p vermittelt wird. Die Ubiquitinylierung erfordert außerdem Pex4p, Pex22p und Uba1p (letzteres ist im Text nicht erwähnt). Der Re-Export wird durch Komplexe der ATPasen Pex1p und Pex6p angetrieben, die über Pex15p (im Text nicht erwähnt) in der Membran verankert sind (IV). Daraufhin können die Rezeptorproteine erneut Substrat binden. Nach Walter & Erdmann, 2019.

Otera et al., 2000; Reguenga et al., 2001; Romano et al., 2019; Saidowsky et al., 2001; Salomons et al., 2000; Will et al., 1999). Obwohl für Pex14p keine Transmembrandomänen vorhergesagt wurden, handelt es sich ebenfalls um ein integrales Protein. Dieser Umstand deckt sich mit Daten zur Interaktion mit den löslichen Domänen von Pex13p (Albertini et al., 1997; Azevedo & Schliebs, 2006; Barros-Barbosa et al., 2019; Brocard et al., 1997; Niederhoff et al., 2005; Pires et al., 2003).

#### 1.1.4 Re-Export der Rezeptoren

Die Proteine Pex4p und Pex22p, sowie der sog. RING-Finger-Komplex mit Pex2p, Pex10p, Pex12p vermitteln anschließend die Ubiquitinylierung von Pex5p bzw. den PTS-2-Corezeptoren (Hensel et al., 2011; Léon & Subramani, 2007), die den Re-Export reguliert. Dies führt im Falle einer Monoubiquitinylierung zum Re-Export und dem Recycling des Rezeptors und bei einer Polyubiquitinylierung zur proteosomalen Degradation (Carvalho et al., 2007; El Magraoui et al., 2012; Kiel et al., 2005; Kragt et al., 2005; Platta et al., 2007; Williams et al., 2012; *Reviews* bspw. Francisco et al., 2017; Walter & Erdmann, 2019). Zum Export des Rezeptorproteins kommen noch Komplexe der ATPasen Pex1p und Pex6p hinzu (Saffian et al., 2012).

#### 1.1.5 Zur Energetisierung und dem Wirkprinzip der PIM-Translokation

Nur die Ubiquitinylierung und der Re-Export der Rezeptoren benötigt Adenosintriphosphat (ATP). Die Insertion der Rezeptoren ist hingegen ATP-unabhängig (A. M. Gouveia et al., 2003; Imanaka et al., 1987; Lanyon-Hogg et al., 2010; Oliveira et al., 2003; Romano et al., 2019; Wendland & Subramani, 1993). Auch der Membrangradient scheint dabei keine Rolle zu spielen (Imanaka et al., 1987; Wendland & Subramani, 1993).

Ebenso unklar wie die Energetisierung von PIM ist auch der Mechanismus, der beim Translokationsereignis wirkt. Pex5p selbst wird als Motor der PTS-1-abhängigen Translokation diskutiert und könnte bei seiner Membraninsertion das Translokationsereignis auslösen (Azevedo & Schliebs, 2006; Carvalho et al., 2006). Möglicherweise setzt auch die hochaffine Interaktion von Pex5p mit Pex14p dafür genügend Energie aus Konformationsübergängen frei (Barros-Barbosa et al., 2019; Lanyon-Hogg et al., 2010; Oliveira et al., 2003; Saidowsky et al., 2001). Rekonstituierte Pex5p-Pex14p-Komplexe sind in der Lage kurzlebige ionenleitende Poren zu öffnen (Meinecke et al., 2010). Als eines der wenigen umfassenden Modelle zur Translokation stellten Francisco et al. (2017) die Hypothese auf, dass das PIM-Translokon wie eine Spritze aufgebaut ist. Dabei sollen die Proteine des Andockkomplexes und des RING-Finger-Komplexes die Rolle des Zylinders ausüben und Pex5p quasi als Kolben das Substrat durch die peroxisomale Membran schieben.

Weiterhin wird die PIM im Gegensatz zum Tat-Transportsystem nicht zur Insertion von Membranproteinen genutzt. Zu diesem Zweck existiert das unabhängige Pex19p-System. Pex19p

bindet neu synthetisierte Membranproteine im Cytoplasma und begleitet sie zur peroxisomalen Membran, wo die Insertion erfolgt (Azevedo & Schliebs, 2006; Dyer et al., 1996; Erdmann & Blobel, 1996; Gould et al., 1996; Jones et al., 2004; McCammon et al., 1994; *Review* siehe bspw. Kim & Hettema, 2015).

## 1.2 Das Tat-Translokationssystem

Das Tat-System ist sowohl in Prokaryoten als auch Eukaryoten zu finden. In Bakterien und Archaeen vermittelt es den Export cytoplasmatischer Proteine in das umgebende Medium bzw. das Periplasma. Zu nennen sind hier bspw. *Escherichia coli* (Dolata et al., 2019; Ize et al., 2004; Jack et al., 2001; P. Rose et al., 2013), *Bacillus subtilis* mit zwei separaten Tat-Systemen (Eijlander et al., 2009; Goosens et al., 2015; Jongbloed et al., 2004) oder Haloarchaeen, bei denen Tat 90 % der exportierten Proteine transloziert (Dilks et al., 2005; Ghosh et al., 2019; R. W. Rose et al., 2002). In Cyanobakterien (bspw. Aldridge et al., 2008) und den Chloroplasten von Pflanzen (Finazzi et al., 2003; Hofmann & Theg, 2003; Mould & Robinson, 1991; Voelker & Barkan, 1995) vermittelt Tat außerdem den Transport über die Thylakoidmembran in das Thylakoidlumen. Auch in den Mitochondrien von Pflanzen und anderen Eukaryoten, außer Hefen und Tieren, könnte ein Tat-System existieren, da hier Tat-homologe Proteine nachgewiesen wurden (Bennewitz et al., 2020; Carrie et al., 2016; K. Schäfer et al., 2020; Sünkel et al., 1994; Unseld et al., 1997; Yen et al., 2002).

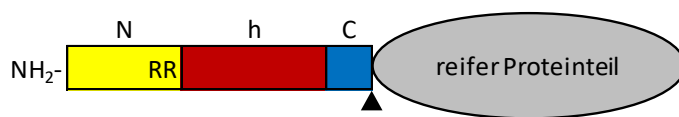
### 1.2.1 Das Tat-Signalpeptid

Bis auf einige Ausnahmen (s. u.) vermitteln klassische Signalpeptide (SP) prokaryotischer Struktur die Tat-Translokation: Es handelt sich um Amino- (N-) terminale, in Membrenumgebung helikale (Kerth et al., 2012; San Miguel et al., 2003) Verlängerungen der Proteine. Sie lassen sich grob in eine eher positiv geladene N-terminale Region, eine klar hydrophobe h-Domäne und eine kurze, hydrophile C-terminale Region unterteilen (siehe Abb. N2; Berks, 1996; Henry et al., 1997; von Heijne, 1985). Nach der Translokation wird das SP hinter letzterer abgespalten, was den funktionellen (sog. reifen) Teil des Proteins erst freisetzt (Frielingsdorf & Klösgen, 2007; Hageman et al., 1986; Lüke et al., 2009). Das SP selbst verbleibt in der Membran und wird dort abgebaut (Dissertation Fan, 2008).

Da das sog. Sec-Transportsystem ebenfalls SP nutzt, muss eine spezifische Unterscheidung von Tat-Substraten erfolgen. Charakteristisch für Tat-SP ist das namensgebende RR-Motiv unmittelbar vor der h-Domäne (Chaddock et al., 1995), welches für bakterielle SP in der Konsensussequenz (S/T)-RRxFLK liegt (Berks, 1996). Sec-SP tragen hier ein einzelnes R oder K. Eine ganze Reihe weiterer Merkmale wurden als zusätzlich Tat-dirigierend gezeigt, es ergab sich allerdings kein

alleinig bestimmender Faktor (Berks, 1996; Brink et al., 1998; Chaddock et al., 1995; Cristóbal et al., 1999; Henry et al., 1997; Hou et al., 2006; Sanders et al., 2001; Schünemann, 2007).

Für die Rolle des RR-Motivs wurde vermutet, dass es die Spezifität und Effizienz der Interaktion mit dem Tat-Rezeptorkomplex wesentlich verbessert (Huang & Palmer, 2017; McDevitt et al., 2006; Panahandeh et al., 2008; N. R. Stanley et al., 2000; Ulfing et al., 2017), aber nicht allein definiert, da sogar SP ohne RR-Motiv eine gewisse Bindung vermitteln können, wenn die Hydrophobizität der h-Domäne erhöht wird (Bageshwar et al., 2009; Huang & Palmer, 2017; Kreutzenbeck et al., 2007; Ulfing et al., 2017).



**Abbildung N2: Schema eines Tat-Signalpeptids mit reifem Protein.** Bezeichnet sind die N-, h- und C-Domäne und die Prozessierungsstelle (schwarzes Dreieck), sowie das Zwillingarginin.

Abgesehen von den Signalpeptiden als N-terminale Anhängsel existieren auch Tat-Signale, die innerhalb der Proteinsequenz liegen. Diese werden zur Integration von Membranproteinen genutzt, wobei die Signaltbereiche selbst als Membrananker dienen können (V. Braun & Hantke, 2020; Hatzixanthis et al., 2003; Passmore et al., 2020; Summer et al., 2000). Eine ähnliche Funktion können die SP von Tat-Substraten ausüben, wenn sie nach der Translokation nicht abgespalten werden. Ein Beispiel hierfür ist das thylakoidäre Rieske-FeS-Protein (S. Molik et al., 2001; K. Schäfer et al., 2020)).

### 1.2.2 Transport gefalteter Proteine durch Tat

Das Tat-System kann nachweislich gefaltete Proteine transportieren (Clark & Theg, 1997; Hynds et al., 1998; X. Ma & Cline, 2010; Marques et al., 2004; Rodrigue et al., 1999; Santini et al., 1998). Grundsätzlich ist Tat in der Lage, ungefaltete oder miteinander verknüpfte Substrate und Substrate anderer Translokasen zu transportieren. Dabei kann es jedoch zu einer Effizienzminderung oder nicht funktionellen Nebenprodukten kommen (Asai et al., 1999; Dittmar et al., 2014; E. Fan et al., 2010; Musser & Theg, 2000a; Panahandeh et al., 2008; Richter et al., 2007; Roffey & Theg, 1996; Schlesier & Klösgen, 2015).

Gegenstand von Diskussionen ist die Frage, ob die Tat-Translokase die korrekte Faltung der Substrate überprüfen kann (Richter & Brüser, 2005; Taw et al., 2020). In jedem Fall existiert in Bakterien eine Reihe von Faktoren, die die SP binden und so die Interaktion mit Tat verzögern oder verbessern könnten (Holzapfel et al., 2007; Maillard et al., 2007; Papish et al., 2003). Anscheinend üben die Proteine STT1 und STT2 im Stroma von *Arabidopsis thaliana* eine vergleichbare Funktion aus und helfen Tat-Substraten beim Übergang an die Thylakoidmembran (Ouyang et al., 2020).

Im Fokus dieser Arbeit steht chloroplastidäres Tat, für das besonders die Tat-Substrate PsbP und PsbQ (auch *oxygen evolving enhancer* OEC23 und OEC16) zu nennen sind. Diese und ihre Derivate stellen gut charakterisierte Modellsubstrate dar (Berghöfer & Klösigen, 1999; Cline & Mori, 2001; Klösigen et al., 1992; Voelker & Barkan, 1995).

## 1.3 Die Komponenten des Tat-Systems

### 1.3.1 Die TatAB-Proteinfamilie

Tat-Systeme bestehen stets aus mindestens einem, in der Regel zwei, Proteinen der TatAB-Familie und einem Vertreter der TatC-Familie (Wu et al., 2000; Yen et al., 2002). In Pflanzen werden TatA, TatB und TatC auch als Tha4, Hcf106 und cpTatC bezeichnet.

Pflanzliche und bakterielle TatA- und TatB-Proteine wurden im Zeitraum von 1995-1999 erstmals identifiziert. Sie weisen auf Sequenzebene eine deutliche Ähnlichkeit zueinander auf, die in der N-terminalen Region sehr hoch ist, aber zum Carboxy- (C-) Terminus verloren geht (siehe Abb. N3 A; Berks, Sargent, De Leeuw, et al., 2000; Chanal et al., 1998; H. Mori et al., 1999; Roy & Barkan, 1998<sup>1</sup>; F. Sargent et al., 1998; Settles et al., 1997; Voelker & Barkan, 1995; Walker et al., 1999; Weiner et al., 1998). Es handelt sich um eher kleine Proteine. Die Molekulargewichte von TatA und TatB aus Erbse (*Pisum sativum*) betragen etwa 8,9 bzw. 18,9 kDa (Quellen: Material Abschnitt 2.10, Abb. M2).

Der N-Terminus der TatAB-Proteine befindet sich auf der *trans*-Seite der Membran (d. h. auf der Seite, zu der das Substrat transloziert wird), der C-Terminus hingegen in *cis* (siehe Abb. N3 C; Aldridge et al., 2012; Gouffi et al., 2004; Koch et al., 2012; P. A. Lee et al., 2006; Y. Zhang, Wang, et al., 2014).

TatAB-Proteine liegen über eine  $\alpha$ -helikale Transmembrandomäne (TMH) integral in Membranen vor (Carrie et al., 2016; De Leeuw et al., 2001; Frielingsdorf et al., 2008; H. Mori et al., 1999; Walker et al., 1999), in die sie spontan inserieren können (Dabney-Smith et al., 2003; De Leeuw et al., 2001; Dissertation Fincher, 2001; Hauer et al., 2013; H. Mori et al., 1999; Zinecker et al., 2020). Plastidäres TatA und TatB sind allerdings im Kerngenom kodiert. Um zur Thylakoidmembran gelangen zu können, besitzen sie daher abspaltbare Transportsignale, die den Transport über die plastidären Hüllmembranen vermitteln (H. Mori et al., 1999; Settles et al., 1997<sup>2</sup>).

Für TatA wurde auch gezeigt, dass es in einer löslichen Population vorliegen kann. Es ist noch

---

<sup>1</sup> unveröffentlichte Daten

<sup>2</sup> unveröffentlichte Daten nach „Note 21“, einem nachgestellten Kommentar zur Publikation

unklar, ob es in dieser Form eine Funktion erfüllt (Cline & Mori, 2001; De Keersmaecker et al., 2007; Dilks et al., 2005; Frielingsdorf et al., 2008; Hauer et al., 2017; Nielsen et al., 1994; Pop et al., 2003; Taubert et al., 2015).

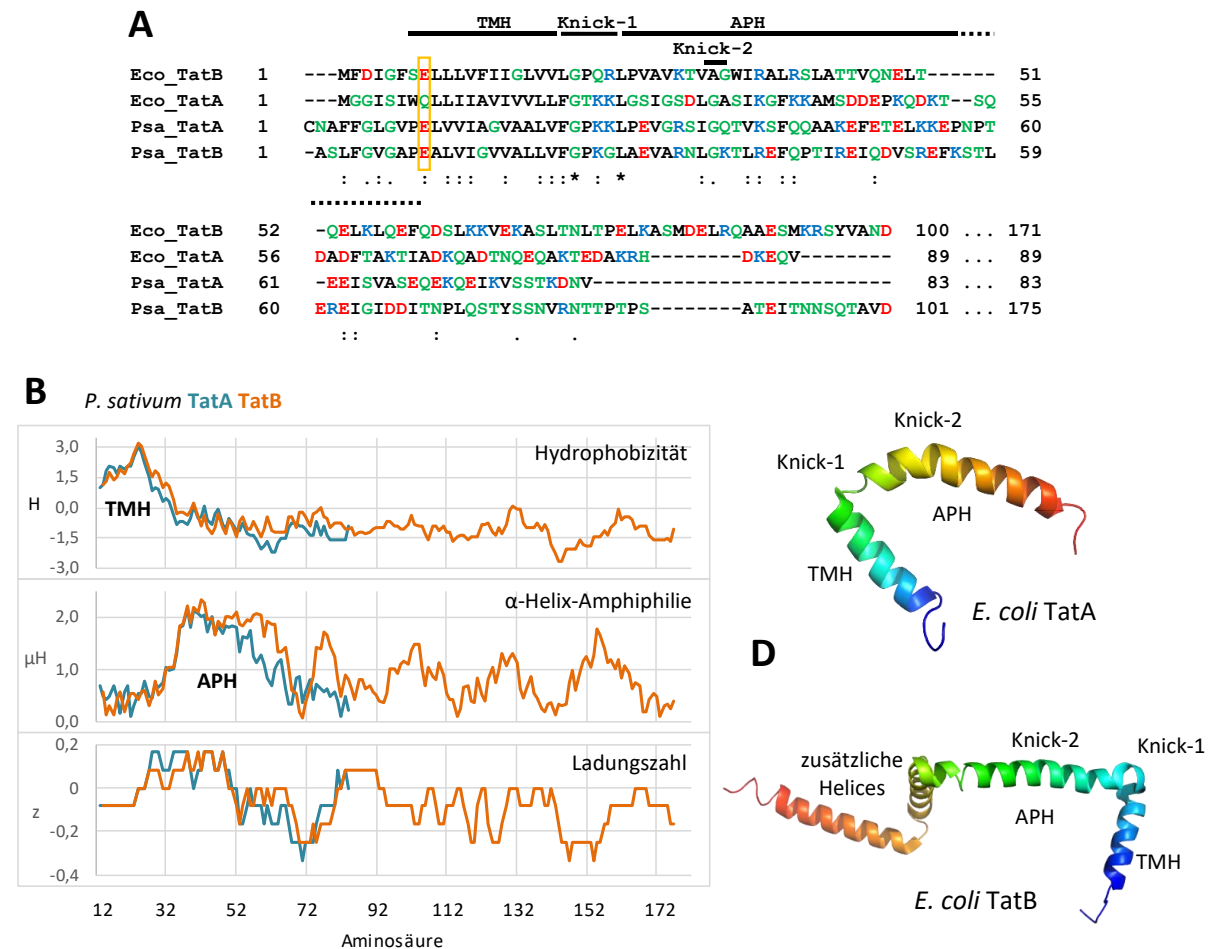
#### 1.3.1.1 Aufbau der TatAB-Proteine

Die Abfolge der Sekundärstrukturelemente der TatAB-Proteine ist äußerst charakteristisch (siehe Abb. N3 B-D): Ab dem N-Terminus geht der N-terminale Fortsatz (NTF) von höchstens ca. zehn Aminosäuren, der auf struktureller Ebene wenig auffällig ist, unmittelbar in die TMH über. Möglicherweise kann der NTF bei der Interaktion mit Membranen einen helikalen Charakter annehmen und die TMH verlängern (Pettersson et al., 2018). Es gibt auch Hinweise, dass hier wesentliche funktionelle Unterschiede zwischen TatA und TatB vorliegen: Normalerweise kann TatA die Funktion von TatB nicht übernehmen. Werden allerdings bestimmte Aminosäuren in der NTF von *E. coli* TatA verändert, entsteht ein bifunktionelles Protein, das sowohl die TatA- als auch die TatB-Rolle erfüllen kann ((Barrett et al., 2007; Blaudeck et al., 2005)).

Die ausgeprägt hydrophobe  $\alpha$ -helikale Transmembrandomäne (TMH) von TatA und TatB hebt sich dadurch hervor, dass sie recht kurz ist, was zu einer energetisch ungünstigen Exposition der hydrophileren TMH-Ränder an das hydrophobe Innere der Membran führen könnte (Y. Hu et al., 2010; Müller et al., 2007; Pettersson et al., 2018; Rodriguez et al., 2013; Y. Zhang, Wang, et al., 2014, 2014). Dazu kommt, dass sich am Anfang der TMH oft ein charakteristischer sehr hydrophiler Rest befindet (siehe Abb. N3 A orangefarbenes Rechteck und zusätzlich zu den genannten Quellen: Aldridge et al., 2012; Dabney-Smith et al., 2003). Der Einfachheit halber wird dieser Rest im Folgenden für alle Proteine nach der Position in *E. coli* TatB als „E8“ bezeichnet. Aufgrund der genannten Merkmale wird vermutet, dass die TMH durch eine Fehlpaarung hydrophiler Aminosäurereste mit dem hydrophoben Membraninneren lokalen Membranstress verursachen kann (siehe folgender Abschnitt). Weiterhin ist die TMH durch einen nahezu idealen helikalen Charakter vermutlich sehr stabil (Y. Hu et al., 2010; Müller et al., 2007; Walther et al., 2010).

Es folgt ein kurzer, stark abgeknickter Bereich am Übergang der TMH in die amphipathische Helix (APH). Diese Verbindung wird in dieser Arbeit als „Knick-1“ bezeichnet. In der Literatur wird sie häufig auch Gelenk genannt, aber es ist unklar, wie flexibel dieser Bereich ist und ob die Funktion der TatAB-Proteine auf eine hohe Beweglichkeit oder eine stabile Konformation dieser Region angewiesen ist (Y. Hu et al., 2010; Pettersson et al., 2018; Y. Zhang, Wang, et al., 2014).





**Abbildung N3: Eigenschaften von TatAB-Proteinen.**

**A** Sequenzvergleich von TatA und TatB aus Erbsen und *E. coli*. Quellen: Erbsen TatA NCBI: Q9XH46.1 (Reste 55-137, ohne Transitpeptid) und TatB Q94G16.1 (87-261) und *E. coli* TatA: VWQ03364.1, TatB: VWQ03363.1 mit dem Programm ClustalO (Madeira et al., 2019). Die längere C-terminale Domäne der TatB-Proteine ist nicht dargestellt. Sehr hydrophobe Aminosäuren sind schwarz, hydrophilere grün, saure rot und basische blau dargestellt.

Die Ähnlichkeit der Reste ist mit : abgestuft, \* markiert identische. Die längere APH von TatB ist durch eine Punktlinie angedeutet. Die hydrophilen Reste der TMH sind mit einem orangen Rechteck markiert und werden im Text nach dem *E. coli* TatB als „E8“ bezeichnet. **B** Darstellung des gleitenden Durchschnitts der Hydrophobizität  $H$ , der Ladungszahl  $z$  und des  $\alpha$ -helikalen hydrophoben Moments  $\mu H$  als Maß der Amphiphilie nach Eisenberg et al., 1982 (jeweils Fensterbreite 12) von Erbsen-TatA und TatB. Verwendet wurde die Hydropathieskala nach Kyte & Doolittle (1982). Entsprechend des Vergleichs in A wurde die Sequenz von TatB um eine Position nach rechts gerückt. Für TatA und TatB von *E. coli* finden sich entsprechende Darstellungen in Anhang Abb. A12. **C** Mutmaßliche Membrantopologie von TatAB-Proteinen. Die Membran ist grün und die CTR verkürzt dargestellt. Erstellt mit Hilfe des Programms Protter (Omasits et al., 2014). **D** Darstellung von *E. coli* TatA (PDB: 2MN7) und TatB (2MI6) nach NMR-Strukturdaten Y. Zhang, Wang et al. (2014) und Y. Zhang, Hu et al. (2014). Für TatB wurden zwei zusätzliche  $\alpha$ -Helices gefunden, die vermutlich nicht zum konservierten Aufbau der TatAB-Familie gehören. Die Bilder wurden mit dem Programm PyMol (Schrödinger LLC, 2015) erstellt. Der N-Terminus ist blau. Die Proteindomänen sind bezeichnet (NTF - N-terminaler Fortsatz, TMH - Transmembranhelix, APH - amphipathische Helix, CTR - C-terminale Region). Für weitere Details siehe Text.

Bei der APH fällt vor allem die namensgebende ausgeprägte Trennung von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren auf (siehe Abb. N3 B). Diese Amphiphilie führt in Gegenwart von Membranoberflächen (Dabney-Smith et al., 2006; D. Eisenberg et al., 1984; Fincher et al., 2003)<sup>3</sup> zur Ausbildung der  $\alpha$ -helikalen Struktur (Y. Hu et al., 2010; Lange et al., 2007; Maurer et al., 2010; Müller et al., 2007; Pettersson et al., 2018; Rodriguez et al., 2013; Y. Zhang, Wang, et al., 2014, 2014). Ein weiteres Merkmal sind die Ladungen der hydrophilen Oberfläche (Berks, Sargent, & Palmer, 2000; Y. Zhang, Wang, et al., 2014): Der anfänglich kationische Charakter wird neutraler und geht zum Ende der APH in negative Ladungen über (siehe Abb. N3 B).

Mit ihrer Amphiphilie und dem Bereich der positiven Ladungen ähnelt die APH sog. antimikrobiellen oder oberflächenaktiven Peptiden, die Membranen auf vielfältige Weise beeinflussen können (Chan et al., 2011; Dabney-Smith et al., 2006<sup>4</sup>).

Die APH besitzt einen Knick (Knick-2) und beschreibt dadurch einen leichten Bogen in Richtung der Membran (Y. Hu et al., 2010; Pettersson et al., 2018; Y. Zhang, Hu, et al., 2014). Bei TatB-Proteinen ist die APH länger und/oder ihre Amphiphilie ist stärker ausgeprägt als bei Vertretern der TatA-Gruppe, was ein Merkmal zur Unterscheidung ist (siehe Abb. N3 B und Anhang Abb. A12; Fincher et al., 2003; Sargent et al., 1999; Y. Zhang, Wang, et al., 2014).

Eine flexible und kaum konservierte Region bildet das Ende der Proteine (C-terminale Region, CTR). Diese zeichnet sich durch negative Ladungen aus, die am Übergang der APH in die CTR eine wichtige Rolle zu spielen scheinen (Hicks et al., 2003; Warren et al., 2009). Das auffälligste Unterscheidungsmerkmal zwischen TatA- und TatB-Proteinen ist, dass diese Region bei letzteren wesentlich länger ist (Sargent et al., 1999; Walker et al., 1999). Für TatB von *E. coli* wurden hier außerdem zwei zusätzliche  $\alpha$ -helikale Regionen nachgewiesen (Y. Zhang, Wang, et al., 2014) deren Funktion, wie auch die der gesamten CTR, bislang nur wenig untersucht ist. Bislang geht man davon aus, dass sie nicht essentiell ist (P. A. Lee et al., 2002), aber neuere Daten weisen auf eine Rolle bei der Bindung korrekt gefalteter Substrate hin (Taw et al., 2020).

### 1.3.1.2 Membraninteraktionen von TatAB-Proteinen

Das Zusammenspiel von TMH, Knick-1 und APH führt an der Membran wahrscheinlich zur Ausbildung einer „L“-förmigen Organisation (vgl. Abb. N3 C und D). Zu beachten sind allerdings auch jüngere Strukturdaten von Pettersson et al. (2018) nach denen die Stellung der APH wesentlich flexibler sein könnte als bisher angenommen.

---

<sup>3</sup> Dabney-Smith et al. (2006) & Fincher et al. (2003) jeweils unveröffentlichte Daten

<sup>4</sup> unveröffentlichte Daten von Dabney-Smith, Mori & Cline

Bei der L-Konformation liegt die N-proximale APH bis zum Knick-2 nicht parallel auf der Membranoberfläche auf, sondern ist leicht in sie geneigt. Dadurch steigt das Protein nach der TMH über Knick-1, der in die Membran eingetaucht ist, auf und wird ab Knick-2 zur CTR deutlich lösungsmittlexponiert (Aldridge et al., 2012; Hou et al., 2018; Y. Hu et al., 2010; Q. Ma et al., 2018; Rodriguez et al., 2013; Walther et al., 2010; Y. Zhang, Wang, et al., 2014). Hou et al. (2018) postulierten für TatA, dass das Zusammenspiel aus recht kurzer TMH und der Affinität der APH zur Membranoberfläche einen regulierbaren Membranstresser ergeben könnte. Tatsächlich wurde für Peptide der TMH und APH eine störende Wirkung auf Membranen gezeigt (Chan et al., 2011; Hou et al., 2018; Porcelli et al., 2002; Rodriguez et al., 2013; L. Zhang et al., 2013; L. Zhang, Liu, et al., 2014). Bei einer Überexpression von TatA zeigten *E. coli*-Zellen Membranstress-spezifische Reaktionen (Dissertation Heidrich, 2019; Mehner et al., 2012). Für membranständige TatA-Oligomere wurde weiterhin festgestellt, dass sie in einer lateral besonders beweglichen Form vorliegen können, was als Hinweis auf eine Membrandestabilisierung ausgelegt wurde (Varadarajan et al., 2020).

Wie gezeigt sind TatA und TatB einander sehr ähnlich. Mit der Ausnahme von bifunktionellen TatA-Proteinen, wie bspw. in *Bacillus subtilis* (Barnett et al., 2008; Goosens et al., 2015; Jongbloed et al., 2004), führen sie allerdings unterschiedliche Funktionen aus, auf die in den folgenden Kapiteln eingegangen wird. Zunächst soll jedoch die TatC-Proteinfamilie vorgestellt werden.

### 1.3.2 Die TatC-Proteinfamilie

Pflanzliches und bakterielles TatC wurde als letzte Komponente des Tat-Systems erstmal in den Jahren 1998-2001 beschrieben (Bogsch et al., 1998; H. Mori et al., 2001; Motohashi et al., 2001; F. Sargent et al., 1998). Auch TatC ist ein integrales Protein, wobei es im Gegensatz zu TatA ausschließlich membranassoziiert existiert (De Leeuw et al., 2001; Dilks et al., 2005; Frielingsdorf et al., 2008; H. Mori et al., 2001). TatC kann auch nicht spontan in Membranen inserieren (Fincher et al., 2003; Martin et al., 2009). In *E. coli* wurde eine komplexe Topogenese unter Beteiligung des SRP- und des Sec-System, sowie der YidC-Insertase gezeigt (Yi et al., 2003; Zhu et al., 2012). Plastidäres TatC ist, wie TatA und TatB, kernkodiert und wird über ein plastidenspezifisches Transportsignal in das Organell transportiert (Martin et al., 2009; H. Mori et al., 2001). Dort wurde die Beteiligung eines zweiten Sec-Systems an der Membraninsertion von TatC diskutiert (Martin et al., 2009; Skalitzky et al., 2011).

### 1.3.2.1 Die Struktur von TatC

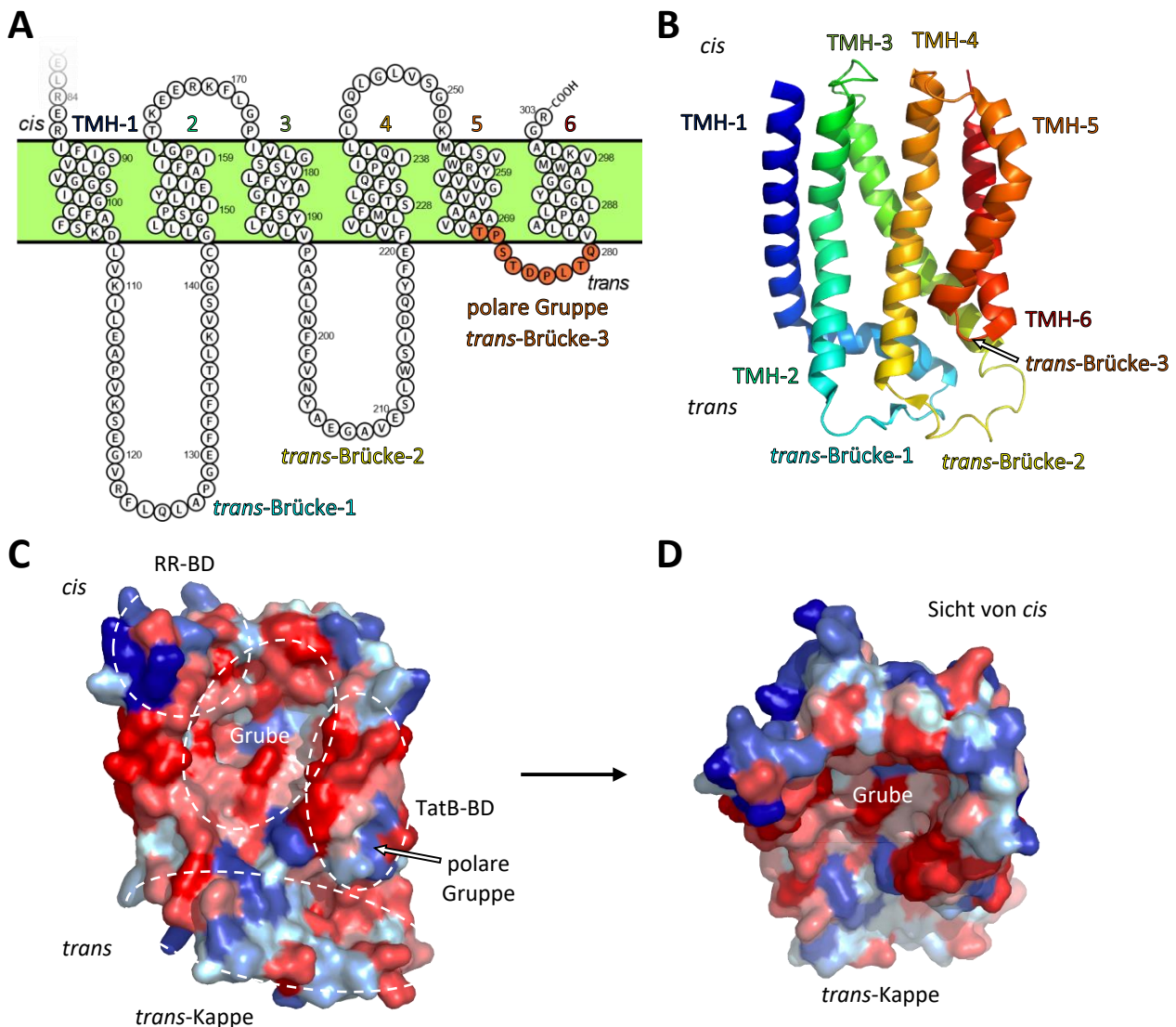
Der charakteristische Kern des Proteins wird durch sechs TMHs gebildet (siehe Abb. N4 A und B), N- und C-Terminus sind in *cis* lokalisiert (Gouffi et al., 2002; H. Mori et al., 2001; Punginelli et al., 2007; Ramasamy et al., 2013; Rollauer et al., 2012). Die TMHs sind durch die löslichen *cis*-Brücken-1 und -2, sowie die *trans*-Brücken 1-3 verbunden. Sequenzvergleiche der TatC-Familie zeigen nur eine mäßige Konserviertheit mit wenig essentiellen Resten, was darauf hindeutet, dass neben der Identität wichtiger Aminosäuren vor allem die räumliche Ordnung des Proteins die Funktion vermittelt (Allen et al., 2002; Punginelli et al., 2007; Simone et al., 2013; Yen et al., 2002). In dieser Hinsicht stellten die Röntgenkristallstrukturanalysen von Rollauer et al. (2012) und Ramasamy et al. (2013) einen Durchbruch dar, da die Tertiärstruktur von TatC einzigartig und komplex ist (siehe Abb. N4 C und D und stereoskopische Darstellung in Anhang Abb. A5).

Das Protein besitzt in etwa die Form einer hohlen Hand: Die TMHs liegen nicht dicht gepackt vor, sondern sind eher nebeneinander aufgereiht. Während sie in der *cis*-Hälfte des Proteins eher senkrecht verlaufen (entspr. Handfläche), sind sie zur *trans*-Seite oft abgeknickt. Der hintere Teil von TMH-1 (TMH-1-*trans*) liegt sogar beinahe parallel zur Membranoberfläche. Durch die abgeknickte Form der TMHs ergibt sich zu *trans* eine Vorwölbung, die durch die TMH-1-*trans* und die daran anschließende lange *trans*-Brücke-1 und *trans*-Brücke-2 zur sog. *trans*-Kappe erweitert wird (entspr. gewölbten Fingern).

### 1.3.2.2 Die TatC-Epitope

TatC besitzt in seiner Tertiärstruktur eine Reihe wichtiger Regionen: Einen von nur zwei deutlich konservierten Bereichen machen der N-terminale lösliche Bereich und die *cis*-Brücke-1 aus. Sie bilden die Bindedomäne (RR-BD) für das RR-Motiv der Tat-Signalpeptide, vermutlich zusammen mit dem C-terminalen löslichen Bereich, wenn vorhanden (Alami et al., 2003; Alcock et al., 2013; Allen et al., 2002; Barrett et al., 2005; Barrett & Robinson, 2005; Blümmel et al., 2017; Buchanan et al., 2002; Eijlander et al., 2009; Holzapfel et al., 2007; H. Mori et al., 2001; Ramasamy et al., 2013; Rollauer et al., 2012).

Die bereits erwähnte *trans*-Kappe ist strukturbestimmend, da die starke Interaktion ihrer Elemente die Neigung der TMH-*trans*-Abschnitte stabilisiert (Rollauer et al., 2012). Sie ist außerdem maßgeblich an der Bildung der TatC-Homooligomere beteiligt, die für die Tat-Proteinkomplexe strukturgebend sind (siehe Abschnitt 1.5.1.3).



**Abbildung N4: Struktur von TatC.** **A** Mutmaßliche Membrantopologie von Erbsen-TatC (NCBI: Q94G17 Reste 51-353, ohne Transitpeptid und mit verkürzter lösliche N-terminaler Region). Die TMHs sind gemäß der Annotation des NCBI-Datenbankeintrages Q94G17 festgelegt. Die Membran ist grün dargestellt. **B, C, D** Darstellung von *Aquifex aeolicus* TatC nach Röntgenkristallographiedaten von Rollauer et al. (2012), PDB: 4B4A. Die Daten enthalten keine löslichen N- und C-terminalen Regionen. Sicht auf die TatC-Innenseite (konkav, Grube): **B** Bändermodell zur Hervorhebung der TMHs und *trans*-Brücken. Der N-Terminus beginnt mit blauer Farbe. **C** Darstellung der Moleküloberfläche mit Farbkodierung für die Hydrophobizität: rot - sehr hydrophob, blau - sehr hydrophil. Hydropathieskala nach Kyte & Doolittle (1982). Bezeichnung der funktionellen Regionen (RR-BD - Zwillingsarginin-Bindedomäne, TatB-BD - TatB-Bindedomäne). **D** wie C, mit Sicht von *cis* zur Hervorhebung der TatC-Grube und der vorgewölbten *trans*-Kappe. Bilder erstellt mit PyMol (Schrödinger LLC, 2015). Für weitere Details siehe Text. Siehe auch stereoskopische Darstellung in Anhang Abb. A5.

TMH-4 fällt durch einen E- oder Q-Rest inmitten der ansonsten hydrophoben Sequenz auf. TMH-5 und -6 sind im Vergleich zu den anderen TMHs deutlich kürzer, wodurch die verbindende *trans*-Brücke-3 im Inneren der Membran liegt und etwas von der *trans*-Kappe entfernt ist. TMH-5, -6 und *trans*-Brücke-3 stellen auch die zweite der zwei konservierten Regionen dar. Hier befindet sich die TatB-Bindedomäne „TatB-BD“ (Allen et al., 2002; Buchanan et al., 2002; Gouffi et al., 2002; Holzappel et al., 2007). Dabei ist die Kürze der TatAB- TMH und der TatC-TMH-5 und -6 eine

auffällige Gemeinsamkeit.

Die besagte Form einer hohlen Hand ergibt eine Vertiefung, die von der vorgewölbten *trans*-Kappe, dem N-proximalen Teil von TMH-1 und besonders TMH-5 umgrenzt wird. Diese TatC-Grube enthält vor allem hydrophobe Aminosäurereste und kann vermutlich mit dem hydrophoben Membraninneren interagieren (siehe Abb. N4 C und D). Für sein Volumen besitzt TatC eine große Oberfläche und stellt wahrscheinlich eine Art Gerüst für die Tat-Translokation dar (Ramasamy et al., 2013; Rollauer et al., 2012).

#### 1.4 Zur Energiequelle – protonenmotorische Kraft

Das Tat-System zeichnet sich dadurch aus, dass es nur auf die protonenmotorische Kraft (PMK) als Energiequelle angewiesen ist und keine löslichen Faktoren wie ATP benötigt (K. Cline et al., 1992; Klösgen et al., 1992; Mould & Robinson, 1991; Nielsen et al., 1994). Lange war unklar, welche Komponente der PMK genutzt wird: Zunächst stand die Differenz der Protonenkonzentration  $\Delta\text{pH}$  im Fokus. Später zeigte sich aber, dass auch der Unterschied im elektrischen Potenzial  $\Delta\psi$  genutzt werden kann (Bageshwar & Musser, 2007; N. A. Braun et al., 2007; Brock et al., 1995; Finazzi et al., 2003; Whitaker et al., 2012). Die Schwierigkeit beim Tat-Transport gefalteter Proteine besteht darin, dass die PMK nicht durch Translokationsporen „kurzgeschlossen“ werden darf. Es stand daher schon früh fest, dass das Tat-System keine dauerhaften oder durchgängigen Poren schaffen kann (Berks, Sargent, De Leeuw, et al., 2000; Teter & Klionsky, 1999; Teter & Theg, 1998).

Die Tat-Translokation benötigt die PMK während des gesamten Transportprozesses (Alder & Theg, 2003b; Brock et al., 1995). Die energetischen Anforderungen teilen sich dabei in zwei Abschnitte auf: Ein intensiverer, kurzer und substratunabhängiger PMK-Einfluss wird gefolgt von einem längeren, schwächeren und substratabhängigen PMK-Bedarf. Erstere könnte eine Vorbereitung des Tat-Systems, letztere den Aufbau des Translokationsereignisses selbst darstellen (Alder & Theg, 2003b; Bageshwar & Musser, 2007; Whitaker et al., 2012). Möglicherweise muss ein substratspezifischer Mindestbedarf an Energie erfüllt werden, um die Translokation auszulösen. Dieser Bedarf ist aber anscheinend so niedrig, dass schon geringe PMK-Differenzen entsprechend 1-2 pH-Einheiten für den Transport genügen (Alder & Theg, 2003b; Brock et al., 1995).

## 1.5 Interaktionen der Tat-Komponenten

Im Folgenden soll die höhere Organisation der Tat-Proteine bis hin zur aktivierten Translokase dargestellt werden. Zunächst werden homooligomere Interaktionen der Proteine TatA, TatB und TatC beschrieben und im Anschluss auf dieser Grundlage die TatABC-Komplexe „zusammengebaut“.

### 1.5.1 Homooligomerisierung der Tat-Proteine

#### 1.5.1.1 TatA-Komplexe

Die Oligomerisierung von membranständigem TatA wurde in Bakterien schon häufig beobachtet (Bolhuis et al., 2000; de Leeuw et al., 2002; Gohlke et al., 2005; Oates et al., 2005; Rodriguez et al., 2013). TatA-Oligomere können unabhängig von TatB, TatC und der PMK auftreten (Barrett et al., 2005; Gohlke et al., 2005; Leake et al., 2008). Speziell für *E. coli* wurde das Auftreten eines breiten Spektrums von TatA-Komplexen beschrieben, wobei sich ein Komplex nur durch wenige TatA-Einheiten vom nächstgrößeren unterscheidet (Barrett et al., 2005; Behrendt et al., 2007; Gohlke et al., 2005; Leake et al., 2008; Oates et al., 2005; Richter & Brüser, 2005). In vielen der genannten Quellen war der Nachweis der TatA-Komplexe erst mit der rekombinanten Überproduktion von TatA möglich. Daher wird die funktionelle Relevanz der freien TatA-Oligomere noch immer diskutiert.

Die TMH der TatA-Proteine, und insbesondere der hydrophile Rest „E8“, vermitteln sowohl bei reinen TatA-Komplexen als auch in der Translokase Kontakte zwischen TatA-Molekülen (Aldridge et al., 2014; De Leeuw et al., 2001; Greene et al., 2007; Rodriguez et al., 2013; Y. Zhang, Hu, et al., 2014). Auch der NTF könnte eine Rolle spielen (Blümmel et al., 2015). Interaktionen im Bereich des Knick-1 und der APH sind schwächer und dynamischer (Barrett et al., 2005; Hicks et al., 2005; Y. Zhang, Hu, et al., 2014). Die CTR könnte einen negativen Einfluss auf die TatA-TatA-Interaktion haben (Y. Zhang, Hu, et al., 2014). Alternativ könnte sie sich nach dem sog. *charge-zipper*-Modell über die Interaktion komplementärer Ladungen parallel an der APH ausrichten und diese mit ihrer hydrophoben Oberfläche wiederum an der TMH (Berks, Sargent, & Palmer, 2000; Walther et al., 2013). Dieser Mechanismus, der zur TatA-Oligomerisierung führen soll, ist aber umstritten. Walther et al. zogen ihre Schlussfolgerungen aus Daten elektrophoretischer Analysen von *Bacillus subtilis* TatAd. Diese konnten jedoch durch *in vivo*-Daten zur TatA-Oligomerisierung in *E. coli* von Alcock et al. (2017) nicht bestätigt werden. Weiterhin ist es fraglich, ob die Knick-1-Region die notwendige Flexibilität für eine solche Konformation aufweist (siehe Abschnitt 1.3.1.1).

### 1.5.1.2 TatB-Komplexe

Auch für TatB sind homooligomere Kontakte beschrieben, allerdings zumeist innerhalb des „Gerüsts“ der strukturgebenden TatC-Oligomere (Behrendt & Brüser, 2014; De Leeuw et al., 2001; Kneuper et al., 2012; P. A. Lee et al., 2006; Q. Ma et al., 2018; Orriss et al., 2007). Wie bei TatA sind für TatB intensivere Kontakte über die TMH mit dem hydrophilen Rest „E8“ und den NTF beschrieben (Blümmel et al., 2015; P. A. Lee et al., 2006; Q. Ma et al., 2018; Y. Zhang, Wang, et al., 2014). Symmetrische APH- und CTR-Interaktionen liegen ebenfalls vor, sind aber wiederum dynamischer als in der TMH (P. A. Lee et al., 2006; Q. Ma et al., 2018). Eine Vermittlung von TatB-TatB-Interaktionen durch eine Häufung von Glutamatresten am Übergang zur CTR wurde allerdings von Fröbel et al., 2019 hervorgehoben siehe auch Hicks et al., 2003.

### 1.5.1.3 TatC-Oligomere

TatC bildet stabile Oligomere (Alcock et al., 2013; Barrett et al., 2005; Kneuper et al., 2012; X. Ma & Cline, 2013). In *E. coli* wurden nach selektiver Proteinsynthese Komplexe mit einem Molekulargewicht von ca. 220-250 kDa und kleinere Unterstufen beschrieben (Behrendt et al., 2007; Orriss et al., 2007). Da die Reste der *trans*-Kappe in Kontakt mit dem *trans*-Teil der TMH-3 treten können, könnten die TatC-Moleküle eines Oligomers ringförmig angeordnet sein, so dass die C-terminale Längsseite eines TatC an die N-terminale Seite des Nachbarn anschließt (siehe hierzu Abb. N6; Aldridge et al., 2014; Blümmel et al., 2015, 2017; Habersetzer et al., 2017).

Wie bereits angedeutet ist die *trans*-Kappe essentiell für die Ausbildung von TatC-TatC-Kontakten (Barrett et al., 2005; Behrendt & Brüser, 2014; Blümmel et al., 2015; Cléon et al., 2015; Geise, 2019; Geise et al., 2019; Holzapfel et al., 2007; Punginelli et al., 2007; Zoufaly et al., 2012).

Für die Stabilität von TatC-Oligomeren könnten aber auch Reste der RR-BD wichtig sein (Behrendt & Brüser, 2014; Punginelli et al., 2007).

Im Gegensatz zu TatA-Homooligomeren ist die funktionelle Relevanz von TatC-Oligomeren unstrittig. TatC liegt in der Translokase mindestens als Dimer vor (Bolhuis, 2002; Buchanan et al., 2002; Cléon et al., 2015; Dilks et al., 2005; Maldonado et al., 2011). Die heute weit verbreitete Meinung ist, dass TatC-Oligomere die Gerüststrukturen der Tat-Komplexe darstellen (Behrendt et al., 2007; Fröbel et al., 2019; Mangels et al., 2005; Orriss et al., 2007; Ramasamy et al., 2013; Rollauer et al., 2012). Zur Bildung von TatBC-Komplexen assembliert TatB vermutlich in diese „Gerüstoligomere“ (Behrendt et al., 2007; De Keersmaecker et al., 2007; P. A. Lee et al., 2006; Mangels et al., 2005; Orriss et al., 2007; Punginelli et al., 2007; P. Rose et al., 2013; Zinecker et al., 2020).



### 1.5.2 Aufbau von TatBC-Rezeptorkomplexen

TatB und TatC bilden Heterooligomere (Bolhuis et al., 2001; Cline & Mori, 2001; Fincher et al., 2003; H. Mori et al., 1999; Sargent et al., 1999). Diese sog. TatBC-Rezeptorkomplexe sind stabil und existieren unabhängig von PMK oder Substratbindung (Alcock et al., 2013; Cline & Mori, 2001). Im Gegensatz zu TatB liegt TatC unter physiologischen Bedingungen nicht zusätzlich frei vor, sondern findet sich immer im Komplex (Alami et al., 2003; Cline & Mori, 2001; Q. Ma et al., 2018; Oates et al., 2005).

Für *E. coli* wurden sowohl TatBC- als auch TatABC-Komplexe beschrieben. Das Molekulargewicht von aus der Membran gelösten (solubilisierten) TatBC-Spezies liegt, abhängig vom verwendeten Detergens, zumeist bei 400-650 kDa (Bolhuis et al., 2001; Cléon et al., 2015; McDevitt et al., 2006; Richter & Brüser, 2005; Tarry et al., 2009; Wojnowska et al., 2018). TatA scheint in TatABC-Komplexen nicht fest gebunden zu sein, da es bei Präparationen oft verloren geht und die enthaltene Menge je nach Analyse schwankt. Es wird für die Rezeptorfunktion nicht benötigt und stellt evtl. ein Überbleibsel eines vorherigen Translokationsereignisses dar (Behrendt & Brüser, 2014; de Leeuw et al., 2002; Habersetzer et al., 2017; McDevitt et al., 2005; Oates et al., 2003; Orriss et al., 2007; Taubert et al., 2015).

Für Pflanzen wurden TatBC-Komplexe mit einer Größe von ca. 600-700 kDa, gelegentlich mit Unterstufen bis 300 kDa, gezeigt (Berghöfer & Klösgen, 1999; Cline & Mori, 2001; Fincher et al., 2003; Jakob et al., 2009; H. Mori et al., 1999). In pflanzlichen TatBC-Komplexen wurde außerdem noch nie TatA nachgewiesen (Celedon & Cline, 2012<sup>5</sup>; Cline & Mori, 2001; Frielingsdorf et al., 2008; Jakob et al., 2009).

Das Verhältnis von TatB zu TatC ist vermutlich 1:1. Protomere des Komplexes wären somit TatB<sub>1</sub>C<sub>1</sub>-Heterodimere. (Bolhuis et al., 2001; Fröbel et al., 2019; Oates et al., 2003). Die Anzahl von TatBC-Protomeren im Komplex ist jedoch unklar, liegt aber vmtl. im Bereich von zwei bis acht (Alcock et al., 2016; Aldridge et al., 2014; Blümmel et al., 2015; Cledon & Cline, 2012; Maurer et al., 2010; Oates et al., 2005; Tarry et al., 2009). Nach Elektronenmikroskopiedaten besitzen Tat(A)BC-Komplexe eine elliptische Grundfläche. Sie grenzen halbkugelförmig einen inneren Hohlraum vom Rest der Membran ab, wobei die flache Seite nach *cis* weist. (Oates et al., 2003; Tarry et al., 2009)

#### 1.5.2.1 Interaktionen von TatB und TatC

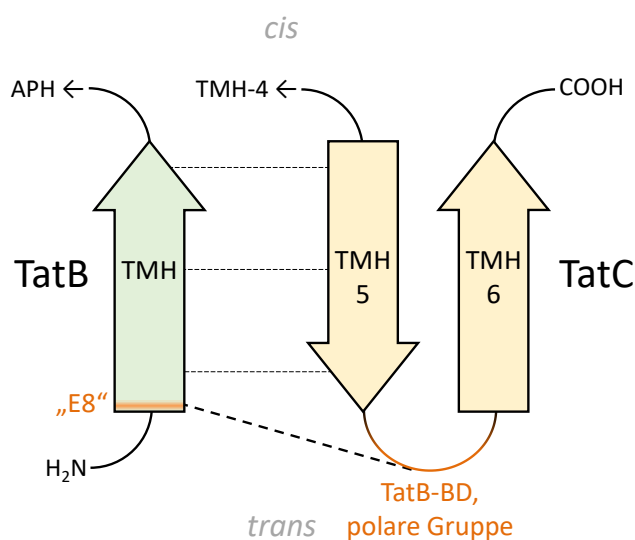
Beinahe alle Domänen von TatB stehen in ausgeprägtem Kontakt mit TatC: Die wichtigsten Kontakte vermittelt die TMH und ihr hydrophiler Rest „E8“, aber auch NTF, Knick-1 und APH

---

<sup>5</sup> unveröffentlichte Daten

spielen eine Rolle (Alcock et al., 2016; Behrendt & Brüser, 2014; De Leeuw et al., 2001; Fincher et al., 2003; Q. Ma et al., 2018; Zinecker et al., 2020). Die CTR scheint für die Interaktion von TatB und TatC eher unwichtig zu sein (Q. Ma et al., 2018; McDevitt et al., 2005).

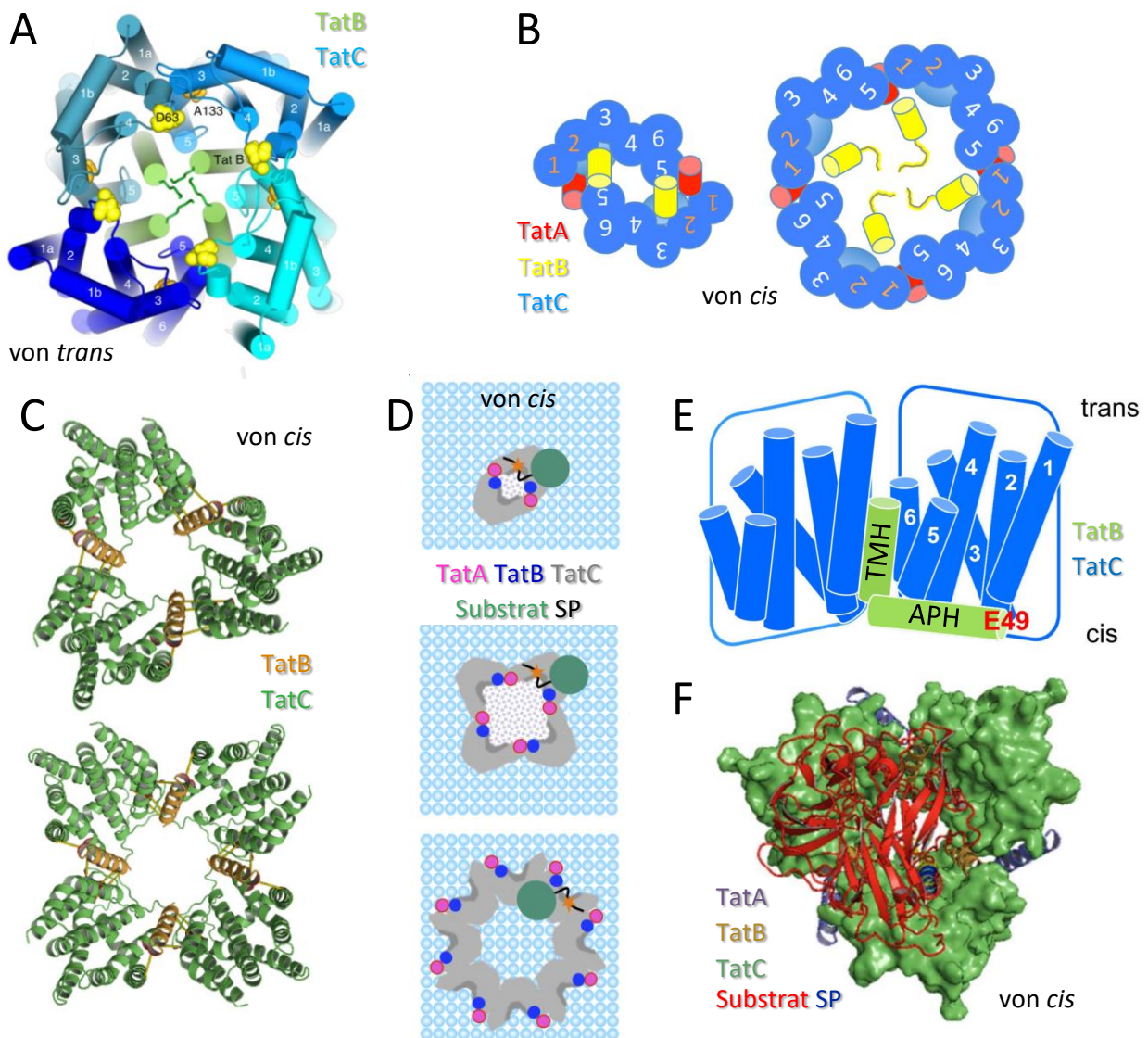
Die TatC *trans*-Brücke-3 beinhaltet eine Folge hydrophilerer Aminosäuren, die sog. „polare Gruppe“ (siehe Abb. N4 A), die zusammen mit Teilen von TMH-5 und -6 die wichtigste TatB-Bindestelle (TatB-BD) darstellt. Die TatB-TMH bindet ab hier entlang der TMH-5, wobei die beiden Helices antiparallel ausgerichtet sind, wie in Abb. N5 dargestellt (Alcock et al., 2016; Blümmel et al., 2015; Cléon et al., 2015; Habersetzer et al., 2017; Kneuper et al., 2012; Q. Ma et al., 2018; Rollauer et al., 2012).



**Abbildung N5: Schematische Illustration der Interaktion von TatB mit der TMH-5 der TatB-Bindedomäne von TatC.** Die Transmembranhelices 5 und 6 von TatC und die TMH von TatB sind als Blockpfeile in N→C-Orientierung dargestellt. Die angrenzenden Proteinabschnitte sind als dünne Linien gezeichnet und die folgenden Domänen bzw. der N- oder C-Terminus sind angegeben. Die dicke gestrichelte Linie verdeutlicht die Interaktion zwischen der Region um den hydrophilen Rest „E8“ der TatB-TMH mit der TatB-Bindedomäne (TatB-BD) von TatC. Diese sind orange hervorgehoben. Die dünnen gestrichelten Linien deuten weitere Wechselwirkungen zwischen der TatB-TMH und der TatC-TMH-5 an. Da die beiden Helices eine entgegengesetzte N→C-Orientierung haben ist ihre Anordnung antiparallel. Die Membran ist nicht gezeigt. Details siehe Text.

Vermutlich als Konsequenz der primären Interaktion mit der TatB-BD ergeben sich weitere Kontakte mit der *trans*-Kappe und den *trans*-seitigen Anteilen von TMH-2 und -4. Auch der NTF von TatB könnte mit der *trans*-Kappe interagieren (Blümmel et al., 2015; Cléon et al., 2015; Patel et al., 2014). Allerdings steht anscheinend auch die RR-BD von TatC in Kontakt mit TatB (Buchanan et al., 2002; Fröbel et al., 2019; Zoufaly et al., 2012).

Diese Daten könnten so interpretiert werden, dass TatB zwischen zwei TatC interkaliert. Dabei würde ein Molekül TatB die TatB-BD eines TatC und die Region um die RR-BD eines benachbarten TatC binden (siehe Abb. N6; Alcock et al., 2016; Blümmel et al., 2015; Fröbel et al., 2019; New et al., 2018; Rollauer et al., 2012). Dies legt zum einen die erwähnte ringförmige Anfang-zu-Ende-Orientierung benachbarter TatC nahe, zum anderen impliziert es eine Mitwirkung von TatB an der Gesamtstruktur von TatBC (Behrendt & Brüser, 2014; Blümmel et al., 2015; Q. Ma et al., 2018).



**Abbildung N6: Aktuelle Modelle zum Aufbau des TatBC-Rezeptorkomplexes, ggf. mit TatA und Substrat.** Basis aller Modelle ist eine interkalierte Position eines Moleküls TatB zwischen zwei Molekülen TatC. Dabei interagiert die TatB-TMH mit der TatB-Bindedomäne eines TatC (siehe auch Abb. N5) und der RR-Bindedomäne (*cis*-Brücke-1, also *cis*-Bereich von TMH-1 und -2) eines anderen TatC. In allen Modellen ist die TatB-TMH dargestellt, der NTF ist hingegen nur in den Bildern A und B gezeigt, die APH nur in Bild E. **A** Verändert nach Blümmel et al. (2015). Für die Publikation interessante Reste wurden gelb hervorgehoben. 1a und 1b entsprechen TMH-1 und TMH-1-*trans*. **B** Zwei verschiedene Modelle verändert nach Cline (2015). **C** Zwei Modelle mit drei oder vier TatBC-Protomeren, verändert nach Alcock et al., 2016. **D** Drei verschiedene Modelle verändert nach Hamsanathan & Musser (2018). Zu beachten ist auch das dritte Modell mit nach außen gerichteter TatC-Grube. Die Membranoberfläche ist mit blauen Kreisen für die Lipidkopfgruppen dargestellt. **E** Verändert nach Fröbel et al., 2019. Seitliche Sicht in die TatC-Grube. Der für die Publikation interessante Rest E49 ist hervorgehoben. **F** Verändert nach Palmer & Stansfeld (2020). Das Substrat SufI befindet sich oberhalb (in Richtung des Betrachters) des Komplexes.

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt in der Vermutung, dass die Assoziation von TatB mit den TatBC-Komplexen nur schwach affin ist. Eindrucksvoll sind in dieser Hinsicht Daten von Barrett et al. (2007) und Zinecker et al. (2020), die Experimente mit einem *E. coli* TatA-Protein, das auch die Funktion von TatB ausüben kann, bzw. einer mutierten Variante von Erbsen-TatB durchführten: Diese Proteine waren prinzipiell in der Lage, den Tat-Transport zu vermitteln, obwohl sie so schwach mit TatC interagierten, dass die Assoziation mit den Tat-Komplexen nicht nachweisbar war.

### 1.5.3 Substratbindung als Vorbereitung des TatBC-Komplexes auf die Translokation

Die SP der Substratproteine können spontan mit Membranoberflächen wechselwirken. Dies wird als optionaler erster Schritt bei der Substratbindung diskutiert (Bageshwar et al., 2009; Bageshwar & Musser, 2007; Berghöfer & Klösigen, 1999; Brüser & Sanders, 2003; Hamsanathan et al., 2017; Hou et al., 2006; Kerth et al., 2012; San Miguel et al., 2003; Schlesier & Klösigen, 2010; Shanmugham et al., 2006). In jedem Fall trifft das Substrat schließlich auf den TatBC-Komplex und wird gemeinsam von beiden Proteinen gebunden.

Da TatBC-Komplexe mehrere TatBC-Protomere aufweisen ist es denkbar, dass ein Komplex mehrere Substrate zugleich binden kann. Dies wird allerdings intensiv diskutiert und die Daten hierzu divergieren (Aldridge et al., 2014; Celedon & Cline, 2012; X. Ma & Cline, 2010; Tarry et al., 2009; Wojnowska et al., 2018).

Der erste Kontakt am TatBC-Rezeptor, die sog. *initiale Bindung*, ist recht schwach und reversibel (Gérard & Cline, 2007; Whitaker et al., 2012; Zoufaly et al., 2012). Die RR-BD von TatC interagiert dabei spezifisch mit dem RR-Motiv des SP (Alami et al., 2003; Fincher et al., 1998; Gérard & Cline, 2006, 2007; Kreutzenbeck et al., 2007; Lausberg et al., 2012; McDevitt et al., 2006; Strauch & Georgiou, 2007). Vermutlich vermittelt TatC (Blümmel et al., 2017; Fröbel et al., 2012) anschließend eine Insertion des SP und des unmittelbaren Anfangs des reifen Proteinteils in den Komplex (Aldridge et al., 2014; Blümmel et al., 2015; Kreutzenbeck et al., 2007; Strauch & Georgiou, 2007; Zoufaly et al., 2012). Der restliche reife Teil interagiert wahrscheinlich nicht mit TatC (Cline, 2015) und verbleibt demzufolge in *cis*. Der N-Terminus des Substrates verbleibt ebenso in *cis* und die Bindung von SP und RR-BD wird erst nach der erfolgten Translokation gelöst (Fincher et al., 1998; Gérard & Cline, 2006). Daher bilden das SP und der Anfang des reifen Substrates eine Haarnadelstruktur, die tief in den TatBC-Komplex hineinreicht – der *fortgeschrittene Bindemodus* (Fincher et al., 1998; Fröbel et al., 2012; Gérard & Cline, 2007; Hamsanathan et al., 2017; Tarry et al., 2009; Ulfing & Freudl, 2018). Vermutlich ist die hydrophobe Grube von TatC (vgl. Abb. N4 C und D) der Ort dieser Insertion der Haarnadel (Aldridge et al., 2014;

Blümmel et al., 2015; Habersetzer et al., 2017; Ramasamy et al., 2013). Es wäre möglich, dass das SP, ähnlich wie das zwischen die TatC-Moleküle interkalierte TatB, an einem TatC mit der RR-BD interagiert und an einem benachbarten TatC die Haarnadelstruktur ausbildet. Die genaue Stellung des SP ist aber unklar (Aldridge et al., 2014; Hamsanathan & Musser, 2018).

Im Rahmen der fortgeschrittenen Bindung ermöglicht erst die tiefe Insertion des SP in TatC die Interaktion von TatB und Substrat (Blümmel et al., 2017; Cline & Mori, 2001; Fröbel et al., 2012; Gérard & Cline, 2006; Kneuper et al., 2012; Maurer et al., 2010; San Miguel et al., 2003). Anders als bei der initialen Bindung des SP an die RR-BD von TatC ist die Interaktion des SP mit TatB sehr großflächig: Sie beginnt beim RR-Motiv des SP und erstreckt sich über die gesamte h-Domäne. Auf der Seite von TatB ist die TMH involviert (Alami et al., 2003; Blümmel et al., 2015; Gérard & Cline, 2006; Hamsanathan et al., 2017; Huang et al., 2017; Kreutzenbeck et al., 2007; Lausberg et al., 2012; Maurer et al., 2010; Panahandeh et al., 2008). Auch der NTF von TatB ist an der Bindung beteiligt (Blaudeck et al., 2005; Blümmel et al., 2015; Ulfing et al., 2017). Die Interaktion mit dem Substrat läuft weiter über den frühen reifen Teil des Substrates (zweite Hälfte der Haarnadel) und die APH von TatB und endet mit vereinzelt Kontakten der CTR und des gefalteten Substratkerns (Alami et al., 2003; Blümmel et al., 2015; Gérard & Cline, 2006; Hamsanathan et al., 2017; Huang et al., 2017; Q. Ma et al., 2018; Maurer et al., 2010; Ulfing & Freudl, 2018).

Werden die Interaktionen zwischen Substrat und TatB durch Mutationen verstärkt, ist es möglich, dass der initiale Bindschritt von SP und RR-BD schnell in den fortgeschrittenen übergeht oder quasi „übersprungen“ wird (Gérard & Cline, 2006, 2007; Huang et al., 2017; Huang & Palmer, 2017; Kreutzenbeck et al., 2007; Lausberg et al., 2012; Ulfing et al., 2017; Ulfing & Freudl, 2018; Zoufaly et al., 2012).

Die initiale Bindung ist PMK-unabhängig, die fortgeschrittene wird durch sie gefördert und erhalten (Alami et al., 2003; Brock et al., 1995; Cline & Mori, 2001; Gérard & Cline, 2007; Musser & Theg, 2000b; Whitaker et al., 2012).

#### 1.5.4 Aktivierung der Translokase – Eintritt von TatA in den Substrat-Rezeptor-Komplex

Erst nach der Substratbindung und dem Vorliegen der PMK und nur für die eigentliche Translokation assoziiert TatA mit dem Komplex (Alami et al., 2003; Alcock et al., 2013; Cline & Mori, 2001; Hauer et al., 2013; McDevitt et al., 2005; Mehner et al., 2012; Mori & Cline, 2002; Panahandeh et al., 2008; Pop et al., 2003; P. Rose et al., 2013; Smith et al., 2017).

#### 1.5.4.1 Interaktion von TatA mit TatBC

Man könnte annehmen, dass Interaktionen, die TatB mit anderen Proteinen zeigt, zu einem Teil auch für TatA zutreffen, da die Proteine sehr ähnlich sind. Dies könnte Vorstellungen zur TatA-Funktion ergänzen, da im Vergleich zu TatB weniger Interaktionsdaten vorliegen.

TatA interagiert unmittelbar mit TatB und TatC (Cline & Mori, 2001; Fröbel et al., 2011). Ganz ähnlich wie für TatB sind die TatC-Oligomere für TatA die essentielle organisierende Struktur (Aldridge et al., 2014; Bolhuis et al., 2001; Cléon et al., 2015; Dabney-Smith et al., 2006; Rollauer et al., 2012). Auch TatA kann mit der TatB-BD von TatC interagieren. Für die Bindung an die polare Gruppe ist der hydrophile Rest „E8“ der TatA-TMH essentiell, was seine Rolle für die Funktionalität erklärt. Wahrscheinlich nimmt TatA dabei eine ähnliche Ausrichtung entlang der TatC-TMH-5 wie TatB ein (Alcock et al., 2016; Aldridge et al., 2014; Dabney-Smith et al., 2003; Greene et al., 2007; Habersetzer et al., 2017; P. A. Lee et al., 2002; Zoufaly et al., 2012). Hierdurch entsteht eine räumliche Nähe zu TatB.

Möglicherweise reguliert die TatB-TMH den Zugang von TatA in den Komplex (Alami et al., 2003; Blümmel et al., 2015; Habersetzer et al., 2017; Huang et al., 2017). In jedem Fall interagieren sie miteinander (Barrett & Robinson, 2005) und Mutationen eines konservierten F in der APH von *E. coli* TatA können zur Störung der TatBC-Komplexstruktur führen (Barrett et al., 2005; Gohlke et al., 2005; Hicks et al., 2003, 2005). Weiterhin führt die Interaktion von TatA mit Substrat möglicherweise zur Bindung der C-proximalen APH an TatBC (Aldridge et al., 2012; Hou et al., 2018).

Vermutlich spielt auch der NTF von TatA eine Rolle. Dieser interagiert unter anderem mit den weit in *trans* liegenden TatB-NTF und der TatC *trans*-Kappe. Anscheinend befindet sich hier ein Koaleszenzbereich aller drei Proteine (Aldridge et al., 2014; Blümmel et al., 2015; Zoufaly et al., 2012).

Es existieren auch Daten zu alternativen Bindestellen von TatA im Tat-Komplex. Für *E. coli* wurde beim Fehlen von Substrat eine Bindung von TatA an die TatC TMH-6 beschrieben (vgl. auch TatABC-Komplexe in Abschnitt 1.5.2). Sind Substrat und PMK anwesend, tauscht *E. coli* TatA mit TatB die Plätze, was die Vorstellung der Regulierung des TatA-Eintritts durch TatB stützt (Habersetzer et al., 2017). Für Pflanzen wurde ein solcher Positionswechsel bislang nicht festgestellt. TatA in Thylakoiden interagiert scheinbar auch ohne Substratbindung mit der TatB-BD-Region, was vermutlich durch eine gewisse Dynamik der Konformation der TatBC-Komplexe, in der Publikation als „Atmen“ bezeichnet, ermöglicht wird (Aldridge et al., 2014). Zusätzlich zeigten Aldridge et al. (2014) aber auch eine substratabhängige TatA-Interaktion an der TMH-4

von TatC in der Nähe des dort eingebetteten E/Q-Restes.

Trotz der großen Menge an Daten wird die Struktur der Tat-Komplexe noch immer diskutiert. Unklar ist dabei insbesondere, ob die TatC-Grube ins Innere eines Komplexes gerichtet ist oder nach außen weist. Wichtig wäre weiterhin zu klären, ob TatA *in* den Komplex (Fröbel et al., 2019) oder peripher assembliert wird (Alcock et al., 2016).

#### 1.5.4.2 Interaktion von TatA und Substrat

Die Ausbildung weitreichender Interaktionen zwischen TatA und Substrat findet vermutlich als einer der letzten Schritte unmittelbar vor der Translokation statt. Dies könnte das Substrat noch tiefer in den Komplex inserieren (Panahandeh et al., 2008)

Wie auch TatB interagiert die TatA-TMH mit der h-Domäne des SP in der Nähe des TatC RR-Motivs (Alami et al., 2003; Blümmel et al., 2017; Fröbel et al., 2011). Verstärkt durch die PMK interagiert der NTF weiter in *trans* vermutlich mit der tief inserierten SP-Haarnadelstruktur (Blümmel et al., 2015; Fröbel et al., 2011), aber auch mit dem reifen Substratkern (Pal et al., 2013). Am eben erwähnten Koaleszenzbereich könnten folglich alle vier Proteine des Komplexes interagieren. Auch die TatA-APH und -CTR wechselwirken mit dem Substrat (Fröbel et al., 2011; Pal et al., 2013). Für die Ausbildung der TatA-Substrat-Interaktion besteht ein kurzer, nicht dauerhafter PMK-Bedarf (Alami et al., 2003; Aldridge et al., 2014; Blümmel et al., 2015; Fröbel et al., 2011).

#### 1.5.4.3 TatA-Homooligomere an der aktivierten Translokase

Eine gängige Vorstellung der aktivierten Tat-Translokase beinhaltet die Ausbildung von TatA-Oligomeren an bzw. in TatBC-Komplexen (Dabney-Smith et al., 2006). Unklar ist, ob diese mit den in Abschnitt 1.5.1.1 beschriebenen freien TatA-Komplexe zusammenhängen. Diese ist von der Anwesenheit des TatBC-Komplexes, Substratbindung und insbesondere der PMK abhängig (Alami et al., 2003; Alcock et al., 2013; Aldridge et al., 2014; Cléon et al., 2015; Dabney-Smith et al., 2006; Whitaker et al., 2012). Bis zum heutigen Tage ist nicht abschließend geklärt, ob und warum TatA im TatBC-Komplex oligomerisiert (Hamsanathan & Musser, 2018).

#### 1.5.5 Der Translokationsvorgang

Die Ausbildung der aktivierten Translokase erfordert ca. 20-40 s, bis der Transportvorgang erfolgt (Celedon & Cline, 2012; Cline, 2015; Hauer et al., 2013; Whitaker et al., 2012). Mit dem pflanzlichen Modellsubstrat 16/23 kann man intermediäre Zustände unmittelbar vor (SP interagiert mit Membran oder Rezeptor) und nach (reifer Teil transloziert, noch nicht prozessiert) dem Transport feststellen (siehe Abb. N7; Berghöfer & Klösigen, 1999). Das Translokationsereignis selbst scheint allerdings äußerst kurzlebig zu sein; hierzu liegen kaum Daten vor. Da das RR-Motiv

des SP während der Translokation an der RR-BD von TatC verbleibt, ermöglicht ein Aufklappen der SP-Haarnadel den Übergang des reifen Substratteils über die Membran (Hamsanathan et al., 2017). Anschließend dissoziiert der Translokationskomplex in etwa 30 s wieder in Rezeptorkomplex und TatA. Ein Transportzyklus läuft also im Maßstab von wenigen Minuten ab (Celedon & Cline, 2012; Teter & Theg, 1998; Whitaker et al., 2012).

#### 1.5.5.1 Modelle zum Mechanismus der Tat-Translokation

Der dem Translokationsereignis zugrunde liegende Mechanismus ist noch immer ungeklärt. Die gängigsten Modelle sollen im Folgenden vorgestellt werden.

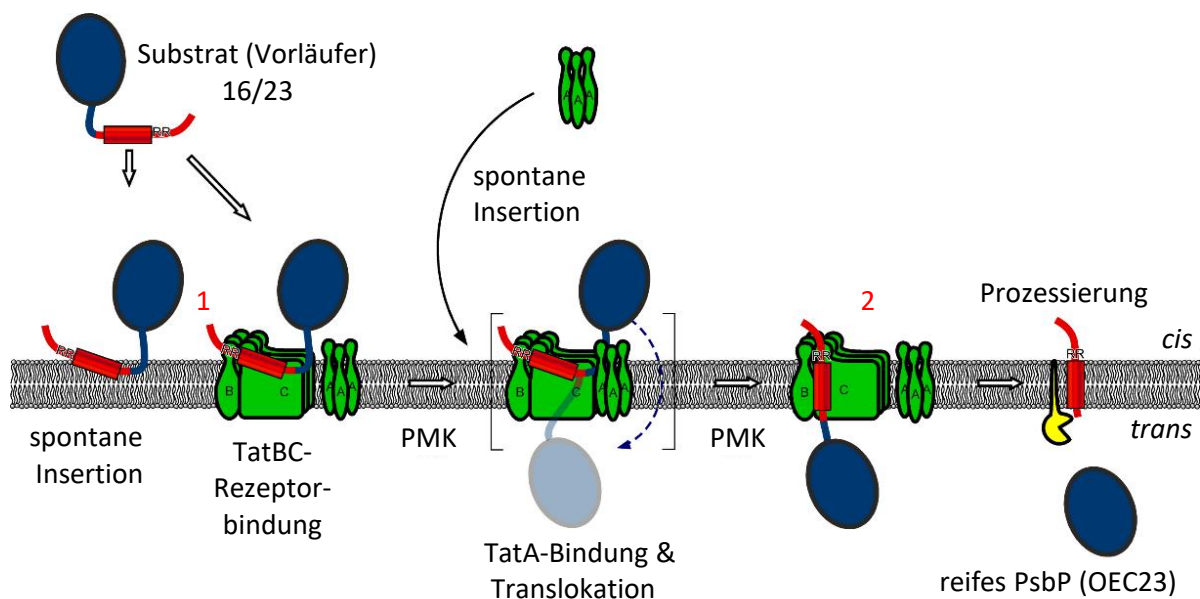
Als erstes Arbeitsmodell mit breitem Zuspruch wurde eine TatA-Pore postuliert. Dabei soll TatA in der Membran wässrige Poren auskleiden, die zur Größe des Substrates passen (Berks, Sargent, De Leeuw, et al., 2000; Gohlke et al., 2005; Mori & Cline, 2002; Rodriguez et al., 2013). Gestützt wurde dies durch die Existenz freier, quasi „vorgefertigter“ TatA-Komplexe (siehe Abschnitt 1.5.1.1) und Daten die mit etwa 25 TatA pro Translokase einen Überschuss im Vergleich zu TatB und TatC nahelegen (Celedon & Cline, 2012; Leake et al., 2008). Dieses Modell wird heute aber als unwahrscheinlich angesehen (zusammengefasst in Hamsanathan & Musser, 2018): Obwohl die Mitglieder der TatAB-Familie TatE (*E. coli*) und TatAd (*Bacillus subtilis*) den Tat-Transport in der Abwesenheit anderer TatA-Proteine vermitteln können, sind ihre Komplexe zu klein für Poren, die die Substratmoleküle umfassen könnten (Baglieri et al., 2012; D. Beck et al., 2013). Darüber hinaus zeigt sich das für *E. coli* typische Spektrum von TatA-Komplexgrößen bei weitem nicht für alle Proteine der TatA-Familie in anderen Organismen (Baglieri et al., 2012; Barnett et al., 2009; D. Beck et al., 2013; Cline & Mori, 2001; Dilks et al., 2005; Jakob et al., 2009; Porcelli et al., 2002). Desweiteren wurde kein Einfluss der Substratgröße auf die benötigte TatA-Menge festgestellt (Leake et al., 2008; unveröffentlichte Daten der AG Klösgen). Daher erscheint eine dem Substrat angepasste reine TatA-Pore unrealistisch.

Als alternativer Ansatz entwickelte sich die Hypothese einer Schwächung der Membranintegrität durch TatAB-Proteine (Brüser & Sanders, 2003; Hou et al., 2018; Natale et al., 2008). Wie in 1.3.1.2 angemerkt, könnte die Kombination aus TMH, Knick-1 und APH Membranstress verursachen. Für TatA zeigten Aldridge et al. (2012) und Hou et al. (2018), dass der N-proximale Anteil der APH als Reaktion auf die Anwesenheit von Substrat aus der Membran auftaucht, wodurch die TMH vermutlich in Richtung *cis* gezogen wird. Dies könnte Membranstress in *trans* verursachen. Dazu passend entspricht der TMH-Knick-1-APH-Aufbau einer häufig in Membranproteinen beobachteten Struktur. Diese Anordnung kann die Energie der PMK in Drehbewegungen der TMH umsetzen (X. C. Zhang & Li, 2019). In diesen Kontext passt auch die Ähnlichkeit der APH mit



antimikrobiellen oder oberflächenaktiven Peptiden (siehe Abschnitt 1.3.1.1).

Ein weiteres Konzept, das mit den genannten Modellen durchaus vereinbar sein könnte, ist die sog. katalytische Rolle von TatA. Hierbei spielt TatA die Rolle eines Coenzym, das einen Schritt bei der Aktivierung der Translokase vermittelt. Gestützt wird dies durch Analysen des Tat-Transportes in Abhängigkeit von der TatA-Konzentration, wobei sich coenzymartige Eigenschaften, unter anderem die sog. positive Kooperativität, zeigten (Hauer et al., 2013). Dies ist möglicherweise auch für TatB der Fall (Zinecker et al., 2020). Im Gegensatz zur Porenhypothese wird ein geringes, möglicherweise sogar äquimolares, Verhältnis von TatA-Gesamtmenge zu TatC als Argument herangezogen. Problematisch bei dieser Fragestellung der Stöchiometrie der Tat-Untereinheiten ist, dass die entsprechenden Daten stark divergieren (Celedon & Cline, 2012; Hauer et al., 2013; Jakob et al., 2009; H. Mori et al., 2001). Bemerkenswert ist aber, dass der Vergleich der Daten von Hauer et al., 2013 und Zinecker et al., 2020 für ein 1:1-Verhältnis von TatA und TatB in der aktiven Translokase spricht. Desweiteren zeigt auch die Beziehung von Transportaktivität und Substratkonzentration positive Kooperativität (Alder & Theg, 2003a; Celedon & Cline, 2012).



**Abbildung N7: Modell zur thylakoidären Tat-Translokation des Substrates 16/23.** Verändert nach Dissertation Schlesier (2015). Das Substrat 16/23 erlaubt Rückschluss auf intermediäre Zustände während des Transportzyklus: Transportschritt 1 - Das Substrat bindet vor der Translokation spontan an die Membran (im Text nicht erläutert) oder unmittelbar an den TatBC-Komplex. Transportschritt 2 - Die Translokation erfolgt unter Mitwirkung von TatA und das Substrat ist bereit für die Prozessierung. Blau - Substrat 16/23, rot - SP, gelb - thylakoidäre Prozessierungspeptidase. Weitere Details siehe Text.

Obwohl sich die meisten Modelle zum Mechanismus des Tat-Transportes zu einem großen Teil mit der Funktion von TatA beschäftigen, ist die unverzichtbare Rolle von TatB und TatC unstrittig. Das TatA-Coenzym-Modell deutet bereits darauf hin, dass die TatBC-Komplexe selbst den Kern des Translokationsereignisses ausmachen könnten. So könnte TatA bspw. Konformationsänderungen des Komplexes bewirken, die die Translokation auslösen (Fröbel et al., 2012; Geise et al., 2019; Rollauer et al., 2012).

Auch ein Beitrag der Membranlipide zur Tat-Translokation sollte nicht ausgeschlossen werden (Brüser & Sanders, 2003; Hamsanathan & Musser, 2018; Mikhaleva et al., 1999; Rathmann et al., 2017). Wojnowska et al. (2018) zeigten, dass bei der Isolierung von Tat-Komplexen auch erhebliche Mengen gebundener Lipide auftreten. Weiterhin gelang der Versuch der Komplementation des Tat-Transportes in Erbse und *E. coli* mit dem TatA des jeweils anderen Organismus um so besser, je ähnlicher die TMH dem „korrekten“ TatA gemacht wurde. Da die TMH von *E. coli* TatA und auch die Cytoplasmamembran hydrophober sind als die Pendants aus Erbse, muss die Hydrophobizität der Tat-Proteine möglicherweise an die Membran angepasst sein. (Hauer et al., 2017).

## 1.6 Zielstellung

Bei der Tat-Translokation werden gefaltete Proteine unterschiedlicher Form und Größe durch zelluläre Membranen transportiert, ohne dass bei diesem Prozess das Membranpotenzial verloren geht. Die Aufklärung des zugrundeliegenden Mechanismus ist daher von großem Interesse. Die Arbeit an der aktiven Translokase wird jedoch durch ihre Kurzlebigkeit deutlich erschwert.

In dieser Arbeit wurde deshalb ein alternativer Ansatz verfolgt, der sich auf die TatBC-Rezeptorkomplexe konzentriert. Hierbei handelt es sich um die komplexeste stabile Einheit der Tat-Translokationsmaschinerie, deren Untereinheit TatC vermutlich eine Art organisierendes Gerüst ausbildet.

Das langfristige Ziel der durchgeführten Versuche war, thylakoidäre TatBC-Rezeptorkomplexe in eine künstliche Membranumgebung zu rekonstituieren. Auf dieser Basis sollte es möglich sein, die Tat-Translokase in vitro zu assemblieren und ihre Eigenschaften unter kontrollierten Bedingungen zu charakterisieren. Zum Erreichen dieses Ziels wurden in dieser Arbeit vier Aspekte bearbeitet:

1. Charakterisierung von TatBC-Rezeptorkomplexen, die nach dem etablierten Vorgehen mit Digitonin solubilisiert wurden;
2. Suche nach alternativen Detergenzien zur Solubilisierung der Komplexe in großen Mengen und mit hoher Stabilität, sowie die Analyse anderer stabilisierender Faktoren;
3. Etablierung und Optimierung eines Verfahrens zur Anreicherung und Isolierung von TatBC-Komplexen aus Erbsenchloroplasten und
4. Rekonstitution der präparierten TatBC-Komplexe in eine künstliche Membranumgebung.

## 2. Material

### 2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen abcr (Karlsruhe), Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf), GE Healthcare (Chicago, USA), Merck (Darmstadt, inklusive Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen.

#### 2.1.1 Styrol-Maleinsäure-Copolymer

Gebrauchsfertige Lösungen (Kaliumsalze) von Styrol-Maleinsäure-Copolymer-Varianten wurden als kostenfreie Proben von polyscope (Geleen, Niederlande) bezogen:

Name	Kurzname	Verhältnis Styrol:Maleinsäure	durchschnittliches Molekulargewicht
XIRAN	XIRAN		
SL40005 P20	40	1,4:1	5 kDa
SL30010 P20	30	2:1	7,5 kDa
SL25010 P20	25	3:1	10 kDa

### 2.2 Größenstandards

DNA	Hyperladder™ 1 kb Plus	Bioline (Luckenwalde)
DNA	GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DNA	1 kb Ladder	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Protein (SDS-PAGE)	PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Protein (Blue Native-PAGE)	High Molecular Weight Native Protein Marker	GE Healthcare (Chicago, USA)

## 2.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen <i>NcoI</i> , <i>XhoI</i> , <i>EcoRV</i> , <i>DpnI</i> , <i>NdeI</i> , <i>NotI</i> , <i>HindIII</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	NZYTech (Lissabon, Portugal)
Phusion High Fidelity Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Thermolysin	Sigma-Aldrich (München)

Sowie dazugehörige Reaktionspuffer.

## 2.4 Reaktionskits

NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® Gel & PCR Clean Up	Macherey-Nagel (Düren)

## 2.5 Oligonukleotide

Name	Sequenz
Sp-OEC16-TP-fw	5'-TTTCCATGGCTCAAGCTATGGCTTCAATG-3'
Sp-OEC16-TP-rv	5'-TTTCTCGAGTTAGGCAAGAACAGCCTTAA-3'
OE16-M64F-QC-fw	5'-CTAGCCGCCGAGCTTTCTTGGGCTTCGTGCG-3'
OE16-M64F-QC-rv	5'-CGACGAAGCCCAAGAAAGCTCGGCCGGCTAG-3'
OE16-S54C-QC-fw	5'-GAGCTCAGCAAGTGTGCGCTGAGGCTGAGA-3'
OE16-S54C-QC-rv	5'-TCTCAGCCTCAGCGCACACTTGCTGAGCTC-3'
T7-Promoter	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7-Terminator	5'-CGGACACAATCCGTTATTTATTATG-3'
M13 fw	5'-GGTTTTCCAGTCACGACGTTG-3'
M13 rv	5'-CACACAGGAAACAGCTATGACC-3'

## 2.6 Plasmide

Vektor	Zweck	Eigenschaften	Quelle	Antibiotikum
pET26b(+)-16/EGFP	heterologe Proteinsynthese	trägt die kodierende Sequenz für ein Fusionsprotein aus dem PsbQ-Transitpeptid und EGFP	AG Klösigen/Peter Hanner	Kanamycin
pET30a(+)	heterologe Proteinsynthese	siehe Anhang Abb. A6	Merck (ursprünglich Novagen), Darmstadt	Kanamycin
pET30a-tPTP	heterologe Proteinsynthese	enthält die kodierende Sequenz für das Fusionsprotein tPTP aus dem vektoreigenen <i>tag</i> und dem Transitpeptid von PsbP (= OEC23, Spinat) zwischen den Restriktionsschnittstellen von <i>NcoI</i> und <i>XhoI</i>	AG Klösigen, Bachelorarbeit Sarah Stoppe (2014)	Kanamycin
pET30a-tQTP	heterologe Proteinsynthese	wie pET30a-tPTP, das Transitpeptid stammt jedoch von PsbQ (Spinat), das Produkt heißt tQTP	diese Arbeit, siehe Abschnitt 3.1.2	Kanamycin
pET30a-tQTP <sup>C</sup>	heterologe Proteinsynthese	pET30a-tQTP mit dem Aminosäureaustausch S54C	diese Arbeit, siehe Abschnitt 3.1.3	Kanamycin
pET30a-tQTP <sup>F</sup>	heterologe Proteinsynthese	pET30a-tQTP mit dem Aminosäureaustausch M64F	diese Arbeit, siehe Abschnitt 3.1.3	Kanamycin
pET30a-tQTP <sup>CF</sup>	heterologe Proteinsynthese	pET30a-tQTP mit den Aminosäureaustauschen S54C und M64F	diese Arbeit, siehe Abschnitt 3.1.3	Kanamycin
pBAT	<i>in vitro</i> -Transkription		Anweiler et al., 1991	Ampicillin
pBAT-tQTP <sup>CF</sup>	<i>in vitro</i> -Transkription	die kodierende Sequenz für tQTP <sup>CF</sup> wurde in die Restriktionsschnittstelle von <i>EcoRV</i> inseriert	diese Arbeit, siehe Abschnitt 3.1.4	Ampicillin
pBAT-pTatC	<i>in vitro</i> -Transkription	trägt die kodierende Sequenz für Vorläufer-TatC aus Erbse	AG Klösigen/Kathleen Heilmann	Ampicillin
pBSC-16/23	<i>in vitro</i> -Transkription	trägt die kodierende Sequenz für ein Fusionsprotein aus dem PsbQ (=OEC16)-Transitpeptid und dem reifen Anteil von PsbP (=OEC23)	Clausmeyer et al., 1993	Ampicillin

## 2.7 Bakterienstämme

Verwendet wurden Stämme von *Escherichia coli*.

Stamm	Genotyp	Herkunft
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 nupG</i> <i>recA1 araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galE15 galK16 rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1</i> $\lambda^-$	Invitrogen (Carlsbad, USA)
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup></i> <i>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> $\lambda$ (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene</i> <i>1 ind1 sam7 nin5</i> ])	Novagen (Darmstadt)

Informationen zum Genotyp wurden von [https://openwetware.org/wiki/E.\\_coli\\_genotypes](https://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes) (Stand 01.09.2020) bezogen.

## 2.8 Kulturmedien

<i>lysogeny broth</i> (LB-Medium)	1,0 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1,0 % (w/v) NaCl
<i>super optimal broth</i> + 20 mM Glucose (SOC-Medium)	2,0 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucose pH = 7,0 (NaOH)
M9-Minimalmedium	1x M9-Salze 20,6 mM MgSO <sub>4</sub> 0,41 % (w/v) Glucose 1 mM CaCl <sub>2</sub> 1 % (v/v) LB-Medium
M9-Salze	239 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 110 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 42,8 mM NaCl 93,5 mM NH <sub>4</sub> Cl
Festmedien	1,5 % (w/v) Agar in LB-/M9-Medium

## 2.9 Antibiotika

	Gebrauchslösung	Endkonzentration
Kanamycin	50 mg/ml in Wasser	50 µg/ml
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml

## 2.10 Verwendete Proteine

Die Sequenzen der Signalpeptid-Derivate tPTP und tQTP sowie dessen Varianten sind in Abb. M1 dargestellt.



### Abbildung M1: Sequenz der Proteine tPTP, tQTP und Varianten.

Die Aminosäuresequenz der Proteine setzt sich aus der auf pET30a (+) kodierten *tag*-Region und den Transitpeptiden von Spinat PsbP (OEC23) oder PsbQ (OEC16) zusammen. Die *tag*-Region enthält unter anderem einen His<sub>6</sub>-Abschnitt, der für Affinitätschromatographie genutzt wurde (siehe Methoden Abschnitt 3.4.2). Die Transitpeptide setzen sich aus der stromadirigierenden Domäne (SDD) und dem Tat-Signalpeptid (Tat-SP) zusammen. In letzterem ist das Zwillingsarginin fett hervorgehoben. Für tQTP sind außerdem die Aminosäureaustausche S54C (nach Daten der AG Klösgen) und M64F (nach Gérard & Cline, 2007) rot hervorgehoben. Die Nummerierung der ausgetauschten Positionen beginnt mit dem ersten Rest der SDD. Die Mutationen führten zu den Varianten tQTP<sup>C</sup>, tQTP<sup>F</sup> und tQTP<sup>CF</sup>.



Die errechneten Molekulargewichte wichtiger Proteine sind in Abb. M2 und M3 zusammengefasst.

	Erbse		Spinat	
	MW	Quelle (NCBI)	MW	Quelle (NCBI)
TatB	18,9 kDa	Q94G16.1(78-261)	22,8 kDa*	XP_021844253.1(93-305) XP_021844254.1(93-303)
TatC	33,3 kDa	Q94G17.1(51-353)	31,4 kDa	XP_021835089.1(63-350)
tQTP <sup>CF</sup>			13,2 kDa	

**Abbildung M2: Theoretisches Molekulargewicht (MW) von TatB, TatC und tQTP<sup>CF</sup>.** Die theoretischen Molekulargewichte der Proteine wurden anhand der Aminosäuresequenzen mit Hilfe des Programms ProtParam berechnet (Gasteiger et al., 2005). Für TatB und TatC wurden die reifen Formen (ohne chloroplastidäres Importsignal, verwendete Sequenzabschnitte in Klammern) gemäß der Annotation in der Proteindatenbank des National Center for Biotechnology Information verwendet. \* - Spinat besitzt zwei TatB-Isoformen mit 22,7 und 22,9 kDa Molekulargewicht, daher ist der Mittelwert angegeben.

16/23 (Spinat)	NCBI: P12301.1(183) + P12302.1(81-267)	
	MW	Anzahl Methionine
Vorläufer	28,5 kDa	6 Met
Intermediat	23,6 kDa	2 Met
reif	20,2 kDa	1 Met

**Abbildung M3: Theoretisches Molekulargewicht (MW) und Anzahl der enthaltenen Methionine von 16/23.** Die Werte sind für das Vollängen-Vorläuferprotein, das stromale Intermediat (ohne stromadirigierende Domäne aber noch mit Tat-Signalpeptid) und das reife Protein ohne Signalpeptid angegeben. Die Werte wurden anhand der Aminosäuresequenzen mit Hilfe des Programms ProtParam bestimmt (Gasteiger et al., 2005). Das proteolytisch erzeugte Ti-2-Degradationsprodukt entspricht der intermediären Form weitestgehend und enthält ebenfalls 2 Methionine (Frielingsdorf & Klösger, 2007).

In der Analyse mit Natriumdodecylsulfat-(SDS)-PAGE zeigen Proteine der TatAB-Familie oftmals ein apparentes Molekulargewicht, welches deutlich höher ist als das theoretische. Für TatB aus Erbse und Spinat sind diese Abweichungen in Abbildung M4 aufgeführt.

	MW (in kDa)	
	Erbse	Spinat
TatB (theor.)	18,9	22,8
TatB (app. SDS-PAGE)	26-32	35-37
Differenz $d_{\text{TatB}}$	ca. 10,1	ca. 13,2

**Abbildung M4: Differenz zwischen dem theoretischen und dem apparenten Molekulargewicht von TatB.** Das apparente Molekulargewicht (MW) von TatB in der SDS-PAGE unterscheidet sich von der theoretischen. Die Werte für Erbse stammen aus Mori et al. (2001); Zinecker et al. (2020; *Supplemental Material S2*), sowie Abb. E10 und E28. Die Werte für Spinat beziehen sich auf Dissertation Waclawek (2016).  $d_{\text{TatB}}$  ist die Differenz zwischen dem theoretischen und dem apparenten Molekulargewicht. Für TatC wird eine solche Abweichung nicht beobachtet.

## 2.11 Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	eingesetzte Verdünnung	Herkunft
<i>Primär</i>			
anti-TatB	spezifisch für stromale Domäne von <i>Pisum sativum</i> TatB, aus Kaninchen, antigenspezifisch gereinigt	1:1000	M. Jakob
anti-TatC	spezifisch für N-terminale stromale Domäne von <i>Pisum sativum</i> TatC, aus Kaninchen, antigenspezifisch gereinigt	1:1000	M. Jakob
<i>Sekundär</i>			
anti-rabbit-HRP (Antiserum)	spezifisch für F <sub>c</sub> -Teil von Kaninchen-Antikörpern, konjugiert mit Meerrettichperoxidase, aus Ziege	1:10000	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

## 2.12 Affinitätschromatographie

Produktname	Eigenschaften	Hersteller
Ni Sepharose™ 6 Fast Flow	Ni <sup>2+</sup> -NTA-Sepharose	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Econo-Pac® Chromatography Columns (20 ml)	Schwerkraftsäule, für diese Arbeit mit 6 ml Matrix gepackt	Bio-Rad (Hercules, USA)
His Spintrap	vorgepackte Zentrifugensäule, Ni <sup>2+</sup> -NTA-Sepharose (ca. 100 µl), fasst max. 600 µl Probe	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)

## 2.13 Pflanzenmaterial

Zur Chloroplasten- und Thylakoidisolierung wurden 7-8 Tage alte Erbsenkeimlinge (*Pisum sativum* var. Feltham First) genutzt. Die Pflanzen wurden auf kokosfaserhaltiger Erde unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 20 °C) kultiviert.

Spinat (*Spinacia oleracea* Sorte Lina) wurde, wie in der Dissertation von M. Waclawek (2016) beschrieben, kultiviert.

### 3. Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Methoden der Molekularbiologie wurden nach den Protokollen von Sambrook & Russell (2001) durchgeführt. Ansonsten erfolgte die Handhabung von Enzymen nach den Herstellerangaben. Auch die Präparation von Plasmid-DNA und die Reinigung von DNA-Fragmenten nach PCR-Reaktionen mithilfe von Reaktionskits und aus Agarosegelen erfolgte nach den Herstellerangaben.

##### 3.1.2 Konstruktion von pET30a-tQTP

Mittels Polymerasekettenreaktion wurde der für das PsbQ (OEC16)-Transitpeptid kodierende Abschnitt des Plasmides pET26b (+)-16/EGFP mit Phusion *High Fidelity Polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) amplifiziert und durch die verwendeten Oligonukleotide „Sp-OEC16-TP-fw“ und „-rv“ Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *NcoI* (5') und *XhoI* (3') angefügt. Das Amplifikat wurde durch Agarosegelelektrophorese von anderen Probenbestandteilen getrennt und aus dem Gel isoliert. Anschließend wurde dieses DNA-Fragment, wie auch eine Präparation des Plasmides pET30a, mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NcoI* behandelt um zueinander kompatible Schnittstellen zu schaffen. Die wiederum gereinigten DNA-Moleküle wurden gemischt und mit einer T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ligiert. Der Ansatz wurde für eine Transformation von *E. coli* TOP10-Zellen per Elektroporation eingesetzt. Die Plasmide wurden anschließend aus den kultivierten Zellen präpariert, mittels Sequenzierung überprüft und zur Transformation von *E. coli* BL21 (DE3) genutzt. Mit diesen Zellen wurde die heterologe Überproduktion von tQTP durchgeführt.

##### 3.1.3 Erzeugung von pET30a-tQTP<sup>C</sup>, -tQTP<sup>F</sup> und -tQTP<sup>CF</sup> durch ortsspezifische Mutagenese

Die Aminosäureaustausch-Mutationen S54C und M64F (siehe auch Material Abschnitt 2.10 Abb. M1) wurden durch ortsspezifische Mutagenese entsprechend der Anleitung des *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene, La Jolla, USA) mit den Oligonukleotiden „OE16-S54C-QC-fw“ und „-rv“, sowie „OE16-M64F-QC-fw“ und „-rv“ etabliert. Im Wesentlichen handelt es sich dabei um vollständig zueinander komplementäre Oligonukleotid-Paare, die bis auf die zu verändernden Nukleotide identisch mit der entsprechenden Sequenz des Zielbereichs sind. Bei der folgenden PCR mit Phusion *High Fidelity Polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wird von den Oligonukleotiden ausgehend das gesamte Trägerplasmid amplifiziert, das nun die

Veränderung beinhaltet. Nach einer Behandlung mit dem Restriktionsenzym *DpnI*, welches die unveränderten Ausgangsplasmide degradiert, wurde der Ansatz zur Elektroporation von *E. coli* TOP10 Zellen eingesetzt. Diese Zellen wurden selektiert und kultiviert, um aus ihnen die replizierten Plasmide zu gewinnen. Diese wurden durch Sequenzierung überprüft und zur Transformation von *E. coli* BL21 (DE3) eingesetzt. Mit diesen Zellen wurde die heterologe Überproduktion von tQTP<sup>C</sup>, tQTP<sup>F</sup> und tQTP<sup>CF</sup> durchgeführt.

#### 3.1.4 Konstruktion von pBAT-tQTP<sup>CF</sup>

Mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* wurde das für tQTP<sup>CF</sup> kodierende Fragment (bestehend aus den kodierenden Bereichen für *tag*-Region, stromadirigierender Domäne und Signalpeptid) aus dem Plasmid pET30a-tQTP<sup>CF</sup> geschnitten. Anschließend wurde der zu den überhängenden Einzelstrangenden komplementäre Rest des DNA-Gegenstrangs mit *PfuTurbo*-DNA-Polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) ergänzt. Das DNA-Fragment wurde gereinigt und im folgenden Ansatz in den Zielvektor pBAT eingeführt. pBAT wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* geschnitten, welches keine überhängenden Enden erzeugt und gleichzeitig die Ligation des tQTP<sup>CF</sup>-kodierenden Fragments mit T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Dabei akkumulieren Plasmide in die das tQTP<sup>CF</sup>-kodierende Fragment erfolgreich inseriert wurde, da die Ligation nur in diesem Fall nicht zu einer erneuten Ausbildung der *EcoRV*-Schnittstelle führt, die durch das Restriktionsenzym bald wieder geschnitten würde. Der Ansatz wurde anschließend für die Elektroporation von *E. coli* TOP10-Zellen verwendet. Da das beschriebene Ligationsverfahren nicht spezifisch für die Richtung der Insertion des tQTP<sup>CF</sup>-kodierenden Bereiches in pBAT ist, wurden anschließend PCR-Reaktionen durchgeführt, nach der Klone mit dem korrekten Konstrukt ausgewählt werden konnten. Dazu wurden die Oligonukleotide „Sp-OEC16-TP-fw“ (liegt im Zielgen) und „M 13 fw“ (liegt außerhalb des Zielgens) verwendet. Entsprechende Klone wurden vermehrt und die daraus präparierten Plasmide per Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft. Hiermit wurde *in vitro* Transkription und Translation zur Herstellung von radioaktiv markiertem tQTP<sup>CF</sup> durchgeführt.

#### 3.1.5 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde von Microsynth Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Die Proben wurden gemäß den Anweisungen der Firma vorbereitet. Es wurden die Oligonukleotide „T7-Promoter“ und „T7-Terminator“ für pET30a-Konstrukte und „M 13 rv“ und „M 13 fw“ für pBAT-Konstrukte verwendet. Diese flankieren die inserierten Zielgene.

## 3.2 Arbeit mit *Escherichia coli*

### 3.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Zellen von *E. coli* wurden bei 37 °C kultiviert. Flüssigkulturen wurden entweder auf einem Rotator oder in einem Schüttler agitiert, so dass aerobes Wachstum nicht sauerstofflimitiert war. Für TOP10-Zellen wurde LB-Medium verwendet, BL21 (DE3)-Zellen wurden mit M9-Minimalmedium kultiviert.

### 3.2.2 Dauerhafte Lagerung von *E. coli*-Zellen

Hierfür wurden 500 µl einer Übernachtskultur von *E. coli* mit 500 µl Glycerin-Lagerpuffer versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden bei -20 °C gelagert und sind über einen Zeitraum von einigen Jahren haltbar.

Glycerin-Lagerpuffer	65 % (v/v) Glycerin 0,1 M MgSO <sub>4</sub> 2,5 mM Tris pH = 8,0 (HCl)
----------------------	---

### 3.2.3 Elektroporation

Hierfür wurden bis zu 2 µl DNA zu 50 µl elektrokompenten Zellen gegeben und diese in einer sterilen Elektroporationsküvette (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf) im *E. coli* Pulser (Biorad, München) mit einer Spannung von 1,8 kV elektroporiert. Anschließend wurde 1 ml SOC-Medium zugesetzt und die Mischung 1 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurde der Ansatz auf antibiotikumhaltigem Festmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.4 Heterologe Überproduktion von Proteinen

Mit pET30a-tPTP bzw. pET30a-tQTP und seine Varianten transformierte *E. coli* BL21 (DE3) wurden zur heterologen Überproduktion der Signalpeptid-Derivate eingesetzt. 500 ml M9-Minimalmedium + Kanamycin wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur in demselben Medium inokuliert und kultiviert. Bei Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,5-1,0 wurde die heterologe Expression durch Einstellen eines Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid-Gehaltes von 1 mM induziert. Die Zellen wurden so über Nacht kultiviert und anschließend zur Gewinnung von Einschlusskörperchen verwendet.

### 3.3 Methoden mit Pflanzenmaterial

#### 3.3.1 Isolierung von Chloroplasten

Chloroplasten aus Erbsenkeimlingen wurden nach einem kumulierten Protokoll, das in Zinecker, 2020 (Dissertation) zusammengefasst ist, gewonnen (siehe auch Hou et al., 2006). Bei der Präparation größerer Mengen als den ursprünglich vorgesehenen 70-80 g Pflanzenmaterial wurden Material und Prozesse maßstabsgetreu angepasst.

Chloroplasten aus Spinatblättern wurden nach dem kumulierten Protokoll, das in Waclawek, 2016 (Dissertation) nach Molik, 2005 (Dissertation) modifiziert ist, isoliert.

#### 3.3.2 Bestimmung des Chlorophyllgehalts

Zur Bestimmung der Chlorophyllkonzentration einer Chloroplasten- oder Thylakoidsuspension wurden 10 µl der Probe mit 990 µl 80 % (v/v) Aceton gemischt. Nach einer Zentrifugation (2 min, 13.000 rpm, RT, Heraeus Biofuge fresco) wurde photometrisch die Extinktion des Überstandes bei 645 nm und 663 nm bestimmt. Mit der folgenden Formel nach Arnon (1949) wurde die Chlorophyllkonzentration errechnet:

$$c [\mu\text{g/ml}] = (20,2(A_{645}) + 8,02(A_{663})) \times 100 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

#### 3.3.3 Isolierung von Thylakoiden

Erbsen- oder Spinatchloroplasten-Suspension entsprechend 750 µg Chlorophyll pro Probe wurde sedimentiert (1 min, 10000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge fresco). Der Überstand wurde verworfen und die Chloroplasten in 800 µl eisgekühltem HM-Puffer resuspendiert. Nach 10 min Osmolyse auf Eis wurde erneut zentrifugiert (5 min, 10000 rpm, 4 °C). Die Zugabe von HM-Puffer und Zentrifugation (ohne Warteschritt) wurden noch zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Thylakoide mit HM-Puffer auf 1 ml Volumen und 750 µg Chlorophyll eingestellt. Zur Lagerung der Thylakoide siehe Anhang Abschnitt 1.

HEPES-MgCl <sub>2</sub> -Puffer (HM-Puffer)	10 mM HEPES 5 mM MgCl <sub>2</sub> pH 8,0 (KOH)
--	---

### 3.3.4 Behandlung von Thylakoiden oder solubilisierten TatBC-Komplexen mit Metallsalz- oder EDTA-haltigen Puffern

Für die Versuche in Ergebnisse Abschnitt 4.4 wurden präparierte Thylakoide mit salzhaltigen oder Ethylendiamintetraessigsäure- (EDTA)-haltigen Puffern behandelt. Sofern nicht anders beschrieben wurden zu 25 µl Thylakoidsuspension (in HM-Puffer) mit einem Chlorophyllgehalt von 0,75 µg/µl 300 µl HM-Puffer mit 10 mM Metallsalz (Dichloride von Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> oder KCl) oder mit 30 mM EDTA gegeben. Nach ca. 10 min Inkubation auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (4 min, 4 °C, 10.000 rpm, Heraeus Biofuge fresco) und entweder in 300 µl eines anderen Puffer aufgenommen oder zur Solubilisierung in 20 µl Solubilisierungspuffer ohne EDTA resuspendiert und mit 25 µl digitoninhaltigem Solubilisierungspuffer solubilisiert (siehe Abschnitt 3.3.6).

Zur Behandlung bereits solubilisierter Thylakoide wurde ca. 40 µl Probe jeweils 27 µl HM-Puffer mit 20 mM CaCl<sub>2</sub> oder mit 60 mM EDTA für eine Endkonzentration von 8 mM bzw. 24 mM hinzugefügt. Die Konzentrationen wurden im Vergleich zu den obigen Angaben leicht verringert, um eine Störung des Laufverhaltens in der folgenden *Blue Native*-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) zu vermindern.

### 3.3.5 Bindung thylakoidärer TatBC-Komplexe mit (radioaktiv markierten) Signalpeptid-Derivaten (tPTP und tQTP-Varianten)

Zur Bindung der TatBC-Komplexe durch Signalpeptid-Derivate wurden bspw. 800 µl Thylakoidsuspension (mit 0,75 µg/µl Chlorophyll) mit 200 µl rekombinant synthetisiertem Signalpeptid-Derivat (in HM-Harnstoff-Puffer, siehe Abschnitt 3.4.3) vermischt und 20 min unter gelegentlichem Invertieren auf Eis inkubiert. Die geringe Temperatur hemmt den Tat-Transport, erlaubt aber die Bindung des Signalpeptid-Derivates (Daten der AG Klösgen, Cline et al., 1992 und Celedon & Cline, 2012). Durch die relativ geringe Menge von TatBC in den Thylakoiden und das Vorliegen von Coomassie-färbbaren Mengen der Signalpeptid-Derivate konnte stets von einem erheblichen Überschuss des Tat-Substrates ausgegangen werden (siehe hierzu Abb. E21-24). Für eine anschließende Komplexanreicherung wurden die Thylakoide, falls nicht anders angegeben, sedimentiert (5 min, 10.000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge fresco), der Überstand verworfen und das Pellet entsprechend 750 µg/ml Chlorophyll in HM-Puffer resuspendiert. Nach erneutem Abzentrifugieren und Resuspendieren der Thylakoide entsprechend derselben Chlorophyllkonzentration in HM-Puffer war die Probe bereit zur Solubilisierung (siehe Abschnitt 3.3.6).

Zur Markierung der TatBC-Komplexe mit <sup>35</sup>S-tragendem tQTP<sup>CF</sup> wurden 40 µl Thylakoidsuspension

mit 5  $\mu\text{l}$  *in vitro*-Translationsprobe versetzt und wie beschrieben verfahren. Im Anschluss wurde mit 200  $\mu\text{l}$  HM-Puffer gewaschen. Es folgte die Solubilisierung (siehe Abschnitt 3.3.6).

### 3.3.6 Solubilisierung von Thylakoiden

Zur Solubilisierung wurden Thylakoidsuspensionen mit solubilisierendem Agens, d. h. Detergenzien oder Styrol-Maleinsäure-Copolymer (SMA), und Puffer versetzt. Die Endkonzentration, Inkubationsdauer und -temperatur sind entweder in den Abbildungsunterschriften notiert oder folgten den Standardbedingungen (siehe auch Ergebnisse Abschnitt 4.1): In der Regel wurden gleiche Teile von Thylakoidsuspension und 2x konzentriertem detergens- oder SMA-haltigem Solubilisierungspuffer gemischt. Die Standardkonzentration für Digitonin beträgt 1,5 % (w/v). Anschließend wurde 1 h im Kühlraum (ca. 7 °C) unter langsamem Invertieren inkubiert. Anschließend folgten Zentrifugationsschritte bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 min (Heraeus Biofuge fresco) und bei 55.000 rpm und 4 °C für 20 min (Optima™ MAX, Beckman Coulter, Brea, USA; Rotor MLA-80). Der Überstand entspricht solubilisierten Thylakoiden (Membranproteine und verdünntes Lumen).

5x Solubilisierungspuffer wurde vorbereitet, um daraus durch Mischen mit Detergenslösungen 2x detergenshaltigem Solubilisierungspuffer herzustellen. Dafür wurden zumeist 10 % (w/v) Detergensstammlösungen verwendet. Digitoninstammlösungen mit 5 % (w/v) wurden frisch hergestellt und zum Lösen 5-10 min auf 95 °C erhitzt. Wenn diese nach einigen Stunden präzipitierten, wurden sie verworfen.

5x Solubilisierungspuffer	50 mM Bistris, pH 7,0 (HCl)
	20 % (v/v) Glycerin
	5 mM EDTA pH 8,0 (NaOH)
	0,5 mM MgCl <sub>2</sub>
	1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid in Ethanol
	1 mM Dithiothreitol



### 3.3.7 *in thylakoido*-Transportversuche

Hierbei handelt sich um einen *in vitro*-Transportversuch zum Tat-Transport mit isolierten Thylakoiden. Der entsprechende Versuch (Ergebnisse Abschnitt 4.4.1) wurde von Jana Kungel durchgeführt. Im Wesentlichen erfolgte dies nach dem in ihrer Dissertation (Kungel, 2020) beschriebenen Vorgehen:

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten für 4 min mit 10.000 rpm bei 4 °C mit einer Biofuge fresco (Heraeus, Hanau).

Pro Probe werden 60 µl frisch präparierte Thylakoide entsprechend 45 µg Chlorophyll mit 7,5 µl *in vitro* synthetisiertem und radioaktiv markiertem 16/23 (ein Tat-Modellsubstrat, für Erläuterungen siehe Ergebnisse Abschnitt 4.4.1) unter Beleuchtung bei 25 °C inkubiert. Hierbei kommt es zum Tat-abhängigen Transport über die Thylakoidmembran. Anschließend wird die Reaktion durch die Zugabe von 75 µl eiskaltem HM-Puffer (siehe Abschnitt 3.3.3) gestoppt, die Thylakoide abzentrifugiert und mit 255 µl HM-Puffer gewaschen. Die Proben werden in 1x 100 µl und 1x 200 µl geteilt, wobei der kleinere Teil mit der Protease Thermolysin behandelt wird um nicht durch die Thylakoide geschützte Proteine zu degradieren (+10 µl: 2 mg/ml Thermolysin & 25 mM CaCl<sub>2</sub>, Inkubation 30 min auf Eis). Dies gibt Aufschluss über den erfolgreichen Transport in das Thylakoidlumen. Die Proteasebehandlung wird durch Waschen der Probe mit 100 µl HM Puffer + 10 mM EDTA gestoppt. Die unbehandelte Probe wird weiter in 2x 100 µl geteilt. Eine Hälfte wird gemeinsam mit den proteasebehandelten Proben zentrifugiert und die Sedimente mit je 50 µl 2x Laemmli-Probenpuffer (siehe Abschnitt 3.4.4.1) versetzt. Anschließend wird SDS-PAGE und die Detektion der radioaktiven Signale mittels Autoradiographie durchgeführt.

Die verbleibenden 100 µl unbehandelter Probe werden zur Solubilisierung mit Digitonin eingesetzt. Mit diesen Proben wurde BN-PAGE und die Detektion der radioaktiven Signale durch Autoradiographie durchgeführt.

Der entscheidende Punkt bei dem in Ergebnisse Abschnitt 4.4.1 durchgeführten Versuch ist, dass die Thylakoide vor der Zugabe von 16/23 zusätzlich in 200 µl HM-Puffer und/oder HM-Puffer + 5 mM CaCl<sub>2</sub> und/oder HM-Puffer + 10 mM EDTA aufgenommen bzw. gewaschen wurden.

### 3.3.8 Präparation von TatBC-Komplexen mit radioaktiv markiertem TatC

Durch *in vitro*-Translation erzeugtes radioaktiv markiertes Vorläufer-TatC wurde mit intakten Chloroplasten inkubiert. Dabei wird TatC in die Organellen transportiert und in thylakoidäre TatBC Komplexe assembliert, wodurch sie radioaktiv markiert sind. Das Vorgehen zum *in organello*-Transportversuch entspricht einem verkürzten Protokoll, das in der Dissertation von Jana Kungel (2020) beschrieben ist.

Alle Arbeitsschritte wurden mit gekappten Pipettenspitzen durchgeführt. Ein Transportansatz wird mit den folgenden Komponenten auf Eis vorbereitet:

Das Zielvolumen ist 300  $\mu$ l (in 1x SRM-Puffer) mit Chloroplasten entsprechend 100  $\mu$ g Chlorophyll (Volumen A). Da die präparierten Chloroplasten bereits in 1x SRM vorliegen, muss die entsprechende Menge B an 5x SRM-Puffer für das restliche Probenvolumen ( $B = (300 \mu\text{l} - A)/5$ ) eingesetzt werden. Durch Subtrahieren aller Teilvolumina vom Zielvolumen erhält man dann die benötigte Menge C an Wasser zum Auffüllen auf 300  $\mu$ l.

Lösung	Volumen
5x SRM-Puffer	B $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	C $\mu$ l
100 mM Mg <sup>2+</sup> - Adenosintri-phosphat	12 $\mu$ l
250 mM Methionin	24 $\mu$ l
1 M Magnesiumchlorid	3 $\mu$ l
<u>danach</u>	
in vitro Translation (Vorläufer- TatC Erbse)	45 $\mu$ l
Präparierte Chloroplasten entsprechend 100 $\mu$ g Chlorophyll	A $\mu$ l
Summe	300 $\mu$ l

Die Probe wird anschließend 40 min bei 25 °C im beleuchteten Wasserbad inkubiert. Der Transportvorgang wird durch die Zugabe von 500  $\mu$ l eiskaltem SRM-Puffer gestoppt und die Probe zentrifugiert (3 min, 4 °C, 6000 rpm). Der Überstand wird verworfen und anschließend die Thylakoide wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben, aber mit jeweils 133  $\mu$ l HM-Puffer präpariert. Schließlich wird das Thylakoidpellet zu einer Konzentration von 0,75  $\mu$ g/ $\mu$ l Chlorophyll in HM-Puffer resuspendiert. Zur besseren Handhabbarkeit wird zusätzlich dasselbe Volumen einer unbehandelten Thylakoidsuspension hinzugefügt. Es folgt die Inkubation der Mischung mit 50  $\mu$ l

tQTP<sup>CF</sup>-Lösung wie unter Abschnitt 3.3.5 beschrieben. Die sedimentierten Thylakoide werden zentrifugiert und das Sediment in 250 µl HM-Puffer aufgenommen. Die Digitoninsolubilisierung und Anreicherung der TatBC-Komplexe erfolgt wie unter 3.3.6 und 3.4.2.2 beschrieben mit den folgenden Volumina: 250 µl Solubilisierungspuffer, 3x 500 µl Waschpuffer und 4x 100 µl Elutionspuffer. Die vier Elutionsfraktionen werden vereinigt und für eine Gradientenrekonstitution (Abschnitt 3.5.4) oder eine einfache Rekonstitution (Abschnitt 3.5.5) eingesetzt.

### 3.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.4.1 Präparation einer Einschlusskörperchen-Rohfraktion aus *E. coli*-Zellen

*E. coli* BL21 (DE3)-Zellen wurden nach der heterologen Überproduktion durch zentrifugieren (30 min, 4000 rpm, 4 °C) geerntet. Das Sediment von 500 ml Kultur wurde in 25 ml 1x PBS (Abschnitt 3.4.8.1) resuspendiert und unmittelbar vor dem folgenden Zellaufschluss zu einer Konzentration von 1 mM mit Phenylmethylsulfonylfluorid versetzt. Mittels *french press* (3 Durchläufe bei 1000 psi, SLM-Instruments, Urbana, USA) wurden die Zellen aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation des Lysats (30 min, 10000 rpm, 4 °C) wurde das Sediment (Einschlusskörperchen und Zelltrümmer) über Nacht durch Inkubation auf einem Rotator bei RT in ca. 30 ml Guanidiniumchlorid-Waschpuffer (Abschnitt 3.4.2) resuspendiert. Anschließend wurden weitere 70 ml dieses Puffers hinzugefügt und die Probe wenigstens eine Stunde bei 4 °C auf einem Magnetrührer inkubiert. Dann folgte die Abtrennung der Zelltrümmer und ungelösten Einschlusskörperchen durch Ultrazentrifugation (60 min, 28000 rpm, 4 °C) mithilfe der Zentrifuge L8-50 M/E mit dem Rotor SW-28 (beides von Beckman Coulter, Brea, USA). Der Überstand wurde dann für eine immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) zur Anreicherung von tPTP bzw. tQTP oder dessen Varianten eingesetzt.

Eine Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte mit SDS-PAGE, Coomassie-Colloidal-Färbung und *Western Blotting* mit Immunodetektion. Guanidiniumchloridhaltige Proben wurden vor der Zugabe von Laemmli-Probenpuffer einer Acetonfällung unterzogen. Hierzu wurde 80 % (v/v) Aceton im zwanzigfachen Überschuss hinzugefügt, die Probe mindestens 2 h bei -20 °C inkubiert und die gefällten Proteine durch Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, 4 °C, Biofuge fresco, Heraeus, Hanau) sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet luftgetrocknet.

### 3.4.2 Anreicherung und Isolierung von Proteinen durch IMAC

Die immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose wurde zur Gewinnung rekombinant erzeugter Signalpeptid-Derivate oder thylakoidärer TatBC-Komplexe genutzt.

#### 3.4.2.1 Reinigung von Signalpeptid-Derivaten (tPTP und tQTP-Varianten)

Die Signalpeptid-Derivate wurden nach heterologer Überproduktion in *E. coli* aus Guanidiniumchlorid-gelösten Einschlusskörperchen gewonnen. Es wurden selbstgepackte Schwerkraftsäulen (EconoPac Chromatography Columns, 20 ml, Bio-Rad, Hercules, USA) mit ca. 6 ml Matrix (Ni Sepharose 6 Fast Flow, GE Healthcare, Chicago, USA) verwendet.

Guanidiniumchlorid-	20 mM HEPES
Waschpuffer	500 mM NaCl
	20 mM Imidazol
	6 M Guanidiniumchlorid
	pH = 7,5 (KOH)

Guanidiniumchlorid-	20 mM HEPES
Elutionspuffer	500 mM NaCl
	500 mM Imidazol
	6 M Guanidiniumchlorid
	pH = 7,5 (HCl)

Die Säulen wurden wie folgt beschickt:

- Äquilibrieren mit ca. 12 ml Waschpuffer
- Laden der gelösten Einschlusskörperchen-Probe auf die Säule
- Waschen mit ca. 36 ml Waschpuffer
- Elution mit 3 ml (Vorfraktion), 6 ml (Hauptfraktion), 6 ml (Schlussfraktion)

Nahezu das gesamte Zielprotein befindet sich in der Hauptfraktion, die Vor- und Schlussfraktion wurde später verworfen. Vor der Verwendung mit Thylakoiden wurden die Signalpeptid-Derivat-Präparationen dialysiert.

### 3.4.2.2 TatBC-Komplexanreicherung

Die immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose für solubilisierte TatBC-Komplexe (Komplexanreicherung) wurde mit Lösungen auf Basis des digitoninhaltigen Solubilisierungspuffers (siehe Abschnitt 3.3.6) durchgeführt. Die Komplexanreicherungen wurden mit vorgepackten His Spintrap-Zentrifugensäulen (GE Healthcare, Chicago, USA) mit ca. 100 µl Matrix und einem maximalen Ladevolumen von etwa 600 µl Flüssigkeit in 2 ml Eppendorf-Probenröhrchen durchgeführt. Für jeden Schritt wurde eine langsame Zentrifugation durchgeführt (1 min, 800 rpm (ca. 70 g), 4 °C, Heraeus Biofuge fresco).

Komplexanreicherung- Waschpuffer	1x konzentrierter detergenschaltiger Solubilisierungspuffer + 20 mM Imidazol (pH 6,8, HCl)
-------------------------------------	--

Komplexanreicherung- Elutionspuffer	1x konzentrierter detergenschaltiger Solubilisierungspuffer + 500 mM Imidazol (pH 6,8, HCl)
--	---

Mit den Säulen wurden wie folgt verfahren:

- Abzentrifugieren des Hersteller-Lagerpuffers
- 3x Waschen mit 600 µl H<sub>2</sub>O
- 1x Waschen mit 600 µl Äquilibrier- und Waschpuffer
- Laden der mit Signalpeptid-Derivaten (i.d.R. tQTP<sup>CF</sup>) beschickten und digitoninsolubilierten Thylakoide in 600 µl-Schritten
  - Es ist nicht nötig, die Proben für eine längere Zeit mit der Matrix zu inkubieren. Die Bindereaktion ist nach der Zeit der Handhabung anscheinend größtenteils abgeschlossen (Daten nicht gezeigt).
- 2x Waschen mit 600 µl Wasch- und Äquilibrierpuffer
- 4x Eluieren mit 100 µl Elutionspuffer

Die Elutionsfraktionen wurden zur baldigen Weiterverwendung auf Eis gelagert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.4.3 Pufferaustausch durch Dialyse

Gereinigte Signalpeptid-Derivate wurden einer Dialyse zum Austausch ihres Puffers unterzogen. Dazu wurden die Proben (in Guanidiniumchlorid-Elutionspuffer) in Cellulose-Dialyseschläuche mit möglichst kleiner Porengröße (Molekulargewicht-Ausschluss von 1-3,5 kDa) überführt und in etwa dem 1000-fachen Volumen vorgekühltem HM-Harnstoff-Puffer im Kühlraum (ca. 7 °C) über Nacht äquilibriert. Präzipitiertes Protein wurde durch Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min, 4 °C, Heraeus Biofuge fresco) sedimentiert, der Überstand aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

HM-Harnstoff-Puffer	10 mM HEPES
	5 mM MgCl <sub>2</sub>
	1 M Harnstoff
	pH 8,0 (KOH)

### 3.4.4 Elektrophoretische Methoden

Zur Analyse von Proteinen wurde Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) eingesetzt. Einzelne Proteine wurden mit denaturierender Natriumdodecylsulfat-PAGE (SDS-PAGE) und Membranproteinkomplexe mit nicht denaturierender PAGE mit Coomassie Brillantblau G250 (*Blue Native*-PAGE, BN-PAGE) untersucht. Für BN-PAGE wurden 100x105x1 mm große Gele verwendet. SDS-PAGE wurde stets mit 90x70x0,75 mm großen Gelen durchgeführt, außer bei Abb. E15 E22, wo Gele mit den Abmessungen 1800x1900x1 mm verwendet wurden.

Alle Trenngele wurden nach dem Gießen sofort gleichmäßig mit Wasser überschichtet. Die Polymerisationsreaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

30 % (w/v) Acrylamidlösung	292 g 2x Acrylamid
	8 g N, N'-Methylenbisacrylamid
	ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

Mit festem Acrylamid wurde nur unter einem Abzug gearbeitet. Nach der Auflösung in Wasser wird die Lösung über Nacht mit 3 g/l des Ionentauschers Serdolit MB (Serva, Heidelberg) gerührt. Dieser wird zum Schluss abfiltriert.

### 3.4.4.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Laemmli (1970) durchgeführt.

Proben für SDS-PAGE wurden zu einfacher Konzentration mit Laemmli-Probenpuffer versetzt.

4x Laemmli-Probenpuffer	4,6 % (w/v) SDS
	250 mM Tris pH = 6,8
	7,8 % (v/v) Glycerin
	0,08 % (w/v) Bromphenolblau

Zur Verwendung wurden 92 Teile des Puffers mit 8 Teilen  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und ggf. zu 2x oder 1x Probenpuffer verdünnt.

Da es bei dem normalerweise üblichen Erhitzen der Proben mit Probenpuffer (95 °C, 10 min) zu einem Verlust von TatC kommt (pers. Mitteilung M. Jakob), wurde hierauf verzichtet.

#### SDS-Gel (isokratisch)

Lösung	Trenngel 15 % (w/v) Acrylamid	Sammelgel 4,8 % (w/v) A
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	8 ml	10,8 ml
2 M Tris, pH = 8,8	6 ml	-
1 M Tris, pH = 6,8	-	1,5 ml
10 % (v/v) SDS	300 $\mu$ l	150 $\mu$ l
30 % (w/v) Acrylamid	15 ml	2,4 ml
10 % (w/v) APS	100 $\mu$ l	120 $\mu$ l
TEMED	15 $\mu$ l	12 $\mu$ l
Summe	30 ml	15 ml

Hiermit wurden 4 Gele in der passenden Gießapparatur (Hoefer, Holliston, USA) hergestellt. Je nach verwendetem Platzhalter zur Erzeugung der Taschen fassen diese 15  $\mu$ l bis ca. 25  $\mu$ l Probe.

großes SDS-Gel (Gradient 10 %-17,5 % (w/v) Acrylamid)

Lösung	Trenngelfraktion 10 % (w/v) Acrylamid	Trenngelfraktion 17,5 % (w/v) A	Sammelgel 5,1 % (w/v) A
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	7,1 ml	1,7 ml	6,9 ml
2 M Tris, pH = 8,8	3,0 ml	3,0 ml	-
1 M Tris, pH = 6,8	-	-	1,2 ml
10 % (v/v) SDS	160 µl	160 µl	100 µl
30 % (w/v) Acrylamid	5,3 ml	9,3 ml	1,7 ml
10 % (w/v) APS	70 µl	70 µl	80 µl
TEMED	7 µl	7 µl	8 µl
Summe	16 ml	16 ml	10 ml

Die Trenngelfraktionen wurden in einen Gradientenmischer auf einem erhöhten Magnetrührer gegeben. Der Gießvorgang erfolgte durch Schwerkraft zwischen abgedichtete Glasplatten mit Abstandshaltern (1 mm). Die Taschen dieser Gele fassen bis zu 50 µl Probe.

Für kleine SDS-Gele wurde die Elektrophorese zunächst mit 80 V durchgeführt, bis die Proben in das Trenngel vorgedrungen waren. Anschließend wurde die Spannung regelmäßig erhöht, so dass der Stromfluss maximal 25 mA betrug.

Die Elektrophorese von großen Gelen wurde über Nacht bei ca. 80 V durchgeführt. Der Lauf wurde bis zu einer Voltstundenzahl von ca. 1500 Vh fortgeführt. Für alle Gele wurde SDS-Laufpuffer als Anoden- und Kathodenpuffer eingesetzt.

SDS-Laufpuffer                      25 mM Tris  
    192 mM Glycin  
    0,1 % (w/v) SDS

#### 3.4.4.2 Blue-Native-PAGE und CN-PAGE

Die *Blue-Native*-PAGE (BN-PAGE) und *Colorless-Native*-PAGE (CN-PAGE) wurden in Anlehnung an die Arbeiten von Schägger & von Jagow, 1991, Schägger *et al.*, 1994 sowie Pollock *et al.*, 2019 für die Verwendung von Styrol-Maleinsäure-Copolymer in CN-PAGE durchgeführt.

Proben für BN-PAGE wurden mit 10 % (v/v) BN-Probenpuffer versetzt.

10x BN-Probenpuffer                      5 % (w/v) Coomassie Brilliantblau-G250  
    500 mM ε-Aminocaprinsäure





BN-Kathodenpuffer	50 mM Tricin 15 mM Bistris 0,01 % (w/v) Coomassie Brillantblau G250 pH nicht nachgestellt
-------------------	--

CN-Kathodenpuffer entspricht BN-Kathodenpuffer, enthält aber *kein* Coomassie.

BN-Anodenpuffer	50 mM Bistris pH = 7,0 (HCl)
-----------------	---------------------------------

### 3.4.5 Coomassie-Colloidal-Färbung von Proteinen

Nach der Auftrennung von proteinhaltigen Proben mittels PAGE konnten die Proteine durch eine Coomassie-Colloidal (CoCo) Färbung sichtbar gemacht werden. Diese beruht auf dem Phosphorsäure-Ammoniumsulfat-Protokoll von Neuhoff *et al.* (1985).

Fixierlösung	40 % (v/v) techn. Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Lösung A	2 % (w/v) 85 % Phosphorsäure 10 % (w/v) Ammoniumsulfat
Lösung B	5 % (w/v) Coomassie Brillantblau G250
CoCo-Färbelösung	78,4 % (v/v) Lösung A 1,6 % (v/v) Lösung B (98 A: 2 B) über Nacht rühren, dann 20 % (v/v) Methanol

Das Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese mindestens 30 min in Fixierlösung inkubiert. Der anschließende Färbeprozess erfolgte über Nacht, kann aber auch länger durchgeführt werden. Die Färbelösung ist mehrfach verwendbar, bis sie eine einheitlich blaue Farbe annimmt und verworfen werden sollte.

### 3.4.6 Western Blotting

Es ist entscheidend, dass vor dem hier beschriebenen Transfervorgang BN-PA-Gele nicht mit einer SDS-Denaturierungslösung behandelt werden, da dies zu einem völligen Versagen der Detektion von (Erbsen)-TatC führt. Siehe hierzu auch Anhang Abschnitt 1. Die Gele werden stattdessen direkt nach der Elektrophorese mit dem unten beschriebenen Kathodenpuffer inkubiert.

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen auf Polyvinylidenfluorid-Membranen (0,2 µm Porengröße, Amersham™ Hybond™ Sequencing (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) oder Roti-PVDF 2.0 Porengröße 0,2 µm (Carl Roth, Karlsruhe) erfolgte mittels *Semidry-Blotting*. Dazu wurden die Membran und sechs Stücke Filterpapier (Gel Blotting Papiere Whatman 3MM, Carl Roth, Karlsruhe) ungefähr auf das Maß des Geles zugeschnitten und der Blot wie folgt aufgebaut:

Nach der Elektrophorese wird das Gel für 15 min in 200 ml Kathodenpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran wird mit Methanol benetzt und anschließend kurz mit Wasser gewaschen. Daraufhin wird sie für 5 min mit Anodenpuffer II äquilibriert. Zum Aufbau des Blots (Kathodenplatte unten, Anode oben) wird mit 3 Stück in Kathodenpuffer getränkten Filterpapiers begonnen, darauf wird das Gel platziert, auf das wiederum die Membran gelegt wird. Den Abschluss bildet ein in Anodenpuffer II und darauf zwei in Anodenpuffer I getränkte Filterpapiere. Luftblasen sind zu vermeiden. Nach jedem Schritt wird der Stapel mit einem Reagenzglas abgerollt, um Luftblasen herauszudrücken. Beim Aufbau eines Blots mit BN-PA-Gelen ist zu beachten, dass diese insbesondere im oberen Bereich sehr weich und fragil sind.

Der Transfer erfolgt für ca. 1 h mit einer konstanten Stromstärke von 1,2 mA pro cm<sup>2</sup> Membranfläche.

Kathodenpuffer	25 mM Tris 40 mM ε-Aminocaprinsäure pH nicht nachgestellt
Anodenpuffer II	25 mM Tris pH nicht nachgestellt
Anodenpuffer I	300 mM Tris pH nicht nachgestellt

Vor der Verwendung wird jedem Puffer 10 % (v/v) technisches Methanol hinzugefügt.

### 3.4.7 Immobilisierung von Proteinen zur Immunodetektion ohne Elektrophorese

Für die in Abb. E27 und Anhang Abb. A7 gezeigte Detektion von TatC in den Fraktionen der Rekonstitutionsproben wurde wie folgt verfahren: Mit einem Locher wurden Kreise aus Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schuell Protran BA 79) ausgestanzt und auf ein Stück Klebeband (Scotch Tape, 3M, Saint Paul, USA) geklebt. Auf die Membrankreise wurden vorsichtig je 20 µl Probe aufgetragen. Das Ganze wurde anschließend bei Raumtemperatur oder im

Heizschrank bei ca. 60 °C völlig getrocknet, was insbesondere bei saccharosehaltigen Proben recht lange dauern kann. Anschließend wurde mit dem Klebeband verfahren, wie im folgenden Abschnitt 3.4.8 beschrieben.

### 3.4.8 Immunodetektion von Proteinepitopen

Der spezifische Nachweis von Proteinepitopen wurde mithilfe zweistufiger Antikörperbehandlungen und Chemilumineszenz-Detektionsreaktion durchgeführt.

#### 3.4.8.1 Antikörperbehandlung

Nach dem Proteintransfer wurden die PVDF-Membranen zunächst kurz in  $H_2O_{dd}$  gewaschen. Es folgte die Blockierung freier Bindestellen der Membranen mit einer Inkubation in Waschlösung I für 2 h. Bei BN-PA-Gelen wurden der Lösung für diesen ersten Schritt außerdem 0,09 % (v/v)  $H_2O_2$  hinzugefügt. Dies führte zur Unterdrückung eines unspezifischen Signals des thylakoidären Cytochrom- $b_6/f$ -Komplexes (siehe auch Anhang Abschnitt 1, Abb. A1 und A4).

Waschlösung I	1x PBS
	0,5 % (v/v) Tween 20
	5 % (w/v) Magermilchpulver
	ggf. + 0,09 % (v/v) $H_2O_2$
<i>10x phosphate buffered saline</i>	750 mM NaCl
(PBS)	30 mM KCl
	45 mM $Na_2HPO_4$
	15 mM $KH_2PO_4$
	pH nicht nachgestellt

Anschließend wurde die Membran 2 h in frischer Waschlösung I mit dem erwünschten primären Antikörper in der entsprechenden Verdünnung inkubiert (siehe Material Abschnitt 2.11). Es folgten vier Waschschrte mit Waschlösung I á 10 min, woraufhin 1 h mit dem sekundären Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in Waschlösung I inkubiert wurde. Anschließend wurden vier Waschschrte á 10 min mit Waschlösung II (Waschlösung I ohne Milchpulver) durchgeführt. Da es sich beim sekundären Antikörper um ein nicht affinitätsgereinigtes Antiserum handelte, war die recht lange Dauer der letzten Waschschrte wichtig für die Reduktion des unspezifischen Hintergrundes.

### 3.4.8.2 *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Detektionsreaktion

Die Membran wurde 1 min mit *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Lösung inkubiert und anschließend in einen aufgeschnittenen Plastikbeutel überführt. Die Detektion erfolgte entweder mit der Exposition auf Röntgenfilm oder mit einem Digitalkameraufbau (FUSION FX, Vilber, Collégien, Frankreich) mithilfe der dazugehörigen Software. Die Expositionszeit wurde so gewählt, dass die interessanten Signale möglichst noch nicht im Bereich der Sättigung lagen. Für Detektionen mit  $\alpha$ TatC-Antikörper bewegte sie sich im Bereich von einigen Dutzend Sekunden bis Minuten, mit  $\alpha$ -TatB-Antikörper genügte zumeist wenige Sekunden bis Dutzende Sekunden.

Für die Belichtung eines Röntgenfilms (Amersham Hyperfilm™; GE Healthcare, Little Chalfont, UK) wurde die verpackte Membran mit dem Film in eine Kassette eingesetzt. Dieser wurde anschließend mit Entwickler- & Fixierlösung (Kodak GBX Carestream Dental; Kodak, Rochester, USA) entwickelt und haltbar gemacht. Für die Aufnahme mittels FUSION FX wurde die verpackte Membran in das Gerät eingelegt und gemäß den Anweisungen der Software fotografiert.

ECL-Lösung	50 mM Tris (pH = 8,3 (HCl))
	1,25 mM Luminol
	198 $\mu$ M Cumarsäure
	2,7 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Für die in Anhang Abb. A4 A und B dargestellten Versuche wurde die Membran nach dem Proteintransfer lediglich mit 1x PBS, bzw. 1x PBS mit 0,09 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gewaschen und dann direkt zur ECL-Detektion eingesetzt. Für das in Abb. A4 C dargestellte Experiment wurde das SDS-PA-Gel 20 min mit 50 mM Tris, pH = 8,3 inkubiert, einmal mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> abgespült und dann in einem Plastikbeutel mit ECL-Lösung inkubiert. In diesem Zustand wurde es zur Exposition eines Röntgenfilms eingesetzt.

### 3.4.9 Herstellung radioaktiv markierter Proteine

Zur Gewinnung der radioaktiv markierten Proteine tQTP<sup>CF</sup>, Erbsen-Vorläufer-TatC und 16/23 wurde zunächst mittels *in vitro* Transkription mRNA gewonnen, wie in Dissertation Molik (2005) beschrieben. Dafür wurde das Plasmid pBAT-tQTP<sup>CF</sup> eingesetzt, das zuvor mit dem Restriktionsenzym *NotI* linearisiert wurde. Die *in vitro*-Transkription von Vorläufer-TatC-mRNA wurde von Sarah Zinecker mit dem ebenfalls durch *NotI* linearisierten Plasmid pBAT-pTatC durchgeführt. Die *in vitro*-Transkription von 16/23-mRNA wurde von Jana Kungel mit dem durch

*HindIII* linearisierten Plasmid pBSC-16/23 durchgeführt. Die Proteinsynthese per *in vitro* Translation mit dem Einbau von <sup>35</sup>S-markiertem Methionin erfolgte nach den Angaben der Hersteller mit dem Reaktionskit *Flexi® Rabbit Reticulocyte Lysate System* (Promega) für tQTP<sup>CF</sup> und 16/23 und *Wheat Germ Extract* (Promega) für Vorläufer-TatC. Für 16/23 wurde dies von Jana Kungel durchgeführt.

#### 3.4.10 Visualisierung radioaktiver Signale

Polyacrylamid (PA)-Gele wurden nach der Elektrophorese ca. 30 min in Fixierlösung (siehe Abschnitt 3.4.5) inkubiert. Anschließend wurden sie mithilfe eines Gelrockners durch Anlegen von Unterdruck und langsamer Erwärmung bis 80 °C für ca. 1 h auf Filterpapier getrocknet. Europiumhaltige Kunststoffplatten (*Phosphoimager Screens*) wurden der Radioaktivität der Gele für einige Tage ausgesetzt und anschließend mithilfe eines Fujifilm FLA-3000 (Fujifilm, Düsseldorf) und der Software BASReader 3.14, sowie AIDA Image Analyzer 3.25 (Raytest, Straubenhardt) ausgelesen. Die densitometrische Analyse erfolgte mit Fiji (Schindelin et al., 2012).

#### 3.4.11 Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrische Analyse einer Probe angereicherter TatBC-Komplexe wurde durch eine SDS-PAGE vorbereitet. Das Gel wurde nach der Elektrophorese in Stücke geschnitten, mit Dithiothreitol reduzierend behandelt und die Cysteinyreste der Proteine anschließend mit Iodacetamid alkyliert. Durch die folgende Trypsinbehandlung wurden die Proteine fragmentiert. Diese Arbeitsschritte und die anschließende massenspektrometrische Analyse wurden von Julian Bender (AG Carla Schmidt, ZIK HALOmem, Halle (Saale) durchgeführt. Im Wesentlichen folgte dies dem in Wittig et al. (2019) beschriebenen Vorgehen. Der Vergleich der erhaltenen Daten erfolgte in Ermangelung einer vollständigen Proteindatenbank von Erbse mit der recht nahe verwandten Kichererbse *Cicer arietinum*.

### 3.5 Rekonstitution von Membranproteinen

#### 3.5.1 Herstellung von Liposomen

Hierfür wurde in der Regel Lecithin als Rohfraktion aus Eigelb (Carl Roth, Karlsruhe) verwendet, das zuvor zu 100 mg/ml in Chloroform gelöst wurde. Um bspw. 2,5 ml einer Liposomensuspension mit einer Lecithin-Konzentration von 1,25 mg/ml herzustellen, wurden 31,25 µl und etwa 700 µl Chloroform in eine kleine (ca. 8 ml) verschließbare Glasflasche gegeben. Unter einem Stickstoffstrom wurde das Chloroform aus der offenen Flasche verdampft, während die Flasche so gedreht wurde, dass das Lecithin die Seiten gleichmäßig und dünn beschichtet. Anschließend wurden 2,5 ml kalter HM-Puffer hinzugegeben, das Gefäß verschraubt und das Lecithin durch

kräftiges Mischen (ca. 5 min, Vortex) abgelöst und hydratisiert. Anschließend wurden die entstandenen Liposomen mithilfe eines Extruders (Liposofast Handextruder Avestin, Ottawa, Kanada) unilamellär gemacht und auf eine einheitliche Größe gebracht. Dazu wurden zwei Schichten einer Polycarbonatmembran mit 200 nm Porengröße eingelegt und die Suspension 21-mal hindurchgepresst. Die Suspension wird dabei nahezu transparent und opalesziert leicht. Hiermit wurden Rekonstitutionsversuche durchgeführt.

### 3.5.2 Erzeugung von Thylakoidvesikeln mit Ultraschall

1 ml präparierte Thylakoide wurde mit kurzen manuell gesteuerten Impulsen einer Ultraschallsonotrode (Gerät Sonopuls HD 3100, Sonde MS72, Leistung 40 W, Bandelin, Berlin) im Wechsel mit einigen Sekunden Pause und einer Nettolaufzeit von ca. 25 s behandelt. Die Probe wurde dabei mit Eis gekühlt. Die Suspension wird bei der Behandlung etwas lichtdurchlässiger. Die so erzeugten Vesikel wurden für Rekonstitutionsversuche verwendet.

### 3.5.3 Detergensvermittelte Destabilisierung von Liposomen und Thylakoidvesikeln

Für tiefere Erklärungen hierzu siehe Ergebnisse Abschnitt 4.7.1 und Abb. E26. Zunächst wurde ein geeignetes Lipid-Detergens-Verhältnis der Destabilisierung für die späteren Rekonstitutionsversuche ermittelt. Dazu wurde einer Liposomen- oder Thylakoidvesikelsuspension schrittweise Triton X-100-Lösung hinzugefügt, 5 min inkubiert und nach jedem Schritt die Trübung der Probe analysiert. Dazu wurde mithilfe des Spektralphotometers UV-1900 (Shimadzu, Kyoto, Japan) bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Damit Absorptionmesswerte über einen großen Bereich der Detergenskonzentration im technisch sinnvollen Messbereich 0,1-1 ermittelt werden können, wurde für Lecithinliposomen bei 400, 500, 600 und 700 nm gemessen, da die Messwerte mit steigender Wellenlänge abnehmen (siehe Abb. E26). Für Thylakoidvesikel wurde bei 560 (Grünlücke des Chlorophylls), 700 (Absorptionsmaximum des Chlorophylls) und 850 nm (außerhalb des Absorptionsbereichs des Chlorophylls) gemessen. Die fortschreitende Destabilisierung wurde durch eine gleichmäßige Abnahme der Trübung über einen großen Konzentrationsbereich des Detergens festgestellt (Abb. E26 und Anhang Abb. A7 A).

Die für die Rekonstitution genutzten Endkonzentrations-Verhältnisse waren für Lecithinliposomen ca. 1,5 mg/ml Triton X-100 zu 2,5 mg/ml Lecithin = 0,6 T/L und für Thylakoidvesikel ca. 45 µg/ml Triton X-100 zu 50 µg Chlorophyll/ml = 0,9 T/C. Die tatsächlich zur Destabilisierung und Rekonstitution verwendeten Lecithin- und Chlorophyllkonzentrationen wurden je nach Versuch variiert. In den letzten Versuchen betragen sie 0,25 mg/ml (Lecithinliposomen) bzw. 100 µg/ml (Thylakoidvesikel).

### 3.5.4 Gradientenrekonstitution (GRecon) von Membranproteinen

Die Gradientenrekonstitution basiert auf einem Protokoll von Althoff et al., 2012. Sie wurde mit einer Optima™ MAX Ultrazentrifuge und dem Rotor MLS-50 (Beckman Coulter, Brea, USA) durchgeführt. Dafür wurde in einem transparenten 5 ml *ultra clear* Zentrifugenröhrchen ein auf HM-Puffer basierender Gradient vorbereitet. Bei diesem nimmt von oben nach unten die Konzentration von Saccharose,  $\gamma$ -Cyclodextrin (abcr, Karlsruhe) und destabilisierten Liposomen (siehe Abschnitt 3.5.3) zu. Im Standardansatz wurden dazu für zwei Röhrchen die folgenden Puffer vorbereitet:

Endkonzentration	unterer Puffer	oberer Puffer
28 % (w/v) Saccharose	1,46 g	-
6 % (w/v) Saccharose	-	0,31 g
24,4 mM $\gamma$ -Cyclodextrin	164,6 mg	-
0,25 mg/ml Lecithinliposomen, mit Triton X-100 destabilisiert	1,04 ml von 1,25 mg/ml Lec.-liposomen (destab. mit Triton X-100)	-
HM-Puffer	ad 5,2 ml, lösen	ad 5,2 ml, lösen

Jeweils 2,5 ml des oberen Puffers wurden in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Mithilfe einer Spritze mit einer langen, stumpfen Kanüle wurden 2,5 ml des unteren Puffers unterschichtet. Anschließend wurde das Röhrchen mit einem selbstgemachten Gummistopper, der einen kleinen Luftdurchlass, hat luftblasenfrei verschlossen. Die Herstellung des kontinuierlichen Gradienten erfolgte nach dem Prinzip der gekippten Rotation nach Coombs & Watts (1985), indem das Röhrchen auf einen Rotator in einen selbstgemachten Röhrchenhalter mit einer Neigung von 77 ° platziert wurde. Dabei sollte das Röhrchen so senkrecht wie möglich zur Rotatorenplatte stehen. Der Gradient wurde ca. 3 min mit 10 Umdrehungen pro Minute gemischt. Dieses Vorgehen ist nicht optimiert, genügte aber für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ersten Versuchen. Anschließend wurde der Gradient auf Eis gekühlt und vorsichtig mit ca. 200-300  $\mu$ l einer Präparation angereicherter TatBC-Komplexe oder HM-Puffer (Gegengewicht zur Zentrifugation) überschichtet. Die Röhrchen wurden paarweise auf 1 mg genau austariert. Es wurde außerdem darauf geachtet, die dünnwandigen Zentrifugengefäße so hoch wie möglich zu befüllen, um sie bei der folgenden Zentrifugation genügend zu stabilisieren.

Die Zentrifugation erfolgt über Nacht (45.000 rpm, 4 °C, 18 h) mit dem Rotor MLS-50, in den stets alle Schwingeimer eingehängt sein müssen, auch wenn keine Probe enthalten ist. Anschließend werden die Liposomen entnommen, zweimal mit HM-Puffer gewaschen (Optima™ MAX, Rotor MLA-80, 55.000 rpm, 10-20 min, 4 °C) und können dann ggf. solubilisiert und analysiert werden.



### 3.5.5 Einfache Rekonstitution von Membranproteinen

Im Gegensatz zur Gradientenrekonstitution erfolgt diese Variante ohne gleichzeitige Zentrifugation. Dazu wurden zwei Lösungen vorbereitet: 3 ml HM-Puffer mit Triton X-100-destabilisierten Thylakoidvesikeln entsprechend 100 µg/ml Chlorophyll und 3 ml HM-Puffer mit 31,68 mg/ml  $\gamma$ -Cyclodextrin. Diese Lösungen wurden gleichzeitig über Nacht langsam in ein offenes Gefäß gepumpt, in dem 350 µl angereicherter TatBC-Komplexe ständig gerührt wurden. Dies sollte das langsame, graduelle Zusammentreffen der solubilisierten Membranproteine, destabilisierten Liposomen und  $\gamma$ -Cyclodextrin in der Gradientenrekonstitution nachahmen. Das Verfahren wurde bei ca. 7 °C im Kühlraum durchgeführt.

Am nächsten Tag wurden die Vesikel zweimal mit HM-Puffer gewaschen (Ultrazentrifuge Optima™ MAX, Rotor MLA-80, 48.000 rpm, 20 min, 4 °C) ggf. solubilisiert und analysiert.

## 3.6 Regressionsanalysen

### 3.6.1 Ermittlung der apparenten Molekülmasse von Proteinkomplexen aus der BN-PAGE und der Proteinmenge aus der SDS-PAGE

Die apparenten Molekulargewichte der TatBC-Komplexe wurden anhand der elektrophoretischen Mobilität in der BN-PAGE im Vergleich zum Größenstandard *High Molecular Weight Native Protein Marker* ermittelt. Dazu wurde die Laufweite der Proteinbanden im Polyacrylamidgel mithilfe des Programms Fiji (Schindelin et al., 2012) ausgemessen. Das apparente Molekulargewicht (MW) kann aus der Laufweite über folgende Funktion bestimmt werden:

$$\text{apparentes MW} = m \cdot \ln(\text{Laufweite}) + n$$

Die Variablen m und n wurden durch lineare Regression mit den Wertepaaren Laufweite und theoretisches Molekulargewicht der Proteinkomplexe des Größenstandards bestimmt. Dies geschah mit dem Programm Microsoft Excel über die automatische Erzeugung einer logarithmischen Trendlinie in einem Diagramm. Die dazu ausgegebene Formel wurde zur Berechnung des apparenten Molekulargewichtes der TatBC-Komplexe verwendet.

In ähnlicher Weise wurde zur Abschätzung der Konzentration eines bestimmten Proteins in einer Probe verfahren. Dazu wurden die Proben einer SDS-PAGE unterzogen und die Proteinbanden mit Coomassie-Colloidal-Färbung sichtbar gemacht. Eine Lysozym-Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen wurde als Standard mitgeführt.

Die Bandenintensitäten wurden mithilfe des Programms Fiji (Schindelin et al., 2012) quantifiziert. Die Proteinmenge (Masse) errechnet sich aus der Intensität mithilfe einer einfachen linearen Gleichung:

$$\text{Proteinmenge (Masse)} = p \cdot \text{Intensität}$$

$p$  wird durch lineare Regression mit den bekannten Werten der Lysozym-Verdünnungsreihe bestimmt und erlaubt die Berechnung der Proteinmenge der Proben. Diese Masse wird durch das Volumen, welches in das Gel geladen wurde, dividiert und ergibt die Proteinkonzentration in der Probe.

### 3.6.2 Abschätzung der Protomerzahl von TatBC-Komplexen

Die Anzahl der Protomere (Dimere aus einem Molekül TatB und einem TatC) solubilisierter thylakoidärer TatBC-Komplexe sollte über Regressionsanalysen mit a) der Beschreibung der Dissoziation von TatB als Beziehung zwischen den unterschiedlich großen Komplexen (zur Komplexdissoziation siehe Ergebnisse Abschnitt 4.2) und b) ihren apparenten Molekulargewichten ermittelt werden. In der Diskussion Abschnitt 5.5 wird dazu eine Funktion (Formel 3) zur Berechnung des apparenten Molekulargewichts (MW) jedes einzelnen TatBC-Komplexes entwickelt, die hier ebenfalls aufgeführt ist:

$$\text{Formel 3: } m_{\text{app TatBC}}(i) = 1,8 \cdot (n \cdot m_{\text{TatC}} + (n - ik) \cdot m_{\text{TatB}} + m_{\text{Substrat}}) + (n - ik) \cdot d_{\text{TatB}}$$

$m_{\text{app TatBC}}(i)$  ... apparentes (BN-PAGE) MW eines TatBC-Komplexes als Funktion von  $i$

$m_{\text{TatC}}, m_{\text{TatB}}$  ... theoretisches TatB- bzw. TatC-MW nach Aminosäuresequenz

$m_{\text{Substrat}}$  ... MW eines komplexgebundenen Tat-Substrates

$i$  ... Anzahl erfolgter Dissoziationsschritte

$n$  ... Protomerzahl (Anzahl TatB und TatC im intakten Komplex)

$k$  ... pro Dissoziationsschritt verlorene Menge TatB

Faktor 1,8 ... Korrekturfaktor zum Ausgleich des unterschiedlichen Laufverhaltens von löslichem Größenstandard und Membranproteinkomplexen

$d_{\text{TatB}}$  ... Abweichung des apparenten MW von TatB vom erwarteten Wert (besondere Eigenschaft der TatAB-Proteinfamilie)

**Zu weiterführenden Erklärungen siehe Diskussion Abschnitt 5.5.**

Die Funktion enthält als unabhängige Größe  $i$  die Anzahl an Dissoziationsschritten, die ein solubilisierter Komplex nach dem Modell der Komplexdissoziation durchlaufen hat (siehe

Ergebnisse Abschnitt 4.1 und 4.2) und schließt als Konstanten die Protomerzahl  $n$  der intakten Komplexe, die Anzahl  $k$  der pro Dissoziationsschritt verlorenen Moleküle TatB, die Molekulargewichte der Proteine TatC, TatB und ggf. Substrat, sowie eine Reihe von Korrekturfaktoren ein. Bei letzteren handelt es sich zum einen um einen Faktor (1,8), der das abweichende Laufverhalten des löslichen BN-PAGE-Größenstandards gegenüber den Membranproteinkomplexen berücksichtigt (Heuberger et al., 2002; I. Wittig et al., 2010) und zum anderen um einen möglichen überproportionalen Beitrag  $d_{\text{TatB}}$  von TatB zum apparenten Molekulargewicht (siehe Abb. M4). Die Eignung der hinzugefügten Korrekturfaktoren wurde dadurch festgestellt, dass die Formel besser zu den Messwerten der apparenten Molekulargewichte passende Ergebnisse lieferte, was sich in einem Anstieg des Bestimmtheitsmaßes  $R^2$  äußerte (siehe folgender Text).

Zur Regressionsanalyse wurden Wertepaare aus der Anzahl der mutmaßlich durchlaufenen Dissoziationsschritte  $i$  eines Komplexes von 0 bis 3 (unabhängige Größe) und den aus der BN-PAGE ermittelten apparenten Molekulargewichten (abhängige Größe entsprechend der Funktion  $f(i)$ ) gebildet. Mit der jeweils zu testenden Formelvariante wurden aus den jeweiligen  $i$  die  $f(i)$  berechnet und diese rechnerischen Werte von den tatsächlich gemessenen apparenten Molekulargewichten subtrahiert. Diese Abweichungen aller vier Komplexe wurden jeweils quadriert und zur Summe der Abweichungsquadrate (SAQ) addiert. Die Regressionsanalyse wurde mithilfe des Programms Microsoft Excel und dem Add-In „Solver“ durchgeführt. Dabei wurde die Variable Protomerzahl  $n$  und später auch andere Variablen innerhalb der Funktion durch computergestützte Näherungsverfahren (eingestellte Lösungsmethode: GRG-Nichtlinear) so lange verändert, bis die SAQ ein Minimum erreichte. Die so genäherte Protomerzahl und andere Variablen stellten das Ergebnis der Regressionsanalyse dar. Die Güte der Übereinstimmung der mit der genäherten Formel berechneten Werte der apparenten Masse und den tatsächlichen Messwerten wurde als Bestimmtheitsmaß  $R^2$  zwischen 0 und 1 ausgedrückt. Nach den in 5.5 angestellten Vorüberlegungen kam für die Anzahl  $k$  der pro Dissoziationsschritt verlorenen Moleküle TatB nur 1 oder 2 in Frage. Entsprechend wurden zwei Gruppen von Analysen durchgeführt, bei denen  $k$  zuvor auf 1 bzw. auf 2 festgelegt wurde.

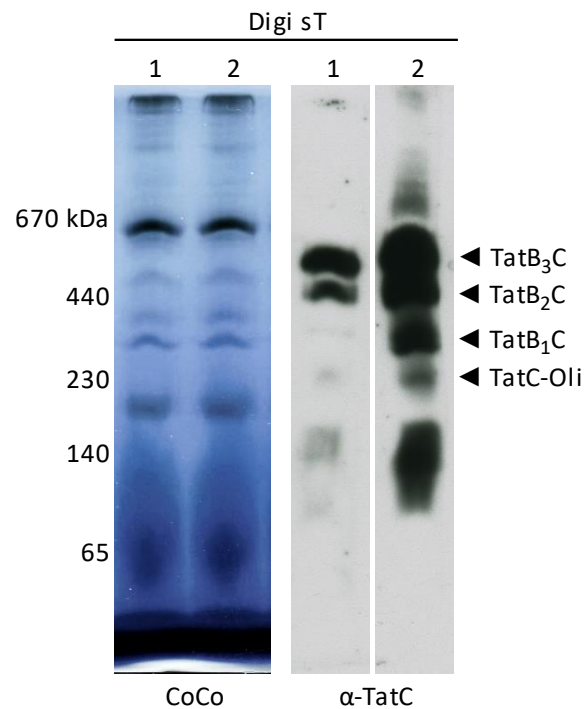
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Einführung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden thylakoidäre TatBC-Rezeptorkomplexe vor allem mithilfe der *Blue Native*-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) charakterisiert. Sie erlaubt eine nicht-denaturierende Auftrennung von Proteinkomplexen mit geringer Eigenladung und Löslichkeit nach ihrem Molekulargewicht. Dabei bindet der Farbstoff Coomassie Brilliantblau G 250 an die Oberfläche der Proteinkomplexe und verleiht ihnen eine negative Gesamtladung, durch die sie im elektrischen Feld migrieren. Sie ist für solubilisierete Membranproteinkomplexe wie bspw. TatBC gut geeignet.

Die Solubilisierung, d. h. Überführung der eigentlich unlöslichen Membranproteinkomplexe in wasserlösliche Partikel mit dem schonenden Detergens Digitonin ist gut charakterisiert (bspw. Berghöfer & Klösigen, 1999; Cline & Mori, 2001; Jakob et al., 2009). Aus Erbsenkeimlingen (*Pisum sativum*) präparierte Thylakoide werden dazu mit 1,5 %iger (w/v) Digitoninlösung (Standardwert, Zusammensetzung des Puffers siehe Methoden Abschnitt 3.3.6) inkubiert und ungelöste Reste anschließend mithilfe von Mikro- und Ultrazentrifuge entfernt. Führt man mit diesen digitoninsolubilisierten Thylakoiden (Digi sT) BN-PAGE durch, erfordert die vergleichsweise geringe Menge von Tat-Proteinen gegenüber bspw. den Photosystemen eine sehr sensible

Nachweismethode. Dazu wird *Western Blotting* und eine immunologische Detektion mit den Antiseren  $\alpha$ -TatB oder  $\alpha$ -TatC durchgeführt (vgl. Methoden Abschnitte 3.4.6 und 3.4.8, in dieser Arbeit als *Western Blotting* zusammengefasst, in Abbildungen nach den verwendeten Antiseren bezeichnet). In Abb. E1 ist ein Beispiel einer solchen Analyse dargestellt. Die abundanten Komplexe der photosynthetischen Elektronentransportkette lassen sich durch unspezifische



**Abbildung E1: Analyse digitoninsolubilisierter Membranproteinkomplexe aus Thylakoiden mit BN-PAGE und spezifischer Nachweis von TatBC-Komplexen.** Präparierte Thylakoide wurden mit 1,5 % (w/v) Digitonin solubilisiert (Digi sT) und zwei identische Proben davon mit BN-PAGE und Coomassie-Colloidal-Färbung (CoCo) oder TatC-spezifischem *Western Blotting* analysiert. Dabei wurde bei der Detektion für Probe 2 eine verlängerte Exposition durchgeführt. Links sind die Molekulargewichte des *High Molecular Weight Native Protein Marker*-Größenstandards notiert. Zu den Bezeichnungen der TatBC-Komplexe siehe Text des folgenden Abschnitts.

Coomassie-Proteinfärbung zeigen, während der Nachweis von TatBC-Komplexen erst mithilfe von  $\alpha$ -TatC-Western Blotting gelingt.

Digitoninsolubilierte TatBC-Komplexe zeigen sich als komigrierende TatB- und TatC-spezifische Signale (vgl. auch Abb. E2). Für Komplexe aus Erbsenthylakoiden liegt das apparente Molekulargewicht bei ca. 650 kDa. Zusätzlich existieren jedoch oft kleinere Komplexe von etwa 530, 400 und 300 kDa (Berghöfer & Klösgen, 1999; Cline & Mori, 2001; E. Fan et al., 2010; Q. Ma et al., 2018; X. Ma & Cline, 2013). Diese verschiedenen Komplexspezies treten in einem charakteristischen leiterartigen Muster auf.

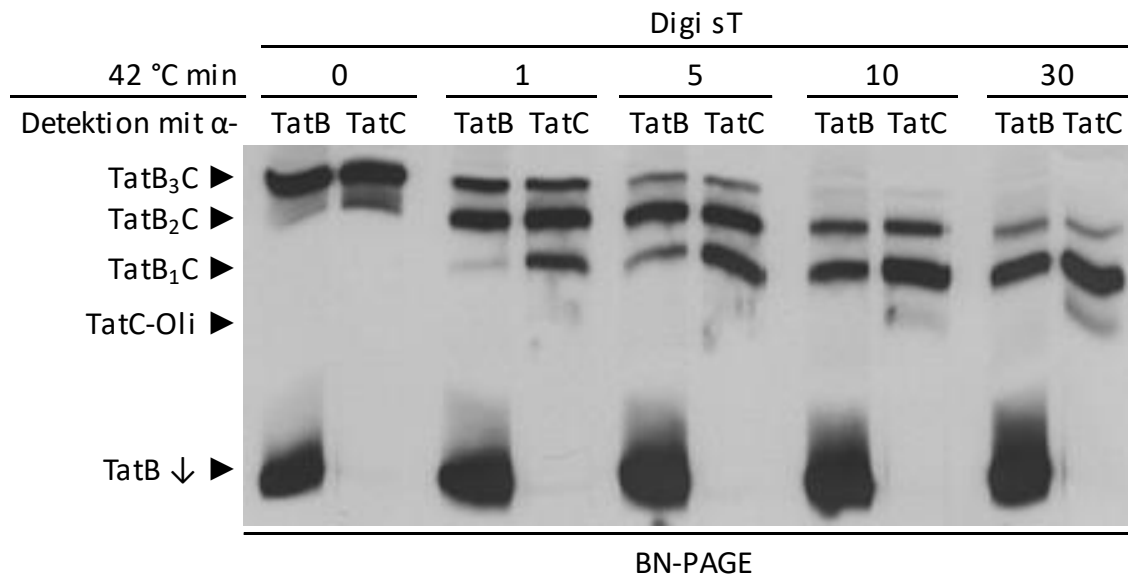
Es ist zu beachten, dass die apparenten Molekulargewichte aus der BN-PAGE-Analyse das tatsächliche Molekulargewicht von Proteinkomplexen nur näherungsweise widerspiegeln, da das Migrationsverhalten durch zahlreiche Faktoren verändert wird (siehe dazu auch Diskussion Abschnitt 5.5). Aus diesem Grund wurde bei vielen Experimenten auch kein zusätzlicher Größenstandard eingesetzt. Stattdessen kann man über das leiterartige Muster der TatBC-Komplexe selbst die einzelnen Komplexspezies zuordnen. Die Beobachtung dieses Musters steht in der vorliegenden Arbeit im Fokus.

Im Folgenden sollte zunächst analysiert werden, was der Grund für die Entstehung der verschiedenen Komplexspezies ist.

#### 4.2 Die Dissoziation von TatB verändert die Stöchiometrie von TatBC-Rezeptorkomplexen

Es bestand die Vermutung, dass die kleineren Komplexe Zerfallsprodukte der größeren sind. Daher wurden Digi sT-Proben mit erhöhter Temperatur (42 °C) inkubiert und mittels BN-PAGE analysiert (Abb. E2). Ohne Wärmebehandlung zeigen sich nur die größten TatBC-Komplexe TatB<sub>3</sub>C und TatB<sub>2</sub>C (zur Bezeichnung siehe weiter unten). Durch die Inkubation bei 42 °C scheinen diese größeren TatBC-Komplexe, in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer, in die kleineren Komplexe TatB<sub>1</sub>C und TatC-Oli zu zerfallen. Insgesamt zeigen sich für TatC vier verschiedene Komplexe, für TatB aber nur drei. Das Auftreten dieses anscheinend TatB-freien TatC-Oligomers lässt die Vermutung zu, dass ein sukzessiver Verlust von TatB der Grund für die Verkleinerung der Komplexe ist. Das abgelöste TatB könnte möglicherweise am unteren Ende der BN-PAGE nachgewiesen werden, wenn dort nicht bereits für unbehandelte Digi sT ein intensives Signal auftreten würde. Dieser Ansatz wird deshalb bei Abb. E6 weiterverfolgt.

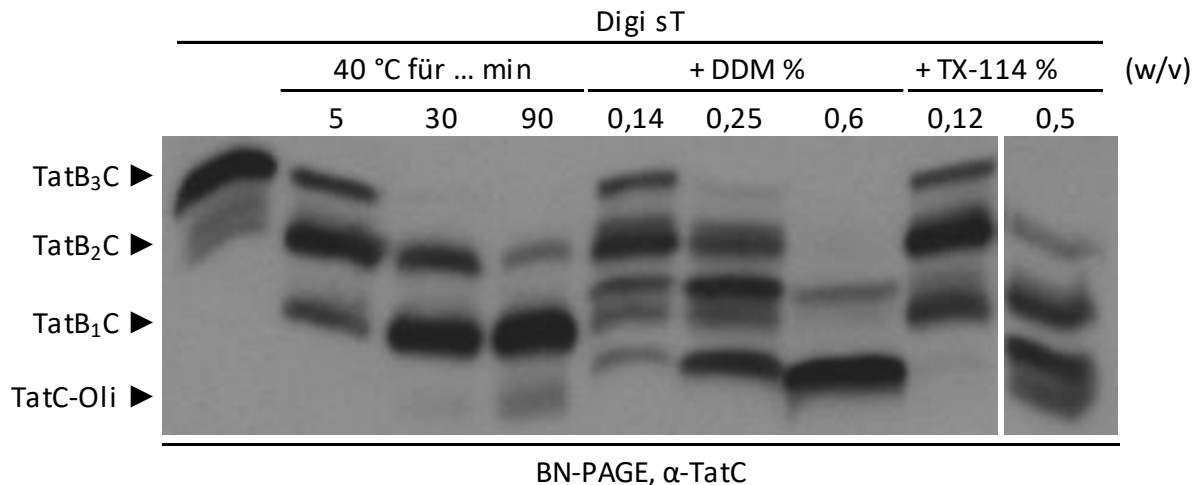
Auf Basis der Hypothese des schrittweisen TatB-Verlustes werden die verschiedenen Komplexe der Einfachheit halber im Folgenden als „TatB<sub>3</sub>C“ bis „TatB<sub>1</sub>C“ bezeichnet. Dies soll die Stufen des mutmaßlichen TatB-Verlustes widerspiegeln, enthält aber keine Aussage über die Zahl der tatsächlich enthaltenen TatB-Monomere. Das mutmaßlich TatB-freie TatC-Oligomer wird als „TatC-Oli“ bezeichnet.



**Abbildung E2: Dissoziation solubilisierter TatBC-Komplexe durch Wärmeeinwirkung.** Thylakoide wurden mit 1,5 % (w/v) Digitonin solubilisiert (Digi sT) und 0-30 min bei 42 °C inkubiert. Die Proben wurden mit BN-PAGE und *Western Blotting* analysiert. Die auf die PVDF-Membran transferierten Probenspuren wurden längs halbiert und eine Hälfte zur Detektion mit α-TatB, die andere mit α-TatC behandelt. Für die Chemilumineszenzreaktion wurden die Membranstreifen wieder aneinandergelagt. Die Bezeichnungen „TatB<sub>3</sub>C“ bis „TatC-Oli“ sollen den mutmaßlichen Verlust von TatB bis zum reinen TatC-Oligomer widerspiegeln. „TatB ↓“ ist mutmaßlich monomeres TatB.

In den folgenden Versuchen sollte diese Dissoziation der Komplexe näher analysiert werden. Insbesondere sollte herausgefunden werden, ob es sich um ein methodenspezifisches Artefakt oder ein allgemeingültiges Konzept handelt.

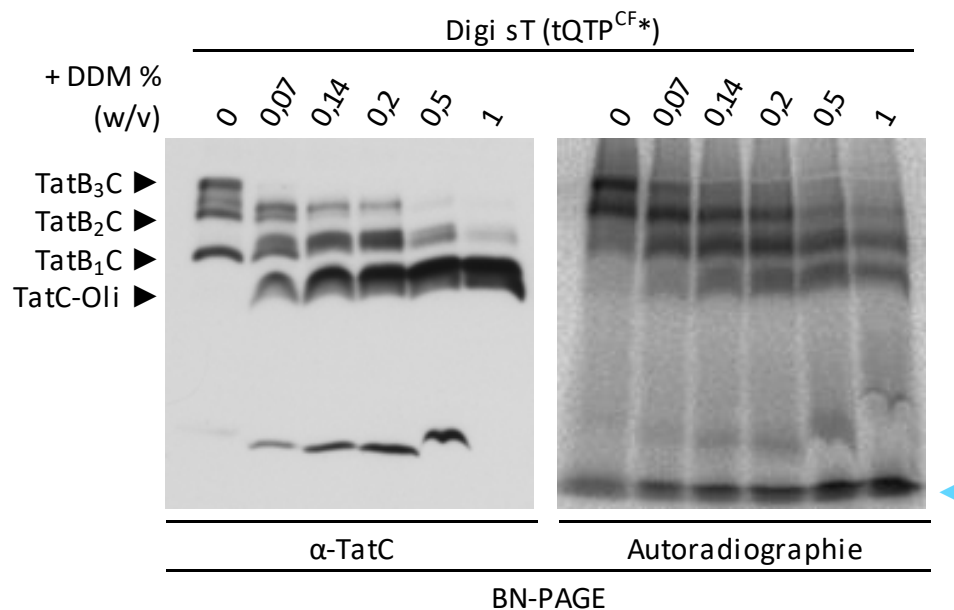
Hierfür wurden Digi sT wiederum mit erhöhter Temperatur (40 °C) oder vergleichend mit den nichtionischen Detergenzien n-Dodecyl-β-D-Maltosid (DDM) bzw. Triton X-114 (TX-114) behandelt und wie zuvor analysiert. Auch hier zeigen sich bis zu vier TatC-enthaltende Komplexe. Diese werden in Abhängigkeit von der Detergenzkonzentration sukzessive kleiner (Abb. E3). Dies zeigt, dass die Komplexdissoziation nicht spezifisch durch Wärmebehandlung verursacht wird, sondern auch unter anderen Bedingungen auftritt. Zu bemerken ist außerdem, besonders für DDM, eine zusätzliche Aufspaltung der Signale in Paare. Hierfür gibt es bisher keine Erklärung.



**Abbildung E3: Die Detergenzien DDM und TX-114 können TatBC-Komplexe ebenfalls dissoziieren.** Digitoninsolubilierte Thylakoide (Digi sT) wurden 10 min bei 40 °C inkubiert oder mit DDM bzw. TX-114 versetzt und per BN-PAGE und *Western Blotting* gegen TatC analysiert.

Weiterführende Tests zeigten, dass die Komplexdissoziation nicht von allen Detergenzien hervorgerufen wird. So bewirkte die Behandlung von Digi sT mit Tween 20 im Gegensatz zu DDM kein Auftreten kleinerer TatBC-Komplexe (siehe Anhang Abb. A8). Des Weiteren ist die Tatsache, dass sich alle Komplexspezies in denaturierender Natriumdodecylsulfat-PAGE (SDS-PAGE) in monomeres TatC auflösen lassen (siehe Anhang Abb. A9) ein Anhaltspunkt dafür, dass es sich bei den kleineren TatBC-Komplexen nicht bspw. um Aggregate, besonders des recht hydrophoben TatC (vgl. auch Einleitung Abschnitt 1.3.2), handelt.

Es stellt sich die Frage, ob die Fähigkeit zur Substratbindung bei der Dissoziation der TatBC-Komplexe erhalten bleibt. Hierfür wurde der Verbleib eines vor der Digitoninsolubilisierung an die TatBC-Komplexe gebundenen Modellsubstrates während der Behandlung mit DDM untersucht. Intakte Thylakoide wurden mit dem Fusionsprotein „tag-PsbQ-Transitpeptid S54C M64F“ (tQTP<sup>CF</sup>, siehe auch Material Abschnitt 2.10 zum Protein an sich, Abschnitt 4.6 zur Verwendung und Diskussion Abschnitt 5.3.2 zur Charakterisierung der besonderen Eigenschaften) behandelt (siehe Methoden Abschnitt 3.3.5). tQTP<sup>CF</sup> beinhaltet eine leicht veränderte Variante des Tat-spezifischen Signalpeptids (vgl. Einleitung Abschnitt 1.2.1) des Proteins PsbQ (16 kDa Untereinheit des Wasserspaltungsapparates, auch „OEC16“ aus Spinat (*Spinacia oleracea*)) ein. Dieses Protein bindet sehr stabil an die membranständigen TatBC-Komplexe und verbleibt dort auch nach der Solubilisierung mit Digitonin. Setzt man es in radioaktiv markierter Form ein (siehe Methoden Abschnitt 3.4.9), lassen sich damit beladene TatBC-Komplexe nach BN-PAGE mittels Autoradiographie ermitteln (siehe Abb. E4).



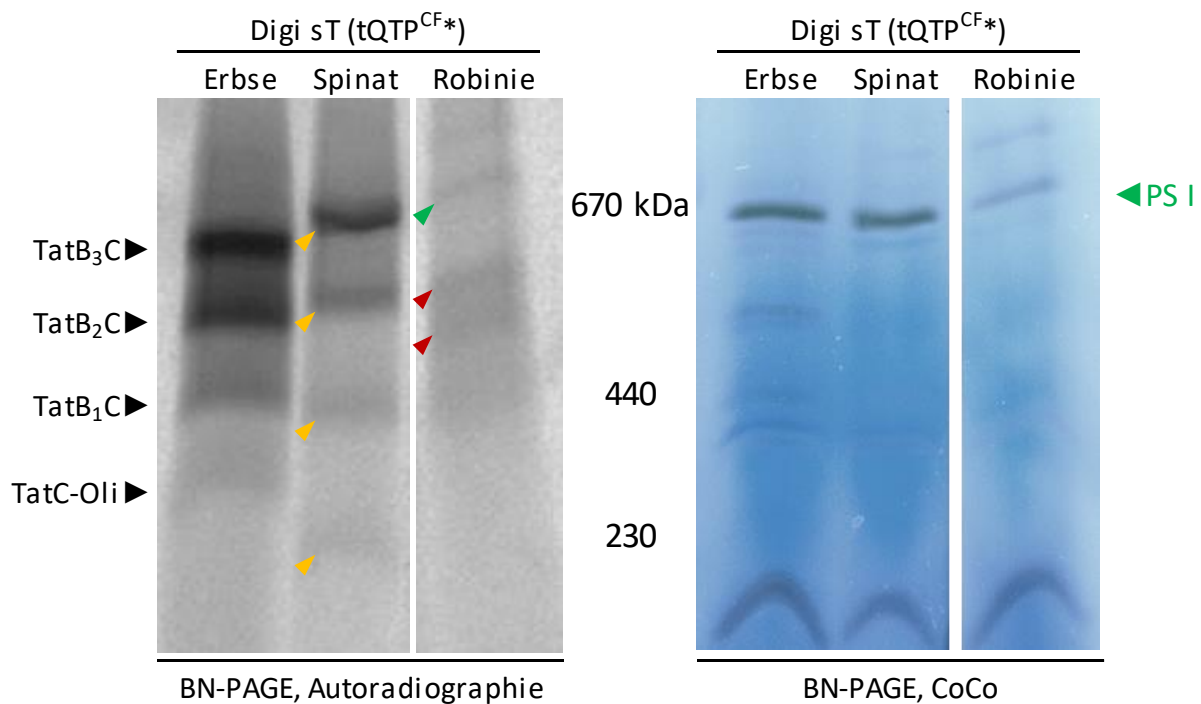
**Abbildung E4: An TatBC gebundenes  $tQTP^{CF}$  verbleibt bei der Komplexdissoziation teilweise am Komplex.** Thylakoide wurden mit radioaktiv markiertem (\*)  $tQTP^{CF}$  inkubiert, gewaschen, mit Digitonin solubilisiert (Digi sT) und mit DDM versetzt. Die Analyse erfolgte mit BN-PAGE und Autoradiographie.   
 ◀ markiert freies  $tQTP^{CF}$ .

Eine DDM-Behandlung der  $tQTP^{CF}$ -tragenden TatBC-Komplexe (als Digi sT) führt zu dem bekannten Muster der kleiner werdenden Komplexe. Die Menge des komplexassoziierten  $tQTP^{CF}$  nimmt dabei zwar mit sinkender Komplexgröße ab, aber auch in der Probe mit 1 % (w/v) DDM hat das TatC-Oligomer noch Modellsubstrat gebunden. Prinzipiell kann die Bindung zum Substrat also auch bei der Dissoziation von TatB erhalten bleiben. Daher kann man auch davon ausgehen, dass die Komplexe durch die Dissoziation nicht zerstört werden. Versuche, bei denen  $tQTP^{CF}$  erst nach der Solubilisierung und DDM-Behandlung zugegeben wurde, wären zur Analyse einer solchen Restfunktion ebenfalls aufschlussreich (vgl. auch Wojnowska et al., 2018). So könnte man feststellen, ob die solubilisierten und dissoziierten TatBC-Komplexe noch in der Lage sind, als Rezeptor Substrate zu binden, oder ob nur bereits gebundene Substratproteine am Komplex verbleiben können.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob das Phänomen der Komplexdissoziation auch bei den TatBC-Komplexen anderer Pflanzen zu finden ist. Spinatblätter wurden nach dem eigens dafür etablierten Protokoll der Arbeitsgruppe (siehe Dissertation Waclawek, 2016 modifiziert nach Dissertation Molik, 2005) aufgearbeitet. Mit Erbsenkeimlingen und Blattmaterial von verschiedenen Pflanzen aus der Umgebung des Institutsgebäudes (davon gezeigt ist Robinie) wurde hingegen nach dem für Erbse optimierten Protokoll verfahren. Die präparierten Thylakoide wurden anschließend mit radioaktiv markiertem  $tQTP^{CF}$  behandelt und mit Digitonin solubilisiert



(Abb. E5). Durch die hohe Sensitivität der Autoradiographie zeigten sich alle Komplexspezies auch ohne zusätzliche dissoziierende Behandlung.



**Abbildung E5: Auch für andere Pflanzenarten zeigt sich eine Abstufung der TatBC-Komplex-Molekulargewichte.** Thylakoide von Erbse, Spinat und Robinie wurden mit radioaktiv markiertem (\*) tQTP<sup>CF</sup> inkubiert, gewaschen und mit Digitonin solubilisiert (Digi sT (tQTP<sup>CF\*</sup>)). Die Analyse erfolgte mit BN-PAGE und Autoradiographie oder Coomassie-Colloidal-Färbung (CoCo). Pfeile markieren die Position (mutmaßlicher) TatBC-Komplexe von Spinat (▶) und Robinie (▶). ▶ zeigt ein mögliches unspezifisches Signal von PS I bei der Western-Detektion, bzw. die Position des PSI-Komplexes. Mittig sind die Referenzwerte des *High Molecular Weight Native Protein Marker*-Größenstandards notiert.

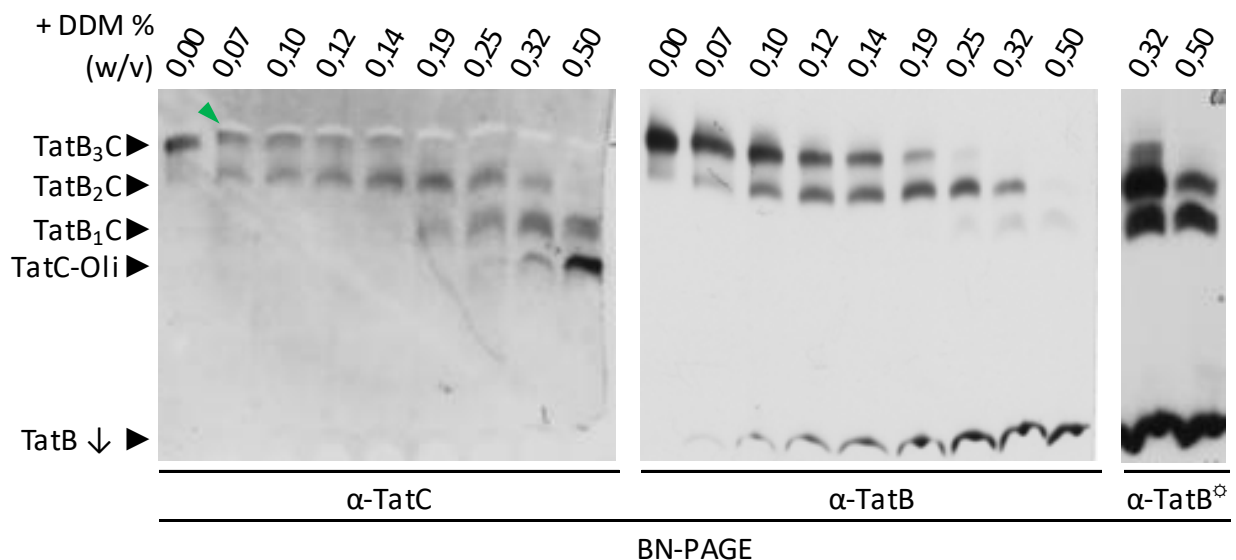
Für Spinat zeigt sich eine große Ähnlichkeit mit dem bekannten Muster der Erbsenprobe, wobei die Signale der substratbeladenen TatBC-Komplexe über einen größeren Bereich verteilt sind (gelbe Pfeile, vergleiche auch ähnliche Daten Dissertation Waclawek, 2016). Auch für die Probe Robinie (*Robinia pseudoacacia*) sind Signale sichtbar, die in Muster und apparentem Molekulargewicht an die der Erbse erinnern (rote Pfeile). Ein zusätzliches höher migrierendes Signal ist mit einem grünen Pfeil markiert. Im Vergleich mit dem coomassiegefärbten BN-Gel zeigt sich, dass es sich um eine unspezifische Bindung des radioaktiven tQTP<sup>CF</sup> an Photosystem I handeln könnte. Diese Vermutung wird nach Erfahrungswerten durch die schmale Bandenform und das Fehlen eines gleichmäßigen Leitermusters bestärkt. Auch die Proben anderer Pflanzen, wie Eiche und Kanadische Goldrute, bei denen die Darstellung mutmaßlicher TatBC-Komplexe nicht gelang, besaßen ein einziges radioaktives Signal ebenfalls auf Höhe des PS I (Daten nicht gezeigt).

Anscheinend neigen auch die TatBC-Komplexe anderer Pflanzen zu der beschriebenen Dissoziation von TatB.

All diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei der beschriebenen Veränderung der TatBC-Komplexe nicht um Artefakte, sondern um ein allgemeingültiges und untersuchenswertes Konzept handelt. Daher war es nun sinnvoll, zu überprüfen, ob die Verkleinerung der TatBC-Komplexe tatsächlich durch den Verlust von TatB verursacht wird.

In Abb. E2 zeigte sich am unteren Rand der BN-PAGE-Analyse von unbehandelten Digi sT monomeres TatB. Dieses würde das aus dissoziierenden Komplexen freiwerdende TatB überlagern. Aus diesem Grund wurden für den folgenden Versuch sog. angereicherte TatBC-Komplexe verwendet, die kein monomeres TatB enthalten (siehe Abb. E6 Probe 0 % DDM „TatB ↓“ und zur Anreicherung von TatBC-Komplexen siehe Abschnitt 4.6).

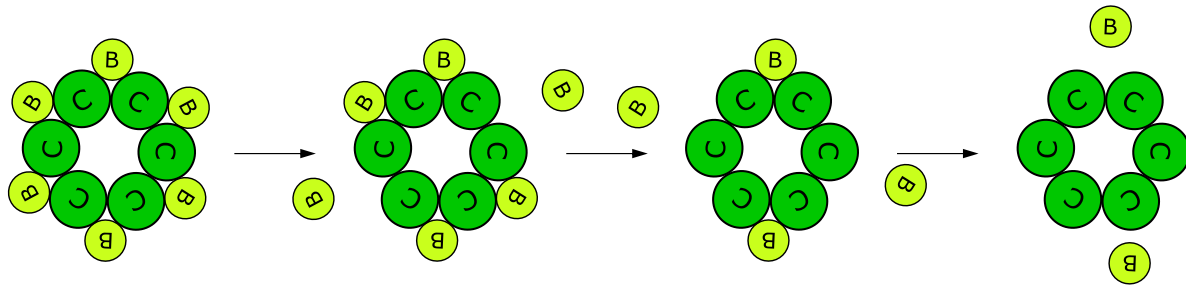
Die angereicherten TatBC-Komplexe wurden mit DDM behandelt (Abb. E6). In Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an DDM zeigt sich das bekannte Muster des sukzessiven Komplexzerfalls auch hier. Auch wenn die spezifische Detektion mit verlängerter Exposition ( $\alpha$ -TatB<sup>⊙</sup>) durchgeführt wurde (vgl. Methoden Abschnitt 3.4.8.2), zeigen sich für Proben mit hohem DDM-Gehalt bei der Detektion von TatB nur drei, anstatt wie für TatC vier, Komplexe. Wie vermutet zeigt sich mit zunehmender Detergengkonzentration eine Zunahme des mutmaßlich dissoziierten monomeren TatB-Proteins am unteren Rand der BN-PAGE (TatB ↓).



**Abbildung E6: Die TatBC-Komplexdissoziation geht mit einem Verlust von TatB einher.** Aus Thylakoiden wurden angereicherte TatBC-Komplexe gewonnen, mit DDM versetzt und per BN-PAGE und *Western Blotting* gegen TatC bzw. TatB analysiert. „TatB ↓“ ist mutmaßlich dissoziiertes monomeres TatB. Für die Proben „0,32“ und „0,50 % (w/v) DDM“ ist eine verlängerte Exposition bei Detektion mit  $\alpha$ -TatB gezeigt (<sup>⊙</sup>). ► markiert eine Reihe durch Photosystem I verursachter Negativbanden.

Des Weiteren weist das intensive Signal des mutmaßlich TatB-freien TatC-Oligomers bei der höchsten DDM-Konzentration darauf hin, dass dies der vorläufige Endpunkt des Vorgangs sein könnte. All dies zeigt, dass die Komplexdissoziation tatsächlich mit dem Verlust von TatB zusammenhängt.

Aus den gewonnenen Ergebnissen wurde ein Arbeitsmodell abgeleitet, das den schrittweisen Verlust von TatB aus digitoninsolubilisierten TatBC-Komplexen als Ursache oder zumindest Effekt der Komplexdissoziation postuliert (Abb. E7).



**Abbildung E7: Arbeitsmodell zum TatB-Verlust bei der TatBC-Komplexdissoziation.** Hypothetisches Modell zur Dissoziation von TatB aus TatBC-Komplexen. TatB geht schrittweise aus den TatBC-Komplexen verloren. Zur einfacheren Darstellung ist TatB außen am TatC-Oligomer platziert. Dies soll keine Aussage über die tatsächliche Position im Komplex treffen.

Da die Komplexe mittelfristig mithilfe des Proteins tQTP<sup>CF</sup> angereichert und isoliert werden sollten, wurde mit dem Wissen um die Komplexdissoziation im Folgenden versucht, Faktoren zu identifizieren, die solubilisierete TatBC-Komplexe stabilisieren. Als alternativer Ansatz wurde die Gewinnung von TatC-Oligomeren verfolgt, da auch diese tQTP<sup>CF</sup> tragen können, wie zuvor in Abb. E4 und E5 gezeigt. Zusätzlich lassen sich durch die weitere Charakterisierung der Komplexdissoziation möglicherweise Erkenntnisse über die Natur der TatB-Bindung und die Struktur der TatBC-Komplexe ableiten.

### 4.3 Optimierung der Solubilisierung von TatBC-Rezeptorkomplexen mit Detergenzien

Die Solubilisierung des thylakoidären TatBC-Rezeptors mithilfe von Digitonin ist die Standardmethode der Arbeitsgruppe. Allerdings birgt die Verwendung dieses Detergens gewisse Schwierigkeiten. Die Verbindung ist giftig und mit einem Preis um 200 € pro Gramm (bspw. vom Hersteller SERVA, Heidelberg) für Präparationen oberhalb von einigen Millilitern recht kostspielig. Vor allem sind Lösungen des Stoffes nur metastabil und präzipitieren nach einigen Stunden (siehe hierzu auch Wojnowska et al., 2018).

Daher wurden auch andere Detergenzien auf ihre Fähigkeit zur Solubilisierung intakter TatBC-Komplexe aus Thylakoiden untersucht.

Zunächst wurden Solubilisierungsexperimente mit BN-PAGE und spezifischem Nachweis von TatB und TatC durchgeführt. Allerdings zeigt die *Western Blotting*-Detektion von TatB häufig Kreuzreaktionen (bspw. Photosystem I, siehe z. B. Abb. E21), während der Nachweis von TatC zum damaligen Zeitpunkt der Arbeit noch nicht reproduzierbar möglich war (Daten nicht gezeigt, zu Problemen beim Nachweis von TatC siehe außerdem Anhang Abschnitt 1). Daher wurde stattdessen eine Markierung der TatBC-Komplexe über die Bindung der radioaktiv markierten Proteine TatB (etabliert von Zinecker et al., 2020) bzw. 16/23 vorgenommen. Bei 16/23 handelt es sich um ein chimäres Tat-Modellsubstrat (siehe Abschnitt 4.4.1 Text bei Abb. E15). Doch auch auf diese Weise wurde kein Detergens gefunden, das ein zum Muster digitoninsolubilisierter TatBC-Komplexe vergleichbares Bild erzeugt hätte (Daten nicht gezeigt).

Zu diesem Zeitpunkt wurde die Hypothese der Komplexdissoziation aufgestellt. Die dazu durchgeführten Experimente ließen vermuten, dass viele der getesteten Detergenzien eine Dissoziation von TatB hervorrufen und deshalb lediglich TatC-Oligomere erzeugen. Im Folgenden wurde dieses Verhalten charakterisiert und eingeschätzt, ob für weiterführende Versuche die Gewinnung von TatC-Oligomeren anstelle von TatBC-Komplexen (im Sinne der sog. Komplexanreicherung, Abschnitt 4.6) möglich wäre.

#### 4.3.1 Nichtionische Detergenzien

Zunächst sollen Vertreter der nichtionischen Detergenzien vorgestellt werden, zu denen auch Digitonin zählt.

##### n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid (DDM)

n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid (DDM) ist, wie Digitonin, ein recht schonendes Detergens. Bei der Verwendung von 1,5 % (w/v) DDM für die Solubilisierung thylakoidärer TatBC-Komplexe ist die Komigration von TatC und TatB in der BN-PAGE aufgehoben (Abb. E8). Bei den TatC-Signalen handelt es sich nach dem Vergleich mit der Digi sT-Probe vermutlich um TatC-Oligomere. Die TatBC-Komplexe sind daher vermutlich völlig dissoziiert. Ein ausführlicherer Vergleich von mit DDM-behandelten Digi sT und DDM-solubilisierten TatBC-Komplexen in Anhang Abb. A8 stützt dies ebenfalls. DDM ist demnach für die Solubilisierung intakter TatBC-Komplexe ungeeignet.

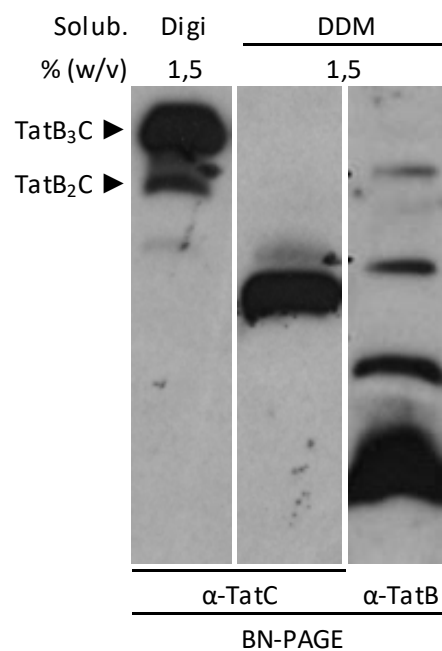
### Triton X-100 und X-114

Die Polyethylenglykolderivate Triton X-100 (TX-100) und Triton X-114 (TX-114) sind recht häufig genutzte Detergenzien. Sie wurden zur Solubilisierung von TatBC-Komplexen verwendet, die mit radioaktivem tQTP<sup>CF</sup> beladen waren (Abb. E9). Dabei entstehen bei Detergenkonzentrationen von 0,5-1,5 % (w/v) stark dissoziierte Komplexe, die aber zum großen Teil noch das Signalpeptid-Derivat tragen (E9 A, vgl. auch Abb. E4). Die intakte Bindung von tQTP<sup>CF</sup> ist entscheidend für die Möglichkeit der Anreicherung der Komplexe (vgl. Abschnitt 4.6).

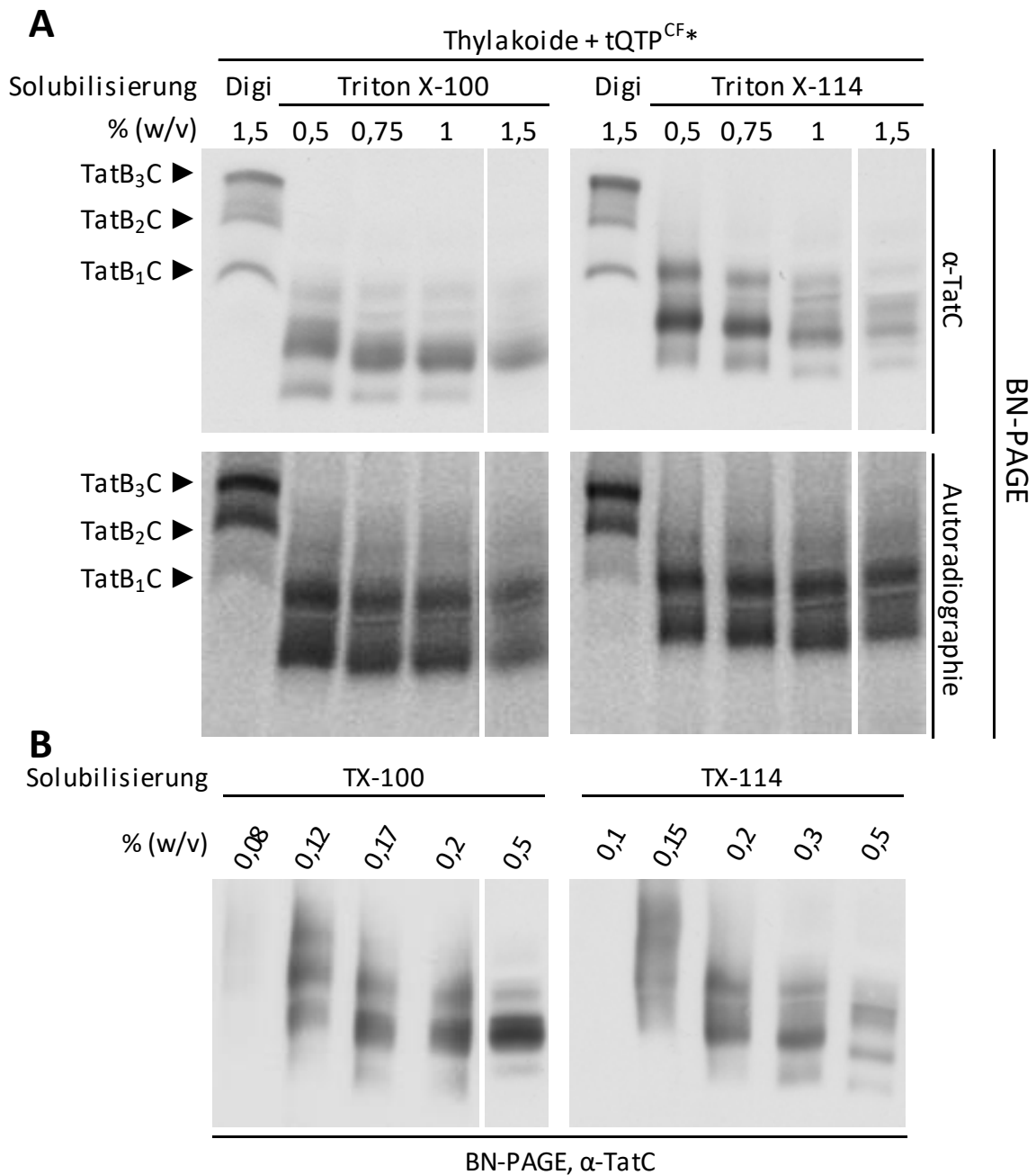
Die schrittweise Verringerung der Konzentration des eingesetzten Detergens führt, vermutlich durch eine Limitierung der Solubilisierung, zu weniger stark dissoziierten TatBC-Komplexen, die allerdings oftmals schlecht in der Elektrophorese aufgelöst werden (vgl. auch Arnold et al., 1998). Unterhalb von 0,12 % (w/v)

TX-100 bzw. 0,15 % (w/v) TX-114 findet keine Solubilisierung statt (Abb. E9 B).

Im Gegensatz zu DDM handelt es sich bei TX-100 und TX-114 um eher preisgünstige Stoffe (vgl. bspw. Hersteller Carl Roth, Karlsruhe). Aus diesem Grund wurden sie eingehender für die Möglichkeit der Präparation angereicherter TatBC-Komplexe bzw. TatC-Oligomere untersucht. Der Fokus lag dabei auf TX-114, da Lösungen dieses Detergens unter bestimmten Bedingungen eine Phasentrennung in eine detergensarme und eine angereicherte Fraktion zeigen, die zur Konzentrierung von TatC genutzt werden kann (siehe auch Anhang Abb. A10 und bspw. Everberg et al., 2006). Das Protokoll zur TatBC-Komplexanreicherung aus Abschnitt 4.6 wurde entsprechend für die Verwendung von TX-114 bzw. TX-100 modifiziert. Leider konnten trotz umfangreicher Optimierungen keine stabilen TatC-Oligomere gewonnen werden. Die Oligomere zerfielen im Laufe der Präparation stets - wahrscheinlich zu Monomeren (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren nahm im Laufe der Arbeit die Empfindlichkeit der BN-PAGE-basierten *Western Blotting*-Nachweismethode für TX-114- und TX-100-solubiliertes TatC drastisch ab (siehe hierzu außerdem Anhang Abschnitt 1 und besonders Abb. A3). Die Gründe hierfür sind unbekannt. Daher konnte letztlich auch die TatBC-Solubilisierung mit TX-100 und TX-114 nicht genutzt werden.



**Abbildung E8: Die Solubilisierung von Thylakoiden mit DDM erzeugt TatC-Oligomere.** Thylakoide wurden mit Digitonin oder DDM solubilisiert und per BN-PAGE und *Western Blotting* gegen TatC bzw. TatB analysiert.



**Abbildung E9: Thylakoidsolubilisierung mit TX-100 und TX-114 erzeugt konzentrationsabhängig vorrangig TatC-Oligomere.** Die Solubilisierung der Thylakoide mit TX-100 oder TX-114 wird anstatt für 1 h (vgl. Standardvorgehen in Methoden Abschnitt 3.3.6) für ca. 5 min durchgeführt. **A** Mit radioaktiv markiertem tQTP<sup>CF</sup> vorinkubierte Thylakoide wurden gewaschen, mit Digitonin, TX-100 oder TX-114 solubilisiert und per BN-PAGE mit folgendem *Western Blotting* gegen TatC bzw. TatB oder Autoradiographie analysiert. **B** Behandlung der TatBC-Komplexe mit Detergenismengen an der Grenzkonzentration der Solubilisierung. Nachweis mittels BN-PAGE und *Western Blotting* für TatC.

### 4.3.2 Ionische Detergenzien

Bestimmte ionische Detergenzien, die allgemein als weniger schonend gelten (Seddon et al., 2004), zeigten bei der Solubilisierung von thylakoidärem TatBC ungewöhnliche Effekte. Daher sind die dazugehörigen Experimente hier gezeigt.

#### 3-((3-Cholamidpropyl)-Dimethylammonium)-1-propansulfonat (CHAPS)

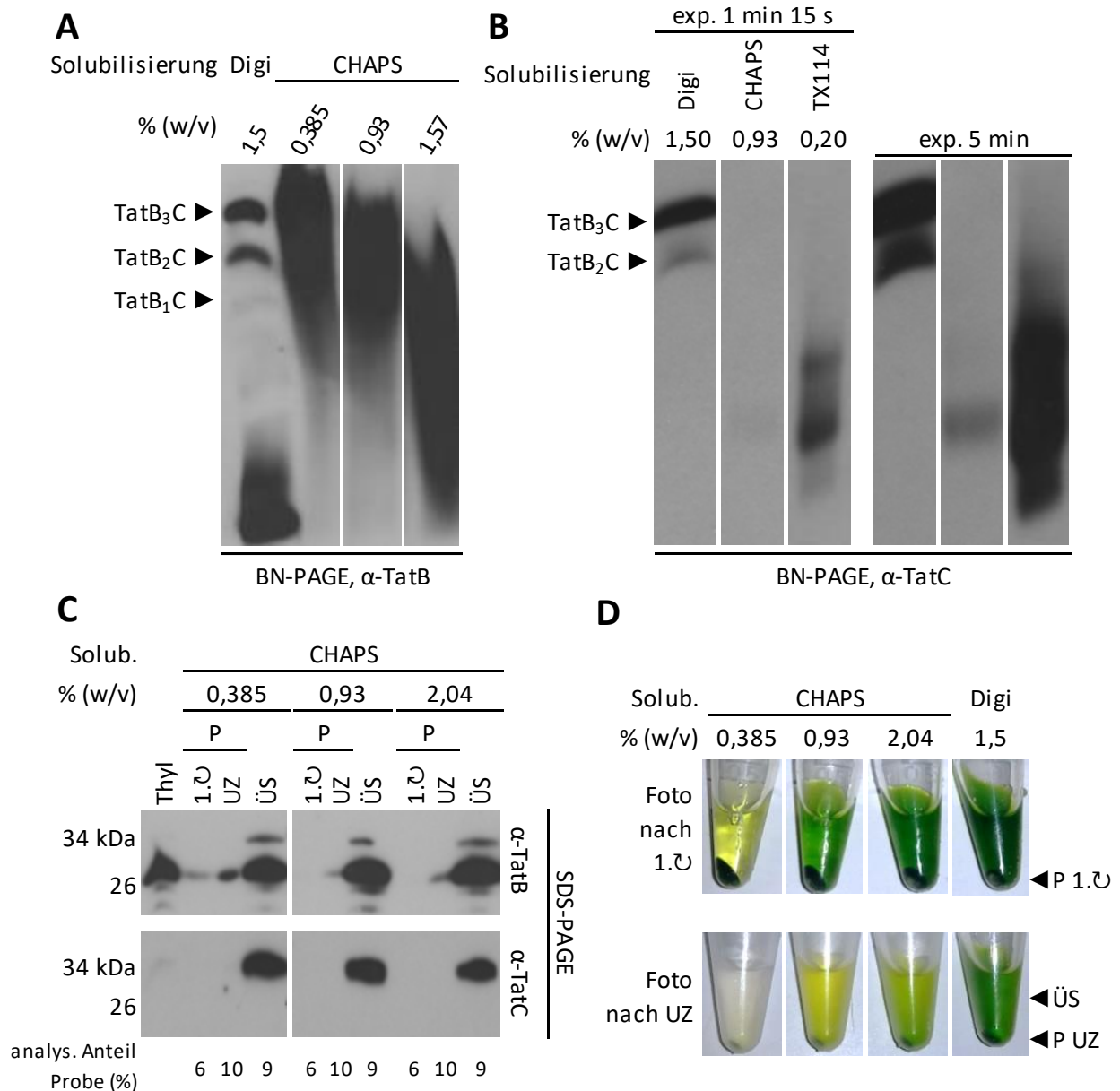
Das zwitterionische 3-((3-Cholamidpropyl)-Dimethylammonium)-1-propansulfonat (CHAPS) kann TatB und TatC aus Thylakoiden solubilisieren (Abb. E10 C). Die apparenten Molekulargewichte von TatB und TatC in der SDS-PAGE-Analyse bei der SDS-PAGE-Analyse entsprechen ca. 30 kDa und 33,3 kDa (siehe Material Abschnitt 2.10). Wie in der BN-PAGE-Analyse beim Vergleich mit TX-114-solubilierten Thylakoiden ersichtlich, entstehen bei der CHAPS-Solubilisierung ebenfalls TatC-Oligomere (Abb. E10 B, vgl. auch Anhang Abb. A3). Ihre Detektion wird allerdings durch geringe Signalstärken erschwert (siehe hierzu ebenfalls Anhang Abschnitt 1), was auch die weitere Nutzung dieses Detergens für die in Abschnitt 4.6 erklärte Komplexanreicherung ausschloss. TatB-spezifische Signale zeigen sich in der BN-PAGE-Analyse weit oberhalb davon (Abb. E10 A). Die Gründe hierfür sind unklar.

Bemerkenswert ist der Vergleich des Grades der Extraktion von TatC und TatB aus dem Thylakoidmaterial mit der Menge an gelöstem Chlorophyll. Letzteres kann nach persönlichen Erfahrungen bei der Solubilisierung mit Digitonin als Maß für den Grad der Auflösung der Thylakoidmembran genutzt werden. So ist auffällig, dass die Solubilisierung mit 0,385 % (w/v) CHAPS den größten Teil TatB und TatC extrahiert (Abb. E10 C), obwohl die Lösung farblos erscheint (Abb. E10 D, UZ).

#### Natrium-N-Dodecylsarcosinat (NaDDSar)

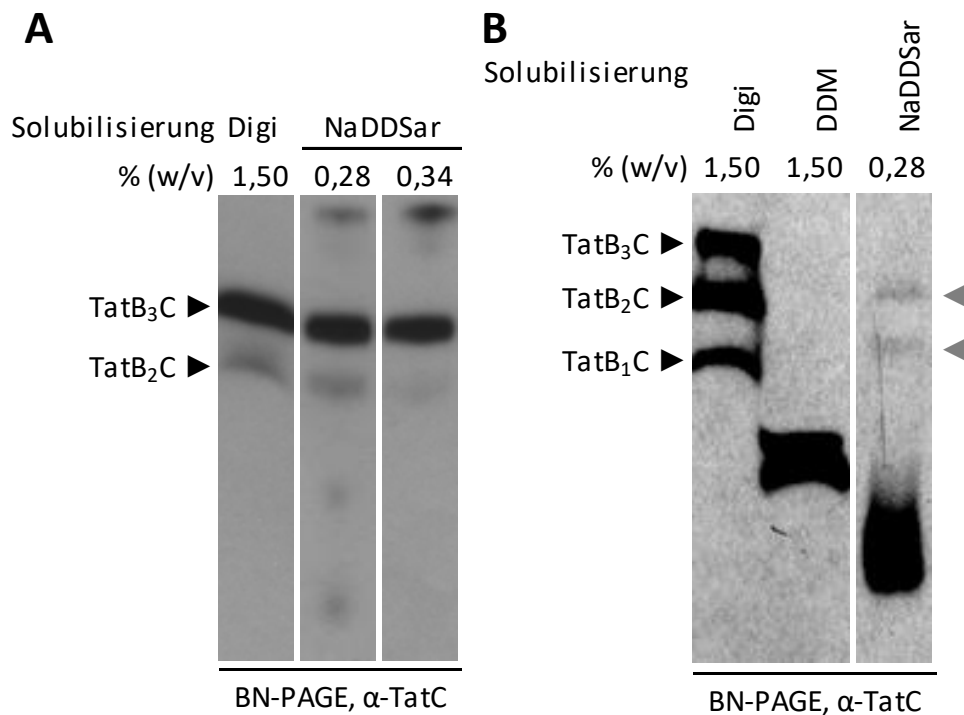
Nach einem Hinweis von Anne-Sophie Blümmel (AG Matthias Müller, Freiburg) eignet sich das anionische Detergens Natrium-N-Dodecylsarcosinat (auch -Lauroylsarcosinat; NaDDSar) für die Solubilisierung von TatBC-Komplexen aus *Escherichia coli*. Daher wurde diese Substanz in die Untersuchungen einbezogen. Die Solubilisierung von Thylakoiden mit ca. 0,3 % (w/v) NaDDSar kann anscheinend TatBC-Komplexe generieren, die in elektrophoretischem Laufverhalten und Signalmuster mit digitoninsolubilierten übereinstimmen (Abb. E11). Jedoch kann es, wie Abb. E11 B zeigt, aus bislang unbekanntem Gründen ebenso zu einer Auflösung der Komplexstruktur kommen, was sich in der Verschiebung der TatC-Signale noch unter die Position des mutmaßlichen TatC-Oligomers (vgl. Probe DDM) äußert. Dies deutet auf TatC-Monomere oder Oligomere niedriger Ordnung hin. Ein Versuch der TatBC-Komplexanreicherung (vgl. Abschnitt 4.6) auf Basis

von NaDDSAr führte zu demselben Ergebnis (Daten nicht gezeigt), so dass auch dieses Detergens keine Alternative zu Digitonin darstellte.



**Abbildung E10: CHAPS-Solubilisierung von thylakoidärem TatB und TatC.** **A** Verwendung unterschiedlicher CHAPS-Konzentrationen (oder Digitonin) zur Thylakoidsolubilisierung, *Western Blotting*-Nachweis von TatB nach BN-PAGE. **B** Zusätzliche vergleichende Analyse mit digitonin- und TX-114- solubiliertem thylakoidärem TatC. **C** SDS-PAGE (15 % PA) und *Western Blotting*-Nachweis von TatB und TatC bei der CHAPS-Solubilisierung von Thylakoiden. Analysiert wurden Proben vor der Solubilisierung (Thyl), das Sediment des ersten (P 1. UZ) und des zweiten (Ultra-) Zentrifugationsschrittes (P UZ, siehe hierzu Methoden Abschnitt 3.3.6), sowie der resultierende Überstand - die solubilierte Probe (ÜS). Der zur Analyse verwendete Anteil der Proben wurde aus den (genäherten) Verdünnungsfaktoren errechnet. **D** Fotografien von nach **C** reproduzierten Proben im Vergleich mit digitoninsolubilierten Proben. Die Probenbestandteile sind wie in **C** beschriftet.





**Abbildung E11: Solubilisierung von Thylakoiden mit NaDDSar erzeugt mutmaßlich intakte TatBC-Komplexe (A) oder führt zum Zerfall dieser (B).** Thylakoide wurden in zwei ähnlichen Versuchen mit NaDDSar, Digitonin oder DDM solubilisiert und per BN-PAGE und *Western Blotting* gegen TatC analysiert. Bei **B** konnten die NaDDSar-Komplexsignale ( $\blacktriangleleft$ ) denen der Digi sT-Kontrollprobe nicht zugeordnet werden, die NaDDSar-Spur wurde daher nicht nach oben oder unten verschoben, um sie der Digi-Spur anzupassen.

Die Solubilisierung thylakoidärer TatBC-Komplexe zeigt bei der Verwendung von vier der fünf zusätzlichen vorgestellten Detergenzien eine Präferenz zur Bildung von TatC-Oligomeren. NaDDSar ist grundsätzlich in der Lage intakte TatBC-Komplexe solubilisieren, die denen einer Digitoninsolubilisierung entsprechen. Allerdings zerfallen diese aus unbekanntem Grund auch häufig. Auch weitergehende, mit TX-114 analog zu den Versuchen in Abschnitt 4.6 durchgeführte Versuche zur Präparation angereicherter TatC-Oligomere führten zum Zerfall dieser. Daran zeigt sich, dass die Solubilisierung nicht dissoziierter TatBC-Komplexe eher die Ausnahme als die Regel ist, was erneut das Augenmerk auf die Natur der TatB-TatC-Interaktion legt. Für die beabsichtigte Anreicherung von TatBC-Komplexen oder TatC-Oligomeren wurde kein Detergens als Alternative zur Digitoninsolubilisierung gefunden. Daher wurden im folgenden Abschnitt 4.4 weitere Möglichkeiten zur Stabilisierung der digitoninsolubilierten Komplexe charakterisiert und im darauffolgenden Kapitel 4.5 mit Styrol-Maleinsäure-Copolymer eine Alternative zur detergensvermittelten Solubilisierung getestet.

## 4.4 TatBC-Komplexe werden durch Calciumionen oder Substratbindung stabilisiert

Bei der Suche nach Faktoren, die solubilisierete TatBC-Komplexe stabilisieren, gerieten Metallionen in den Interessenfokus. Dabei handelte es sich ursprünglich um einen Zufallsfund, der beim Waschen der Thylakoide mit unterschiedlichen Puffern gemacht wurde.

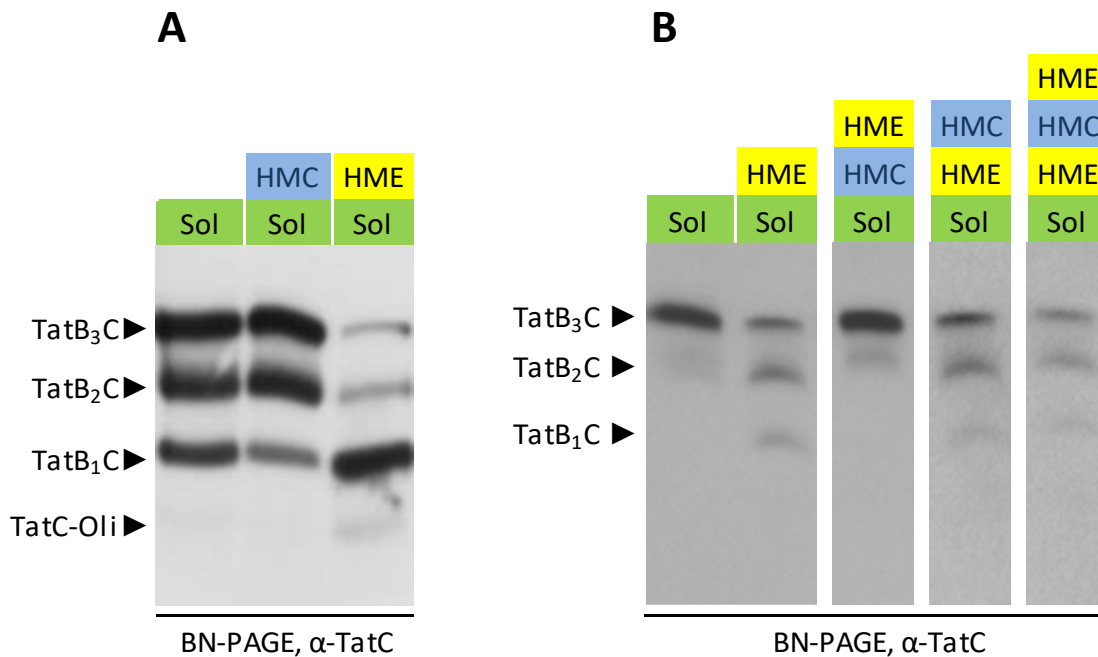
### 4.4.1 $\text{Ca}^{2+}$ hemmt die Dissoziation von solubilisierten TatBC-Komplexen, aber auch die Aktivität der Translokase

Zur Solubilisierung vorbereitete Thylakoide liegen in 10 mM HEPES und 5 mM  $\text{MgCl}_2$  (HM-Puffer) mit einem pH-Wert von 8,0 (eingestellt mit KOH) vor. Wäscht man intakte Thylakoide mit HM + 25 mM Calciumchlorid (HMC), zeigen sich in der BN-PAGE-Analyse im Vergleich zu HM-Puffer verstärkt die größeren TatBC-Komplexe. Eine Behandlung mit HM + 50 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure, Puffer HME) hat den gegenteiligen Effekt (Abb. E12 A). EDTA-haltiger Puffer scheint die TatBC-Komplexe demnach zu destabilisieren, während HM-Puffer allein zu einer mäßigen und  $\text{CaCl}_2$ -haltiger HM-Puffer zu einer stärkeren Stabilisierung der Komplexe führt.

Zu den Abbildungsbeschriftungen dieses Abschnitts: Da zahlreiche Behandlungsschritte in wechselnder Reihenfolge durchgeführt wurden, sind diese über der jeweiligen Probenspur chronologisch von oben nach unten genannt. Bspw. bedeutet „HME, HMC, Sol“ das Waschen von Thylakoiden mit HME-, dann HMC-Puffer und anschließender Solubilisierung.

Nun sollte festgestellt werden, ob die Effekte von HMC- und HME-Puffer auf denselben Sachverhalt, nämlich die Veränderung des Metallionenmilieus der Proben, zurückzuführen sind. Dazu wurden Thylakoide abwechselnd mit HMC- und HME-Puffer gewaschen (Abb. E12 B). Es zeigte sich, dass die Stabilität der TatBC-Komplexe nur durch den jeweils zuletzt verwendeten Puffer definiert wird. HMC- und HME-Puffer wirken also entgegengesetzt zueinander. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass der stabilitätsbestimmende Faktor das Vorhandensein von  $\text{Mg}^{2+}$ - oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ist, bzw. deren Fehlen, wenn sie durch EDTA komplexiert sind.

An diesem Punkt wäre es nachvollziehbar gewesen,  $\text{MgCl}_2$  aus HMC- und HME-Puffer auszuschließen. Zum einen handelt es sich bei HM-Puffer jedoch um den optimierten Standardpuffer für die Thylakoidpräparation, zum anderen liegen  $\text{CaCl}_2$  und EDTA in deutlichem Überschuss vor, so dass der Effekt der zusätzlichen  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen vernachlässigbar sein sollte.

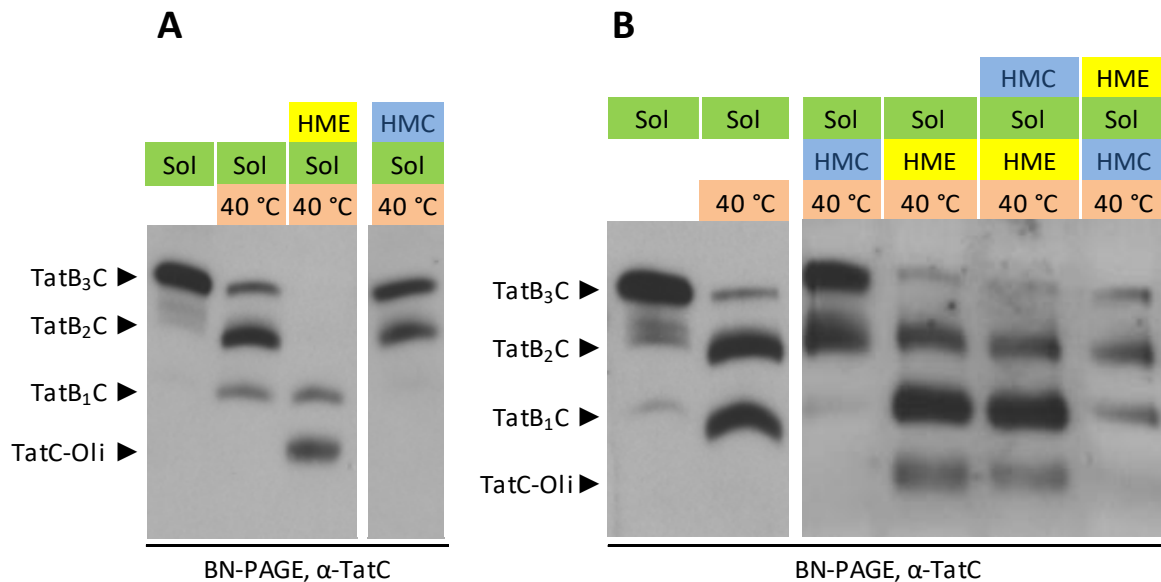


**Abbildung E12: TatBC-Komplexe werden durch Vorbehandlung mit  $\text{CaCl}_2$ - oder EDTA-haltigem Puffer bei der Digitoninsolubilisierung stabilisiert bzw. destabilisiert.** **A** Thylakoiden wurden vor der Digitoninsolubilisierung mit  $\text{CaCl}_2$ - (25 mM, „HMC“) oder EDTA-haltigem (50 mM, „HME“) HM-Puffer gewaschen (siehe Methoden Abschnitt 3.3.4). **B** wie A mit abwechselndem Waschen der Thylakoide mit HMC und HME. Analyse mit BN-PAGE und *Western Blotting* gegen TatC. Zur Beschriftung siehe Hinweis am Anfang des Kapitels.

Da sich in Abb. E12 nur ein geringer Unterschied zwischen den unbehandelten, also in HM-Puffer ohne Zusatz vorliegenden und HMC-behandelten Thylakoiden zeigt, wurden die Proben in einer Wiederholung des Versuches nach der Solubilisierung zusätzlich 10 min bei 40 °C inkubiert (Abb. E13 A). Durch die zusätzliche Wärmebehandlung zeigt sich der beschriebene (de)stabilisierende Effekt von HME- und HMC-Puffer differenzierter: Bei der Verwendung von HME-Puffer treten nun sogar TatC-Oligomere auf, während auch mit HMC-Puffer eine stärkere Dissoziation auftritt, sich die größten TatB<sub>3</sub>C-Komplexe aber noch immer zeigen. Die Verwendung von HM-Puffer führt zu einer intermediären Komplexdissoziation. Die Wärmebehandlung ist demnach ein Faktor, der die Komplexdissoziation zusätzlich fördert.

Zur Klärung der Frage, ob diese Effekte vor oder nach der Solubilisierung wirken, wurden in der folgenden Analyse Thylakoidproben behandelt, die bereits solubilisiert waren. Das Vorhandensein von 8 mM  $\text{CaCl}_2$  (durch Zugabe von HM+20 mM  $\text{CaCl}_2$ ) oder 24 mM EDTA (durch Zugabe von HM+60 mM EDTA) zu bereits solubilisierten TatBC-Komplexen führt grundsätzlich zu denselben Effekten wie bereits beschrieben (Abb. E13 B Spuren 3 und 4 im Vgl. zu A; zu den gewählten Konzentrationen siehe Methoden Abschnitt 3.3.4). Des Weiteren wird dem Effekt der HMC- oder HME-Behandlung intakter Thylakoide durch die Zugabe des jeweils anderen Puffers auch nach der Solubilisierung entgegengewirkt (Abb. E13 B Spuren 5 und 6). Diese Aufhebung erfolgt mit der

Zugabe von HME-Puffer nach der Solubilisierung vollständig, während HMC-Puffer anscheinend nur den bereits vorliegenden Dissoziationszustand der solubilisierten Komplexe konservieren kann. Das bedeutet außerdem, dass HMC-Puffer keine Re-Assoziation von bereits abgelöstem TatB hervorruft (Abb. E13 B Spur 6).



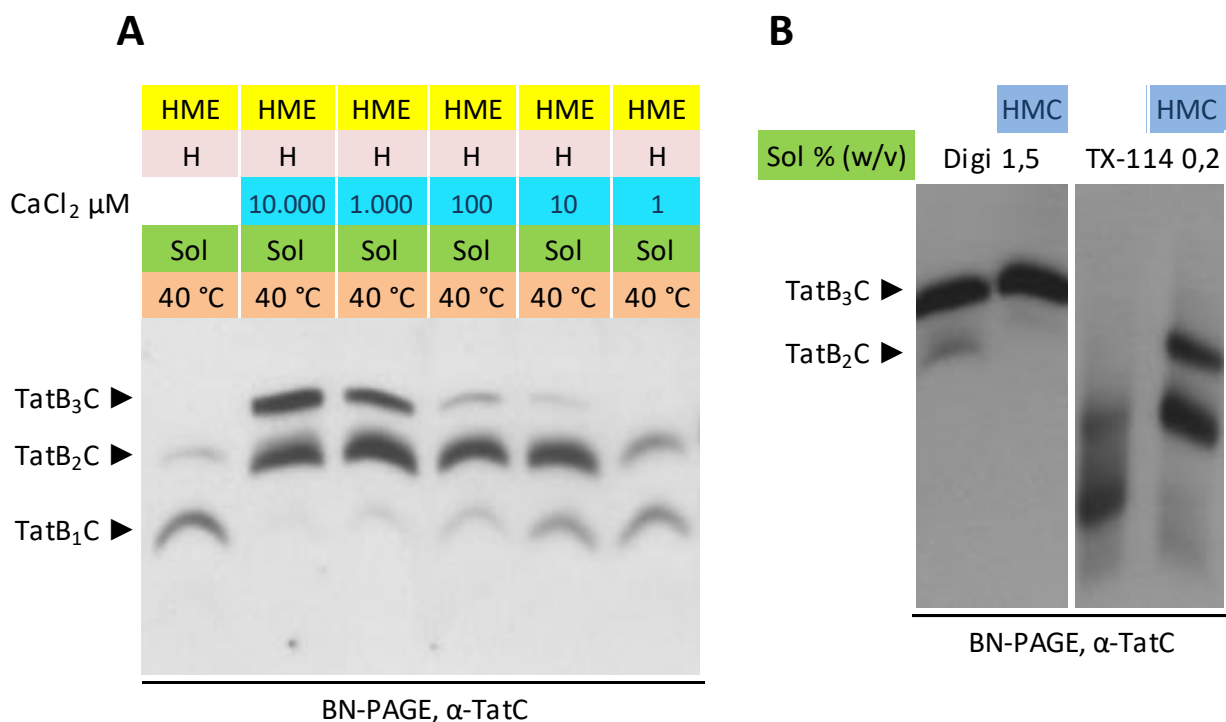
**Abbildung E13: CaCl<sub>2</sub>- und EDTA-haltiger Puffer wirken auch nach der Solubilisierung entgegengesetzt auf die Stabilität von TatBC-Komplexen.** **A** Eine Wärmebehandlung (40 °C, 10 min) nach der Solubilisierung führt zu einer differenzierteren Ausprägung der komplex(de)stabilisierenden Wirkung der HMC- oder HME-Puffer-Behandlung. Durchführung ansonsten wie in Abb. E12. **B** Behandlung von Thylakoiden mit CaCl<sub>2</sub>- oder EDTA-haltigem HM-Puffer vor bzw. nach der Solubilisierung mit Digitonin. Bei einer Behandlung vor der Solubilisierung wurden HM-Puffer mit 25 mM CaCl<sub>2</sub> (HMC) bzw. 50 mM EDTA (HME) verwendet, bei der Behandlung danach wurden Puffer mit 8 mM CaCl<sub>2</sub> bzw. 24 mM EDTA eingesetzt. Die Analyse erfolgte mit BN-PAGE und *Western Blotting* gegen TatC. Zur Beschriftung siehe Hinweis am Anfang des Kapitels.

Zur genaueren Charakterisierung des stabilisierenden Effektes wurde anschließend die Abhängigkeit der Komplexstabilität von der CaCl<sub>2</sub>-Konzentration untersucht. Um nach der Präparation an die Thylakoide gebundene Metallionen zu entfernen, wurden sie zunächst mit HME behandelt. Anschließend wurden die Thylakoide mit 10 mM HEPES-Puffer ohne Mg<sup>2+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ionen gewaschen, um Reste des EDTA zu entfernen. Schließlich wurden die Proben mit einer Konzentrationsreihe von 10 mM bis 1 µM und ohne CaCl<sub>2</sub> in 10 mM HEPES-Puffer inkubiert (Abb. E14 A). Für 10.000 und 1000 µM-CaCl<sub>2</sub> zeigte sich in etwa dieselbe Stabilität der TatBC-Komplexe, die mit jeder Verdünnungsstufe geringer wird, aber selbst für 1 µM noch höher ist als bei der Kontrolle ohne CaCl<sub>2</sub>.

Um zu prüfen, ob der stabilisierende Effekt spezifisch für Ca<sup>2+</sup> (und in gewissem Maße für Mg<sup>2+</sup>) ist, wurden auch Puffer mit SrCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub> in Experimenten analog zu Abb. E13 A und KCl analog zu Abb. E12 B eingesetzt (siehe Anhang Abb. A11). Alle Salze außer KCl konnten TatBC

ebenfalls stabilisieren. Daher scheinen bivalente Metallsalze generell einen stabilisierenden Effekt auf solubilisierte TatBC-Komplexe zu haben.

Um zu prüfen, ob der stabilisierende Effekt einer  $\text{CaCl}_2$ -Behandlung nur bei TatBC-Komplexen auftritt, die mit Digitonin solubilisiert wurden, wurde sie auch im Rahmen einer Solubilisierung mit TX-114 erprobt (Abb. E14 B). Dieses besitzt eine weit größere Tendenz zur Dissoziation von TatB als Digitonin (vgl. Abschnitt 4.3.1 „Triton X-100 und X-114“). Da auch hier deutlich mehr der größeren Komplexspezies auftreten, zeigt sich weiterhin, dass der stabilisierende Effekt nicht spezifisch für das verwendete Detergens ist.



**Abbildung E14: Charakterisierung des TatBC-stabilisierenden Effektes von  $\text{Ca}^{2+}$ .** **A** Einstellung eines definierten Milieus bivalenter Metallkationen in Thylakoidproben. Die Thylakoide wurden nach HME-Puffer (50 mM EDTA) mit HM-Puffer ohne  $\text{MgCl}_2$  gewaschen und mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösungen definierter Konzentration behandelt (vgl. Methoden Abschnitt 3.3.4). **B** analog zu Abb. E12 A mit  $\text{CaCl}_2$  behandelte Thylakoide wurden vergleichend mit Digitonin oder TX-114 solubilisiert. Analyse jeweils mit BN-PAGE und  $\alpha$ -TatC Western Blotting.

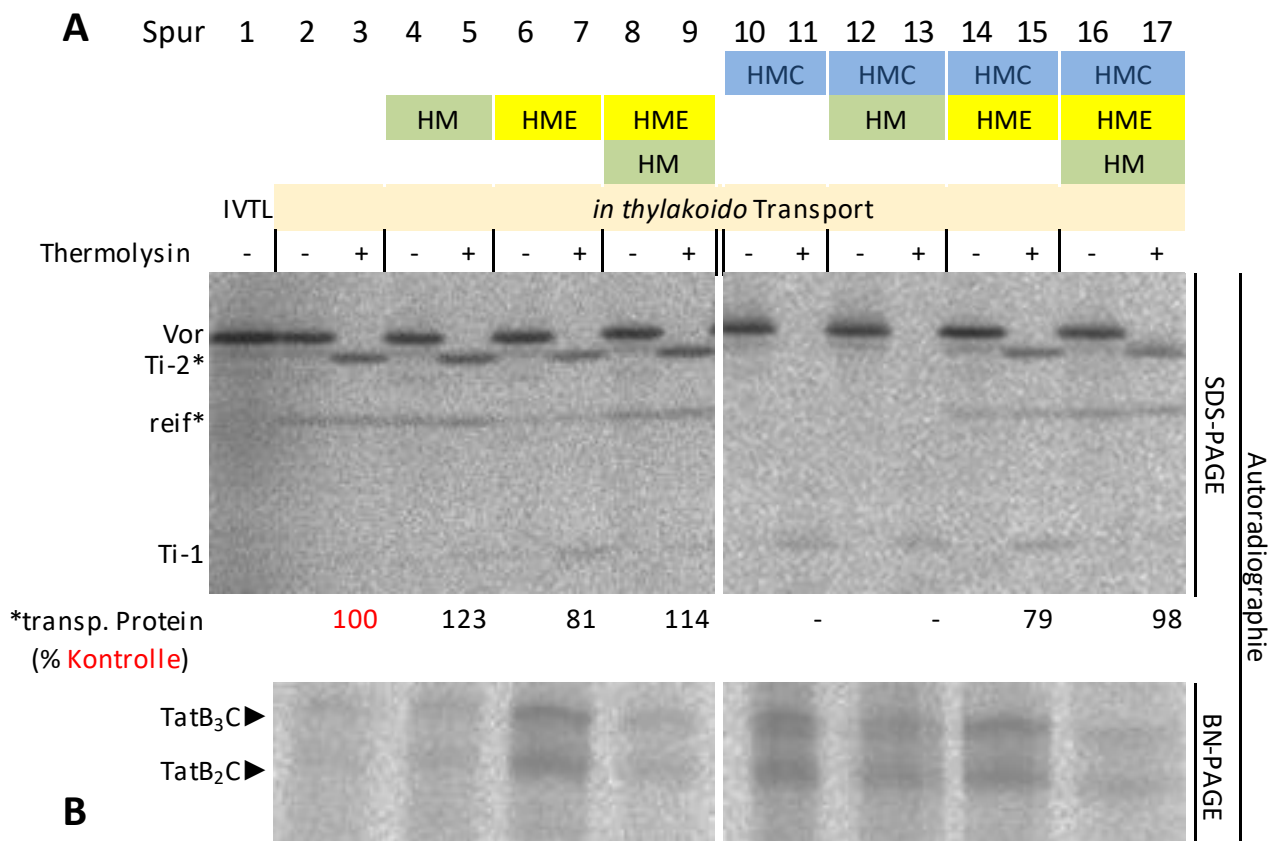
Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass der stabilisierende Effekt nicht spezifisch für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ist, sondern mit vielen bivalenten Metallkationen auftreten zu scheint, vermutlich nicht vom verwendeten Detergens abhängig ist und sich proportional zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verhält. Dies deutet darauf hin, dass es sich vermutlich um ein eher unspezifisches Phänomen und nicht um eine dedizierte Funktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen handelt.

Daher stellte sich die Frage, ob EDTA und  $\text{Ca}^{2+}$  nur die Stabilität der TatBC-Komplexe bei der Solubilisierung beeinflussen oder ob bspw. auch die Funktion der Tat-Translokase moduliert werden kann. *In vitro*-Transportexperimente mit isolierten Thylakoiden, sog. *in thylakoido*-Versuche, boten sich hier an, da sie zu den etablierten Standardmethoden der Arbeitsgruppe gehören. Die Versuche hierzu wurden von Jana Kungel und Sarah Zinecker durchgeführt.

Das Tat-Substrat 16/23 (Clausmeyer et al., 1993) wurde in radioaktiv markierter Form synthetisiert (siehe Methoden Abschnitt 3.4.9). Hierbei handelt es sich um ein gut erforschtes Modellprotein, einer Fusion aus dem Transitpeptid von PsbQ (enthält das Tat-Signalpeptid, vgl. Einleitung Abschnitt 1.2.1) und dem reifen Anteil von PsbP (auch bekannt als OEC16 bzw. OEC23, Untereinheiten des Wasserspaltungsapparates, weitere Details in Material Abschnitt 2.10 Abb. M3). Wird es mit Thylakoiden inkubiert, transportiert die Tat-Translokase es in das Lumen. Eine nachfolgende Behandlung der Proben mit der Protease Thermolysin führt zur Degradation aller zum Lösungsmittel exponierten Proteinanteile, was die Beurteilung des erfolgten Transportes vereinfacht.

16/23 besitzt die besondere Eigenschaft, dass die im Lumen erfolgende Spaltung durch die thylakoidäre Prozessierungspeptidase (vgl. Einleitung Abschnitt 1.2.1) nur langsam erfolgt (Berghöfer & Klösigen, 1999). Durch diese Geschwindigkeitslimitierung treten bei der eigentlichen Translokation zwei typische Membrantopologien, so genannte Translokationsintermediate (Ti), auf. Diese Intermediate führen bei der Thermolysinbehandlung zu charakteristischen Abbauprodukten. So lassen sich in der nachfolgenden SDS-PAGE- und autoradiographischen Analyse die Substratzustände Vorläuferprotein (Vor), Ti-1 (Membran- bzw. TatBC-Komplex-Bindung vor der Translokation), Ti-2 (nach der Translokation, vor der Prozessierung) und reif unterscheiden.

Für den Versuch wurden die Thylakoide vor der 16/23-Transportreaktion mit HM-Puffer, HM mit 5 mM  $\text{CaCl}_2$  (HMC) oder HM mit 10 mM EDTA (HME) gewaschen (Abb. E15 A). Zusätzlich zur abschließenden Thermolysinbehandlung wurden Anteile der proteaseunbehandelten Proben mit Digitonin solubilisiert und für eine BN-PAGE verwendet, um den Status der Bindung von 16/23 an TatBC zu analysieren (Abb. E15 B).



**Abbildung E15: Auswirkung von CaCl<sub>2</sub>- oder EDTA-Zugabe auf den thylakoidären Tat-Transport.** Frisch präparierte und ggf. mit HM, HMC (5 mM CaCl<sub>2</sub>) oder HME (10 mM EDTA) vorbehandelte Thylakoide wurden im Rahmen eines *in thylakoido*-Transportversuches für 5 min mit radioaktiv markiertem 16/23 inkubiert (siehe Methoden Abschnitt 3.3.7). Anschließend erfolgte eine Aufteilung der Proben: ohne Weiterbehandlung („Thermolysin -“, davon ein Teil zur Digitoninsolubilisierung) oder proteolytische Inkubation mit Thermolysin (+). **A** Analyse der unsolubilisierten Proben und des radioaktiv markierten 16/23 (IVTL) per SDS-PAGE (großes Gradientengel, siehe Methoden 3.4.4) und Autoradiographie. Die charakteristischen Signale Vorläufer (Vor), Ti-2, reifes Protein und Ti-1 sind beschriftet (siehe Text). Die Signale des transportierten Proteins (jeweils bei „Thermolysin +“) wurden quantifiziert, nach der Anzahl radioaktiv markierter Methionine des Proteins gewichtet und summiert (Ti-2\*0,5 + reif\*1, siehe auch Material Abschnitt 2.10 Abb. M3). Die Zahlwerte sind als Anteil des unbeeinflussten Transports (rot) dargestellt. **B** Analyse der digitoninsolubilisierten Proben mit BN-PAGE und Autoradiographie zum Nachweis des an die TatBC-Komplexe gebundenen 16/23.

Das Waschen der präparierten Thylakoide mit HM-Puffer (Spur 5) führt aus unbekanntem Gründen zu einer Erhöhung der Transportrate. Wäscht man mit HME-Puffer ist im Vergleich zum unbeeinflussten Transport eine moderate Abnahme translozierten Proteins (Spur 7, Ti-2 und reif) zu beobachten. Außerdem wird das Tat-Substrat anscheinend im TatBC-Komplex-gebundenen Zustand retardiert (BN-PAGE und Zunahme Ti-1). Die Zugabe von HM-Puffer nach einer HME-Behandlung führt im Sinne der Wiederherstellung des Metallionenmilieus zu einer ähnlich hohen Transportrate wie nach HM-Behandlung (Spur 9).

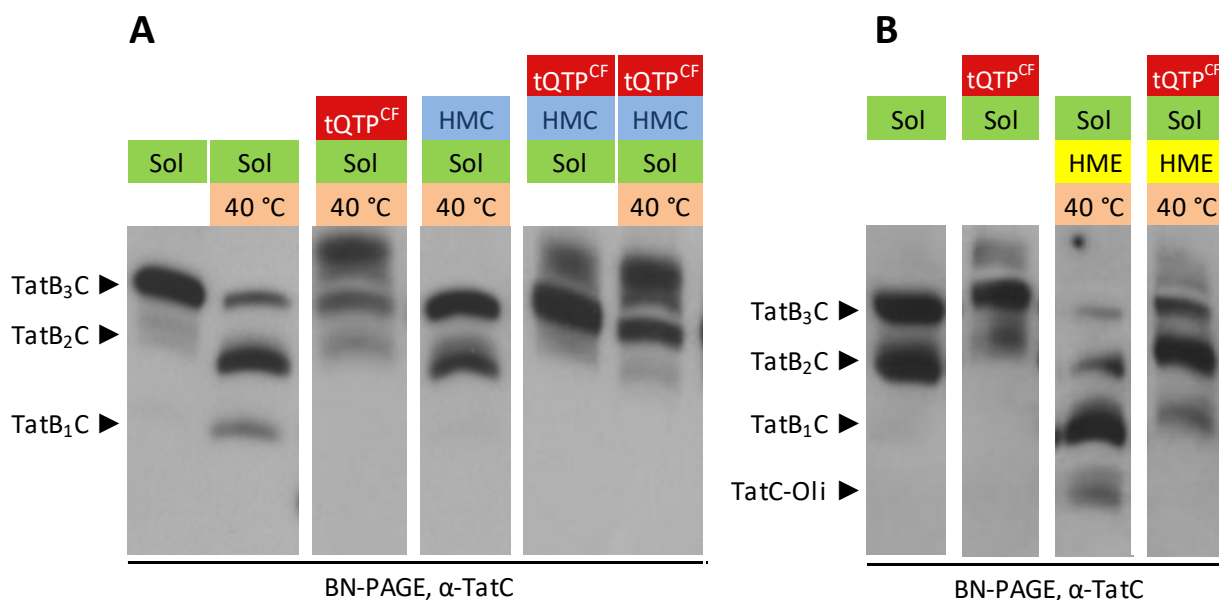
Die Inkubation der Thylakoide mit HMC-Puffer führt interessanterweise zu einer vollständigen

Inhibierung der Translokation (dem Fehlen von reifem Protein und Ti-2, Spur 11) und ebenfalls dem vermehrten Auftreten von Ti-1, sowie einer erhöhten Bindung an TatBC-Komplexe. Erfolgte nach der HMC-Behandlung eine Zugabe von HM änderte sich dieses Bild nicht (Spur 13). Vermutlich konnten die  $Mg^{2+}$ -Ionen die  $Ca^{2+}$ -Ionen nicht verdrängen und die Transportinhibierung nicht aufheben. EDTA ist allerdings in der Lage, die Calciumionen zu entfernen, so dass eine HME-Behandlung nach dem Waschen mit HMC zu einer Rekonstitution des Transportes auf das Niveau der bloßen HME-Behandlung führt (Spur 15). Wie zuvor führt auch hier eine Zugabe von HM- nach dem HME-Puffer zur vollständigen Wiederherstellung des Transportes (Spur 17).

Die Tatsache, dass  $CaCl_2$ -haltiger Puffer den Tat-vermittelten Transport vollständig und reversibel inhibiert ist eine überraschende Beobachtung, die bislang noch nicht beschrieben wurde.

#### 4.4.2 Die Bindung von $tQTP^{CF}$ stabilisiert solubilisierte TatBC-Komplexe

Im Rahmen der Entwicklung der Komplexanreicherung (folgt bei Abschnitt 4.6) ergaben sich zusätzliche Daten, die darauf hinweisen, dass auch die Bindung des rekombinant synthetisierten Signalpeptid-Derivats  $tQTP^{CF}$  die Stabilität der TatBC-Komplexe beeinflussen könnte (siehe Abb. E21). Zur weiteren Charakterisierung wurde die  $tQTP^{CF}$ -Behandlung von Thylakoiden im Folgenden mit HMC- und HME-Behandlung verglichen oder kombiniert (Abb. E16).



**Abbildung E16: Charakterisierung der Stabilisierung von TatBC-Komplexen durch  $tQTP^{CF}$  im Vergleich mit der  $Ca^{2+}$ -/EDTA-Behandlung.** Es wurden verschiedene Kombinationen der Behandlung von Thylakoiden mit HMC- und HME-Puffer oder  $tQTP^{CF}$  durchgeführt. **A** Kombination HMC-Puffer und  $tQTP^{CF}$ . **B**: Kombination HME-Puffer und  $tQTP^{CF}$ . Die Analyse nach der Solubilisierung mit Digitonin erfolgte jeweils mit BN-PAGE und *Western Blotting* gegen TatC.



Die tQTP<sup>CF</sup>-Behandlung zeigt einen ähnlich stabilisierenden Effekt wie HMC-Puffer (Abb. E16 A) und kann dem destabilisierenden Einfluss von HME-Puffer ebenfalls entgegenwirken (Abb. E16 B). Des Weiteren zeigt sich mit tQTP<sup>CF</sup> bei einem geringen Grad der Dissoziation ein weniger fokussiertes Signal noch über dem TatBC<sub>3</sub>-Komplex, das bislang nicht zu erklären ist (siehe hierzu Diskussion Abschnitt 5.3.5).

Die Erkenntnisse zur Stabilisierung von TatBC-Komplexen während der Digitoninsolubilisierung durch rekombinant erzeugtes tQTP<sup>CF</sup> waren ein positiver Nebeneffekt, der bei der geplanten Komplexanreicherung mit diesem Protein half. Da die Komplexanreicherung allerdings mit immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie durchgeführt wurde, konnten keine CaCl<sub>2</sub>-haltigen-Puffer zur TatBC-Stabilisierung verwendet werden. Die Ca<sup>2+</sup>-Ionen würden mit den Ni<sup>2+</sup>-Ionen der Affinitätsmatrix um die Bindung an den immobilisierenden Nitrilotriessigsäurerest und den His<sub>6</sub>-tag-des tQTP<sup>CF</sup> konkurrieren und könnten so die Effizienz der Komplexanreicherung erheblich reduzieren (vgl. Methoden Abschnitt 3.4.2.2).

Aus diesem Grund, und weil für die detergensvermittelte Solubilisierung keine Alternative zu Digitonin gefunden wurde, sollte im Folgenden zusätzlich eine Solubilisierungsprozedur ohne Detergenzien untersucht werden.

#### 4.5 Die Interaktion von TatBC-Komplexen mit Styrol-Maleinsäure-Copolymer (SMA)-Varianten führt zur Dissoziation von TatB

Die am weitesten verbreitete Methode Membranproteine (und -komplexe) zu solubilisieren, ist die Verwendung von Detergenzien (siehe bspw. Duquesne & Sturgis, 2009; Dörr et al., 2016). Es existiert jedoch eine Reihe weiterer solubilisierender Stoffe, die zwar ebenfalls eine amphipathische Natur aufweisen, Detergenzien strukturell aber nur wenig ähneln. Hierzu gehören unter anderem amphipathische Polymere. Bestimmte Vertreter dieser Polymere sind besonders interessant, da sie wie Detergenzien in der Lage sind, Membranen spontan zu solubilisieren. In dieser recht jungen Gruppe finden sich bspw. Styrol-Maleinsäure-Copolymer (SMA, Knowles et al., 2009) und Di-Isobutylene-Maleinsäure-Copolymer (Oluwole et al., 2017). Es handelt sich um lineare Polymere, die Styrol- oder Di-Isobutylene Reste (hydrophober Charakter) und Maleinsäurereste (hydrophil) tragen. Vermutlich richten sich die Reste bei Interaktion an hydrophob-hydrophil-Phasengrenzen so aus, dass sich ein amphipathischer Charakter parallel zum Polymerrückgrat ausbildet. Durch die Fähigkeit, in Membranen einzudringen, können diese Stoffe so kreisförmige Bereiche (sog. *nanodiscs*) extrahieren, die die authentische Membranzusammensetzung beinhalten (Jamshad et al., 2015). Die Ränder der *Nanodiscs* sind vom Polymer eingefasst und so

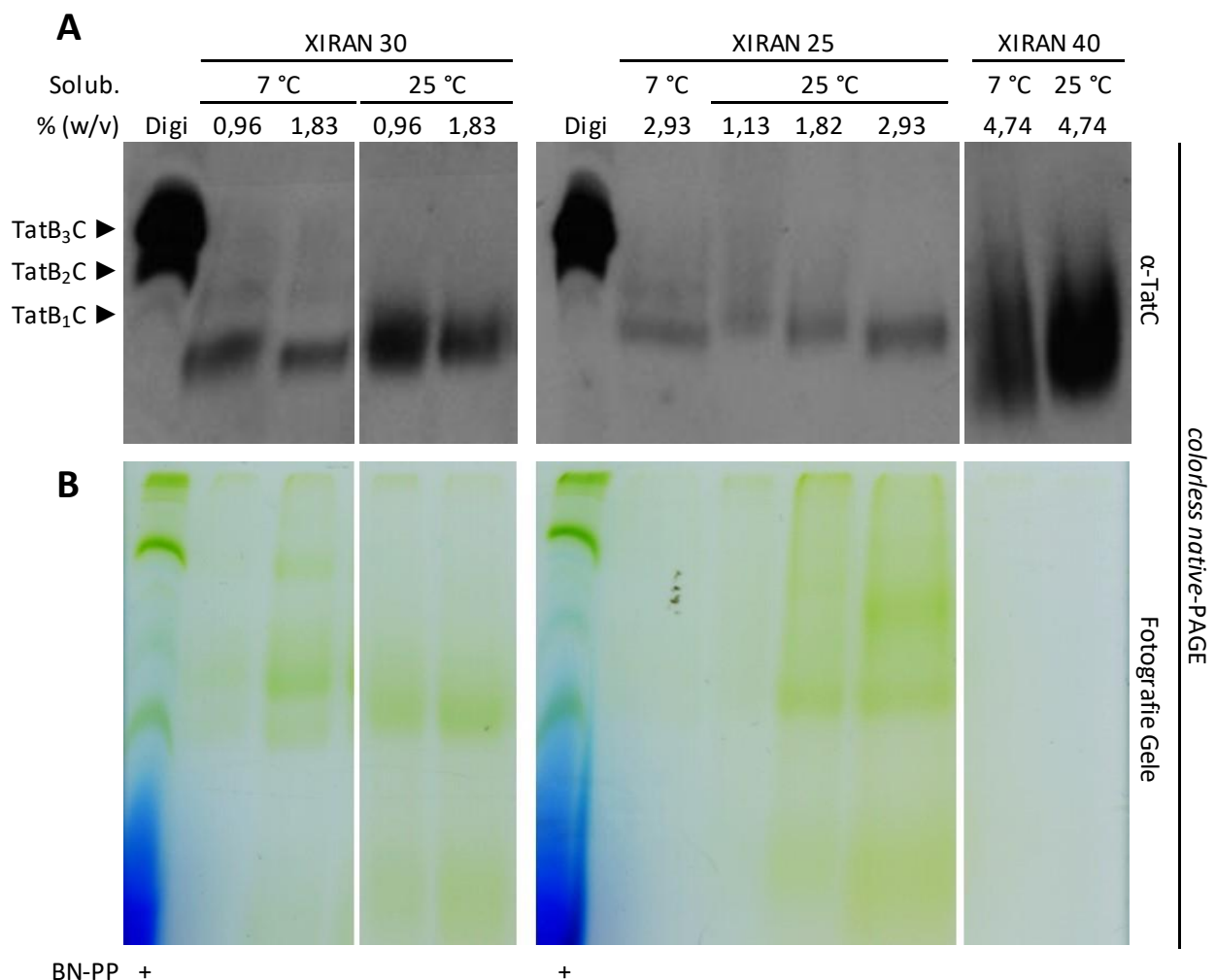
in wässriger Lösung stabil. Befinden sich Proteine oder -komplexe im betreffenden Bereich, so sind diese quasi solubilisiert. Dies wird im Allgemeinen als schonender und den ursprünglichen Zustand besser erhaltend beschrieben als die detergensvermittelte Solubilisierung (bspw. Bell et al., 2015; Brady et al., 2019 sowie *Reviews* von Dörr et al., 2016 und Esmaili & Overduin, 2018).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche zur Interaktion von SMA und thylakoidärem TatBC durchgeführt. Von der Firma polyscope (Geleen, Niederlande) wurden drei Präparationen (hier abgekürzt als XIRAN 25, 30 und 40) bezogen, die sich in Kettenlänge und Maleinsäure-Styrol-Verhältnis unterscheiden (siehe Material Abschnitt 2.1.1).

Es wurde zunächst getestet, ob die SMA-Präparationen in der Lage sind, TatBC aus Thylakoidmembranen zu solubilisieren und besser als die bisherigen Methoden vor Dissoziation zu schützen (Abb. E17). Da die zahlreichen Maleinsäurereste des Polymers den *nanodiscs* eine negative Gesamtladung verleihen, migrieren diese auch ohne die Zugabe von Coomassie-Brillantblau G250 in einer nicht-denaturierenden Elektrophorese (vgl. Abschnitt 4.1 und siehe Korotych et al., 2019 und Pollock et al., 2019), die zur Analyse der Proben durchgeführt wurde. Digitoninsolubilierte Proben können, unter mäßigem Verlust der Trennqualität, auch für eine solche sog. *Colorless Native*-PAGE (CN-PAGE) verwendet werden, wenn sie im Vorfeld mit Coomassie inkubiert werden (Daten der Vortests nicht gezeigt, siehe Abbildung E17 B). Des Weiteren ist die SMA-Solubilisierung bei geringeren Temperaturen gehemmt (siehe Proben XIRAN 30 und 40 und Kopf et al., 2020). Da die Komplexdissoziation andererseits bei erhöhter Temperatur gefördert wird, wurde die Solubilisierung vergleichend bei 7 und 25 °C durchgeführt. Die verwendeten SMA-Konzentrationen wurden in Vortests anhand der Grünfärbung der solubilierten Proben ermittelt. Dabei wurde angenommen, dass die Solubilisierung der chlorophyllhaltigen Proteinkomplexe mit der TatBC-Solubilisierung korreliert. Aus demselben Grund wurden bei dem in Abb. E17 gezeigten Versuch nur Proben analysiert, die eine sichtbare Grünfärbung besaßen. Da im Gegensatz zu XIRAN 25 und 30 alle Proben mit XIRAN 40 farblos waren, wurde stattdessen die Probe mit der höchsten verwendeten XIRAN 40-Konzentration analysiert.

Grundsätzlich scheint die Solubilisierung TatC-enthaltender Komplexe durch SMA möglich zu sein, da sich bei allen Proben Signale für TatC-enthaltende Komplexe zeigen (Abb. E17 A). Im Vergleich zu Digi sT sind die Signale in SMA-Proben jedoch zum einen schwächer, was an unzureichender methodischer Erfahrung mit der langsameren SMA-Solubilisierung liegen kann, zum anderen unfokussierter, was auch auf die chlorophylltragenden Proteinkomplexe in Abb. E17 B zutrifft. Die

geringere elektrophoretische Fokussiertheit in der CN-PAGE zeigte sich für die Solubilisierung von Thylakoiden mit einer anderen SMA-Variante auch in den Daten von Korotych et al. (2019). Auffällig ist weiterhin, dass die XIRAN 40-Proben die chlorophyllhaltigen Proteinkomplexe kaum zu enthalten scheinen, während die TatC-Signale unter den SMA-Varianten hier am stärksten sind. Dies deckt sich mit der Beobachtung von Korotych et al. (2019), dass die SMA-Varianten X25 und X30 beträchtliche Mengen an Gesamtprotein aus der Thylakoidmembran extrahieren, während dies für X40 wesentlich geringer ausfällt. Die Solubilisierung von Tat-Komplexen durch die SMA-Variante X40 scheint also in gewisser Weise eine Ausnahme darzustellen.

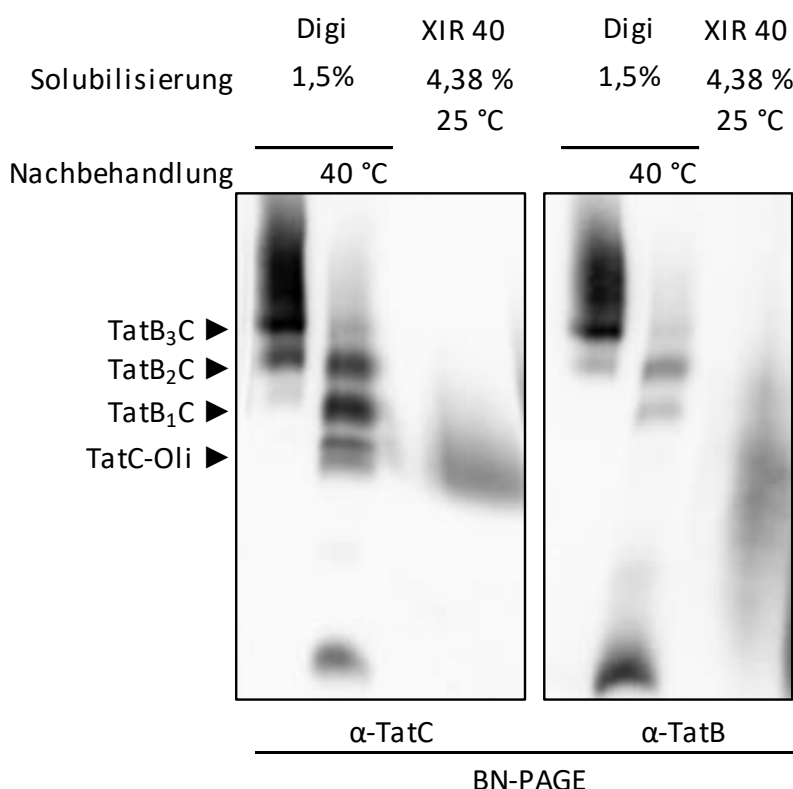


**Abbildung E17: Solubilisierung von Thylakoidmembranproteinen mit SMA.** Thylakoide wurden 30 min bei der angegebenen Temperatur mit XIRAN 25, 30 oder 40 solubilisiert. Die Digitoninsolubilisierung erfolgte nach Standardbedingungen. Alle Proben waren aus methodischen Gründen anschließend ca. 5 min Raumtemperatur ausgesetzt. Sie wurden mittels *Colorless Native*-PAGE analysiert (siehe Methoden Abschnitt 3.4.4.2). Die Referenzproben Digi sT wurden jedoch zuvor mit coomassiehaltigem BN-PAGE-Probenpuffer (BN-PP) versetzt. Gezeigt sind **A** die *Western Blotting*-Detektion von TatC bzw. **B** Fotografien der Gele nach der Elektrophorese.

Die interessanteste Beobachtung ist aber, dass die stärksten Signale aller SMA-Proben ungefähr bei der Höhe zu finden sind, bei der auch TatC-Oligomere liegen (vgl. auch Abb. E18). Hierbei kann es sich um einen Zufall handeln, da sich, wie beschrieben, die Eigenschaften von SMA-*nanodiscs* und somit vermutlich auch das Laufverhalten erheblich von Digitoninmizellen unterscheiden. Allerdings zeigen bei 7 °C mit XIRAN 25 und 30 erzeugte Proben oberhalb des stärksten Signals zusätzliche schwache, die an das bekannte Stufenmuster der TatBC-Komplexdissoziation erinnern könnten.

Da mit XIRAN 40, der hydrophilsten (Styrol:Maleinsäure-Verhältnis 1,4:1) und kurzkettigsten (ca. 5 kDa) SMA-Variante, anscheinend die effizienteste Extraktion von TatC und eine Abtrennung von chlorophyllhaltigen Proteinen möglich war, wurde die Solubilisierung mit diesem Stoff weiter charakterisiert.

Bei einer Wiederholung der Solubilisierung mit XIRAN 40 und Analyse mit BN-PAGE wurde zusätzlich die Detektion von TatB durchgeführt und durch Wärmebehandlung dissoziierte TatBC-Komplexe in Digi sT (vgl. Abschnitt 4.2) als Kontrolle mitgeführt (Abb. E18). Erneut trat für XIRAN 40 ein TatC-Komplex ungefähr auf Höhe des TatC-Oligomers auf, wie sich im Vergleich mit der Kontrollprobe wärmebehandelter Digi sT zeigt. Die TatB-Detektion zeigt für die XIRAN 40-Probe außerdem ein deutlich unfokussierteres Signal, was darauf hinweist, dass TatC- und TatB-enthaltende Proteine bzw. -komplexe nicht komigrieren. All dies stärkt die Vermutung, dass die XIRAN 40-Solubilisierung zu TatC-Oligomeren führt.



**Abbildung E18: BN-PAGE-Nachweis von TatB und TatC bei Solubilisierung thylakoidärer TatBC-Komplexe mit XIRAN 40.** Thylakoide wurden mit XIRAN (XIR) 40 (ca. 1 h, Raumtemperatur) oder Digitonin solubilisiert. Ein Teil der Digi sT wurde zusätzlich 10 min mit 40 °C behandelt. Die Proben wurden einer BN-PAGE- und Western Blotting-Analyse zum Nachweis von TatC oder TatB unterzogen.

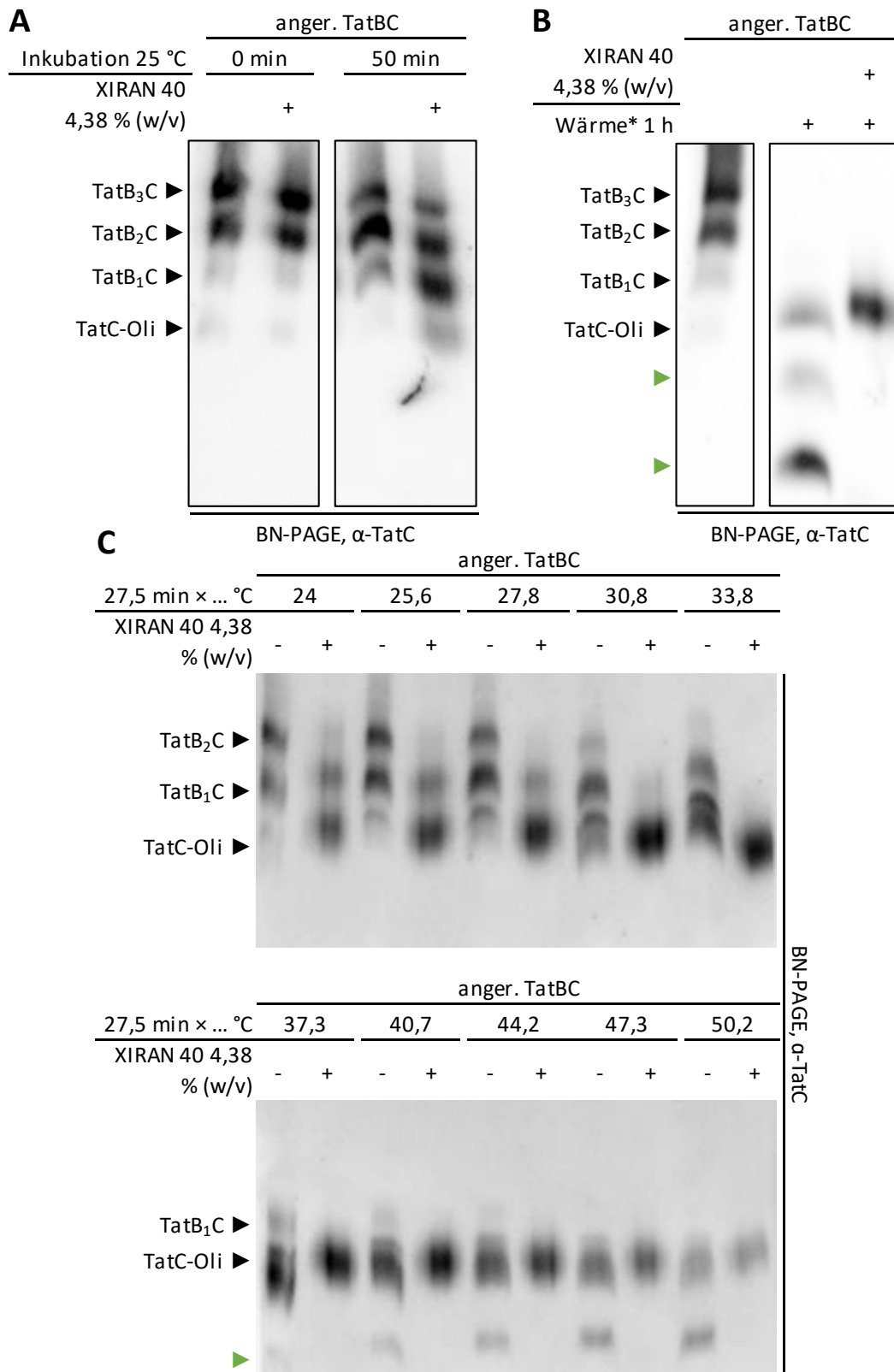
Wenn die Solubilisierung von TatBC-Komplexen mit SMA tatsächlich zu einer Komplexdissoziation mit Verlust von TatB führt, wäre es möglich, dass es diesen Vorgang auch bei Zugabe zu bereits digitoninsolubilisierten Komplexen fördern könnte. In Abb. E19 sind drei Experimente hierzu dargestellt. Es wurden mithilfe des Proteins tQTP<sup>CF</sup> und Affinitätschromatographie angereicherte TatBC-Komplexe verwendet (siehe Abschnitt 4.6). Diese digitoninbasierten Proben wurden mit 4,38 % (w/v) XIRAN 40 und definierter Temperatur sowie Dauer inkubiert. Anscheinend kann SMA auch auf bereits solubilierte TatBC-Komplexe wirken. Bei einer Behandlung mit 25 °C für 50 min scheint die Komplexdissoziation durch den Zusatz von XIRAN 40 tatsächlich verstärkt zu sein (Abb. E19 A). Bei Abb. E19 B wurden die Proben 1 h in einem Schüttler inkubiert, der sie durch unerwartet hohe Abwärme weit über Raumtemperatur erwärmte. Dies führte bei der Kontrollprobe ohne SMA zu einem bislang noch nicht beobachteten Maß an Komplexdissoziation, bei der anscheinend selbst TatC-Oligomere zerfielen (grüne Pfeile). Das Vorhandensein von SMA schien dies allerdings zu verhindern, die TatC-Oligomere blieben intakt.

Im folgenden Experiment wurde versucht, beide Phänomene gleichzeitig zu betrachten (Abb. E19 C). Für 27,5 min wurde ein Temperaturgradient von 24 bis 50,2 °C zur Behandlung einer Reihe identischer Proben eingesetzt. Anzumerken ist, dass die angereicherten Komplexe in diesem Fall schon teilweise dissoziiert vorlagen. Unabhängig davon fördert die Zugabe von SMA die Dissoziation von TatB, denn die kleineren Komplexspezies traten bereits bei geringeren Temperaturen auf als bei den Kontrollproben. Während es ab 37,3 °C in den Proben ohne XIRAN 40 aber zusätzlich zu einem Zerfallen der TatC-Oligomere (grüner Pfeil) kommt, scheint die SMA-Variante dies zu verhindern.

Die generelle Verringerung der Signalstärke bei hohen Temperaturen könnte ein TatC-spezifisches Problem sein, das den in Anhang Abschnitt 1 beschriebenen Schwierigkeiten beim *Western Blotting*-Nachweis ähnelt.

Die Hypothese, dass SMA-solubilierte Tat-Komplexe stabiler als digitoninsolubilierte sind, trifft nur auf TatC-Oligomere und nicht auf TatBC-Komplexe zu. Interessant ist die Frage, weshalb die Bildung von SMA-*nanodiscs* mit TatBC-Komplexen zum zügigen Verlust von TatB führt, während dies für Digitoninmizellen nur deutlich langsamer der Fall ist.

Auch die Daten für die Solubilisierung mit SMA-Varianten weisen nicht auf eine höhere Stabilität von TatBC-Komplexen hin. Zu dem bereits erwähnten Protokoll zur TatBC-Komplexanreicherung basierend auf Digitonin konnte demzufolge keine Alternative entwickelt werden. Im Folgenden wird daher detailliert auf die digitoninbasierte Komplexanreicherung eingegangen.



**Abbildung E19: Förderung der TatBC-Komplexdissoziation aber Schutz des TatC-Oligomers durch XIRAN 40.** Angereicherte (anger.) TatBC-Komplexe (d. h. ohne monomeres TatB) wurden geteilt und ein Teil mit XIRAN 40 versetzt. Alle Proben wurden verschiedenen Wärmebehandlungen unterzogen. Die Analyse erfolgte jeweils mit BN-PAGE und *Western Blotting* gegen TatC. **A** Inkubation 50 min bei 25 °C. **B** Inkubation 1 h bei Raumtemperatur auf einem Probenschüttler, der unerwartet viel Abwärme (Wärme\*) an die Proben übertrug. **C** Inkubation 27,5 min mit 24 - 50,2 °C in einem PCR-cycler. ▶ bezeichnet mutmaßliche Zerfallsprodukte des TatC-Oligomers.

## 4.6 Anreicherung und Isolierung thylakoidärer TatBC-Komplexe

### 4.6.1 Das Konzept der TatBC-Komplexanreicherung

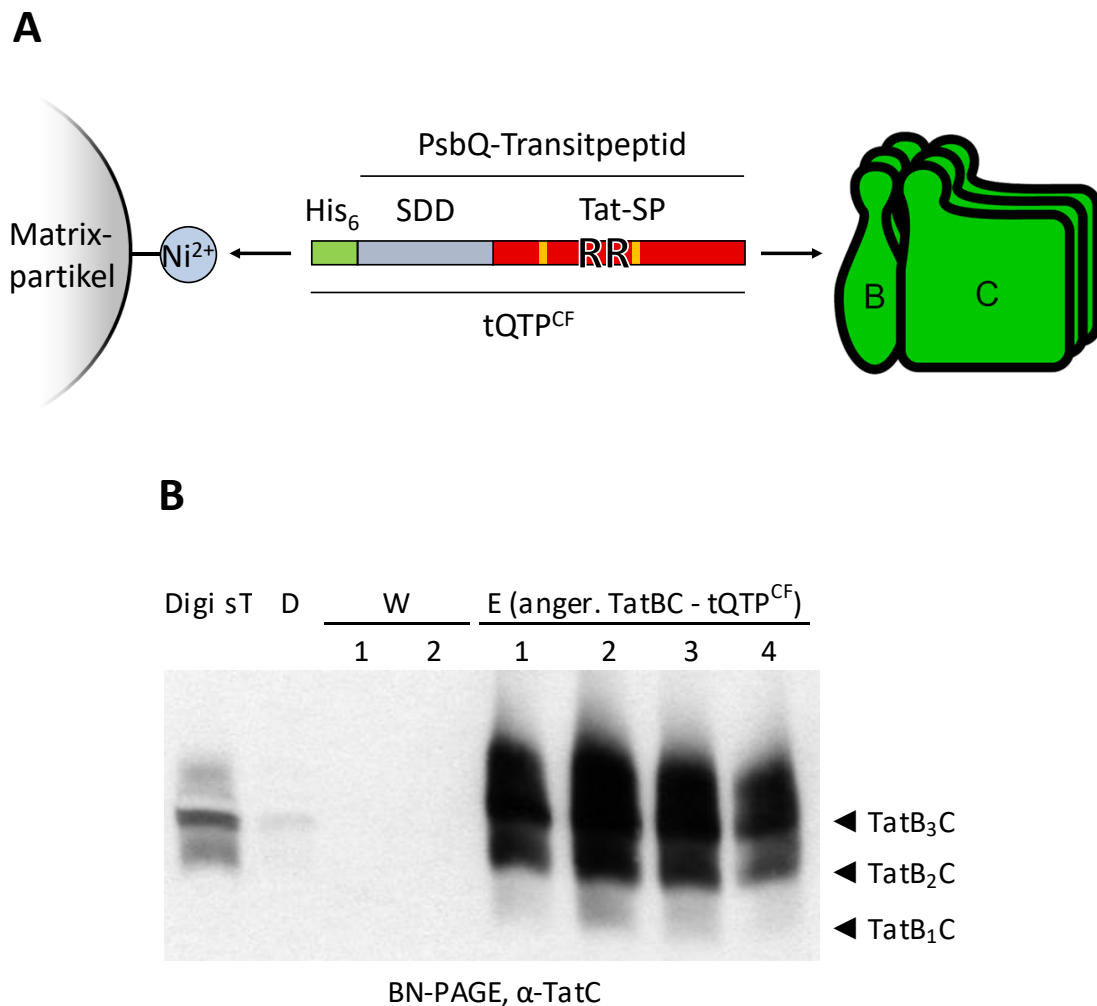
Die Anreicherung von TatBC-Komplexen und die Isolierung vom Rest der Proteine der Digi sT-Proben sollte Präparationen ausreichender Reinheit und Konzentration für Folgeversuche liefern. Langfristiges Ziel dabei war die Rekonstitution in künstliche Membransysteme bis hin zur Erzeugung vollständig funktioneller Tat-Translokasen (siehe dazu Abschnitt 4.7).

Die Komplexanreicherung nutzt die Fähigkeit der TatBC-Komplexe, Tat-Signalpeptide zu binden (vgl. Einleitung Abschnitt 1.5.3). Im Gegensatz zur Interaktion mit bspw. Antikörpern kommen hierfür nur funktionelle Komplexe in Frage. Ergänzt man ein Tat-Signalpeptid um einen geeigneten Affinitäts-*tag*, ermöglicht es die indirekte Bindung von TatBC-Komplexen an eine Affinitätsmatrix (vgl. Abb. E20 A). Entscheidend ist auch die Tatsache, dass einmal gebundene Substrate anscheinend im Maßstab von 10 min an solubilisierten TatBC-Komplexen verbleiben können (Wojnowska et al., 2018).

Für das verwendete Protein tQTP<sup>CF</sup> (*tag*-PsbQ-Transitpeptid S54C M64F, siehe Material Abschnitt 2.10 Abb. M1) trifft dies vermutlich in besonderem Maße zu (siehe Diskussion Abschnitt 5.3.2 und Abb. E4). Hierbei handelt es sich um das Transitpeptid (stromadirigierende Domäne und Tat-Signalpeptid) der 16 kDa Untereinheit (PsbQ bzw. OEC16) des Wasserspaltungsapparates aus Spinat (vgl. Material Abschnitt 2.10 Abb. M3). Es trägt die Aminosäureaustausche S54C und M64F, welche die Bindung an die TatBC-Komplexe verbessern sollen (siehe dazu Abb. E21 A). An dieses Transitpeptid ist amino- (N-)terminal eine *tag*-Region fusioniert. Dazu ist zu beachten, dass die Funktion von Signalpeptiden auch mit N-terminalen Anhängseln möglich ist (Fincher et al., 1998; Klösgen et al., 1992). Die *tag*-Region enthält unter anderem eine His<sub>6</sub>-Domäne, die für eine immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) genutzt werden kann. tQTP<sup>CF</sup> kann durch heterologe Synthese in *E. coli* mit anschließenden Aufarbeitungsschritten gewonnen werden (vgl. Methoden Abschnitte 3.2.4, 3.4.1 und 3.4.2.1).

Vermittelt durch den Tat-Signalpeptid-Anteil bindet tQTP<sup>CF</sup> spezifisch an die in der Thylakoidmembran vorliegenden TatBC-Rezeptorkomplexe. Hierfür werden isolierte Thylakoide mit dem Protein inkubiert. Eine Kühlung mit Eis verhindert den effizienten Transport (Daten der AG Klösgen und Celedon & Cline, 2012), wodurch die Bindung stabilisiert werden soll. Es folgt die Solubilisierung mit Digitonin (siehe Abschnitt 4.1 und Methoden Abschnitt 3.3.6), um die Probe anschließend für IMAC einzusetzen. Vermittelt durch die His<sub>6</sub>-Domäne des tQTP<sup>CF</sup> werden die TatBC-Komplexe an der Affinitätsmatrix zurückgehalten und sind nach zwei Waschschritten in den vier aufeinanderfolgenden Elutionsfraktionen (identische Pufferzusammensetzung) nachweisbar

(Abb. E20 B). Im Vergleich zur Ausgangsprobe Digi sT zeigt sich eine deutliche Anreicherung der TatBC-Komplexe. Weiterführende Optimierungen im folgenden Abschnitt zeigen auch eine Abtrennung unerwünschter thylakoidärer Proteine (Abb. 22). Die gewonnenen Proben werden als angereicherte TatBC-Komplexe bezeichnet.



**Abbildung E20: Anreicherung thylakoidärer TatBC-Komplexe mittels tQTP<sup>CF</sup>.**

**A** Illustration des Prinzips. Der His-Affinitäts-tag (His<sub>6</sub>) von tQTP<sup>CF</sup> vermittelt die Bindung an eine Ni<sup>2+</sup>-Affinitätsmatrix und der Tat-Signalpeptid-Anteil (Tat-SP) an TatBC-Komplexe. Das Tat-SP und die stromadirigierende Domäne (SDD) bilden das sog. Transitpeptid von PsbQ- (OEC16). Die Aminosäureaustausche S54C und M64F sind orange angedeutet. **B** Thylakoide wurden mit tQTP<sup>CF</sup> inkubiert, digitoninsolubilisiert (sT) und für eine Komplexanreicherung eingesetzt. Analysiert wurden gleiche Volumina der sT-Probe vor und nach Durchfließen der IMAC-Säule (D - Durchfluss), der folgenden Waschschrte (W1, 2) und der Elutionsfraktionen (E1 - 4, identischer Puffer, aber aufgeteilt, da die IMAC-Säule nur ein kleines Volumen fasst). Die Elutionsfraktionen enthalten die angereicherten Komplexe.



#### 4.6.2 Entwicklung eines Protokolls für die effiziente TatBC-Komplexanreicherung

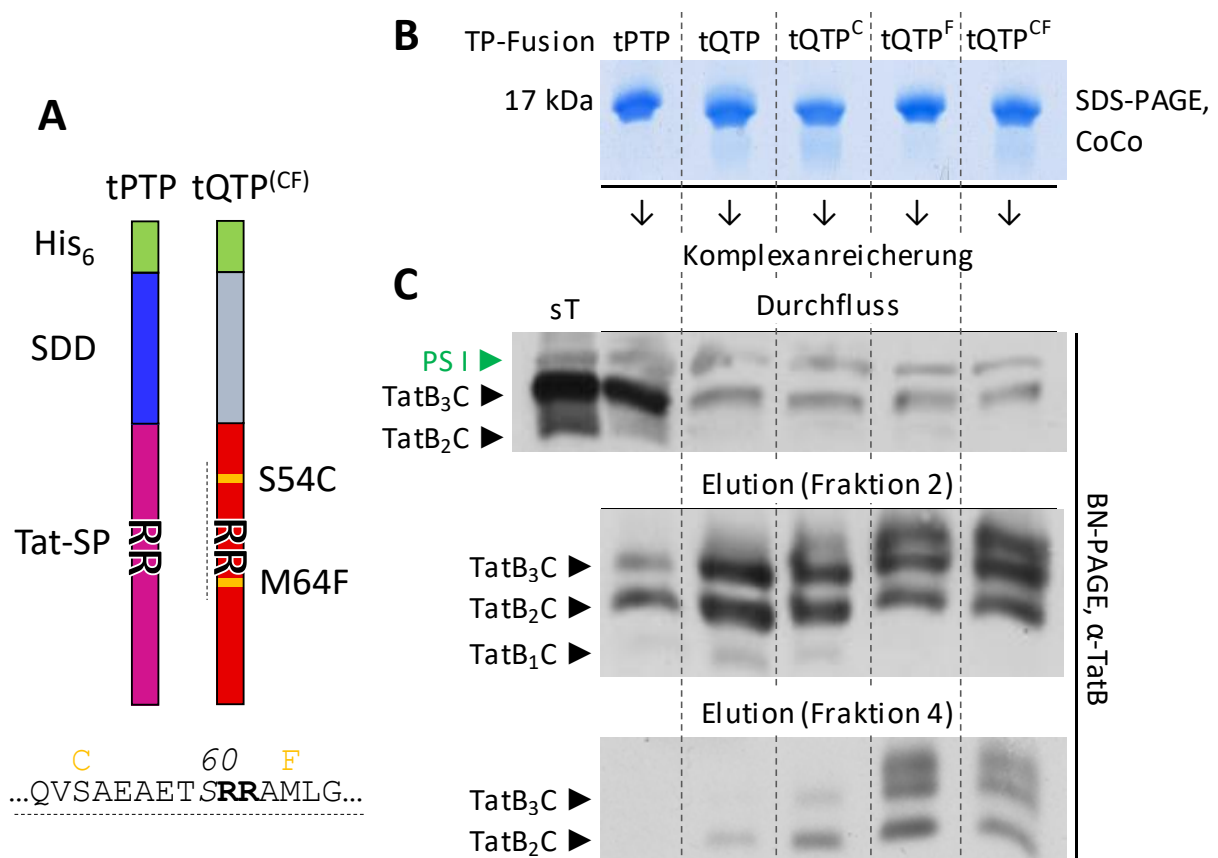
Die ersten Versuche zur Komplexanreicherung wurden mit dem Protein tPTP durchgeführt, das sich vom Tat-Substrat PsbP (23 kDa Untereinheit des Wasserspaltungsapparates, Spinat) ableitet. Da hiermit nur ein Teil der in einer Digi sT-Probe enthaltenen TatBC-Komplexe extrahiert werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurden zusätzlich das Protein tQTP und Aminosäureaustausch-Derivate davon erstellt und auf ihre Eignung für die Komplexbewinnung getestet (Abb. E21 A). Diese Varianten sollten eine stärkere Bindung an TatBC vermitteln (S54C folgte Daten der Arbeitsgruppe Klösgen, M64F wurde aus Gérard & Cline (2007) entnommen; siehe außerdem Diskussion Abschnitt 5.3.2).

Um die Ergebnisse der Komplexanreicherung mit den verschiedenen Signalpeptid-Derivaten vergleichen zu können, wurden diese vor der Inkubation mit präparierten Thylakoiden auf gleiche Konzentrationen eingestellt: Die Fusionsproteine und eine Lysozym-Verdünnungsreihe wurden dafür mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Colloidal-Färbung sichtbar gemacht (Daten nicht gezeigt). Mithilfe des Programms Fiji (Schindelin et al., 2012) wurden die Proteinbanden des gescannten Gels quantifiziert. Durch lineare Regression wurde aus den bekannten Konzentrationswerten und der Bandenintensität der Lysozym-Verdünnungsreihe eine Formel ermittelt, mit der die Konzentration der Signalpeptid-Derivate ermittelt werden konnte (siehe Methoden Abschnitt 3.6.1). Diese wurden im Anschluss durch Verdünnen einheitlich auf 200 µg/ml eingestellt und zur Kontrolle nochmals mit SDS-PAGE analysiert (siehe Abb. E21 B). Hiermit wurden Thylakoide inkubiert, die anschließend solubilisiert und für IMAC verwendet wurden (Abb. E21 B; Details siehe Methoden Abschnitte 3.3.5, 3.3.6 und 3.4.2.2).

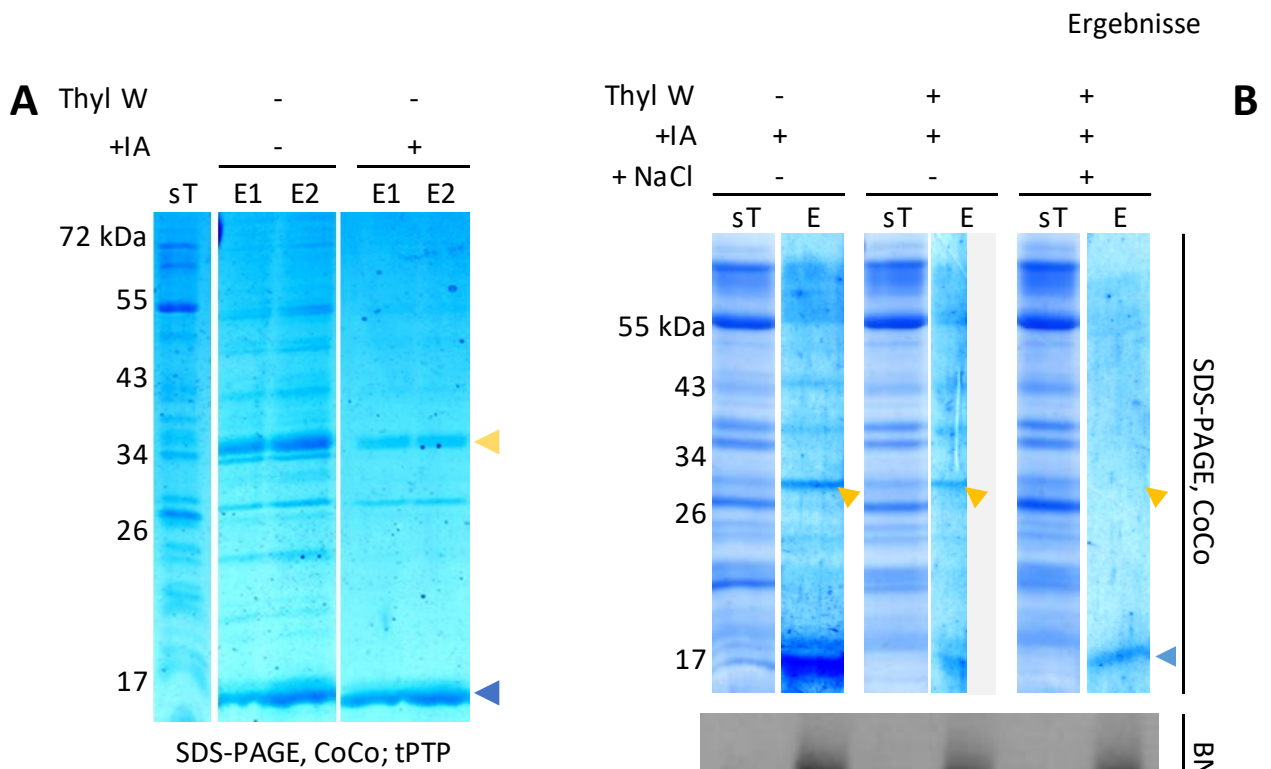
Der Vergleich der unbehandelten Digi sT (als Kontrollprobe) mit den Durchflussproben (nach Passieren der Affinitätsmatrix) zeigt, dass tPTP die verfügbaren TatBC-Komplexe nur mäßig an der Matrix immobilisierte. Die vier von tQTP abgeleiteten Konstrukte ermöglichen eine beinahe vollständige Extraktion. Der Elutionspuffer wurde in vier gleichen Schritten appliziert, wovon jeweils Fraktion zwei (Hauptmenge eluierter Komplexe) und vier (Restmenge) analysiert wurden. tPTP-Proben enthalten weniger TatBC als jene mit tQTP-Varianten. Die Aminosäureaustausche S54C und M64F bringen allein und kombiniert gegenüber tQTP nur eine geringe Steigerung der Ausbeute (vgl. Elution 4). Die TatBC-Komplexe werden von den tQTP-Derivaten jedoch in geringem Maß (S54C) bzw. mäßig (M64F) gegen Dissoziation stabilisiert. Auch das Auftreten eines bislang nicht charakterisierten zusätzlichen Signals oberhalb des TatBC<sub>3</sub>-Komplexes könnte ein Hinweis auf eine noch größere und instabilere TatBC-Komplexspezies sein, die diese Interpretation stützen würde (vergleiche auch Abschnitt 4.4.2 und siehe Diskussion Abschnitt 5.3.5 für ausführliche

Diskussion). Da S54C außerdem den einzigen Cysteinylrest in tQTP einführt, der z. B. für *crosslinking*-Analysen genutzt werden könnte, wurde die tQTP-Variante mit beiden Veränderungen (tQTP<sup>CF</sup>) weiterverwendet.

Nachdem die Effizienz der Komplexanreicherung optimiert wurde, sollte durch die Anpassung der IMAC-Parameter auch die Reinheit der angereicherten TatBC-Komplexe gesteigert werden. Zunächst wurde der Zusatz von 20 mM Imidazol (bis zu 50 mM möglich, Daten nicht gezeigt) zu den Binde- und Waschschritten des IMAC-Protokolls getestet (Abb. E22 A, Experimente allerdings mit tPTP durchgeführt).



**Abbildung E21: Vergleich der Eignung unterschiedlicher Signalpeptid-Derivate für die Komplexanreicherung.** **A** Schema der verwendeten Proteine. Dargestellt ist das Transitpeptid bestehend aus stromadirigierender Domäne (SDD) und Tat-Signalpeptid (Tat-SP) von PsbP- (OEC23) bzw. PsbQ- (OEC16) mit *N*-terminalen His<sub>6</sub>-tags (tPTP bzw. tQTP). Letzteres ist unverändert oder mit den Aminosäureaustauschen S54C und/oder M64F (tQTP<sup>CF</sup>). Die unterschiedlichen Proteinvarianten wurden für eine Komplexanreicherung vorbereitet und auf eine einheitliche Konzentration eingestellt (siehe Text). **B** SDS-PAGE-Analyse (15%) dieser Proben der Signalpeptid-Derivate nach Coomassie-Colloidal- (CoCo) Färbung. Die Proteinvarianten wurden für je eine Komplexanreicherung verwendet: **C** Vergleich der jeweiligen Durchflussprobe mit digitoninsolubilisierten Thylakoiden (Digi sT). Weiterhin sind Elutionsfraktion 2 und 4 repräsentativ für das Maximum und das Ende des Elutionsverlaufs dargestellt. Photosystem I zeigt in der sT- und den Durchflussproben eine Kreuzreaktion mit α-TatB (►). Siehe auch Abb. 20B.

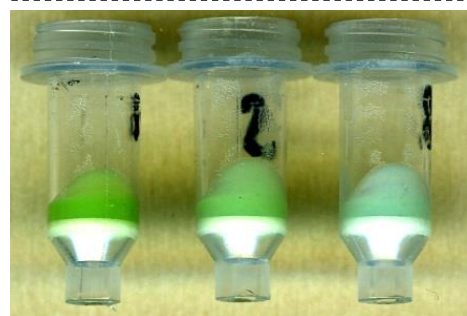
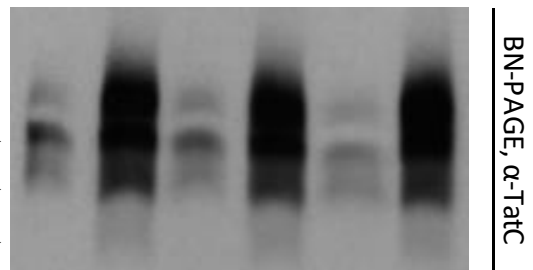


**Abbildung E22: Erhöhung der Reinheit angereicherter TatBC-Komplexe.** Es wurden verschiedene Modifizierungen der Komplexanreicherung getestet. **A** Die Inkubation erfolgte mit tPTP anstelle des sonst verwendeten tQTP<sup>CF</sup>. Überschüssiges tPTP wurde danach *nicht* durch Waschen der Thylakoide entfernt (Thyl W "-"; vgl. Teil B). Der solubilisierten Probe und den nachfolgenden Waschschr...

itten der IMAC wurden im Vergleich zum Kontrollansatz (- IA) 20 mM Imidazol zugesetzt (+ IA). Die Analyse eluierter Proben und Digi sT erfolgte mit CoCo-Färbung nach SDS-PAGE (großes Gradientengel, siehe Methoden 3.4.4). **B** Auswirkung des Waschens der Thylakoide nach Inkubation mit tQTP<sup>CF</sup> (Thyl W) und der Zugabe von 500 mM NaCl zu Digi sT und den Waschschr...

itten der IMAC erfolgte für alle Ansätze. Analyse der eluierten Proben und der dazugehörigen Digi sT mittels SDS-PAGE und CoCo-Färbung wie in **A**. Die Spur der 2. Probe „E“ wurde halb abgedeckt, da sie z. T. durch die Nachbarprobe überlagert war. Die Analyse erfolgte außerdem mit BN-PAGE und *Western Blotting* mit  $\alpha$ -TatC, sowie Fotografie der IMAC-Säulen unmittelbar vor der Elution. Für die SDS-PAGEs sind jeweils links die Molekulargewichte des *PageRuler Prestained Protein Ladder*-Größenstandards notiert.

TatB<sub>3</sub>C ▶  
TatB<sub>2</sub>C ▶  
TatB<sub>1</sub>C ▶



Fotografie IMAC-Säulen vor Elution tQTP<sup>CF</sup>

Analog wurde die Zugabe von 500 mM NaCl (Abb. E22 B) sowie das Waschen der Thylakoide nach der Inkubation mit tQTP<sup>CF</sup> untersucht. Die Reinheit der Proben wurde über die Zahl und Intensität mit Coomassie färbbarer Proteinbanden in einer SDS-PAGE-Analyse beurteilt. Alle drei Modifikationen führen zur Verringerung der Bandenzahl und -intensität und damit zu einer geringeren Kontamination durch andere thylakoidäre Proteine (siehe repräsentative gelb

markierte Bande). Zu beachten ist, dass TatB und TatC vermutlich in so geringer Menge vorliegen, dass sie mit der Coomassie-Färbung nach Elektrophorese hier nicht detektierbar sind (vgl. aber Abb. 23 B). Auch die Menge an chlorophyllhaltigen Proteinen, die nach den Waschschrritten sichtbar an der Affinitätsmatrix gebunden sind, ist mit den Modifikationen verringert (Abb. E22 B, Foto IMAC-Säulen). Die TatBC-Komplexe selbst sind davon unbeeinflusst. Anzumerken ist auch, dass bei der Komplexanreicherung ebenfalls monomeres freies TatB abgetrennt wird (siehe Abb. E6).

Weitere Faktoren, die die Reinheit erhöhen können, sind die Verwendung gleichbleibend hoher Konzentrationen von Digitonin (1,5 % Digitonin bei der Solubilisierung und bei allen Schritten der IMAC; Daten zu Versuchen mit geringeren Konzentrationen nicht gezeigt) oder die Durchführung einer zweistufigen Komplexanreicherung, wie im Folgenden beschrieben.

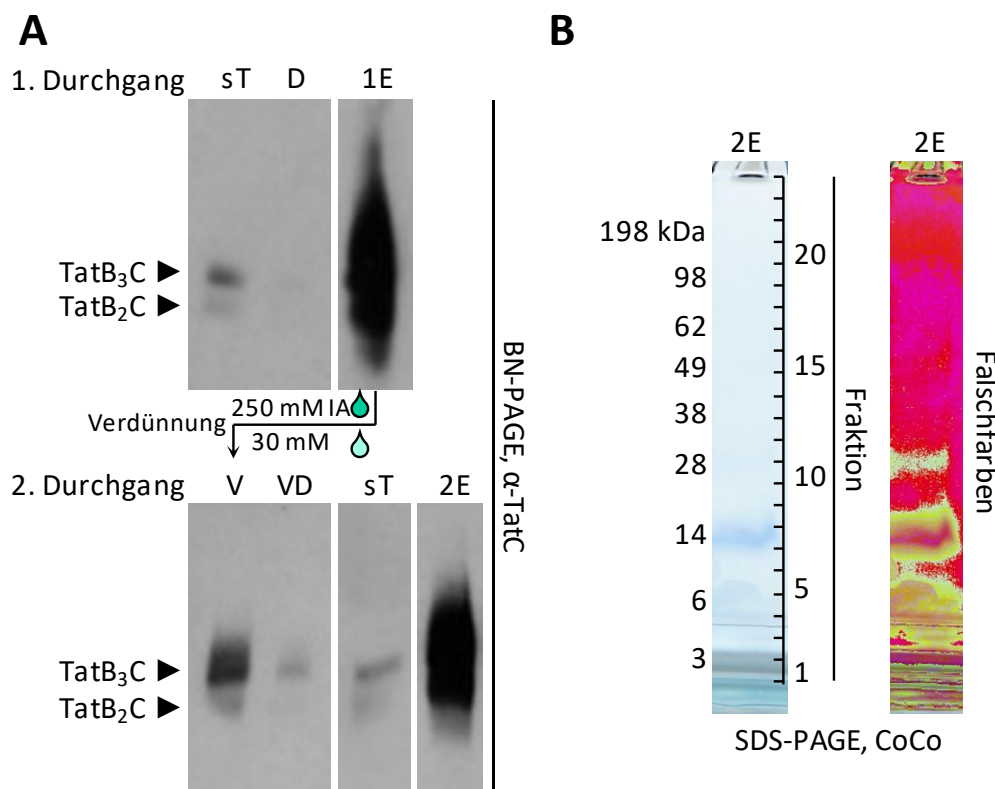
Um die Effizienz der Methode bewerten zu können, wurde eine sehr reine Probe angereicherter TatBC-Komplexe für eine Analyse per Massenspektrometrie erzeugt: Zwei Durchgänge der optimierten Komplexanreicherung wurden hintereinandergeschaltet. Dazu wurde das erste Eluat bis auf 30 mM Imidazol verdünnt und die IMAC wiederholt (Abb. E23 A). Nach den Daten von Vorversuchen ist das Eluat des zweiten IMAC-Durchgangs weniger verunreinigt, was sich auch daran zeigte, dass das zweite Eluat farblos war, während das erste Eluat deutlich grün gefärbt war (Daten nicht gezeigt).

Das zweite Eluat wurde an Julian Bender (Arbeitsgruppe Carla Schmidt, ZIK HALOmem, Halle (Saale)) übergeben. Er führte zunächst eine SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung durch (Abb. E23 B). Hier zeigt sich eine Proteinbande bei etwa 14 kDa, die vermutlich das verwendete tQTP<sup>CF</sup> darstellt (13,2 kDa, zu den Sequenzen und Molekulargewichten der Proteine siehe Material Abschnitt 2.10). Zu beachten ist auch die Falschfarbendarstellung, die eine weitere sehr schwache Bande sichtbar macht, bei der es sich um TatC (33,3 kDa) und/oder TatB (in der SDS-PAGE apparentes Molekulargewicht von 30 kDa) handeln könnte.

Die Probenspur wurde in 25 Teile zerschnitten, mit Trypsin proteolytisch behandelt und mittels Hochdruck-Flüssigchromatographie-Fraktionierung mit nachgeschalteter Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Die erhaltenen Daten wurden mit einer Proteom-Datenbank von Kichererbse (*Cicer arietinum*), sowie den Sequenzen für tQTP<sup>CF</sup> und Erbsen-TatA, -TatB und -TatC verglichen. TatA wurde in die Analyse eingeschlossen, um festzustellen, ob es möglicherweise im TatBC-Rezeptorkomplex enthalten ist (vgl. bakterielle TatABC-Rezeptorkomplexe in Einleitung Abschnitt 1.5.2). Die erhaltenen Daten zu den detektierten Proteinen sind in (Abb. E24) dargestellt. Nach kumulierter und normierter Intensität der detektierten Peptide (iBAQ, siehe

Unterschrift Abb. E24) geordnet, liegt tQTP<sup>CF</sup> in der größten Menge vor. An zweiter Position folgt ein unbekanntes Protein. TatC liegt mit ca. 1/24 des iBAQ von tQTP<sup>CF</sup> an dritter, TatB mit ca. 1/58 an vierter Stelle. TatA wurde nicht gefunden. In Abb. E25 sind die von der Analyse detektierten Anteile der Proteinsequenz dargestellt. Die geringe Abdeckung der Gesamtsequenz der Tat-Proteine (7,7 % TatC; 19,4 % TatB) ist laut J. Bender ein Indiz für eher geringe absolute Proteinmengen, was sich mit dem Ergebnis der Coomassie-Färbung deckt. Im Fall von TatC ist es allerdings ebenfalls möglich, dass sehr hydrophobe Fragmente mangels Löslichkeit nicht detektiert werden können.

Nach TatB folgt eine Reihe von kontaminierenden Proteinen, vor allem zugehörig zur photosynthetischen Elektronentransportkette (in Abb. E24 grün markiert), aber auch Transkription, Translation und deren Regulation (blau markiert).



**Abbildung E23: Versuch der Präparation sehr reiner angereicherter TatBC-Komplexe.** **A** Zweistufige Komplexanreicherung unter Einbeziehung aller in diesem Abschnitt beschriebenen Optimierungen. Angereicherte TatBC-Komplexe einer ersten IMAC (1E; außerdem analysiert Digi sT und Durchfluss, D) wurden von 250 mM auf 30 mM Imidazol (IA) verdünnt (V) und für eine zweite IMAC verwendet (analysiert: Durchfluss-VD und finale Elution-2E; Digi sT als Referenz). Analyse mittels BN-PAGE und Nachweis von TatC durch *Western Blotting*. **B** SDS-PAGE-Analyse und Coomassie-Färbung der Probe „2E“ durchgeführt von J. Bender (siehe Methoden Abschnitt 3.4.11), sowie Falschfarbendarstellung mit dem Programm Fiji (Schindelin et al., 2012) zur Hervorhebung schwacher Signale. Die Probenspur wurde für die folgende massenspektrometrische Analyse in 25 Teile zerschnitten (Leiternmuster, siehe Text und Abb. 24). Der verwendete Größenstandard ist *SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

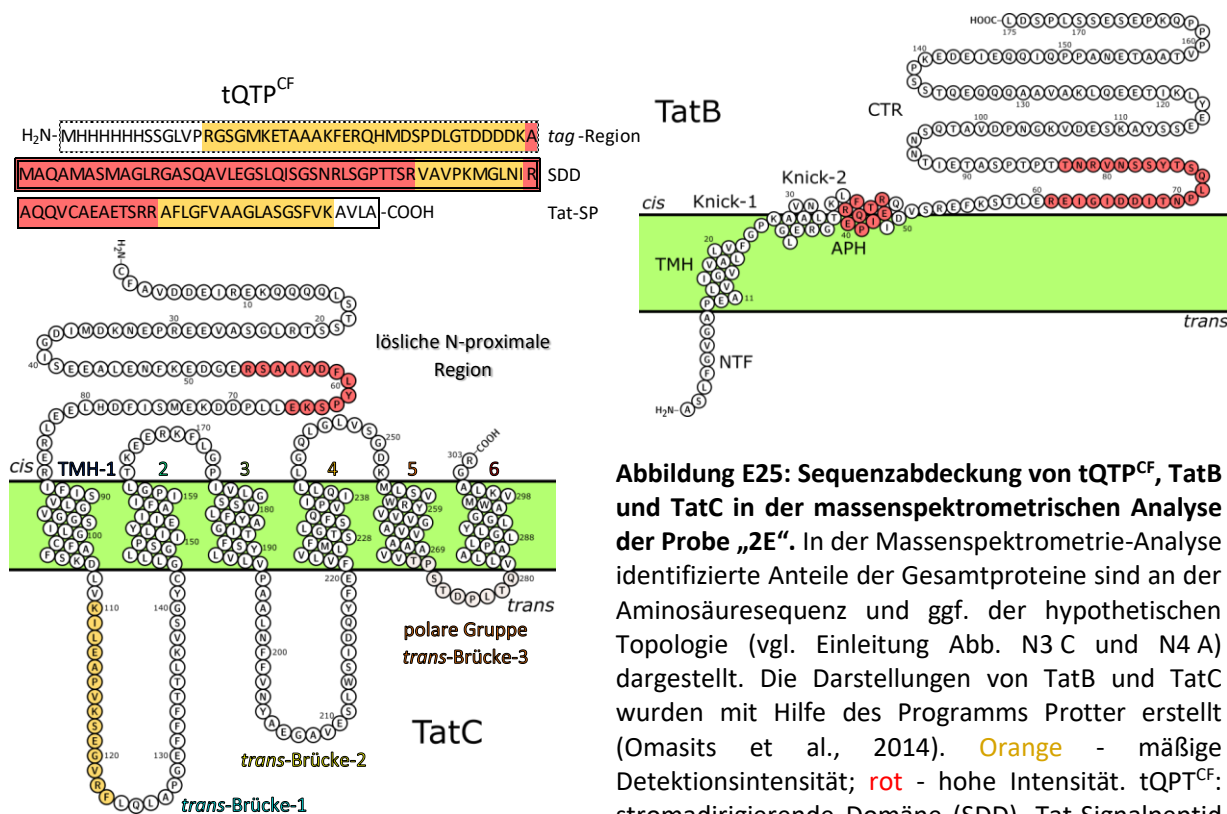
Die Anzahl und die z. T. mit TatC und TatB vergleichbaren iBAQ-Werte dieser Kontaminationen zeigen, dass die Präparation keineswegs rein ist. Jedoch ist zu bedenken, dass es sich bei den Tat-Proteinen im Gegensatz zu bspw. Untereinheiten der Photosysteme um in Thylakoiden deutlich weniger abundante Proteine handelt (vgl. Berghöfer & Klösgen, 1999).

Die beschriebene Methode kann daher als ausgesprochen geeignet für die Isolierung und Anreicherung von TatBC-Komplexen angesehen werden.

Name <i>C. arietinum</i> <sup>1</sup>	Seq-abdeckung in % <sup>2</sup>	∅ Gel-fraktion <sup>3</sup>	Score <sup>4</sup>	Intensität	log <sub>10</sub> (iBAQ) <sup>5</sup>	MS/MS Anzahl <sup>6</sup>
1 tQTP <sup>CF</sup>	85,8	6,28	323,31	5,62E+09	8,905	84
2 mutmaßl. Lyso-phospholipase	3,9	6	-2	7,30E+09	8,541	2
3 <i>P. sativum</i> - TatC	7,7	9,57	13,919	3,64E+08	7,519	7
4 <i>P. sativum</i> - TatB	19,4	8,5	33,119	1,51E+08	7,138	9
5 PsaN	5,9	5	8,0285	6,26E+07	6,951	1
6 PsbS	11,9	8	21,993	9,63E+07	6,942	5
7 AP-3 Komplex UE Delta	2,1	6	7,8915	3,62E+08	6,860	1
8 PsaF	12,6	7,2	19,191	6,37E+07	6,804	6
9 30S ribosomal Rps7	6,5	8	6,9603	4,59E+07	6,759	1
10 Chl a-b bindendes Protein	7,1	8	19,719	4,49E+07	6,749	6
11 Chl a-b bindendes Protein	6,7	8	15,195	5,18E+07	6,715	1
12 PsaL	9,8	7,5	15,814	2,79E+07	6,601	2
13 scarecrow-like Protein 23	2,9	7	8,9476	1,58E+07	5,856	1
14 LHC-like Protein	3,9	9	7,2426	7,85E+06	5,691	1
15 PetC (Rieske-FeS-Protein)	17,8	8,5	11,541	3,72E+06	5,616	2
16 ATP-Synthase UE/AAA-Domäne	4,7	14,5	14,087	1,51E+07	5,612	2
17 coatomer Zeta-3-like	6,1	8	-2	2,01E+06	5,605	1
18 Actin-like Proteine	7,4	10,5	12,801	8,02E+06	5,582	2
19 G-patch-Domäne Protein TGH	1,2	11	6,5965	2,00E+07	5,577	2
20 Psb33-like Protein	4,4	9	7,8344	5,11E+06	5,478	1
21 PsbQ (OEC16)	8,9	7	6,7402	2,98E+06	5,360	1
22 COBW Domäne-Protein 1-like	3,1	15	6,7947	4,91E+06	5,348	1
23 unbekannt	2,5	7	-2	4,49E+06	5,310	0
24 NADPH-Protochlorophyllid OxRed	3	12	7,0504	4,63E+06	5,303	0
25 K <sup>+</sup> -Efflux-Antiporter 3, chloro	1,6	15	6,4282	1,92E+06	4,778	1

**Abbildung E24: Massenspektrometrische Analyse der Probe „2E“ angereicherter TatBC-Komplexe.**

Details siehe Text. Die Tabelle basiert auf dem Vergleich der Messdaten mit einer Proteomdatenbank von *Cicer arietinum* (Kichererbse) sowie den Aminosäuresequenzen von tQTP<sup>CF</sup>, Erbsen (*P. sativum*)-TatA, TatB und TatC. <sup>1</sup> - Bezeichnung oder Kurzbeschreibung des Proteins. <sup>2</sup> - Anteil der als Peptide identifizierten Gesamtsequenz. <sup>3</sup> - durchschnittliche Verteilung auf die 25 analysierten Gelstücke (siehe Abb. E23). <sup>4</sup> - Maß zur Übereinstimmung der erhaltenen Massenspektren mit der Proteinsequenz. <sup>5</sup> - dekadischer Logarithmus des iBAQ (Gesamtintensität aller festgestellten Peptide dividiert durch Anzahl der durch tryptischen Verdau theoretisch erzeugbaren Fragmente). <sup>6</sup> - Anzahl der erhaltenen Tandem MS/MS-Spektren. Zuordnung der mutmaßlichen Proteinfunktionen als photosynthese- (grüne Schrift), transkriptions- bzw. translationsassoziiert (blaue Schrift) oder nicht zugeordnet. Einträge mit negativem score sind grau.



**Abbildung E25: Sequenzabdeckung von tQTP<sup>CF</sup>, TatB und TatC in der massenspektrometrischen Analyse der Probe „2E“.** In der Massenspektrometrie-Analyse identifizierte Anteile der Gesamtproteine sind an der Aminosäuresequenz und ggf. der hypothetischen Topologie (vgl. Einleitung Abb. N3 C und N4 A) dargestellt. Die Darstellungen von TatB und TatC wurden mit Hilfe des Programms Protter erstellt (Omasits et al., 2014). Orange - mäßige Detektionsintensität; rot - hohe Intensität. tQTP<sup>CF</sup>: stromadirigierende Domäne (SDD), Tat-Signalpeptid (Tat-SP). TatB, TatC: Transmembranhelices (TMH), amphipathische Helix (APH), C-terminale Region (CTR, löslich).

## 4.7 Zur Rekonstitution von TatBC-Komplexen in künstliche Membransysteme

### 4.7.1 TatB und TatC können in Liposomen rekonstituiert werden

Das mittelfristige Ziel der vorliegenden Arbeit war es, angereicherte TatBC-Komplexe in künstliche Membransysteme, in diesem Fall Liposomen, einzubringen. Membranlipide sind dabei als geschlossene *bilayer* in Kugelform mit einem Durchmesser im Bereich von  $10^2$  bis  $10^3$  nm organisiert. Die sog. Rekonstitution von Membranproteinen in solche Partikel kann auf verschiedene Weise erfolgen (Rigaud & Lévy, 2003, vgl. Dissertation Li, 2011). Eine Publikation von Althoff et al. (2012) erwies sich für die vorliegende Arbeit als besonders vielversprechend, da die darin beschriebene Variante einer detergensvermittelten Rekonstitution ausdrücklich für digitoninsolubilisierte Proteine vorgesehen ist.

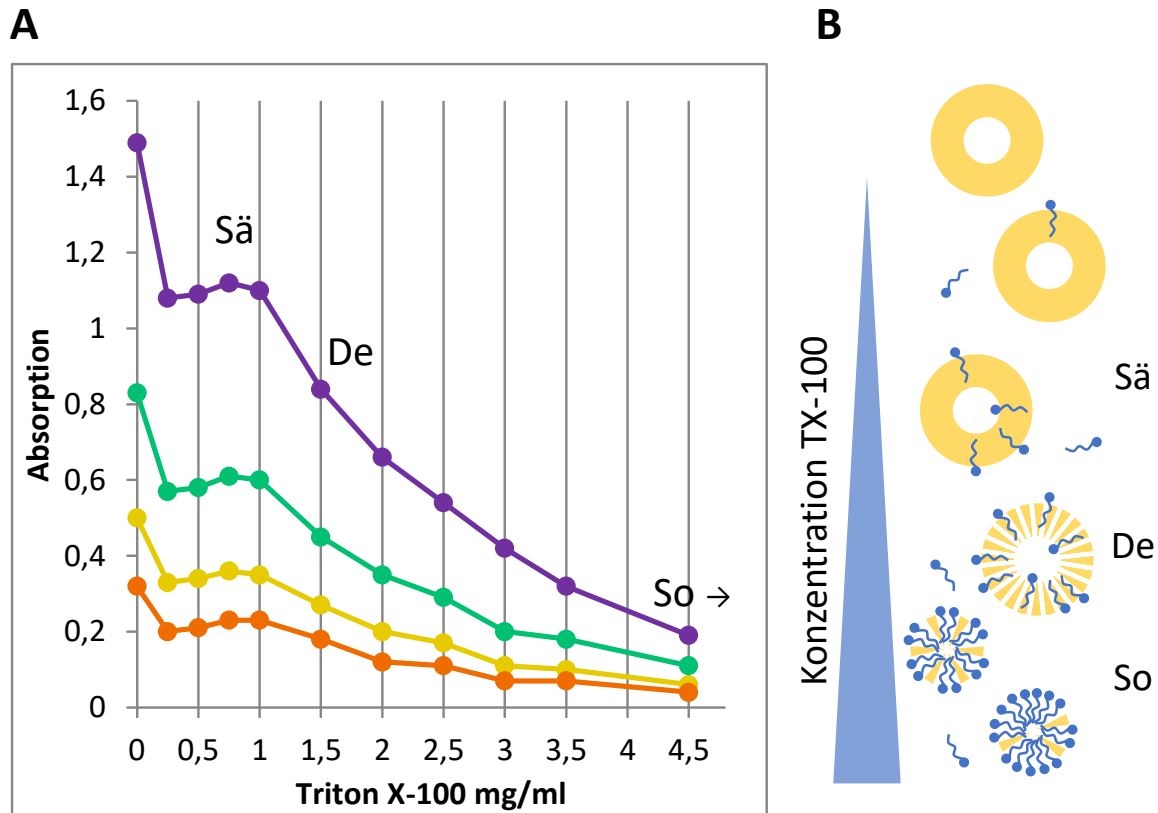
Prinzipiell können Liposomen durch Zugabe geringer Mengen eines Detergens, hier TX-100, in einen Zustand der sog. Destabilisierung noch vor dem Eintreten der Solubilisierung versetzt werden. In dieser Form ist es möglich, dass in der Lösung vorliegende Proteine in die Membran eintreten. Entfernt man anschließend das bzw. die Detergenzien aus der Lösung, so können sich stabile Proteoliposomen bilden, die für weitere Versuche nutzbar sind.

Ein für eine Rekonstitution kritischer Faktor ist die Wahl der Membranlipide. Naheliegender ist die Verwendung der natürlicherweise in der Proteinumgebung vorkommenden Lipide wie bspw. in Althoff et al., 2012 (*supplemental material*). Allerdings sind die in der Thylakoidmembran zum großen Teil enthaltenen Lipide der Gruppe Monogalactosyldiacylglycerole dafür bekannt, keine stabilen *bilayer* auszubilden (vgl. auch Dissertation Li, 2011). Für die im Rahmen der Arbeit durchgeführten ersten Tests fiel die Wahl auf Lecithin aus Eigelb, welches größtenteils Phosphatidylcholine enthält. Es wurde vermutet, dass die große Zahl weiterer Stoffe in der recht unreinen Lecithin-Präparation unbekannt limitierenden Effekten vorbeugen, und so hilfreich bei der Rekonstitution sein könnte.

Im Vorfeld notwendig ist die Bestimmung des Lipid-Detergens-Verhältnisses, bei dem eine Lösung von Liposomen destabilisiert, aber noch nicht solubilisiert ist. Hierzu kann man photometrische Messungen durchführen (Stuart & Boekema, 2007; Dissertation Li, 2011). Absorption und Lichtstreuung zeigen in Abhängigkeit von der Detergenkonzentration ein typisches Verhalten (Abb. E26 A): Zunächst zeigt sich ein Abfall der Absorption bei sehr geringen Mengen TX-100, gefolgt von einem leichten Anstieg bis zum sog. Sättigungspunkt (ca. 0,75 mg/ml). Bis hierhin treten die Detergenmoleküle lediglich in die Membran ein. Das folgende Absinken der Absorption spiegelt den Prozess der Destabilisierung und schließlich Solubilisierung wider (Abb. E26 B), an deren Ende die Lösung transparent sein sollte. Für die Destabilisierung in den folgenden Versuchen wurde ein Verhältnis von ca. 1,5 mg/ml TX-100: 2,5 mg/ml Lecithin = 0,6 T/L festgelegt. Der scheinbare Widerspruch bei der Verwendung von TX-100, welches TatBC-Komplexe dissoziiert (siehe Abschnitt 4.3.1 Triton X-100 und X-114) wird in der Diskussion besprochen (siehe Diskussion Abschnitt 5.4.3).

Das GRecon-(Gradientenrekonstitution) Protokoll von Althoff et al. (2012) ermöglicht die gleichzeitige Inkubation der destabilisierten Liposomen mit solubilierten Proteinen, das Entfernen der Detergenzien und das Trennen verschiedener Populationen von (Proteo)-liposomen voneinander, sowie von möglichen unlöslichen Resten, bspw. aggregierten Proteinen. Dazu wird in einem Ultrazentrifugen-Probengefäß eine Lösung vorbereitet in der die Konzentration von Saccharose, destabilisierten Liposomen und  $\gamma$ -Cyclodextrin von oben nach unten graduell ansteigt (siehe auch Methoden Abschnitt 3.5.4). Dieser Gradient wird mit einer Probe angereicherter TatBC-Komplexe überschichtet und ultrazentrifugiert. Die TatBC-tragenden Digitoninmizellen wandern langsam in den Saccharose-Dichtegradienten ein und treffen auf die Liposomen.

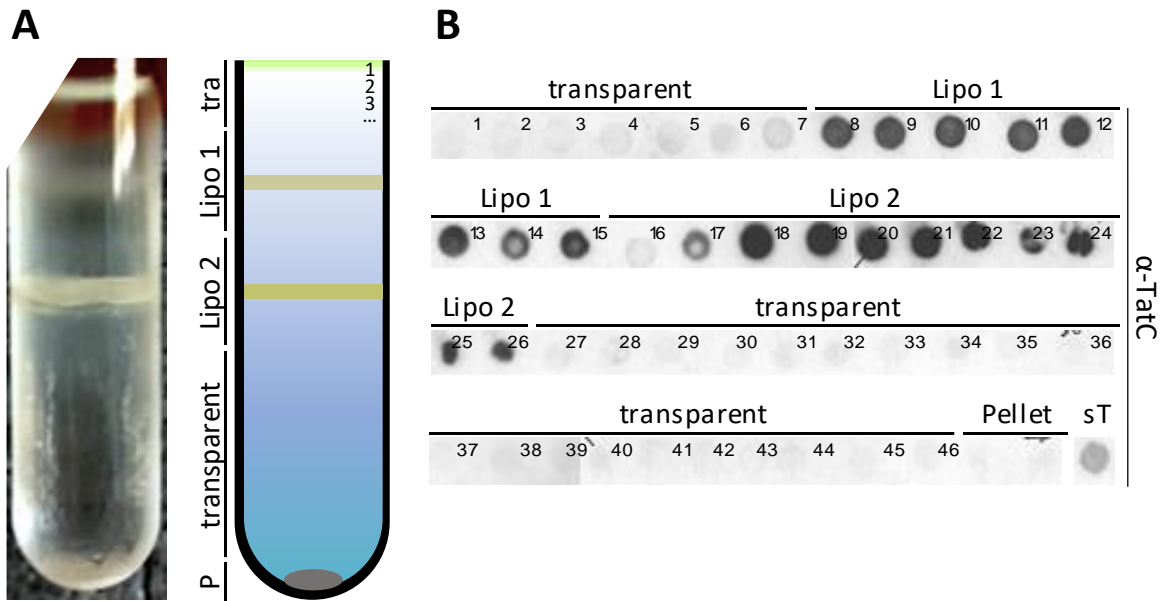




**Abbildung E26: Destabilisierung von Lecithinliposomen mit TX-100.** Zur Vorbereitung der Rekonstitution wurden Liposomen mit TX-100 destabilisiert. **A** Abhängigkeit der photometrischen Absorption (400, 500, 600, 700 nm) einer Probe mit 2 ml Liposomen (2,5 mg/ml Lecithin, siehe auch Methoden Abschnitt 3.5.1) von der TX-100 Konzentration bei ca. 7 °C. Abkürzungen siehe **B** Vereinfachte Illustration der durch TX-100 (Moleküle blau dargestellt) verursachten Veränderung von Liposomen (gelb) mit den Zuständen Sättigung, Destabilisierung und Solubilisierung

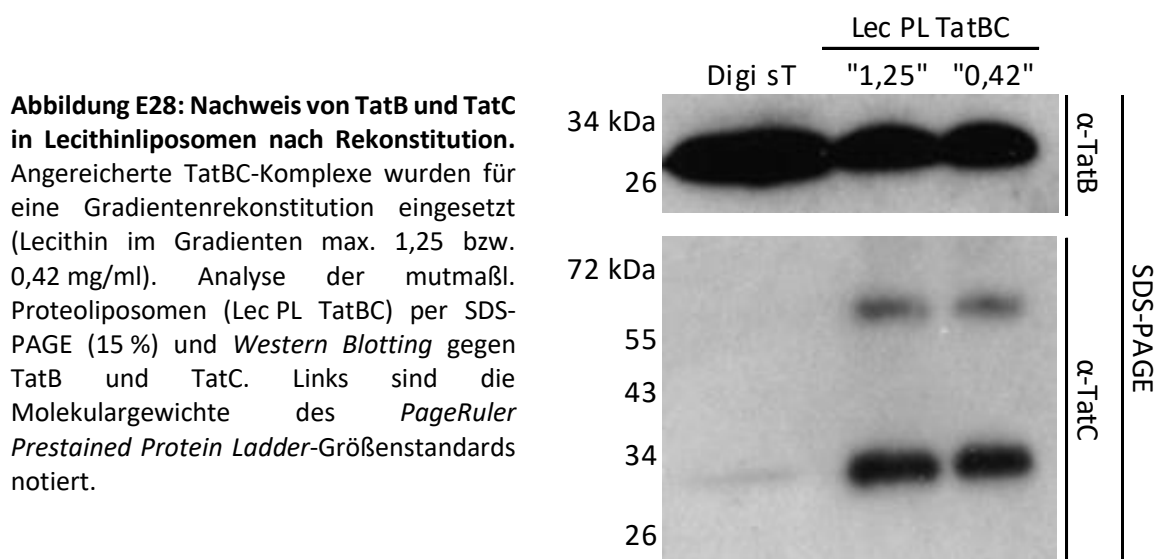
Das außerdem enthaltene Cyclodextrin ist in der Lage, den hydrophoben Anteil von Detergenzien zu binden und sie so zu deaktivieren.  $\gamma$ -Cyclodextrin besitzt dabei eine Präferenz für Digitonin (Althoff et al., 2011 und 2012). Die sich langsam ausbildenden Proteoliposomen wandern weiter bis zum Dichtegleichgewicht, präzipitierte Bestandteile sedimentieren am Boden.

Der Zustand der Probe nach dem Vorgang wurde fotografiert und außerdem schematisch dargestellt (Abb. E27 A). Anzumerken ist, dass die verwendete Lecithinpräparation im Vergleich zu anderen Lipiden zu besonders hohen Positionen der Liposomen im Gradienten führt (weitere Daten nicht gezeigt). Die Liposomen traten in zwei unterschiedlich dichten Populationen auf (Lipo1 und Lipo2). Die Lösung wurde durch Absaugen der Oberfläche in Fraktionen geteilt. Diese wurden auf Nitrocellulosemembran getropft, getrocknet und die Membran analog zur *Western Blotting*-Detektion von TatC behandelt (Abb. 27 B). Nur die Proben, die Liposomen enthalten, zeigen TatC-spezifische Signale. Sofern Proteinkomplexe mit TatC existieren, liegen sie ausschließlich in den liposomenhaltigen Proben vor.



**Abbildung E27: Die Rekonstitution angereicherter TatBC-Komplexe in Lecithinliposomen führt zur Assoziierung von TatC mit den Liposomen.** Angereicherte TatBC-Komplexe wurden für eine Gradientenrekonstitution eingesetzt (siehe Methoden Abschnitt 3.5.4, Lecithin im Gradienten max. 2,5 mg/ml). **A** Fotografie und schematische Darstellung der Probe nach Rekonstitution. Beschriftung nach sichtbarer Zonierung mit (Lipo 1 und 2) oder ohne Liposomen (transparent), bzw. Sediment (Pellet, P). **B** Die Probe wurde von oben nach unten fraktioniert und auf Nitrocellulosemembran getropft (siehe Methoden Abschnitt 3.4.7), getrocknet und eine Detektion mit  $\alpha$ -TatC analog zum *Western Blotting* durchgeführt. Eine Digi sT-Probe diente als Referenz.

In einer Wiederholung des Versuchs wurden die mutmaßlichen Proteoliposomen vereinigt, gewaschen und die Anwesenheit von TatC und TatB mittels SDS-PAGE und Western-Analyse überprüft (Abb. E28). Die Intensität des TatB-spezifischen Signals ist vergleichbar mit der als Kontrolle eingesetzten Digi sT-Probe. Das TatC-Signal ist hingegen im Vergleich erheblich stärker. Hierbei ist es allerdings nach den in Anhang Abschnitt 1 beschriebenen Sachverhalten möglich, dass das TatC-Signal der Kontrollprobe ungewöhnlich schwach ausfiel. Zusammengefasst sind nach der Rekonstitution sowohl TatB als auch TatC mit den Lecithinliposomen assoziiert.



**Abbildung E28: Nachweis von TatB und TatC in Lecithinliposomen nach Rekonstitution.** Angereicherte TatBC-Komplexe wurden für eine Gradientenrekonstitution eingesetzt (Lecithin im Gradienten max. 1,25 bzw. 0,42 mg/ml). Analyse der mutmaßl. Proteoliposomen (Lec PL TatBC) per SDS-PAGE (15 %) und *Western Blotting* gegen TatB und TatC. Links sind die Molekulargewichte des *PageRuler Prestained Protein Ladder*-Größenstandards notiert.

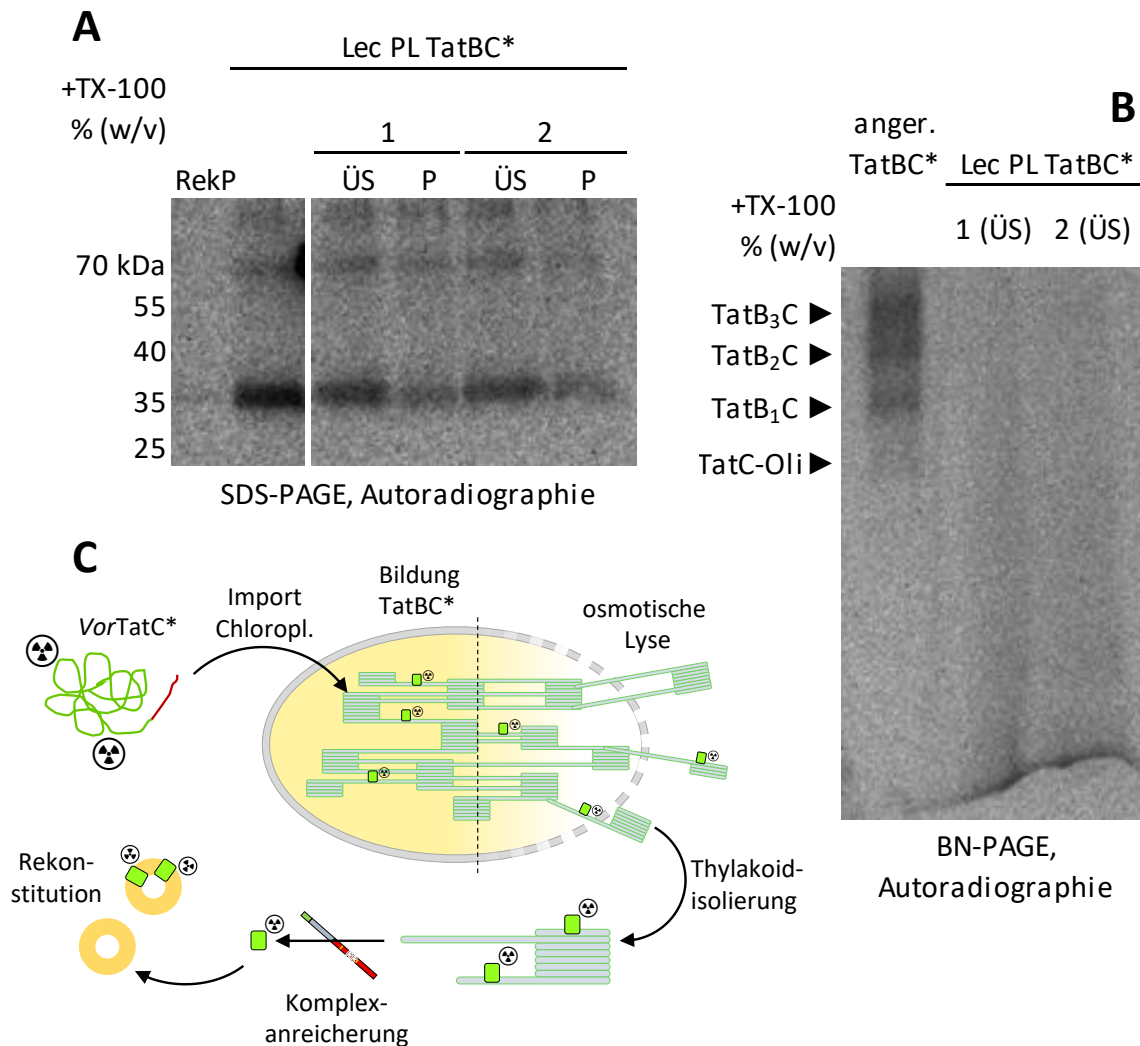
#### 4.7.2 Nachweis der Rekonstitution des TatC-Oligomers in einem Thylakoid-Modellsystem

Der nächste Schritt bei der Charakterisierung der TatBC-Proteoliposomen sollte der Nachweis intakter TatBC-Komplexe durch Digitoninsolubilisierung und BN-PAGE sein. Es zeigte sich jedoch, dass nicht nur Liposomen aus dem hier verwendeten Lecithin, sondern auch aus einer Lecithin-Cholesterol-Mischung, einer reineren Phosphatidylcholin-Präparation oder aus Phosphatidylglycerol auch von sehr hohen Mengen Digitonin (bis zu 20 % (w/v) Endkonzentration, gelöst durch Verreiben in der Probe) nicht solubilisiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Nach weiteren Tests wurde auch TX-100 getestet, für das bereits gezeigt wurde, dass es Thylakoide und Liposomen solubilisieren kann (vgl. Abb. E9 und Abb. E26). Da allerdings, wie in Abschnitt 4.3.1 „Triton X-100 und X-114“ erwähnt und in Anhang Abschnitt 1 weiter ausgeführt, im Verlauf der Arbeit große Probleme mit der *Western*-Detektion von TX-100-solubiliertem TatC in der BN-PAGE auftraten, musste die Nachweismethode geändert werden.

Hierzu wurde radioaktiv markiertes TatC (TatC\*) in seiner Vorläuferform synthetisiert, was bedeutet, dass es sein chloroplastidäres Importsignal trägt (vgl. Einleitung Abschnitt 1.3.2). Vorläufer-TatC\* wird mit isolierten Chloroplasten gemischt, die es importieren, prozessieren und in thylakoidäre TatBC\*-Komplexe assemblieren. Die Thylakoide werden isoliert, eine TatBC-Komplexanreicherung durchgeführt und die erhaltenen Komplexe für eine GRecon eingesetzt (Abb. E29 C). Die Proteoliposomen wurden mit TX-100 solubilisiert und mittels SDS- und BN-PAGE, sowie Autoradiographie zur Detektion, analysiert (Abb. E29 A und B). Es zeigt sich, dass es mit TX-100 möglich ist, einen großen Teil des TatC\* zu solubilisieren (Abb. E29 A). Allerdings wurden die TatC\*-tragenden Komplexe hierbei anscheinend zerstört, da per BN-PAGE nur niedermolekulare radioaktive Signale nachweisbar waren (Abb. E29 B). Die Erzeugung von TatC-Oligomeren durch die Solubilisierung mit TX-100 wurde zuvor bereits erfolgreich durchgeführt (vgl. Abb. E9) und es ist unklar, warum es hier nicht gelang.

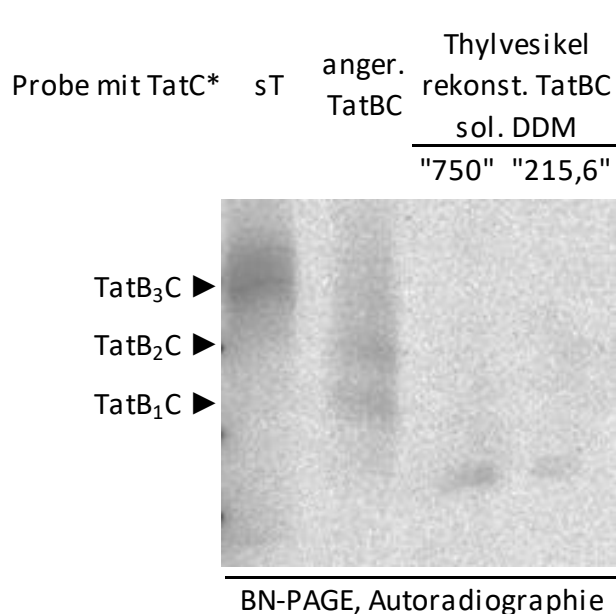
Da also noch immer keine Möglichkeit zum Nachweis der in Proteoliposomen rekonstituierten TatBC-Komplexe gefunden wurde, wurde eine andere Herangehensweise getestet. Hierbei wurde versucht, die Rekonstitution in Thylakoidvesikel anstelle von Liposomen durchzuführen, da bekannt ist, dass Thylakoide mit Digitonin solubilisiert werden können. Allerdings weisen sie mit den Grana und Stromalamellen eine heterogene Struktur auf, aufgrund derer sie beim Versuch einer Destabilisierung differentiell solubilisieren (Morrissey et al., 1986). Es bestand das Risiko, dass Stromalamellen vollkommen solubilisieren, während die dichteren Grana kaum destabilisiert wären. Daher wurde versucht, Thylakoide vor der Destabilisierung mit Ultraschallbehandlung in

eine homogene Vesikelpopulation zu überführen (siehe hierzu Methoden Abschnitt 3.5.2, zur Destabilisierung siehe Anhang Abb. A7 A). Da diese Thylakoidvesikel bereits TatBC-Komplexe enthalten, wurde, wie im vorhergehenden Versuch, mit radioaktiv markierten TatBC\*-Komplexen gearbeitet.



**Abbildung E29: Versuch des Nachweises von TatC-Oligomeren in mutmaßlichen TatBC-Proteoliposomen (Lecithin).** Angereicherte TatBC-Komplexe mit radioaktiv markiertem TatC (TatC\* in TatBC\*-Komplexen, siehe C und Methoden Abschnitt 3.3.8) wurden für eine Gradientenrekonstitution in Lecithinliposomen eingesetzt (Lecithin Gradient max. 0,25 mg/ml). Die Re-Solubilisierung der mutmaßlichen Proteoliposomen (Lec PL TatBC\*) erfolgte mit TX-100 (1 h, nur Ultrazentrifugationsschritt; Überstand, ÜS; Pellet, P). Außerdem analysiert wurden unsolubilierte Proteoliposomen, das Sediment der GRecon (RekP) und die angereicherten TatBC\*-Komplexe. Die Analyse erfolgte mit **A** SDS-PAGE (mit Angabe der Molekulargewichte des *PageRuler Prestained Protein Ladder*-Größenstandards) oder **B** BN-PAGE und jeweils Autoradiographie. **C** Illustration zur Erzeugung von TatBC-Proteoliposomen mit radioaktiv markiertem TatC (\*). Die Vorläuferform von TatC\* (mit Transitpeptid in rot, vgl. Einleitung Abschnitt 1.3.2) wird von Chloroplasten importiert und in TatBC\*-Komplexe assembliert. Diese werden durch Komplexanreicherung gewonnen und in Liposomen rekonstituiert.

Es zeigte sich aber, dass Thylakoidvesikel eine so hohe Dichte besitzen, dass sie bei der GREcon sogar in einem bereits angepassten höher konzentrierten Saccharosegradienten unterhalb des Punktes verbleiben, an dem solubilisierte TatBC-Komplexe im Gleichgewicht sind. Daher interagierten die Komponenten nicht miteinander und die GREcon schlug fehl (siehe Anhang Abb. A7 B). Im folgenden alternativen Ansatz wurde auf die gleichzeitige Zentrifugation verzichtet und destabilisierte Thylakoidvesikel und  $\gamma$ -Cyclodextrin unter Rühren langsam (ca. 10 h) in eine Probe angereicherter TatBC\*-Komplexe gepumpt (siehe Methoden Abschnitt 3.5.5). Die gewaschenen Vesikel ließen sich wiederum leider nicht mit Digitonin, aber mit DDM solubilisieren und für BN-PAGE verwenden (Abb. E30). Die als Referenz ebenfalls analysierten angereicherten TatBC\*-Komplexe sind aus unbekanntem Gründen z. T. dissoziiert, was sich allerdings als geeignete Referenz herausstellte. In den resolubilisierten TatBC\*-Thylakoidvesikel-Proben konnten Signale festgestellt werden, die auf die für DDM typischen TatC-Oligomere hinweisen.



**Abbildung E30: Nachweis von TatC-Oligomeren in mutmaßlichen „TatBC\*-Thylakoidvesikeln“.** Angereicherte TatBC-Komplexe mit radioaktiv markiertem TatC (TatBC\*, Methoden Abschnitt 3.3.8) wurden für eine einfache detergensvermittelte Rekonstitution (nicht GREcon, siehe Text und Methoden Abschnitt 3.5.5) in Thylakoidvesikel eingesetzt (Endkonzentration Chlorophyll 46,9  $\mu\text{g/ml}$ ). Die Vesikel wurden gewaschen, der Chlorophyllgehalt bestimmt und auf 750 bzw. 215,6  $\mu\text{g/ml}$  eingestellt. Die mutmaßlichen „Proteo-Thylakoidvesikel“ wurden dann mit 4 % (w/v) DDM resolubilisiert. Dabei wurde nur der erste Zentrifugationsschritt durchgeführt und keine Ultrazentrifugation. Außerdem wurden die Digi sT und die angereicherten TatBC\*-Komplexe betrachtet. Die Analyse erfolgte mit BN-PAGE und Autoradiographie.

Dies ist der erste Hinweis darauf, dass zumindest intakte TatC-Oligomere, die die Grundstruktur der TatBC-Komplexe darstellen, rekonstituiert werden können. Auf dieser Basis erscheinen weiterführende Pläne zur TatBC-Rekonstitution sehr vielversprechend.

## 5. Diskussion

Die Abschnitte 5.1 bis 5.4 der Diskussion beschäftigen sich mit den Daten des Ergebnisteils. In 5.1 wird zunächst die Komplexdissoziation an sich und Faktoren, die sie beeinflussen, charakterisiert. In 5.2 werden Vermutungen zum Mechanismus der Komplexdissoziation diskutiert. Abschnitt 5.3 ist dem Einfluss der Substratbindung auf die Stabilität von TatBC-Komplexen gewidmet. Eine Zusammenfassung der bisherigen Fortschritte auf dem Weg zur Rekonstitution von TatBC-Komplexen folgt in Abschnitt 5.4.

In Abschnitt 5.5 ist dagegen eine weiterführende Datenanalyse mit detaillierten Erklärungen und eigener Diskussion dargestellt. Dabei soll die Frage geklärt werden, wie viele TatBC-Protomere in intakten Komplexen enthalten sind.

### 5.1 Charakterisierung der Dissoziation von TatBC-Komplexen

#### 5.1.1 Zur Relevanz der Komplexdissoziation

In zahlreichen Publikationen, die im Folgenden genannt werden, wurden bereits solubilisierete TatBC-Komplexe mithilfe von *Blue Native*-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) analysiert. Wie in der vorliegenden Arbeit wurde dabei häufig festgestellt, dass sich mehrere Signale für diese Membranproteinkomplexe zeigten. Das Modell der Komplexdissoziation könnte nun eine einheitliche Erklärung für dieses oft beobachtete und schon lange bekannte Phänomen liefern. Sofern nicht anders angemerkt, wurde in den im Folgenden genannten Publikationen immer Digitonin zur Solubilisierung der Tat-Rezeptorkomplexe verwendet und Analysen mit BN-PAGE durchgeführt.

Mandy Waclawek zeigte in ihrer Dissertation Analysen für solubilisierete TatBC-Komplexe von Erbse (*Pisum sativum*) und Spinat (*Spinacia oleracea*), die zuvor mit dem radioaktiv markierten chimären Substrat 16/23 beladen wurden (Dissertation Waclawek, 2016, Abb. 13). Es zeigten sich jeweils vier Komplexspezies. Da in dieser Analyse nur substratbeladene Komplexe sichtbar sind, könnten diese Signale intakten Komplexen mit ein bis vier Substratmolekülen entsprechen. Wie in Abschnitt 5.3.1 beschrieben, scheinen solubilisierete TatBC-Komplexe in BN-PAGE-Analysen allerdings oft nur ein bis höchstens zwei Substratproteine zu tragen. Jedoch ist es möglich, dass Substrat während der Komplexdissoziation gebunden bleibt, anstatt sich abzulösen (vgl. Abb. E4). Dies kommt insbesondere für die recht stabile Bindung des PsbQ- (OEC16) Signalpeptides, welches auch im Substrat 16/23 enthalten ist, in Frage (vgl. Abschnitt 5.3.2). Daher könnte man die von M. Waclawek beschriebenen Signale alternativ durch die Dissoziation von TatB aus Komplexen mit konstanter Substratbeladung erklären. Generell ist die Ähnlichkeit dieser Daten mit Abb. E4 hoch.

Anzumerken ist noch, dass die Detektion radioaktiver Signale einen so breiten Intensitätsbereich erfassen kann, dass oft auch ohne zusätzliche Behandlung mit dissoziierenden Faktoren die kleineren Komplexspezies nachgewiesen werden können (siehe Abb. E4, E5, E9 A TX-114 Spur „Digi“ und Abb. E29).

Fan et al. zeigten TatBC-Komplexe von Erbse, die ebenfalls mit verschiedenen radioaktiv markierten Substraten beladen waren (Fan et al., 2010, *figure 4*; die Abk. „Fig.“ wird im Weiteren zur ausdrücklichen Kennzeichnung von Bildern aus Artikeln verwendet). Für die Substrate 16/23 und 16/23-EGFP zeigten sich zwei intensive Signale und ein schwächeres unterhalb davon, für 16/23-EGFP(A83L) sogar vier bis fünf. Dies ließe sich, wie eben dargestellt, durch Komplexdissoziation bei erhalten bleibender Substratbindung erklären. Dasselbe gilt für Daten aus der Dissertation von René Schlesier (2015, Abb. 14, 17, 18, 19 und 20). In all diesen Experimenten wurden das Protein i16/23, eine Variante von 16/23, die keine stromadirektierende Domäne besitzt und direkt mit dem Signalpeptid beginnt, und vom Carboxy- (C-)Terminus verkürzte Varianten zur Markierung von Erbsen-TatBC-Komplexen verwendet.

Im Gegensatz zu den bisher genannten Referenzen verwendeten Ma & Cline radioaktives TatC zur Markierung von Erbsen-TatBC-Komplexen und erhielten je zwei Signale (Ma & Cline, 2013, Fig. 2A BN-PAGE Spur 2 und 3). Da nur in einer der beiden Proben Substrat vorhanden war, lässt sich das Auftreten mehrerer Komplexe in der anderen Probe nur durch die Komplexdissoziation erklären. Dies gilt analog für die Analysen von Ma et al., bei denen radioaktiv markiertes TatB verwendet wurde. Es zeigten sich auch für Proben ohne Substrat mehrere TatBC-Komplexe (Ma et al., 2018, Fig. 2 Spuren „WT“).

Jakob et al. wiesen für *Arabidopsis thaliana* mittels *Western Blotting* gegen TatB und TatC mehrere TatBC-Komplexe nach. Auch hier bietet sich die Komplexdissoziation als Erklärung an. Für TatB fanden sich allerdings bis zu vier Komplexe, was der in dieser Arbeit entwickelten Vorstellung von drei TatB-tragenden Komplexen und einem reinen TatC-Oligomer widerspricht (Jakob et al., 2009, Fig. 3; siehe auch Abschnitt 5.5).

Bei der Beurteilung der BN-PAGE-Komplexsignale von *Escherichia coli*-Proben muss bedacht werden, dass TatA ein Bestandteil des TatABC-Rezeptorkomplexes ist (vgl. Einleitung Abschnitt 1.5.2). Dies verkompliziert die Zuordnung im Sinne der TatB-Dissoziation erheblich, da für jede TatBC-Komplexspezies zusätzliche Banden mit TatA und auch TatAB-/TatAC-Komplexe auftreten könnten (Behrendt & Brüser, 2014; Dissertation Geise, 2019). Die im Folgenden erwähnten Untersuchungen, bei denen TatA ausgeschlossen wurde, sind daher aufschlussreicher:

Parallel zu elektronenmikroskopischen Analysen führten Tarry et al. BN-PAGE-Analysen von *E. coli*

Tat-Komplexen durch. Dazu wurden in einem Bakterienstamm, dessen *tatABC*- und *tatE*-Gene deletiert wurden, TatB und TatC mit dem Substrat SufI, aber nicht TatA, überproduziert. In einem alternativen Ansatz wurde das Substrat CueO nachträglich zu überproduziertem TatBC gegeben. In der elektronenmikroskopischen Analyse wurden für SufI-TatBC ein bis zwei Moleküle gebundenen Substrats pro Komplex beobachtet, für CueO ein Molekül. Allerdings zeigten die BN-PAGE-Analysen nach Coomassie-Färbung in Übereinstimmung mit dem Modell der Komplexdissoziation auch hier Komplexspezies, die nicht durch die Substratbeladung erklärt werden können: In einer Probe nachweislich SufI-freier TatBC-Komplexe zeigten sich zwei verschiedene Komplexspezies, anstatt nur einer (Tarry et al., 2009, Fig. 2 B und Fig. 2 C „FT“). Auch im Fall SufI-enthaltender Komplexe zeigten sich vier Komplexspezies wovon höchstens drei über den SufI-Beladungsstatus (2, 1 und 0 Moleküle SufI) erklärbar sind (Fig. 2 D „Applied“). Analog stellten sich CueO-beladene TatBC-Komplexe, die laut elektronenmikroskopischer Analyse höchstens ein Substratprotein tragen, mit zwei intensiven Signalen und einem schwächeren dar, was auf drei Komplexspezies schließen lässt (Fig. 2 F).

Weitere Signalmuster, die an die Komplexdissoziation erinnern, finden sich bspw. in Fincher et al., 2003 Fig. 4 Spur 1 und 4 und Fig. 5 D; Oates et al., 2005 Fig. 6 „TatC“ Spur „M“ (hier allerdings TatABC); Behrendt et al., 2007 Fig. 2 D „TatBC  $\alpha$ TatC“ sowie Cline & Mori, 2001 Fig. 2 A und B und Fig. 4 A und 8 A.

Fasst man alle beschriebenen Sachverhalte zusammen lässt sich sagen, dass das Vorliegen von mehr als einem substratfreien Komplex ein starker Hinweis auf die Dissoziation der TatBC-Komplexe ist. Das Modell der Komplexdissoziation liefert demnach eine vereinheitlichende Erklärung für viele bereits publizierte Daten.

Ein der Komplexdissoziation auffallend ähnliches Muster zeigt sich auch im Rahmen einer Analyse von Ma et al.: Zu Thylakoiden aus Erbse wurde radioaktives, C-terminal verkürztes TatB gegeben (Ma et al., 2018, Fig. 3). Durch Austausch des authentischen TatB aus den thylakoidären TatBC-Komplexen (siehe hierzu auch Zinecker et al., 2020) gegen die verkürzte Variante verringert sich das Molekulargewicht des Komplexes - hierbei nimmt die TatB-Anzahl also nicht ab. Die Detektion des radioaktiven TatB zeigt bis zu drei Signale. Mit *Western Blotting*-Nachweis von TatB wurden bis zu drei, für TatC vier Signale nachgewiesen. Möglicherweise ist der linke Bildteil zur Detektion der Radioaktivität etwas zu hoch positioniert, da der größte Komplex eigentlich kein verkürztes TatB enthalten kann und somit nicht sichtbar sein sollte. Da die Veränderung des Molekulargewichtes von TatB ein der Komplexdissoziation ähnliches Leitermuster erzeugt, stützen



diese Daten die Vermutung, dass der TatB-Status der Komplexe maßgeblich für deren apparentes Molekulargewicht ist.

### 5.1.2 Die Relevanz des pflanzlichen TatC-Oligomers

Den Endpunkt der Komplexdissoziation stellt das TatC-Oligomer dar. Nach momentanem Kenntnisstand beschreibt die vorliegende Arbeit zum ersten Mal einen pflanzlichen reinen TatC-Komplex als mutmaßliches Grundgerüst der TatBC-Komplexe. Aufgrund der Möglichkeit der selektiven Expression von *tatC* allein wurden TatC-Oligomere in *E. coli* bereits mehrfach erzeugt: Alcock et al. zeigten 2013 *in vivo*, dass TatC allein für die Ausbildung der Oligomere ausreichend ist. In BN-PAGE-Analysen demonstrierten Behrendt et al. (2007), Orriss et al. (2007) und Behrendt & Brüser (2014) TatC-Komplexe mit Molekulargewichten von ca. 220 bzw. 250 kDa und ordneten das TatC-Oligomer als Grundgerüst für die Assemblierung der TatBC- und TatABC-Komplexe ein (vgl. auch Einleitung Abschnitt 1.5.1.3). Besonders interessant ist hierzu ein Versuch von Behrendt et al. (2007): In *E. coli*-Zellen wurde zunächst nur die Synthese von TatC aktiviert und erst nach einer Wartezeit auch die von TatB. Vor dem Auftreten von TatB waren mittels BN-PAGE nur TatC-Oligomere nachweisbar. Diese waren ab der Synthese von TatB nicht mehr sichtbar, während sich nun intakte TatBC-Komplexe zeigten. Scheinbar wurden die bereits vorhandenen TatC-Oligomere durch TatB zu TatBC-Komplexen „aufgefüllt“. Hierbei handelt es sich quasi um den gegenläufigen Prozess zur Komplexdissoziation.

Man kann also davon ausgehen, dass es sich bei den durch die Komplexdissoziation erzeugten TatC-Oligomeren in der vorliegenden Arbeit tatsächlich um eine zu den für *E. coli* gezeigten TatC-Komplexen homologe Struktur handelt. Diese bilden mutmaßlich das Gerüst der TatBC-Komplexe.

### 5.1.3 Der Einfluss von Detergenzien auf die Komplexdissoziation

Vier der sechs in dieser Arbeit zur Thylakoidsolubilisierung getesteten Detergenzien begünstigen die TatB-Dissoziation und erzeugen vorrangig TatC-Oligomere: DDM (Abb. E8), Triton X-100 & Triton X-114 (TX-100/-114; Abb. E9) und CHAPS (Abb. E10). Natriumdodecylsarcosinat (NaDDSar) führt nur unter bestimmten Bedingungen, die nicht näher bekannt sind, zu intakten TatBC-Komplexen (Abb. E11). Selbst bei einer scheinbar sehr selektiven Solubilisierung mit CHAPS, bei der keine chlorophyllhaltigen Komplexe extrahiert werden, kommt es zur Trennung von TatB und TatC (Abb. E10).

Doch auch, wenn die TatBC-Komplexe nicht dissoziiert sind, hat die Solubilisierung erhebliche Auswirkungen auf ihre Eigenschaften, wie Wojnowska et al. (2018) zeigten: (2018): Sie beobachteten in Analysen zur Kinetik der Substratbindung, dass TatBC-Komplexe, die mit dem digitoninverwandten Detergens Glycodiosgenin solubilisiert wurden, Substrate deutlich

langsamer banden und wieder freisetzen als unsolubilisierte Komplexe nach den Daten von Bageshwar et al. (2009) und Whitaker et al. (2012).

Die TatBC-Dissoziation durch die Verwendung anderer Detergenzien als Digitonin wurde auch schon vor dieser Arbeit beobachtet: Cline & Mori (2001)<sup>6</sup> merkten an, dass sie bei Versuchen zur Solubilisierung von Thylakoiden mit TX-100 und DDM komplexe Muster ohne Komigration von TatB und TatC erhielten, die von der Detergenzkonzentration abhängig waren. Es ist bekannt, dass die Wahl des Detergens und seiner Konzentration zur Solubilisierung von Membranproteinkomplexen entscheidend für den Verbleib bestimmter Untereinheiten im Komplex ist (bspw. Schägger & Pfeiffer, 2000; Wittig et al., 2010; Lee et al., 2018). Auch extrahieren die verwendeten Detergenzien je nach Art und Menge verschiedene Lipidarten in unterschiedlichem Maße (Ilgü et al., 2014 und siehe auch Abschnitt 5.2.4).

Die Solubilisierung intakter TatBC-Komplexe ist anscheinend eher die Ausnahme als die Regel, was auf einen besonderen Solubilisierungsmechanismus von Digitonin hinweist (siehe folgender Abschnitt). Doch auch mit diesem ausgesprochen milden Detergens scheint die TatB-Dissoziation stattzufinden, da sich die erste Dissoziationsstufe TatB<sub>2</sub>C oft schon nach bloßer Solubilisierung zeigt und Wärmeeinwirkung dies stark stimuliert (z. B. Abb. E1 und E2).

#### 5.1.3.1 Der gehemmte Solubilisierungsmechanismus von Digitonin

Auch bei der Solubilisierung von Membranproteinkomplexen der sehr komplexen peroxisomalen Importmaschinerie für gefaltete Proteine stellten Agne et al. (2003) fest, dass nur Digitonin schonend genug war, um die Assoziierung der Proteine Pex5p, Pex10p, Pex12p, Pex13p, Pex14p und Pex17p zu erhalten. Sogar bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen mit den als sehr schonend beschriebenen Styrol-Maleinsäure-Varianten zeigte sich, dass Digitonin die TatBC-Komplexe oftmals besser konserviert (siehe Abb. E17 und E18 und vgl. Abschnitt 5.1.4). Es scheint, als ob Digitonin anders mit Membranen interagiert als viele andere Detergenzien.

Fan & Heerklotz (2017) beschrieben, dass Digitonin einen gehemmten Solubilisierungsmechanismus besitzt, da der hydrophobe Sterolanteil recht kurz ist. Hierdurch kann Digitonin nicht wie andere Detergenzien ab einer bestimmten Konzentration von der Außenschicht einer Membran auf die innere Membranschicht überwechseln (langsamer sog. *flip flop*). Es dringt daher lediglich in die äußere Schicht einer Membran ein. Es folgt nun einem sog. *staying out*-Mechanismus, nach dem es ab einer bestimmten lokalen Konzentration nicht weiter in die Membran inseriert, sondern nur weitere Mizellen im Lösungsmittel bildet. Einzelne Lipidmoleküle

---

<sup>6</sup> Daten allerdings nicht gezeigt, Aussage in der Publikation nur als Kommentar

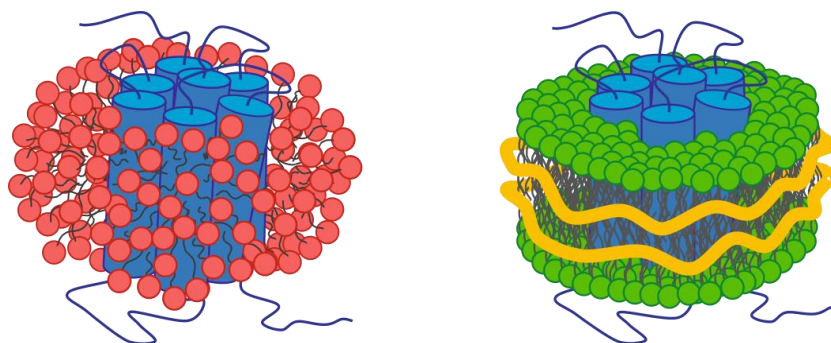
treten von der digitoninhaltigen äußeren Membranschicht langsam in diese Mizellen über. Bei Thylakoiden führt der dadurch entstehende Membranstress schließlich zu einem Aufbrechen der verbleibenden Membran. Offene Membranenden werden dann durch Digitonin besetzt, wodurch Stücke intakten Membrankontinuums quasi solubilisiert werden (H. Y. Fan et al., 2016; H. Y. Fan & Heerklotz, 2017; Koochak et al., 2019). Dies ist vermutlich der Grund, warum Digitonin intakte TatBC-Komplexe solubilisieren kann. Möglicherweise führt der in Abschnitt 5.2.2 beschriebene nur schwach affine und dynamische Charakter der TatB-TatC-Bindung im Weiteren zu einem langsamen Verlust von TatB.

Koochak et al. vermuteten weiterhin, dass Digitonin als relativ großes Molekül nur schlecht zwischen die dicht gepackten Grana gelangt. In der zweidimensionalen Darstellung hat es eine Größe von ca.  $1,5 \times 3,0$  nm. Dies könnte erklären, warum es hauptsächlich die besser zugänglichen Stromalamellen solubilisiert.

#### 5.1.4 SMA-solubilierte TatBC-Komplexe dissoziieren zu TatC-Oligomeren

Die Vorstellungen zum Solubilisierungsmechanismus von Styrol-Maleinsäure-Copolymer-Derivaten (SMA) unterscheiden sich grundlegend zu Detergenzien (Xue et al., 2018, Dörr et al., 2016). Während die Ausbildung von Mizellen je nach Detergens oft zu einem Verlust von Lipiden und Proteinquartärstruktur führt, sollen diese bei SMA-Solubilisierung in Form von kreisförmiger Membran-„ausschnitte“, den sog. *nanodiscs*, wesentlich besser erhalten bleiben (vgl. Abb. D1; Dörr et al., 2016; Esmaili & Overduin, 2018).

Insofern sind die Ergebnisse der ersten Versuche zur Solubilisierung thylakoidärer TatBC-Komplexe mit SMA unerwartet, da sich zeigte, dass es auch hier vorrangig zu einer Dissoziation von TatB kommt.



**Abbildung D1: Modellvorstellungen zum Aufbau von Detergenzmizellen und SMA-nanodiscs.** Detergenzmizellen bilden sich aus vielen kleinen Detergenzmolekülen (rot) und führen häufig zum Verlust von Lipiden (grün). *nanodiscs* beinhalten nur wenige langkettige SMA-Moleküle (gelb) und sollen einen großen Teil der authentischen Membran (grün - Lipide) um die solubilierten Membranproteine (blau) erhalten. Verändert nach Dörr et al. (2016).

In Abbildung E17 A zeigte sich, dass alle drei getesteten SMA-Vertreter präferentiell TatC-Oligomere erzeugen. Nur wenn die Solubilisierung bei 7 °C und mit XIRAN 30 oder 25, aber nicht 40, durchgeführt wird, zeigten sich noch geringe Mengen der zweitkleinsten „TatB<sub>1</sub>C“-Komplexe. Dies könnte darauf hinweisen, dass die geringere Kettenlänge von XIRAN 40 (5 kDa im Gegensatz zu 7,5 und 10 kDa bei XIRAN 30 und 25) zu einer höheren Dynamik der *nanodiscs* führt, durch die möglicherweise dissoziierende Effekte verstärkt auftreten. Allerdings widersprechen die Beobachtungen den Daten von Jamshad et al. (2015), nach denen SMA-Varianten mit einem höheren Anteil des hydrophoben Styrols (XIRAN 40, Styrol:Maleinsäure-Verhältnis 1,4:1 und XIRAN 25 3:1) mehr störende Interaktionen mit den Lipiden der *nanodiscs* eingehen.

Es besteht die Möglichkeit, dass die Dissoziation von Proteinkomplexen unter den verwendeten Bedingungen kein TatBC-spezifischer Effekt ist: Abhängig von verwendeter SMA-Variante, Konzentration und Temperatur ist auch der Grad der Solubilisierung, die elektrophoretische Fokussiertheit und das Migrationsverhalten chlorophyllhaltiger Proteinkomplexe in Abb. E17 B unterschiedlich. Es scheint so, als ob die Solubilisierung bei 25 °C auch bei diesen zu einer verstärkten Dissoziation führt. Bei den in dieser Arbeit verwendeten SMA-Varianten handelt es sich nicht um alternierende, sondern zufällige Copolymere. Lokale Häufungen mehrerer Styrolreste könnten theoretisch weiter in die *nanodiscs* eindringen und hydrophobe Interaktionen stören (pers. Mitteilung Michael Overduin). Eine ausgeprägte Tendenz von SMA, thylakoidäre Proteinkomplexe zu dissoziieren, erscheint aber dennoch eher ungewöhnlich. So konnten Brady et al. 2019 mithilfe von SMA bspw. aktive cyanobakterielle Photosystem I-Trimere gewinnen.

Allerdings vermuten Dörr et al. (2016), dass Thylakoide aufgrund ihres hohen Protein-Lipid-Verhältnisses weniger effizient durch SMA solubilisiert würden. Sie nannten dazu die Arbeiten von Bell et al. (2015), die mit SMA-Behandlung die Isolation eines Photosystem I-Lichtsammelkomplex II-Superkomplexes aus Spinat beschrieben, der allerdings nicht als lösliche *nanodiscs* im eigentlichen Sinne, sondern in einer dichten Membranfraktion, einem mutmaßlichen „Rest“ der Solubilisierung, vorlag. Dies könnte auch erklären, warum nach Abb. E17 B mit XIRAN 40 anscheinend nur Spuren chlorophyllhaltiger Komplexe solubilisiert werden konnten. Andererseits zeigte XIRAN 40 die effizienteste Solubilisierung von TatC-Oligomeren (Abb. E17 A).

Der Umstand, dass die SMA-Varianten keine intakten TatBC-Komplexe solubilisieren, ist unerwartet. Sie können allerdings zur Gewinnung von TatC-Oligomer-*nanodiscs* verwendet werden.

#### 5.1.4.1 Optimierung der Solubilisierung mit SMA

Es ist zu vermuten, dass die Optimierung der Solubilisierungsbedingungen in Zukunft eine höhere Ausbeute intakter TatBC-Komplexe bewirken könnte. Die Zugabe von Lipiden kann die SMA-Solubilisierung sehr proteinreicher Membranbereiche wie der Thylakoidmembran verbessern (Swainsbury et al., 2017). Des Weiteren zeigten Kopf et al. (2020), dass die Anwesenheit von 150 mM NaCl die Solubilisierung des Proteins KcsA aus *E. coli*-Membranen mit 0,25 % (w/v) SMA erst ermöglichte. Die Proben der vorliegenden Arbeit enthielten jedoch kein NaCl, was die Solubilisierung vermutlich hemmte. Hingegen waren im Solubilisierungsansatz etwa 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> enthalten, was die Solubilisierungseffizienz wiederum mindert, da bivalente Metallionen zur Aggregation von SMA führen (Kopf et al., 2020). Der letzte Punkt würde für weitergehende Versuche auch die Verwendung des TatBC-stabilisierenden CaCl<sub>2</sub> einschränken (siehe Ergebnisse Abschnitt 4.4.1).

Die Kompensierung der genannten suboptimalen Bedingungen ist vermutlich der Grund für die recht hohen SMA-Konzentrationen, die in dieser Arbeit verwendet werden mussten. Bei einer Optimierung zukünftiger Versuche sollte dies und auch die konsequente Einhaltung möglichst niedriger Temperaturen bedacht werden (vgl. bspw. Raumtemperatur-Exposition der Proben für 5 min bei Abb. E17), um die Proteinkomplexe intakt zu halten. Auch Solubilisierungszeiten im Bereich von 12 h wurden bereits beschrieben und könnten versucht werden (Brady et al., 2019). Der leicht basische pH-Wert (7,0-8,0) liegt nach Kopf et al. (2020) aber bereits im optimalen Bereich. Auch Di-Isobutyl-Maleinsäure-Copolymer, welches ähnliche Eigenschaften hat wie SMA, könnte getestet werden, da hierfür berichtet wurde, dass es weniger störende Auswirkungen auf die Acylketten der Lipide hat, präferentiell größere Proteinkomplexe solubilisiert und weniger empfindlich auf divalente Kationen reagiert (Oluwole et al., 2017).

#### 5.1.4.2 Wird TatB selektiv aus Tat-SMA-*nanodiscs* ausgeschlossen?

Es stellt sich die Frage, warum die SMA-Varianten TatBC-Komplexe dissoziieren. Dass die amphipathischen Polymere möglicherweise doch einen spezifischen Effekt auf die Tat-Rezeptorkomplexe ausüben, zeigt sich an den Beobachtungen aus Abb. E19: Der SMA-Vertreter XIRAN 40 scheint die temperaturabhängige TatB-Dissoziation zu begünstigen, schützt die entstehenden TatC-Oligomere aber offenbar gegen ein weiteres Zerfallen. Man könnte daher vermuten, dass TatBC-*nanodiscs* eher kurzlebig sind, während TatC-Oligomer-*nanodiscs* dem beschriebenen stabilisierenden Charakter von SMA entsprechen.

Bedenkt man, dass die SMA-Moleküle das Äußere einer *nanodisc* umspannen, stellt sich die Frage, ob *nanodiscs* eine Maximalgröße haben, die möglicherweise von intakten TatBC-Komplexen

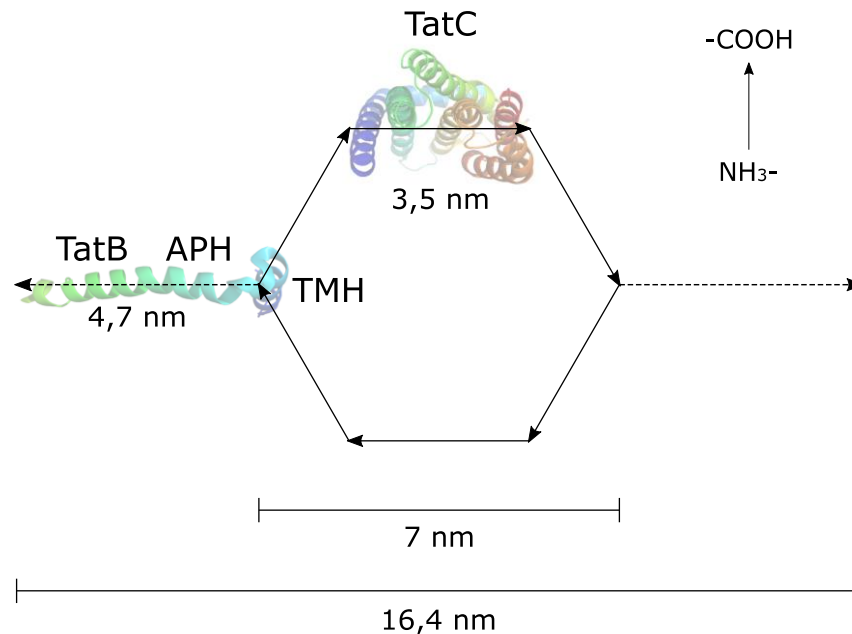
überschritten wird. Anders als bei der Stabilisierung von *nanodiscs* mit sog. Membrangerüstproteinen ist die Größe von SMA-*nanodiscs* weniger von der verwendeten SMA-Variante selbst abhängig und bewegt sich je nach solubilisiertem Protein zumeist im Bereich von 10-24 nm (Dörr et al., 2016) oder 6-30 nm (Esmaili & Overduin, 2018). Es gibt Vermutungen, dass sich die Größe von SMA-*nanodiscs* dem solubilisierten Protein(komplex) anpasst. Dörr et al., (2016) fanden bei Literaturrecherchen allerdings keine klaren Hinweise darauf; es ist nicht geklärt, was genau die Größe definiert. Auch das Lipid-SMA-Verhältnis kommt in Frage (R. Zhang et al., 2017).

Sun et al. (2018) gelang mit der SMA-Solubilisierung von bakteriellen Superkomplexen bestehend aus alternativem Komplex III und einer Cytochromoxidase die Überführung des bis dahin größten Proteinkomplexes in SMA-*nanodiscs*. Diese maßen etwa 9 x 13 nm und zeigten nur einen dünnen Gürtel aus Lipiden und SMA, der der Kontur des ca. 470 kDa großen und 48 Transmembranhelices (TMHs) umfassenden Proteinkomplexes eng anlag und dadurch nicht mehr kreisförmig erschien. TatC hat eine maximale Breite von etwa 3,5 nm (Ramasamy et al., 2013). Für einen Größenvergleich könnte man von TatBC-Komplexen mit sechs Protomeren, wie sie in Abschnitt 5.5 erarbeitet werden, ausgehen. In diesem Fall hätte eine ringförmige Anordnung der TatC-Untereinheiten ohne dazwischenliegende Freiräume einen maximalen Durchmesser von etwa 7 nm (siehe Abb. D2). Selbst wenn die TMH von TatB in der Peripherie der TatBC-Komplexe vorliegen würde, überschritte ein solcher (TatBC)<sub>6</sub>-Komplex mit einem rechnerischen Molekulargewicht von ca. 320 kDa die beschriebene Größenordnung vermutlich nicht. Es scheint daher unwahrscheinlich, dass TatBC-*nanodiscs* aufgrund von Größeneinschränkungen durch die Fläche der Transmembranbereiche weniger stabil wären als solche mit TatC-Oligomer.

Eine weitere Betrachtungsmöglichkeit wäre, dass die amphipathische Helix (APH) von TatB, die in etwa parallel mit der Membranoberfläche verläuft (vgl. Einleitung Abschnitt 1.3.1), vom TatBC-Komplex absteht. Im Fall von *E. coli* TatB hat die APH eine Länge von ca. 4,7 nm und könnte so, jeweils an zwei gegenüberliegenden Punkten eines (TatBC)<sub>6</sub>-Komplexes positioniert, maximal 9,4 nm zur Ausdehnung des Komplexes beitragen (Abb. D2). Der resultierende maximale Durchmesser dieser extremen Anordnung wäre dann etwa 16,4 nm, was noch immer in der Größenordnung der genannten Referenzwerte liegt. Allerdings gibt es keine Hinweise auf eine solche Orientierung der TatB-APH (Fröbel et al., 2019; Oates et al., 2003; Tarry et al., 2009).

Unabhängig davon könnte eine Ausrichtung der TatB-APH, die über die TatC-Grundfläche hinausragt, aber aufgrund des amphipathischen Charakters zu Problemen bei der Ausbildung des

SMA-Gürtels führen (L. Zhang, Liu, et al., 2014). Zur Interaktion von SMA mit amphipathischen Peptiden liegen aber bisher leider noch keine Daten vor.



**Abbildung D2: Darstellung zum maximalen theoretischen Durchmesser eines (TatBC)<sub>6</sub>-Komplexes.** Betrachtung von *cis*. Die Breite von TatC ist als durchgezogener Pfeil dargestellt (N- zu C-Terminus, Legende rechts oben). Der hypothetische Aufbau eines TatC-Oligomers als Ring aus sechs Einheiten basiert auf Einleitung Abschnitt 1.5.2 und Abschnitt 5.5. Außerdem Darstellung der TatB-TMH (senkrecht zur Bildebene) und der amphipathischen Helix (APH) von einem Molekül TatB. Zwei gegenüberliegende der theoretisch sechs TatB-Moleküle sind als gestrichelte Pfeile in einer sehr raumgreifenden, aber eher unwahrscheinlichen Ausrichtung (siehe Text) dargestellt. Die Darstellung der TatB- (nur TMH und APH, Y. Zhang, Wang et al., 2014; PDB ID: 2MI2) und TatC-Struktur (Rollauer et al., 2012; 4B4A) und die Ausmessung der Längen wurde mithilfe des Programmes PyMOL (Schrödinger, LLC) durchgeführt.

SMA-*nanodiscs* sind ausgesprochen dynamische Membransysteme. Die umschlossenen Lipide werden in großem Maße durch Kollisionen zwischen den Partikeln ausgetauscht (Arenas et al., 2017). Da die Interaktion von TatB und TatC möglicherweise nur schwach affin ist (siehe Abschnitt 5.2.2), könnte schon die geringe Störung der Membranintegrität durch SMA ausreichen, um diese Bindung zu lösen.

Hierbei muss allerdings bedacht werden, dass SMA vorrangig mit Lipiden und kaum mit den Membranproteinen selbst interagiert, was sich bereits am Vorhandensein des Lipidgürtels der *nanodiscs* zeigt (Dörr et al., 2016; Esmaili & Overduin, 2018). Eine direkt durch SMA-vermittelte TatB-Dissoziation könnte also bspw. durch die Anwesenheit von Lipiden an der Stelle der TatB-Bindung erklärt werden, die ein Interkalieren von SMA ermöglichen. Dies könnte wiederum durch die Bestrebung, möglichst kleine *nanodiscs* auszubilden, angetrieben werden: Swainsbury et al. (2017) untersuchten die SMA-Solubilisierung von photosynthetischen Reaktionszentren aus *Rhodobacter sphaeroides*. Über rekombinant angefügte Oligomerisierungsdomänen konnten sie

die Assoziierung dieser Proteinkomplexe miteinander von Mono- bis Tetramer steuern und stellten fest, dass die Solubilisierung mit steigender Superkomplexgröße ineffizienter wurde.

Das beschriebene Szenario würde die Vorstellung einer Positionierung von TatB in der Peripherie der TatBC-Komplexe unterstützen. Würde das Innere eines TatBC-Komplexes Lipide tragen, so könnte man hingegen argumentieren, dass SMA auch hier eindringen und eine Art *nanodisc*-Ring erzeugen könnte. Diese Vorstellung ist allerdings rein hypothetisch, bislang wurde kein solches Phänomen beschrieben.

Tatsächlich wurde der Fall einer spezifischen Komplexdissoziation durch SMA bereits beschrieben: Bei der zuvor erwähnten Isolation von Photosystem I-Trimeren stellten Brady et al. (2019) den selektiven Verlust der peripheren Untereinheit PsaF fest. Dies traf auf die Komplexe der beiden thermophilen Cyanobakterien *Thermosynechococcus elongatus* und *Chroococcidiopsis* sp. TS-821 zu und war bei der Verwendung von DDM nicht der Fall.

Für eine abschließende Aussage über die Interaktionen von SMA-Varianten und thylakoidären TatBC-Komplexen reichen die zur Verfügung stehenden Daten nicht aus. Es lässt sich noch nicht bestimmen, warum es auch bei der SMA-Solubilisierung präferentiell zu einer Dissoziation von TatB und der Erzeugung von TatC-Oligomeren kommt.

#### 5.1.5 Zur Stabilisierung solubilisierter TatBC-Komplexe durch bivalente Metallkationen

Einen bislang gänzlich unbekanntem Einfluss auf das Tat-System scheinen bivalente Kationen zu haben. In Ergebnisse Abschnitt 4.4.1 wurde festgestellt, dass die Behandlung mit dem Komplexbildner Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) die Dissoziation von TatB aus solubilisierten TatBC-Komplexen begünstigt.  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  und alle anderen getesteten Salze bivalenter Metallkationen hemmen die Komplexdissoziation hingegen. Besonders zu beachten ist hierbei Abb. E14 B mit der TX-114-Solubilisierung von Thylakoiden nach einer  $\text{CaCl}_2$ -Behandlung.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen scheinen dabei einen größeren Effekt auszuüben als  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen. Umso unerwarteter ist die Tatsache, dass der Tat-vermittelte Transport an isolierten Thylakoiden, der in einem  $\text{MgCl}_2$ -haltigen Puffer effizient abläuft, mit  $\text{CaCl}_2$  völlig zum Erliegen kommt (Abb. E15). Darüber hinaus ist diese Hemmung komplett umkehrbar, wenn die ursprüngliche  $\text{Mg}^{2+}$ -haltige Umgebung durch Behandlung mit EDTA und  $\text{MgCl}_2$  wiederhergestellt wird. Die Entziehung von Metallionen durch EDTA allein hat nur einen gering hemmenden Effekt auf den Transport (Abb. E15).

Calcium ist ein wichtiger zellulärer Botenstoff, der auch in Chloroplasten in komplexe Regulationsmechanismen integriert ist. Stressreize, der Übergang von Beleuchtung zu Dunkelheit und umgekehrt lösen verschiedene Calciumimpulse aus, die bspw. zahlreiche Teilreaktionen der Photosynthese ansteuern (Hochmal et al., 2015; Kreimer et al., 1988; Portis & Heldt, 1976; Sello



et al., 2018). Unter Ruhebedingungen ist der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel des Stromas im Bereich von  $10^{-7}$  bis  $10^{-6}$  M recht gering. Ein großer Teil des ca. 15 mM plastidären Calciums ist stattdessen in Calciumbindeproteinen oder, neben  $\text{Mg}^{2+}$ , der „Hülle“ negativer Ladungen der Thylakoide gebunden, die sich aus den Kopfgruppen der geladenen Membranlipide ergibt (Hochmal et al., 2015; Kreimer et al., 1987, 1988; Nakatani et al., 1979). Das Thylakoidlumen ist ebenfalls in die Regulationsmechanismen eingebunden und enthält im Ruhezustand etwa  $0,5 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen; das 3- bis 5-Fache des Stromas (Sello et al., 2018).

#### 5.1.5.1 Einfluss von membrangebundenen $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen

Die Bindung von bivalenten Kationen an die Thylakoidmembran ist schon seit langem bekannt (Nakatani et al., 1979).  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind essentiell für die Organisation der Thylakoide in Grana (Barber & Chow, 1979; Izawa & Good, 1966a, 1966b; Murakami & Packer, 1971; Ojakian & Satir, 1974). Hierin könnte ein Ansatzpunkt für die Erklärung der beobachteten Phänomene liegen.  $\text{CaCl}_2$  erhöht die Packungsdichte der Thylakoide. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass mit  $\text{CaCl}_2$ -behandelte Thylakoide stark verklumpen und sich wesentlich schwerer resuspendieren lassen als mit  $\text{MgCl}_2$ -haltigen Puffern allein (Daten nicht gezeigt). Dichter gepackte Thylakoide, vor allem Grana, könnten für Detergenzien schlechter zugänglich sein, was die Solubilisierung behindern und die Stabilität von Membranproteinkomplexen fördern könnte. Diese Annahme impliziert jedoch, dass die TatBC-Komplexe sich zumindest zu einem großen Teil in den Grana befinden, was unwahrscheinlich ist, wie im folgenden Abschnitt diskutiert wird.

#### 5.1.5.2 Zur thylakoidären Lokalisierung von Tat

Bisherige Daten deuten darauf hin, dass sich die Tat-Proteine hauptsächlich in den exponierten Stromalamellen der Thylakoide befinden. Eine effiziente Solubilisierung mit Digitonin erfolgt hauptsächlich in diesen Bereichen (Koochak et al., 2019; siehe auch Abschnitt 5.1.3.1). Dies spiegelt sich auch in der effizienteren gleichzeitigen Extraktion des Photosystems I (Stromalamellen) wieder, während Photosystem II (Grana) unterrepräsentiert ist (Anderson & Boardman, 1966; Järvi et al., 2011; Koochak et al., 2019; Krause, 2006; Rantala et al., 2017). Mori et al. schlussfolgerten bereits 1999 aus der Beobachtung der Solubilisierung durch Digitonin, dass TatBC-Komplexe in den ungepackten Stromalamellen vorliegen.

In dieser Arbeit wurde des Weiteren festgestellt, dass geringe Konzentrationen von CHAPS TatB und TatC aus Thylakoidmembranen extrahieren können, ohne dass dabei chlorophyllhaltige Proteine solubilisiert werden (Abb. E10). Ein ähnliches Verhalten zeigte die Solubilisierung von TatC-Oligomeren mit der SMA-Variante XIRAN 40. Im Gegensatz zu XIRAN 25 und 30 scheint dieser Stoff thylakoidäre Membranproteine im Allgemeinen nur sehr ineffizient zu solubilisieren (vgl.

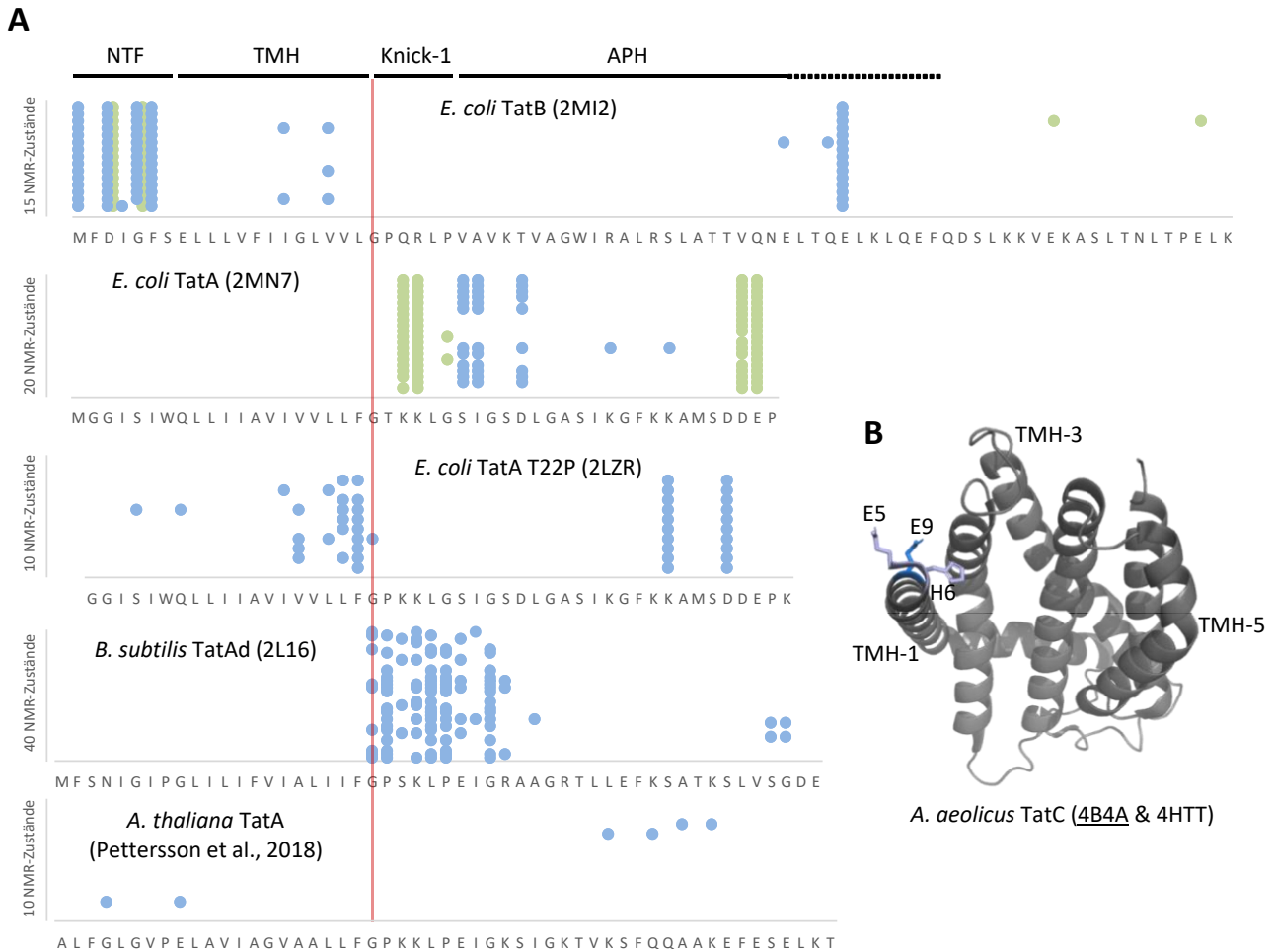
Abb. E17 B und Korotych et al., 2019). Paradoxerweise extrahiert XIRAN 40 TatC-Oligomere aber besser als die beiden anderen SMA-Varianten. Zusammengefasst mit der Solubilisierung durch niedrige CHAPS-Konzentrationen deutet dies darauf hin, dass sich die Membrenumgebung der Tat-Komplexe erheblich von der anderer thylakoidärer Membranproteine unterscheiden könnte. Diese interessanten Beobachtungen stehen möglicherweise in Zusammenhang mit der in Abschnitt 5.2.4 angesprochenen spezifischen Rolle von Membranlipiden.

#### 5.1.5.3 Sind die Tat-Proteine selbst in der Lage Metallionen zu binden?

Wie beschrieben kann man vermutlich ausschließen, dass die Stabilisierung der solubilisierten TatBC-Komplexe auf den Einfluss des  $\text{CaCl}_2$  auf die Organisation der Thylakoide zurückzuführen ist.

Die Effekte der  $\text{CaCl}_2$  bzw. EDTA-Behandlung zeigen sich auch, wenn die TatBC-Komplexe bereits solubilisiert sind (Abb. E13). Da in Detergenzmizellen weniger Lipide enthalten sind als in der natürlichen Membrenumgebung, könnte dies auch ein Hinweis auf eine Interaktion der Metallionen mit den Tat-Proteinen selbst sein. Dies stellt einen zweiten Erklärungsansatz für den beobachteten Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  auf das Tat-System dar. Tatsächlich wird bspw. das TIC-System (*translocon of the inner membrane of chloroplasts*), ein Teil der Proteinimportmaschinerie der Chloroplasten, in großem Maße durch Calcium reguliert: Das Protein Tic110 reagiert direkt auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel, während Tic32 durch die Bindung von Calmodulin reguliert wird (Balsera et al., 2009; Chigri et al., 2005, 2006). Ebenfalls interessant ist auch das Verhalten des *chloride intracellular channel 1* (CLIC1), der im Cytoplasma und der Kern-, ER und Plasmamembran von Säugerzellen vorkommt. Dieses Protein ist eigentlich löslich, kann aber spontan in Membranen inserieren, wenn  $\text{Zn}^{2+}$  und/oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vorliegen.  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen können die Insertion hingegen nicht auslösen (Varela et al., 2019, Vorabveröffentlichung). Diese duale Lokalisierung erinnert an die Proteine der TatAB-Familie (vgl. Einleitung Abschnitt 1.3.1). Zu einem Einfluss von Metallionen bei der Membraninsertion gibt es im Fall der Tat-Proteine allerdings bislang keine Anhaltspunkte.

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob die Tat-Proteine direkt durch  $\text{Mg}^{2+}$ - oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beeinflusst werden könnten, wurden die 3D-Strukturdaten von bakteriellem TatA, TatB und TatC und *A. thaliana* TatA mithilfe des Programms IonCom (X. Hu et al., 2016) zur Vorhersage potenzieller Bindestellen analysiert (Abb. D3). Die Analyse von Strukturdaten eines plastidären TatB-Proteins wäre noch aufschlussreicher, diese stehen aber leider noch nicht zur Verfügung.



**Abbildung D3: Vorhersage von  $Mg^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -Bindestellen für verschiedene Tat-Proteine. A** Die 3D-Strukturdaten von *E. coli* TatB (Y. Zhang, Wang et al., 2014; PDB-ID: 2MI2), TatA (Y. Zhang, Hu et al., 2014; 2MN7 sowie Rodriguez et al., 2013; 2LZR), *Bacillus subtilis* TatAd (Hu et al., 2010; 2L16) und *Arabidopsis thaliana* TatA (Pettersson et al., 2018) wurden mithilfe des Programms IonCom (Hu et al., 2016) auf potenzielle Bindestellen für  $Mg^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen untersucht. Da die NMR-Daten mehrere Konformationen enthalten, wurde jede einzeln analysiert („NMR-Zustände“). Die Aminosäuresequenzen der Proteine sind dargestellt und auf das Glycin der Knick-1-Region zentriert (rote Linie). Die Aminosäurereste, für die eine Bindung vorhergesagt ist, sind mit Kreisen markiert ( $Mg^{2+}$  ●,  $Ca^{2+}$  ●). **B** IonCom-Analyse der 3D-Strukturdaten von *Aquifex aeolicus* TatC (Rollauer et al., 2012; 4B4A sowie Ramasamy et al., 2013; 4HTT). Darstellung der TatC-Struktur nach Rollauer et al., Sicht von *cis*. Die Aminosäurereste, für die eine Bindung an  $Ca^{2+}$ -Ionen vorhergesagt sind, sind in hellblau (Vorhersage für jeweils ein TatC-Modell) oder dunkelblau (Vorhersage für beide Modelle) dargestellt. Das Bild wurde mithilfe des Programms PyMOL (Schrödinger, LLC) erstellt.

In Bildteil A sind die Sequenzen der *E. coli* Proteine TatB, TatA, TatA T22P, *Bacillus subtilis* TatAd und *A. thaliana* TatA dargestellt, die mittels Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie untersucht wurden (vgl. auch Einleitung Abb. N3). Da die Auswertung der NMR-Daten mehrere mögliche Konformationen liefert, wurden diese „NMR-Zustände“ einzeln analysiert. Reste, für die eine Interaktion mit  $Mg^{2+}$ -Ionen vorhergesagt wird, sind grün und für  $Ca^{2+}$ -Ionen blau gefärbt. Für *E. coli* TatB wird eine Bindung von  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  für fast alle Konformationen im Bereich des N-terminalen Fortsatzes vorhergesagt. In der TMH und APH finden sich wenige Reste auf die dies

zutrifft, bis auf einen E-Rest der C-proximalen APH, für die in allen Zuständen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung vorhergesagt ist. Für die drei analysierten bakteriellen TatA-Varianten liegt der Schwerpunkt der vorhergesagten  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung in der TMH oder APH in der Nähe der Knick-1-Region (Übergang von TMH zu APH). Eine  $\text{Mg}^{2+}$ -Bindung wird nur für die TatA-Daten von Zhang, Hu et al. (2014) in der APH vorhergesagt. Interessant ist auch die Verschiedenheit der Vorhersagen für die Strukturdaten von 2MN7 und 2LZR für *E. coli* TatA, bei denen sich die Proteinsequenz nur an den Termini und im Aminosäureaustausch T22P unterscheidet.

Da es sich bei *A. thaliana* TatA um ein pflanzliches Tat-Protein handelt, wurde nach den experimentellen Daten und der oben beschriebenen wichtigen Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in Chloroplasten erwartet, dass IonCom ebenfalls zahlreiche Aminosäurereste als calciumbindend vorhersagen würde. Daher ist es überraschend, dass dies nur punktuell der Fall ist. Nur in drei der zehn NMR-Strukturen nach Pettersson et al. (2018) könnten Reste von NTF (N-terminalem Fortsatz) und TMH bzw. der C-proximalen APH Calciumionen binden, während für Magnesiumionen keine Bindung vorhergesagt wurde. Es ist anzumerken, dass die Daten für *A. thaliana* TatA eine deutlich höhere Flexibilität des Proteins widerspiegeln als bei den Untersuchungen der bakteriellen Proteine. Die einzelnen Tertiärstrukturzustände von *A. thaliana* TatA unterscheiden sich deutlich stärker voneinander, weswegen es nicht verwunderlich ist, dass das Ergebnis der Ionenbindungsvorhersage sehr uneinheitlich ist. Eine weitere Variante der Auslegung dieser Daten ist auch, dass die Bindung von Calciumionen von den zahlreichen möglichen Konformationen bestimmte Zustände stabilisieren könnte.

Nach der Betrachtung aller Daten ist grundsätzlich festzuhalten, dass eine Bindung von bivalenten Kationen an TatAB-Proteine möglich sein könnte. Weiterhin ist es wahrscheinlich, dass die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  unterschiedliche Reste einschließt. Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Effekte der beiden Metallionen sein. Aber auch die Ausbildung von unterschiedlich stabilen Metallkomplexen an denselben Resten, bspw. am NTF von TatB, könnte je nach Ion unterschiedliche Effekte haben.

Die IonCom-Analyse wurde auch für die röntgenkristallographischen Strukturdaten von *Aquifex aeolicus*-TatC (Ramasamy et al., 2013; Rollauer et al., 2012) durchgeführt. Im Gegensatz zur NMR-Analyse ergibt die Auswertung der Strukturdaten in diesen Fällen jeweils nur eine Konformation. Die Reste, für die eine Calciumbindung vorhergesagt ist, sind in Abb. D3 B in der Darstellung von TatC (nach Rollauer et al., 2012) blau markiert.

Der Rest E9 (dunkelblau) wurde für beide TatC-Strukturen und E3 und H5 (hellblau) für jeweils eine Struktur als calciumbindend ausgegeben. Eine Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  durch den Anfang der TMH-1 in TatC wäre also denkbar. Keine Aminosäure wurde als mutmaßlich magnesiumbindend vorhergesagt. Es wäre also vorstellbar, dass alle Tat-Proteine mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen interagieren.

Über den Mechanismus eines mutmaßlichen direkten Einflusses von bivalenten Kationen, besonders  $\text{Ca}^{2+}$ , können nur Vermutungen angestellt werden. Wie in Abschnitt 5.2.2 beschrieben, könnte eine schwach affine Bindung von TatB im ruhenden TatBC-Komplex, d. h. ohne gebundenes Substratprotein, ein wichtiger Teil der Funktion sein. Möglicherweise wird hierdurch die Fähigkeit zum Wechsel zwischen zwei verschiedenen Positionen im Komplex gewährleistet. So könnten die Feststellungen, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sowohl zu einer höheren Komplexstabilität als auch zu einer Hemmung der Transportaktivität führen, miteinander vereinbart werden: Eine unphysiologisch starke Verbindung von TatB und TatC wäre dann eine mögliche Erklärung. Dadurch könnte einerseits der funktionelle Wechsel von TatB zu einer anderen Position im Komplex behindert und andererseits die Dissoziation von TatB aus solubilisierten Komplexen verringert werden. Die Fähigkeit zur initialen Substratbindung bliebe davon unbeeinflusst (vgl. Abb. E15).

Hierfür infrage kommen würde möglicherweise der TatB-NTF, der sich in räumlicher Nähe zur „polaren Gruppe“, einer Häufung relativ hydrophiler Aminosäuren in *trans*-Brücke-3 von TatC befindet (Einleitung Abschnitt 1.5.2.1), für die zwar keine Calciumbindung vorhergesagt ist, die aber durch Anwesenheit eines negativ geladenen Aspartatrestes (vgl. Abschnitt 1.3.2.2) mit Kationen wechselwirken könnte. Weiterhin befindet sich die mutmaßlich calciumbindende Region der bakteriellen TatB-homologen TatA-Proteine um Knick-1 vermutlich in der Nähe der Domäne von TatC, die das RR-Motiv der Tat-Signalpeptide bindet (RR-BD). Dort könnte am Beginn der TMH-1 ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden werden. Es gäbe also zwei interessante Positionen in der Kontaktfläche von Proteinen der TatAB-Familie und der TatC-Familie, an denen Calciumionen die postulierte Stabilisierung der TatB-Bindung bewirken könnten.

Bei all diesen Überlegungen muss allerdings festgehalten werden, dass der stabilisierende Effekt nicht spezifisch für  $\text{Ca}^{2+}$  ist, sondern sich auch für eine Reihe anderer bivalenter Metallionen zeigt (Anhang Abb. A11) und auch proportional zur Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  ist, anstatt ein Optimum zu zeigen (Abb. E14 A). Dies könnte gegen eine funktionelle bspw. regulatorische Rolle und für einen allgemeineren Effekt der Ionen sprechen.

Ein weiterer interessanter Erklärungsansatz für die stabilisierende Wirkung von Metallionen auf TatBC-Komplexe wäre, dass die in Abschnitt 5.1.5.1 erwähnten Wechselwirkungen zwischen

bivalenten Kationen und Thylakoidlipiden den Verbleib der Lipide an den solubilisierten Membranproteinkomplexen begünstigen könnten, was sich möglicherweise förderlich auf deren Stabilität auswirken würde.

Fazit:

Die Dissoziation von TatB aus TatBC-Komplexen ist wahrscheinlich ein weitaus häufiger auftretendes Phänomen als bisher angenommen, das jetzt korrekt eingeordnet werden kann. Die Komplexdissoziation zeigt, dass TatBC-Komplexe zwei strukturelle Ebenen besitzen: Die grundlegenden TatC-Oligomere sind anscheinend stabiler und lassen sich mit zahlreichen Detergenzien und SMA erzeugen. Die Bindung von TatB kann hingegen nur mit der gehemmten Solubilisierung von Digitonin erhalten werden. In Chloroplasten könnte die Stärke der Bindung von TatB an TatC und die Funktion der Tat-Translokase durch Calciumionen reguliert werden.

## 5.2 Zum Mechanismus der TatB-Dissoziation

Nachdem die Abhängigkeit der Komplexdissoziation von einem breiten Spektrum an Faktoren dargestellt und das Phänomen in die bestehende Literatur eingeordnet wurde, soll nun diskutiert werden, warum es auftritt.

### 5.2.1 Schlüsselpositionen der Tat-Proteine, die die Komplexdissoziation fördern

Mutationen in Tat-Proteinen, die die Komplexdissoziation begünstigen sind von besonderem Interesse, da sie Rückschlüsse über die Interaktionen zulassen, die dabei gelöst werden. Alcock et al. stellten fest, dass die Mutation M205R und die kombinierten Mutationen M205A, T208A, Q215A in der polaren Gruppe, einem wichtigen Bestandteil der TatB-Bindedomäne (Tat-BD), von *E. coli*-TatC zum Verlust von TatB bei der Immunopräzipitation von TatC führten (Alcock et al., 2016, Fig. 6 B). Nach Ma & Cline führte eine Mutation des hydrophilsten Restes D276 der polaren Gruppe in Erbsen-TatC zu einer verstärkten Komplexdissoziation (Ma & Cline, 2013, Fig. 2 A, Spur 12). Weitere Mutationen in TMH-5 und in TMH-6 führten ebenfalls zu diesem Effekt (Fig. 5 A). Auch Buchanan et al. zeigten eine geschwächte TatB-Bindung an Komplexe mit der *E. coli*-TatC-Variante D211A, bei der die Mutation ebenfalls in der polaren Gruppe liegt (Buchanan et al., 2002, Fig. 6). Behrendt & Brüser fanden für *E. coli* TatC mit der Mutation L189A (*cis*-Brücke-2, Anfang TMH-5) einen ähnlichen Sachverhalt: Während für Wildtyp-TatC bei der Verwendung von nicht bindefähigem Tat-Substrat (Spuren „RK“, analog zur Abwesenheit von Substrat) Tat-Komplexe mit 580 kDa und 440 kDa auftraten, zeigten sich mit der TatC-Variante L189A nur die 440 kDa-Komplexe. Dies könnte auf eine erhöhte Dissoziationstendenz der TatC(L189A)-tragenden Komplexe hindeuten (Behrendt & Brüser, 2014, Fig. 6 A).

Ma et al. führten eine Studie zur Assoziierung von TatB in TatBC-Komplexe von Erbse mit einzelnen Aminosäureaustauschen gegen Cystein über einen großen Teil der Proteinsequenz durch (Ma et al., 2018, Fig. 2). Dazu wurden Thylakoide mit den radioaktiv markierten TatB-Varianten versetzt, die in die TatBC-Komplexe eingebaut wurden. Hier zeigten sich allerdings keine Signalmuster ähnlich der Komplexdissoziation. Stattdessen bewirkte die Mutation von sehr wichtigen Resten wie E11C (hydrophiler Rest der TMH) sowie G24C und G27C (Knick-1) ein völliges Ausbleiben der Komplexmarkierung (vgl. auch Alcock et al., 2016 Fig. 2 B TatB-Mutation E8A). Andere Mutationen schienen keinen Einfluss auf die Verteilung der Komplexspezies zu haben.

Zusätzlich ist jedoch zu beachten, dass die Menge des radioaktiven TatB im Komplex durch die Komplexdissoziation abnimmt. Dadurch sinkt die radioaktive Signalintensität der kleineren Komplexe ab, während das TatC-Oligomer überhaupt nicht zu detektieren ist.

Insgesamt zeigen die Daten, dass die Stärke der Interaktion von TatB und TatC vor allem an der TatB-Bindedomäne (TMH-5, *trans*-Brücke-3 und TMH-6, vgl. Einleitung Abschnitt 1.3.2.2) die Tendenz zur Komplexdissoziation beeinflusst. Im Umkehrschluss unterstützen diese Beobachtungen die Vermutung, dass der TatB-Verlust das entscheidende Phänomen bei der Komplexdissoziation ist.

### 5.2.2 Die TatB-TatC-Bindung ist eher niedrig affin und dynamisch

Der Überblick über alle Daten dieser Arbeit lässt vermuten, dass die TatB-TatC-Interaktion im ruhenden Komplex, d. h. ohne Substrat, wesentlich schwächer ist als die TatC-TatC-Interaktion: Die Solubilisierung mit DDM, TX-100, CHAPS, drei SMA-Varianten und die Behandlung digitoninsolubilisierter Proben mit Wärme (je Abb. E2, E3, E8, E9, E10 und E17) dissoziiert TatB, aber führt kaum zum Zerfallen der TatC-Oligomere. Auch scheint die TatC-TatC-Interaktion im Gegensatz zu der von TatB und TatC nicht durch EDTA destabilisiert zu werden, da alle dabei auftretenden Signale durch die TatB-Dissoziation erklärbar sind (Abb. E12 und E13).

Eine zum Lösungsmittel exponierte Position von TatB in den TatBC-Komplexen könnte eine einfache Erklärung für die Tendenz zur Dissoziation sein. Dabei könnte die Bindung an TatC möglicherweise besonders leicht von Detergenzien gestört werden. Die meisten Modelle gehen im Moment allerdings davon aus, dass TatB in ein TatC-Oligomer eingebettet ist (vgl. auch Einleitung Abschnitt 1.5.2 und Abb. N6). Unabhängig vom tatsächlichen Aufbau der Komplexe könnte daher auch eine eher niedrig affine und dynamische TatB-Bindung die Ursache für die Neigung zum TatB-Verlust sein.

Eine solche geringe Affinität und Stabilität der Bindung könnte eine wichtige Eigenschaft von TatB darstellen: Zum einen ähnelt TatB TatA, das zwar ein unverzichtbarer Bestandteil der aktivierten

Tat-Translokase ist, aber für Pflanzen noch nie in dauerhafter Assoziation mit dem TatBC-Komplex gezeigt wurde (Einleitung Abschnitt 1.5.2). Zum anderen legen die Daten von Habersetzer et al. (2017) für *E. coli* nahe, dass TatB und vor allem die TMH-Interaktionen, eine gewisse Dynamik aufweisen müssen, um den postulierten Positionswechsel mit TatA vollziehen zu können. So könnte TatB auch den Zugang von TatA in den Komplex regulieren (vgl. Einleitung Abschnitt 1.5.4). Für pflanzliche Tat-Systeme wurde dieser Tausch zwar bisher nicht gezeigt, aber da die TatA-TMH an einer Stelle von TatC sehr nahe der TatB-Bindedomäne binden kann, diskutierten Aldridge et al. (2014), dass die TatB-TatC-Bindung Fluktuationen (in der Publikation als „Atmen“ bezeichnet) unterliegt, die ein Eindringen von TatA ermöglichen. Auch Cline (2015) diskutierte in einem *Review*, dass ein solches „Atmen“ den Zutritt von TatA in den Komplex ermöglichen könnte. Außerdem ist die Interaktion des TatB-homologen TatA mit TatC so flexibel, dass TatA bei der Aktivierung durch Substratbindung noch eine weitere Stelle an TMH-4 von TatC binden kann (Aldridge et al., 2014).

Zinecker et al. (2020) zeigten des Weiteren, dass rekombinant synthetisiertes lösliches TatB die Funktion von thylakoidären TatBC-Komplexen wiederherstellen konnte, die zuvor mit TatB-spezifischen Antikörpern behandelt worden waren. Hierbei gibt es zwei Erklärungsansätze: Das antikörpergebundene TatB könnte durch das hinzugefügte ausgetauscht werden. Alternativ könnten sich mit mutmaßlich frei vorliegendem thylakoidärem TatC neue TatBC-Komplexe bilden. Die Daten meiner Arbeit deuten nicht darauf hin, dass in Thylakoiden freie TatC-Oligomere vorliegen (siehe auch Cline & Mori 2001, Fig. 3). Im Gegenteil zeigen sich bei der Digitoninsolubilisierung von Thylakoiden oft TatB-spezifische Signale, die als Überschuss von monomerem Protein interpretiert werden können (vgl. Abb. E2 und E10 A Spur „Digi“ sowie Jakob et al. (2009), Fig. 3 und Cline & Mori, 2001, Fig. 3). Entsprechend beschrieben Alami et al. (2003), dass ein Überschuss von TatC gegenüber TatB in *E. coli* den Kontakt zwischen TatB und Signalpeptiden beeinträchtigt. Möglicherweise konkurrieren TatC-Oligomere, die ohne TatB nicht transportkompetent sind, mit TatBC-Komplexen um die initiale Bindung der Substrate (vgl. Einleitung Abschnitt 1.5.3), was die Effizienz des Transportes hemmen könnte. Die Daten von Zinecker et al. deuten daher darauf hin, dass das antikörpergebundene komplexständige TatB durch das zugegebene ersetzt wurde. Dieser mutmaßliche Austausch scheint außerdem sehr schnell zu sein: Schon nach der Zeit, die die Handgriffe zur Bearbeitung der Proben erfordern, führte die Inkubation von löslichem TatB mit Thylakoiden (bei 0 °C!) zur maximalen Transportaktivität (Zinecker et al., 2020, *Supplemental Material* Fig. S1).

Wie am Ende von Einleitung Abschnitt 1.5.2.1 beschrieben, zeigten Barrett et al. (2007) und



Zinecker et al. (2020) außerdem, dass Proteine, die die Funktion von TatB prinzipiell ausüben können, nicht notwendigerweise als Bestandteil der Tat-Komplexe nachweisbar sind.

All dies deutet darauf hin, dass die Bindung von TatB im TatBC-Komplex eine niedrige Affinität aufweist und eher dynamisch ist. In Analogie zum erwähnten Modell von Habersetzer et al. (2017) könnte man vermuten, dass dies einen Positionswechsel von TatB bei der Aktivierung des Komplexes durch die Substratbindung ermöglichen soll. Ein daraus resultierendes Zwei-Stufen-Modell der TatB-Bindung wird in Abschnitt 5.3.4 erläutert.

### 5.2.3 Sind gleiche TatB-Moleküle eines TatBC-Komplexes ungleich gebunden?

Es gibt Hinweise darauf, dass TatBC-Komplexe von *E. coli* in Gestalt und Eigenschaften nicht kreisrund sind, sondern eher elliptisch. In Oates et al. (2003) und Tarry et al. (2009) stellten zwei verschiedene Arbeitsgruppen in elektronenmikroskopischen Analysen eine leicht elliptische Form der TatABC- bzw. TatBC-Komplexe fest. Rose et al. (2013) beobachteten mit fluoreszenzmarkierten Tat-Proteinen, dass TatB-Oligomere eine kreisrunde Form aufwiesen, während mutmaßliche TatC-Oligomere nicht gänzlich rund erschienen.

Für TatBC-Komplexe, die mit zwei Substratmolekülen beladen waren, zeigten Tarry et al. außerdem, dass die reifen Anteile stets in enger Nachbarschaft an nur einer Seite des Komplexes vorlagen und nicht etwa zufällig verteilt oder gegenüberliegend. In eine ähnliche Richtung argumentierten Wojnowska et al. (2018), die aufgrund der substöchiometrischen Bindung von Substratproteinen durch TatBC-Komplexe vermuteten, dass die Bindestellen im Komplex unterschiedliche Affinitäten aufwiesen. Hierbei postulierten die Autoren einen Zusammenhang zu einer intrinsischen Asymmetrie des TatBC-Komplexes. Zusammengenommen könnten die Interaktionen gleicher Proteine je nach Position im mutmaßlich elliptischen TatBC-Komplex unterschiedlich affin sein. Aus diesem Grund könnten bei einer Solubilisierung bestimmte TatB-Proteine, die an weniger affin bindenden Stellen des TatBC-Komplexes vorliegen, besonders leicht dissoziieren.

Man könnte weiterhin die Hypothese aufstellen, dass der Verlust von TatB den Übergang zu stabileren Komplexformen darstellt. Möglicherweise existieren zu jeder Komplexspezies Bedingungen (z. B. die Konzentration von löslichem TatB, Detergens, Lipiden oder Temperatur), bei der sie den Gleichgewichtszustand an TatB-Beladung, also Einbau kontra Dissoziation, der TatBC-Komplexe darstellt. Dabei wäre das TatC-Oligomer die stabilste Form. Dies ist allerdings rein hypothetisch. Auch waren die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente nicht auf die Generierung solcher Gleichgewichte ausgelegt. Im Rahmen der Arbeit zeigten sich außerdem keinerlei Hinweise auf einen Einbau von TatB in solubilierte Komplexe. Dies wurde auch von

Fincher et al (2003, Fig. 4) festgestellt.

Für zukünftige Untersuchungen in diese Richtung ist die Darstellung des TatB-Einbaus in TatC-Oligomere oder nicht vollständig mit TatB beladene TatBC-Komplexe Voraussetzung. Grundsätzlich sollte die *in vitro*-Assemblierung von TatB in rekonstituierte Tat(B)C-Komplexe aber möglich sein (vgl. Fincher et al., 2003; Zinecker et al., 2020). Der erfolgreiche Nachweis der Rekonstitution von TatC-Oligomeren in das Thylakoidvesikel-Modellsystem ist ein vielversprechender Schritt in diese Richtung (vgl. Ergebnisse Abschnitt 4.7.2).

#### 5.2.4 Zur Rolle von Lipiden im TatBC-Komplex

Bereits 1972 vermuteten Singer & Nicolson, dass Proteine existieren, die spezifisch Lipide binden. Die Bindung von Lipiden der Monogalactosyldiacylglycerol- und Sulfoquinovosyldiacylglycerolgruppe an thylakoidäre ATP-Synthase-Komplexe und der Phosphatidylglycerolgruppe an Photosystem I und Lichtsammelkomplex II ist ebenfalls schon länger bekannt (Webb & Green, 1991). Die Lipidumgebung beeinflusst sämtliche Aspekte eines Membranproteins und bildet mit ihm eine untrennbare funktionelle Einheit (bspw. Cournia et al., 2015; Overduin & Esmaili, 2019). Es gibt bisher nur wenige, aber sehr interessante Hinweise darauf, dass auch der Tat-Translokationsapparat auf spezifische Lipidinteraktionen angewiesen ist:

Nach Mikhaleva et al. (1999) ist das Tat-System von *E. coli* auf Lipide der Phosphatidylethanolamingruppe (PE) angewiesen, aber nicht auf Phosphatidylglycerole (PG) oder Cardiolipin (CL). Zu demselben Schluss kamen Rathmann et al. (2017). Sikdar & Doerrler (2010) vermuteten außerdem, dass die gehemmte Aktivität des Tat-Systems in der *E. coli*-Mutante BC202 auf den erhöhten Anteil von PG-Lipiden und CL in der Cytoplasmamembran zurückzuführen sei. Besonders hervorgehoben werden soll die damit übereinstimmende Publikation von Wojnowska et al., in der 2018 die Anwesenheit großer Mengen Lipide in isolierten *E. coli* TatBC-Komplexen gezeigt wurde. Dazu wurde das zu Digitonin strukturverwandte Detergens Glycodiosgenin verwendet, was ebenfalls in der Lage ist, intakte TatBC-Komplexe zu solubilisieren. Mit massenspektrometrischer Analyse wurden pro TatBC-Komplex etwa 129 Moleküle PE; 1,5 PG und 0,36 CL nachgewiesen. Diese Verteilung von 98,6 % PE; 1,1 % PG; 0,3 % CL weicht von der durchschnittlichen Zusammensetzung der Plasmamembran ab (70-80 % PE; 15-25 % PG; 5-10 % CL; Kadner (1996) in Neidhardt & Curtiss (1996); nach Wojnowska et al., 2018). PE ist demnach in den von Wojnowska et al. präparierten TatBC-Komplexen deutlich überrepräsentiert. Phosphatidylethanolamin-Lipide scheinen demnach zumindest für das Tat-System von *E. coli* eine funktionelle Relevanz zu besitzen.

Weiterhin diskutierten Wojnowska et al., dass ein Lipidgürtel eine stabilisierende Wirkung auf die solubilisierten TatBC-Komplexe haben könnte (vgl. Abschnitt 5.1.3).

Fazit:

Der entscheidende Punkt der TatB-TatC-Interaktion ist die Bindung von TatB an die TatB-BD von TatC. Eine niedrige Bindungsaffinität an dieser Stelle könnte eine Dynamik schaffen, die entscheidend für die Funktionalität sein könnte. Ein Nebeneffekt der niedrig affinen Bindung könnte die erleichterte Dissoziation von TatB aus solubilisierten Komplexen sein.

TatBC-Komplexe sind möglicherweise nicht kreissymmetrisch, sondern eher elliptisch, wodurch die Bindungsstabilität gleicher TatB-Moleküle an unterschiedlichen Stellen des Komplexes zusätzlich moduliert sein könnte. Die Funktion und Stabilität von TatBC-Komplexen könnte auf spezifische Membranlipide, vor allem aus der Phosphatidylethanolamingruppe, angewiesen sein.

### 5.3 Die Bindung von Substrat ändert die Eigenschaften des TatBC-Komplexes

Die Bindung von Substratproteinen durch die TatBC-Komplexe verursacht anscheinend weitreichende Veränderungen der Komplexeigenschaften. Auf diese wird im folgenden Abschnitt weiter eingegangen. Zur Vorbereitung dieses Diskussionsabschnittes wird aber zunächst die Frage behandelt, warum gebundene Substrate in BN-PAGE-Analysen häufig nur zu einer geringen Erhöhung des Molekulargewichtes der TatBC-Komplexe führen.

#### 5.3.1 Solubilierte TatBC-Komplexe tragen anscheinend nur wenig Substratmoleküle

Die Bindung von Substratmolekülen an TatBC-Komplexe lässt sich mithilfe von BN-PAGE-Analysen zweifelsfrei zeigen (siehe Abb. E4, E5 und E9). Das gebundene Substrat trägt zum Gesamtmolekulargewicht des Komplexes bei, was sich in einer Erhöhung des apparenten Molekulargewichtes in der BN-PAGE äußert (Cline & Mori, 2001; Dissertation E. Fan, 2008; Fincher et al., 2003; Jakob et al., 2009; X. Ma & Cline, 2013). Theoretisch kann man aus dieser Verschiebung auf die Anzahl der gebundenen Substratmoleküle schließen. Es wird allgemein angenommen, dass TatBC-Komplexe aus mehreren Protomeren bestehen, die grundsätzlich jeweils in der Lage sind, Substratmoleküle zu binden (vgl. Einleitung Abschnitt 1.5.3). Nun stellt sich die Frage, ob die Verschiebung des apparenten Molekulargewichts vollständig substratbeladener TatBC-Komplexe darauf schließen lässt, dass jedes TatBC-Protomer ein Substrat trägt. Die Frage nach der Zahl der Protomere in einem TatBC-Komplex ist nach wie vor Gegenstand der Diskussion (siehe auch Abschnitt 5.5). Celedon & Cline (2012) berichteten, dass Komplexe aus Erbse wahrscheinlich acht dieser TatBC-Dimere besitzen und auch acht Substratmoleküle binden könnten. Selbst bei einer alternativen Protomerzahl von sechs, die in

Abschnitt 5.5 erarbeitet wird, sollte demnach mit der BN-PAGE-Analyse der Nachweis von bis zu sechs gebundenen Substraten möglich sein. Die Literaturdaten scheinen allerdings eher darauf hinzudeuten, dass wesentlich weniger Substratmoleküle pro Komplex vorliegen:

Cline & Mori führten einen BN-PAGE-Vergleich von substratfreien Erbsen-TatBC-Komplexen und solchen, die das Substrat tOE17 (ca. 18 kDa, vgl. auch Abb. D4) trugen, durch, bei der eine Verschiebung des apparenten Molekulargewichtes festgestellt wurde. Allerdings liegt diese, auch unter Beachtung der mäßigen Auflösung in diesem Größenbereich der BN-PAGE, nicht im Bereich des bei sechs Substratmolekülen zu erwartenden Molekulargewichts von ca. 110 kDa (Cline & Mori, 2001, Fig. 4A). Dies trifft auch auf das parallel verwendete Substrat DT23 (ca. 19 kDa, nach Henry et al., 1997 und NCBI: AAP43511.1) zu. Mit sechs Molekülen würde das apparente Molekulargewicht um etwa 115 kDa steigen, was nicht der Fall ist. Fincher et al. verwendeten in einem analogen Experiment ebenfalls DT23. Die Daten zeigen dasselbe Phänomen (Fincher et al., 2003 Fig. 5). Auch die Daten von Jakob et al. weisen auf eine Verschiebung des Molekulargewichts der TatBC-Komplexe von *A. thaliana* durch die Bindung des Substrates 16-EGFP (ca. 46 kDa, nach NCBI: P12301.1 und SCV58932.1) hin, die allerdings nicht die bei sechs Molekülen zu erwartenden 276 kDa widerspiegelt (Jakob et al., 2009, Fig. 3). Weiterhin zeigen Experimente von Ma & Cline, die mit dem tOE17-Derivat V-20F (ca. 18 kDa, wie tOE17) durchgeführt wurden, welches außergewöhnlich intensiv an TatBC-Komplexe bindet (siehe hierzu auch Abschnitt 5.3.2) und daher vermutlich viele Bindestellen besetzen sollte, einen ähnlichen Trend.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine direkten Vergleiche zwischen mit dem Substrat tQTP<sup>CF</sup> (siehe Material Abschnitt 2.10)-beladenen und substratfreien TatBC-Komplexen durchgeführt wurden, sollte der Größenunterschied beim Vorliegen von sechs Molekülen tQTP<sup>CF</sup> mit einem Molekulargewicht von 13,2 kDa (siehe Material Abschnitt 2.10) deutlich zu erkennen sein (ca. 80 kDa). Anscheinend liegen also deutlich weniger als sechs Substratmoleküle an den solubilisierten TatBC-Komplexen vor. Weitere Quellen deuten an, dass es sich eher um ein bis zwei Moleküle handeln könnte:

In der Dissertation von Enguo Fan (2008) wurde die elektrophoretische Laufweite von TatBC-Komplexen, die mit dem Substrat 16/23-EGFP beladen wurden, analysiert und vermutet, dass diese ein bis zwei Substratmoleküle tragen (Dissertation Fan, 2008, Fig. 3.12). Auch Elektronenmikroskopiedaten von Tarry et al. (2009) wiesen auf höchstens zwei Substrate an *E. coli*-TatBC-Komplexen hin. Von Wojnowska et al. (2018) ebenfalls für *E. coli* durchgeführte Bindeanalysen mit isothermaler Kalorimetrie mit isolierten TatBC-Komplexen ergaben ein Verhältnis von etwa einem Substratmolekül zu zwei bis drei TatC.

Es erscheint demzufolge sehr wahrscheinlich, dass solubilisierete TatBC-Komplexe höchstens ca. 2 Substratmoleküle tragen. Die Gründe hierfür sind unklar, allerdings könnte eine Verbindung zur postulierten Elliptizität der TatBC-Komplexe und den möglicherweise ungleichen Bindeaffinitäten gleicher Komplexuntereinheiten bestehen (siehe Abschnitt 5.2.3).

Ein weiteres Phänomen könnte dazu führen, dass der Beitrag kleiner Substratmoleküle zum apparenten Molekulargewicht substratbeladener solubilisierter TatBC-Komplexe in BN-PAGE Analysen unterrepräsentiert wird. Nach einem Vorschlag von Behrendt & Brüser (2014) könnten gebundene Substrate teilweise durch die TatBC-Komplex-Mizellen maskiert werden. Ist weniger Oberfläche verfügbar, die durch Coomassie gebunden werden kann, so wird das Molekulargewicht des Substratmoleküls in der BN-PAGE unterrepräsentiert. Dies erinnert auch an die Theorien zur tiefen Insertion des Signalpeptides als regulärem Schritt in der Substratbindung (siehe Einleitung Abschnitt 1.5.3). Für die Substrate tQTP<sup>CF</sup> und das von der Arbeitsgruppe Cline verwendete V-20F könnte diese tiefe Insertion besonders leicht geschehen, was zur mutmaßlichen Maskierung beitragen könnte (siehe folgender Abschnitt 5.3.2). Tarry et al. (2009) zeigten in ihren elektronenmikroskopischen Aufnahmen hingegen, dass der reife Teil der Substrate Sufl und CueO außerhalb der TatBC-Komplexe vorliegt. Diese Moleküle sind mit 51,8 kDa (NCBI: ANK03475.1) und 56,7 kDa (VWQ00903.1) Molekulargewicht allerdings erheblich größer als tQTP<sup>CF</sup> (13,2 kDa) und ragen daher wahrscheinlich weiter über die TatBC-Komplex-Mizellen hinaus.

Aus diesen Gründen ist es zusätzlich möglich, dass sich die Bindung von sehr kleinen Substraten, insbesondere tQTP<sup>CF</sup>, an TatBC-Komplexe in der BN-PAGE-Analyse kaum als Verschiebung des Molekulargewichtes zeigt.

### 5.3.2 Das Substrat tQTP<sup>CF</sup> gelangt möglicherweise besonders leicht in den fortgeschrittenen Bindemodus

Im Lauf dieser Arbeit zeigte sich, dass das Protein tQTP<sup>CF</sup> gut für die Bindung und Anreicherung von TatBC-Komplexen geeignet ist. Die Interaktion des Signalpeptid-Derivates und TatBC bleibt zum großen Teil auch während der Komplexdissoziation bestehen (Abb. E4) und kann deutlich zur Stabilisierung der TatBC-Komplexe bei der Solubilisierung beitragen (Abb. E16). Daher könnte man vermuten, dass tQTP<sup>CF</sup> eine hochaffine Bindung mit den Rezeptorkomplexen eingeht. Bei einem Vergleich verschiedener Signalpeptid-Derivate stellte sich heraus, dass von PsbQ abgeleitete Signalpeptide wie tQTP<sup>CF</sup> tatsächlich eine stärkere TatBC-Bindung auszubilden scheinen als das von PsbP abgeleitete Signalpeptid-Derivat tPTP (vgl. Abb. E21). Allerdings wurden in dieser Arbeit keine weiteren Vergleiche zur Intensität der Bindung mit anderen Tat-Substraten durchgeführt.

Um Hinweise darauf zu erhalten, wie die intensivere Bindung von tQTP<sup>CF</sup> zustande kommt, werden ähnliche Daten von Gérard & Cline (2007) besprochen. Sie analysierten die Interaktion des Proteins V-20F (zu verstehen als V „minus 20“ F) mit TatBC-Komplexen. Es basiert auf dem Protein tOE17, einer bis auf drei Aminosäuren vor das Zwillingsarginin verkürzten Variante von PsbQ aus *Zea mays* (Henry et al., 1997). Mit einem Valin-zu-Phenylalanin-Austausch an der 20. Position vor der Schnittstelle der Thylakoidprozessierungspeptidase (vgl. Einleitung Abschnitt 1.2.1) wurde die Variante V-20F erzeugt. Wie V-20F, ist auch tQTP<sup>CF</sup> von PsbQ abgeleitet und der Aminosäureaustausch zu Phenylalanin wurde an der analogen Stelle nach Gérard & Cline eingeführt (siehe Abb. D4). Die Autoren beschrieben, dass das an TatBC-Komplexe gebundene Protein V-20F im Gegensatz zu tOE17 ausgesprochen stabil gebunden ist und während BN-PAGE-Analysen nicht dissoziiert.

```

tQTPCF    45    tag>MAQAMASMAGLRGASQAVLEGLSLQISGSNRLSGPTTSRVAVPKMGLNIR
V-20F      0    -----

tQTPCF    94    AQQVCAEAETSRRAFLGFVAAGLASGSFVKAVLA
                ...| | | | : | . | | . | : . . | : . . : | . . |
V-20F      1    -----MAGRRAFIGLVATGIVGGALSQAARA>reifer Teil

```

**Abbildung D4: Sequenzalignment von tQTP<sup>CF</sup> und V-20F** Die Aminosäuresequenzen von tQTP<sup>CF</sup> (siehe auch Material Abschnitt 2.10 Abb. M1) und V-20F (nach Henry et al., 1997; Gérard & Cline, 2007 und NCBI-Datenbankeintrag Q41048.1) wurden mithilfe des Programms EMBOSS Needle (Madeira et al., 2019) verglichen und das Ergebnis nachbearbeitet. Der *tag*-Anteil von tQTP<sup>CF</sup> und der reife Anteil von V-20F sind abgeschnitten (grau). Der Signalpeptidanteil ist fett hervorgehoben. Das Zwillingsarginin ist gelb und der Aminosäureaustausch zu F in hellblau unterlegt. Identische Aminosäuren sind mit senkrechtem Strich markiert, ähnliche Aminosäuren mit : und . abgestuft.

Sie diskutierten, dass Konformationsänderungen im Komplex, die zu einer intensiveren Interaktion zwischen dem Signalpeptid (SP) eines Tat-Substrates und TatBC führen, normalerweise erst durch die Einwirkung der protonenmotorischen Kraft zustande kämen. Alternativ dazu könnte das optimierte SP von V-20F ebenfalls solche Konformationsänderungen hervorrufen. Man kann dies so interpretieren, dass der Übergang in den fortgeschrittenen Bindemodus mit V-20F weniger auf die protonenmotorische Kraft angewiesen ist (siehe auch Einleitung Abschnitt 1.4 und 1.5.3).

Nach den oben genannten Fakten ist denkbar, dass dieses Konzept auch auf tQTP<sup>CF</sup> zutrifft. Die stärkere Bindung von tQTP<sup>CF</sup> käme demzufolge durch einen erleichterten Übergang in den fortgeschrittenen Bindemodus zustande. Im Umkehrschluss bedeutet dies aber auch, dass die intensive Bindung von tQTP<sup>CF</sup> an TatBC-Komplexe eine Ausnahme darstellen könnte und nicht für alle Tat-Substrate gilt. Entsprechend interpretierten Wojnowska et al. (2018) die Ergebnisse von Gérard & Cline als unphysiologisch starke Bindeeigenschaften von V-20F.

Die Möglichkeit eines „Springens“ der tQTP<sup>CF</sup>-Bindung in den fortgeschrittenen Bindemodus ist besonders interessant für Überlegungen zu einer Komplexstabilisierung durch Substratbindung (folgender Abschnitt 5.3.3) und einem substratstabilisierten TatBC-Komplex, der noch größer als der bisher bekannte größte, der TatB<sub>3</sub>C-Komplex, sein könnte (Abschnitt 5.3.5).

### 5.3.3 Hinweise auf eine Stabilisierung von TatBC-Komplexen durch Substratbindung

Möglicherweise kann die Bindung von Substrat zur Stabilisierung der Bindung von TatB im TatBC-Komplex beitragen. Die in Abb. E21 das erste Mal für verschiedene Signalpeptid-Varianten beobachtete und in Abb. E16 für tQTP<sup>CF</sup> weiter analysierte Hemmung der Komplexdissoziation durch Substratbindung sind in dieser Hinsicht sehr interessant. Auch Ma & Cline zeigten innerhalb der bereits in Abschnitt 5.2.1 erwähnten Experimente einen ähnlichen Effekt: Die Mutation D276A in der polaren Gruppe (TatB-BD) von TatC schwächt die Bindung von TatB und fördert so die Komplexdissoziation (Ma & Cline, 2013, Fig. 2 A Spur 12). Alternativ wurden die verwendeten Thylakoide vor der Solubilisierung jedoch mit dem Substrat tOE17 V-20F versetzt, was tQTP<sup>CF</sup> stark ähnelt (siehe vorheriger Abschnitt 5.3.2) und die TatBC-Komplexe sehr stabil bindet. Es zeigte sich, dass die durch TatC-D276A begünstigte Komplexdissoziation mit dem Substrat weniger ausgeprägt ist (Fig. 2 A Spur 13).

Die in Abschnitt 5.2.1 angerissenen Arbeiten von Behrendt & Brüser deuteten darauf hin, dass TatBC-Komplexe mit der TatC-Mutation L189A (*cis*-Brücke-2, Anfang TMH-5) eher zur Dissoziation neigen, und deshalb kleiner sind als mit dem Wildtyp-Protein (Behrendt & Brüser, 2014, Fig. 6 A). Jedoch erzeugte die Bindung durch Tat-Substrat (Spuren „RR“) sowohl für Wildtyp-TatC als auch für die L189A-Variante intakte substrattragende Komplexe von ca. 600 kDa. Dies deutet erneut auf eine Stabilisierung der TatBC-Komplexe durch Substratbindung hin.

In den ebenfalls bereits erwähnten Daten von Tarry et al. findet sich ein ähnlicher Effekt: Nach Inkubation von *E. coli* TatBC-Komplexen mit dem Substrat CueO, welches einen Affinitätstag trug, wurden die substratbeladenen Komplexe von den unbeladenen über Affinitätschromatographie getrennt (Tarry et al., 2009, Fig. 2 C und B). Nur die Probe mit Komplexen ohne CueO (Durchfluss, „FT“) zeigte ein zusätzliches Signal unterhalb von 443 kDa, was auf eine verstärkte Dissoziation hinweist.

TatBC-Komplexe könnten also durch die Bindung von Substratproteinen teilweise gegen die Dissoziation von TatB geschützt werden. Der zugrundeliegende Mechanismus könnte Aufschluss über die Interaktionen von TatB und dem Substratprotein geben und möglicherweise mit der Funktion von TatB zusammenhängen.

### 5.3.4 Die Substratbindung führt zu Konformationsänderungen im TatBC-Komplex, wodurch TatB stabiler gebunden wird

Warum führt die Bindung von Substraten zur Stabilisierung der solubilisierten TatBC-Komplexe? Auf den ersten Blick könnte man vermuten, dass die Stabilisierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (vgl. Ergebnisse Abschnitt 4.4.1) und durch die Bindung von Tat-Substraten auf denselben Mechanismus zurückzuführen ist. Da die Bindung von Substrat aber zum Tat-Transport führt, während Calciumionen den Transport inhibieren (Abb. E15), muss es sich um zwei unterschiedliche Mechanismen handeln.

Eine Möglichkeit wäre, dass die Stabilisierung der TatB-Bindung durch Substrate ein unmittelbarer Effekt der Interaktion von SP und TatB bei der fortgeschrittenen Bindung ist (Einleitung Abschnitt 1.5.3). Dabei könnte das SP bspw. durch die Interaktion mit der RR-BD eines TatC und die gleichzeitige Bindung von TatB und TMH-5 eines benachbarten TatC auch mehrere Proteine verbinden (Aldridge et al., 2014).

Ein weiterer Erklärungsansatz umfasst die zuvor erwähnten substratinduzierten Konformationsänderungen der TatBC-Komplexe (Aldridge et al., 2014; Cléon et al., 2015; de Leeuw et al., 2002; Habersetzer et al., 2017; Huang et al., 2017; Punginelli et al., 2007; Whitaker et al., 2012), die eine Stabilisierung bewirken könnten. Ein besonders anschauliches Beispiel für Konformationsänderungen bei der Substratbindung ist hierbei der elektronenmikroskopische Vergleich von substratfreien und substratbeladenen *E. coli* TatBC-Komplexen (Tarry et al., 2009). Substratgebundene Komplexe erschienen dabei kleiner, könnten also eine Konformationsänderung durchlaufen haben. Anzumerken ist aber, dass die Autoren keine Erhöhung der Komplexdichte feststellten und daher vermuteten, dass Anteile des Komplexes verloren gehen, anstatt dass der Komplex kontrahieren würde.

Ebenfalls einen Hinweis auf substratabhängige Konformationsänderungen gibt die Vermutung von Cline (2015), dass die fortgeschrittene Bindung des SP an den Erbsen-TatBC-Komplex möglicherweise zu einer Positionsänderung von TatB führt. Er erarbeitete dies zwar, um zu erklären wie TatB den Zugang von TatA zu den TatBC-Komplexen steuern kann, aber dies könnte auch eine Verbindung zur Stabilisierung der TatBC-Komplexe durch Substratbindung herstellen: Im Zuge der Komplexaktivierung könnte TatB so an eine Position im Komplex verschoben werden, die durch eine affinere, stabilere Bindung gekennzeichnet ist. Falls dieser TatB-Positionswechsel eine wichtige Funktion ist, würde sich auch erklären, warum die ursprüngliche TatB-Bindung dynamisch sein muss und weniger affin ist (vgl. Abschnitt 5.2.2).



Zusammengefasst scheint sich ein Zwei-Stufen-Modell der TatB-Bindung zu ergeben, bei der die Stabilität der TatB-Interaktion mit TatC und seine Position im Komplex durch die (fortgeschrittene) Substratbindung verändert werden. TatB in dementsprechend aktivierten Komplexen könnte stabiler gebunden sein und nach der Solubilisierung eine geringere Neigung zur Dissoziation aufweisen.

Der Bindungswechsel von TatB könnte natürlich mit der von Cline angeregten Steuerung des TatA-Zutritts in den Komplex einhergehen. Hierzu sind erneut die von Habersetzer et al. (2017) veröffentlichten Daten zum Positionswechsel von TatA und TatB in *E. coli*-Tat-Komplexen interessant.

An der initialen Bindung des SP an der RR-BD von TatC scheint TatB kaum beteiligt zu sein (siehe Einleitung Abschnitt 1.5.3). PsbQ-Signalpeptide mit der Mutation M64F gelangen aber anscheinend besonders leicht in den folgenden fortgeschrittenen Bindemodus, der TatB einschließt (siehe Abschnitt 5.3.2). Vor dem Hintergrund der eben beschriebenen Vermutungen könnte dies erklären, warum tQTP<sup>CF</sup> die TatB-Bindung besser stabilisiert als andere SP ohne die M64F-Mutation (Abb. E21). Dies könnte den Zusammenhang zwischen der vermuteten intensiven TatBC-Bindung durch tQTP<sup>CF</sup> und der beobachteten erhöhten Komplexstabilisierung erklären. Ein „Springen“ vom initialen Bindemodus in den fortgeschrittenen, das an den beschriebenen Sachverhalt erinnert, beschrieben auch Huang et al. (2017) für die *E. coli*-TatB-Variante F13Y. Dieses Protein führt selbst in der Abwesenheit von Substrat zu einer für substrataktivierte Komplexe typischen Ansammlung von fluoreszenzmarkiertem TatA. Das bedeutet, dass diese TatB-Variante die aktivierenden Konformationsänderungen dauerhaft zu induzieren scheint, was möglicherweise auch auf die Bindung von tQTP<sup>CF</sup> zutrifft.

### 5.3.5 Vermutungen zu einem zusätzlichen TatBC-Komplex oberhalb des TatB<sub>3</sub>C-Komplexes

Ein bemerkenswertes, aber bisher nicht erklärbares Phänomen stellen auch BN-PAGE Signale dar, die noch oberhalb des mutmaßlich intakten TatB<sub>3</sub>C-Komplexes migrieren (zum Nachweis mit dem Antiserum  $\alpha$ -TatC siehe Abb. E16, E18, E20, E22, E23; zum Nachweis mit  $\alpha$ -TatB siehe Abb. E21 Elutionsfraktionen). Abzugrenzen sind diese Beobachtungen von unspezifischen Photosystem I-Signalen (falsch positive Banden in Abb. E21, Durchflussproben und Negativsignale in Abb. E6  $\alpha$ -TatC, sowie Anhang Abb. A3 frisch präparierte Thylakoide, Digitonin).

In allen Fällen, außer bei Abb. E18, wurden substratgebundene Komplexe analysiert, was vermuten lässt, dass eine Stabilisierung durch Substrate erneut eine Rolle spielen könnte. Allerdings zeigten sich solche Signale bisher nicht bei der Markierung von TatBC-Komplexen durch radioaktiv markierte Substrate (siehe Abb. E4 und E5).

Möglicherweise rückt die Mutation M64F im PsbQ-Signalpeptid des tQTP<sup>CF</sup> bei der Analyse dieses mutmaßlichen größeren TatBC-Komplexes erneut in den Fokus. Diese scheint das Auftreten des zusätzlichen Signals zu fördern (Abb. E21). Ein vergleichbares Phänomen zeigte sich in den Analysen von Gérard & Cline, 2007. TatBC-Komplexe wurden mit radioaktiv markierten Substraten beladen und per BN-PAGE analysiert. Entweder wurde das zuvor erwähnte tOE17 verwendet oder die Variante V-20F mit einer Mutation analog zu M64F (vgl. Abschnitt 5.3.2). Mit der Aminosäuresubstitution V zu F zeigen sich zusätzliche intensive Signale oberhalb des größten TatBC-Komplexes, die denen aus der vorliegenden Arbeit ähneln (Gérard & Cline, 2007, Fig. 3 Spur 1 und 2). Auch die bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnte *E. coli* TatB-Variante F13Y, die den TatBC-Komplex konstitutiv in den Modus der fortgeschrittenen Bindung zu schalten scheint, bewirkt in der BN-PAGE-Analyse ein zusätzliches höher migrierendes Signal. Dies geschieht ebenfalls mit der TatB-Variante L9Q (Huang et al., 2017, Fig. 5 A und B). Möglicherweise hängt das erhöhte apparente Molekulargewicht des fraglichen Komplexes also mit der Aktivierung und dem fortgeschrittenen Bindemodus zusammen.

Über das Phänomen an sich können bislang nur Vermutungen angestellt werden. Dass es sich um eine durch das Molekulargewicht der gebundenen Substrate nach oben verschobene Komplexspezies handelt ist eher unwahrscheinlich, da in der Gegenwart von tQTP<sup>CF</sup> alle TatBC-Komplexspezies, auch die kleineren, gebunden vorliegen (Abb. E4). Denkbare Szenarien wären das Vorliegen von zusätzlichem TatB oder TatA, alternative Konformationen der TatBC-Komplexe oder zusätzlich gebundene Lipide (vgl. Abschnitt 5.2.4). Wojnowska et al. (2018) vermuteten, dass ein intaktes Lipidumfeld die Substratbindefähigkeit der TatBC-Komplexe verbessert. Im Umkehrschluss könnte man annehmen, dass sich die Bindung von Substrat an die Komplexe auch auf die umgebenden Lipide auswirkt – möglicherweise verbleiben an „aktivierten“ Komplexen mehr Lipidmoleküle, als wenn sie im „Ruhezustand“ ohne Substrat vorliegen.

Konformationsänderungen des Komplexes bei der Substratbindung, wie sie im vorhergehenden Abschnitt vermutet wurden, könnten auch hier eine Rolle spielen. Ein erhöhtes apparentes Molekulargewicht in der BN-PAGE wäre vorstellbar, wenn die TatBC-Komplexe kontrahieren würden und so, bei gleichbleibendem Molekulargewicht, die kleinere Oberfläche geringere Mengen von Coomassie binden würde.

Vor dem Hintergrund des erarbeiteten Konzeptes der Komplexdissoziation könnte auch zusätzliches TatB eine Erklärung sein. Dies könnte als „TatB<sub>4</sub>C“-Komplex interpretiert werden. In diesem Falle müssten die in Abschnitt 5.5 durchgeführten Analysen zur Bestimmung der TatBC-Protomerzahl angepasst werden und könnten dann die Protomerzahlen 4 und 8 ergeben.

Allerdings gibt es im Moment keine Hinweise, die diese Vorstellung wahrscheinlicher machen als die anderen Erklärungsansätze. Wenn sich die Tat-Komplexspezies tatsächlich nur in ihrem TatB-Gehalt unterscheiden, wäre unklar, warum der mutmaßliche zusätzliche TatB<sub>4</sub>C-Komplex so viel instabiler zu sein scheint als die Komplexe TatB<sub>3</sub>C bis TatB<sub>1</sub>C.

Eine weitere interessante Möglichkeit wäre auch die Anwesenheit von TatA, welches noch nie in pflanzlichen Rezeptorkomplexen nachgewiesen wurde (siehe Einleitung Abschnitt 1.5.2). Geise et al. (2019) beschrieben die *E. coli*-TatC-Varianten I50Bpa (ein Phenylalanin-Derivat) und I50Y, die in BN-PAGE-Analysen zum Auftreten zusätzlicher, größerer Komplexe führten. Als Erklärung hierfür wurden Konformationsänderungen von TatC vermutet, durch die zusätzliches TatA und TatB binden. Weiterhin diskutierten Geise et al. vor dem Hintergrund der Daten von Habersetzer et al., (2017), dass TatB in *E. coli* TatBC-Komplexen prinzipiell auch die zusätzliche TatA-Bindestelle besetzen könnte und implizierten, dass dies durch Konformationsänderungen im Komplex ausgelöst werden könnte. Möglicherweise kann so bei der Aktivierung von TatBC-Komplexen zusätzliches TatB gebunden werden.

Es liegen bislang nur wenig Daten zu dem zusätzlichen großen TatBC-Komplex vor. Dies könnte aber auch als Hinweis auf eine geringe Stabilität und kurze Lebensdauer ausgelegt werden. Diese Eigenschaften erinnern an die aktive Tat-Translokase, deren transiente Natur sie den meisten Analysen entzieht. Möglicherweise handelt es sich bei dem beschriebenen zusätzlichen TatBC-Komplex um einen Zwischenschritt auf dem Weg zur Translokase.

Fazit:

Solubilierte TatBC-Komplexe scheinen nur wenig Substratmoleküle zu tragen. Die Oberfläche kleiner gebundener Substrate könnte teilweise durch die TatBC-Komplexe maskiert werden, wodurch ihr Molekulargewicht in BN-PAGE-Analysen unterrepräsentiert würde.

Die Aktivierung der TatBC-Komplexe durch die (fortgeschrittene) Bindung von Substratproteinen führt zu erheblichen Konformationsänderungen. Hierbei gelangt TatB möglicherweise aus seiner schwach affinen, dynamischen Bindung im „Ruhezustand“ in eine stabilere, höher affine Interaktion, wodurch es bei der Solubilisierung weniger zur Dissoziation neigt. Es gibt außerdem erste Hinweise auf eine recht instabile, noch größere Komplexspezies, die einen Schritt in Richtung der aktivierten Translokase darstellen könnte.

## 5.4 Gewinnung und Rekonstitution von TatBC-Komplexen

### 5.4.1 Die effiziente Präparation von thylakoidären Rezeptorkomplexen

Die Gewinnung von TatBC-Rezeptorkomplexen, bzw. TatABC bei *E. coli*, wurde bereits mehrfach beschrieben. So zeigten unter anderem Oates et al. (2003); Tarry et al. (2009); Wojnowska et al. (2018) und Geise et al. (2019) die isolierten Komplexe von *E. coli* mittels BN-PAGE-Analyse. Die Möglichkeit der effektiven Proteinsynthese durch rekombinante Expressionssysteme hilft bei der Gewinnung der Komplexe sehr. Solche Methoden wären bei der in dieser Arbeit verwendeten Modellpflanze Erbse mit erheblichem Aufwand verbunden.

Cline & Mori (2001) und Ma & Cline (2013) gewannen ebenfalls TatBC-Komplexe aus Erbsenthylakoiden. In letzterer Veröffentlichung wurden damit auch BN-PAGE-Analysen durchgeführt, die sich mit den Daten der vorliegenden Arbeit decken.

Die Komplexanreicherung wurde im Laufe der vorliegenden Arbeit mehreren Anpassungen unterzogen. Allem voran erhöhte die Verwendung des Signalpeptid-Derivats tQTP<sup>CF</sup> im Vergleich zum zuvor genutzten tPTP die Effizienz der TatBC-Extraktion, so dass der überwiegende Teil der in einer Probe enthaltenen Komplexe gewonnen werden konnte (Abb. E21). Weiterhin wurden übliche Anpassungen von Parametern der immobilisierten Metallionenaffinitätschromatographie durchgeführt (vgl. bspw. Handbuch Affinity Chromatography Vol. 2: Tagged Proteins (2020), GE Healthcare). Die Zugabe von 20 mM Imidazol und 500 mM NaCl während des Binde- und Waschvorgangs erhöhten die Reinheit der Proben deutlich (Abb. E22). Möglicherweise war die zuvor etablierte Verwendung von tQTP<sup>CF</sup> mit dem Aminosäureaustausch M64F dabei ein glücklicher Zufall: Gérard & Cline (2007) berichteten, dass in dem Protein V-20F erst der zu M64F analoge Aminosäureaustausch zu einer Bindung an TatBC-Komplexe führte, die einer Salzbehandlung mit 500 mM KCl widerstand (siehe auch Abschnitt 4.3.2). Diesen Umstand realisierte ich jedoch erst bei der Literaturrecherche beim Schreiben der Dissertation.

Weitere, weniger naheliegende Faktoren, die die Reinheit der angereicherten TatBC-Komplexe erhöhten, sind die Verwendung einer gleichbleibend hohen Digitoninkonzentration (Daten nicht gezeigt) und das Entfernen überschüssigen tQTP<sup>CF</sup>-Proteins nach der Thylakoidbindung durch Waschen (Abb. E22). Ersteres führt vermutlich zu einer Verminderung unerwünschter hydrophober Interaktionen. Der zweite Punkt verringert den Anteil von nicht-TatBC-gebundenem tQTP<sup>CF</sup>, das möglicherweise unspezifisch mit anderen thylakoidären Proteinen interagieren und sie so an der Affinitätsmatrix retardieren könnte. Dieser Umstand weist auch darauf hin, dass der tQTP<sup>CF</sup>-Bindeschritt eher nicht nach der Solubilisierung durchgeführt werden sollte, wie es von Wojnowska et al. (2018) beschrieben wurde. Auch das Wiederholen des

Affinitätschromatographieschrittes führte zu einer Erhöhung der Probenreinheit (Ergebnisse Abschnitt 4.6.2).

Mittels Massenspektrometrie wurde gezeigt, dass die Menge von TatB und TatC relativ zu verunreinigenden Proteinen so weit erhöht werden kann, dass sie selbst die hochabundanten Proteine der Photosysteme überwiegt (Abb. E24). Dies stellt einen großen Fortschritt in der Arbeit mit pflanzlichen TatBC-Komplexen dar.

#### 5.4.2 Alternative Ansätze zur Komplexanreicherung

Alternative Ansätze zur Komplexanreicherung umfassten die Verwendung anderer Detergenzien und Styrol-Maleinsäure-Copolymer. Der Großteil dieser Substanzen führt allerdings zur Komplexdissoziation. Für die nicht weiter beschriebenen Versuche der Komplexanreicherung mit NaDDSar besteht die Möglichkeit, dass eine Interaktion des Detergens mit bivalenten Metallionen, wie dem  $\text{Ni}^{2+}$  der Affinitätsmatrix, zur Störung der Mizellen mit den TatBC-Komplexen führen könnte (Hąc-Wydro et al., 2017).

Allerdings war bislang auch keiner der getesteten Ansätze zur Gewinnung der TatC-Oligomere erfolgreich. Dabei wurden Experimente zur Komplexanreicherung mit TX-100 und TX-114, sowie mit SMA durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Für die Versuche einer Komplexanreicherung mit TX-100 und TX-114 wurden geringe Detergenzkonzentrationen eingesetzt, die zu einer begrenzten Solubilisierung führen (vgl. Ergebnisse Abschnitt 4.3.1 „Triton X-100 und X-114“). Wenn die Tat-Komplexe anschließend an der Affinitätsmatrix gebunden sind, ist es wahrscheinlich, dass die folgenden detergenzhaltigen Waschschrte weitere Lipide ablösen, die möglicherweise eine stabilisierende Wirkung auf die Komplexe haben. Auf diesem Wege könnte es schließlich zur Zerstörung der TatC-Oligomere gekommen sein. Bei den ersten Versuchen zu einer Komplexanreicherung mit SMA wurde kein NaCl verwendet, was vermutlich dazu führte, dass die negativ geladenen Maleinsäuregruppen des SMA mit den positiv geladenen  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen der Affinitätsmatrix wechselwirken. Diese ionische Bindung lässt sich durch Imidazol vermutlich nicht lösen, weswegen die Elution wahrscheinlich fehlschlug.

Grundsätzlich sollte die Gewinnung von TatC-Oligomeren aber möglich sein, da die Stabilität ihrer Interaktion mit tQTP<sup>CF</sup> nachgewiesen werden konnte (Abb. E4). Dies wäre auch von großem Interesse, da man an rekonstituierten reinen TatC-Oligomeren Experimente zur Assemblierung von TatB durchführen könnte, die die Daten von Zinecker et al. (2020) und Fincher et al. (2003) ergänzen könnten.

### 5.4.3 Zur Rekonstitution von TatBC-Komplexen – Etappenziel TatC-Oligomer

Ein wichtiges Etappenziel der Rekonstitution von angereicherten TatBC-Komplexen in Liposomen ist der Nachweis der intakten rekonstituierten Komplexe. Die Assoziierung von TatB und TatC mit den Liposomen konnte mit Natriumdodecylsulfat- (SDS-)PAGE eindeutig gezeigt werden (Abb. E28). Die BN-PAGE-Analyse gelang in dieser Arbeit jedoch nicht. Das Problem hierbei war, dass nach den Daten dieser Arbeit nur Digitonin für die Solubilisierung intakter TatBC-Komplexe infrage kommt. Allerdings wurde festgestellt, dass Digitonin Liposomen unter den angewandten Bedingungen nicht solubilisieren kann (siehe Ergebnisse Abschnitt 4.7.2). Hinzu kommt, dass die Thylakoidmembran, im Gegensatz zu reinen Liposomen, ein ausgesprochen hohes Protein-Lipid-Verhältnis besitzt, was sich positiv auf die gehemmte Digitoninsolubilisierung auswirken könnte und im Umkehrschluss eine Hemmung der Solubilisierung der eher proteinarmen Liposomen bedeutet (H. Y. Fan & Heerklotz, 2017; Kirchhoff et al., 2002; Koochak et al., 2019).

Daher wurden alternative Herangehensweisen getestet, mit denen schließlich die Rekonstitution von radioaktiv markierten TatC-Oligomeren in ultraschallbehandelte Thylakoidvesikel nachgewiesen werden konnte. Ein Einwand könnte an dieser Stelle sein, dass radioaktiv markiertes TatC gegen Untereinheiten der in den Thylakoidvesikeln bereits vorhandenen TatC-Oligomere ausgetauscht werden könnte. Hierdurch würden intrinsische TatC-Komplexe radioaktiv markiert und würden ein falsch positives Ergebnis bewirken. Allerdings scheint in Komplexen organisiertes TatC eher nicht zu solchen Austauschen zu neigen: Ma & Cline importierten TatC mit His-tag in Chloroplasten und gewannen es aus den digitoninsolubilisierten Thylakoiden über Affinitätschromatographie zurück. Es zeigte sich, dass nahezu kein intrinsisches TatC gemeinsam mit der His-Variante extrahiert wurde (Ma & Cline, 2013, Fig. 2C). Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass die TatC-Proteine einmal ausgebildeter TatC-Oligomere im Austausch mit dem monomeren Protein stehen. Abgesehen davon wäre auch die erfolgreiche Rekonstitution von monomeren TatC ein Fortschritt.

Der notwendige Einsatz des Detergens DDM zur Solubilisierung der Thylakoidvesikel verhindert eine Analyse des TatB-Status, da dieses hiermit vollständig dissoziiert wird (vgl. Abb. E8). Der damit erfolgte Nachweis rekonstituierter TatC-Oligomere in Thylakoidvesikeln hat leider nur geringen praktischen Nutzen. Nichtsdestotrotz ist er ein entscheidender prinzipieller Schritt bei der Etablierung eines intakten Tat-Systems *in vitro*.

Die Topogenese von TatC in Chloroplasten und Bakterien ist ein recht komplexer Vorgang, der nicht spontan abläuft (siehe Einleitung Abschnitt 1.3.2). Weiterhin sind die TatC-Oligomere vermutlich die wichtigste strukturgebende Komponente der Tat-Komplexe (siehe Einleitung

Abschnitt 1.5.1.3). Im Gegensatz dazu kann TatB höchstwahrscheinlich spontan in Membranen inserieren (siehe Einleitung Abschnitt 1.3.1). Bislang gibt es keine Hinweise darauf, dass zusätzliche Faktoren für die Assemblierung von TatB mit TatC benötigt werden. Behrendt et al. (2007) wiesen nach, dass in *E. coli* vorhandene reine TatC-Oligomere durch die zusätzliche Synthese von TatB zu TatBC-Komplexen „aufgefüllt“ werden konnten (für Details zu diesem Versuch siehe Abschnitt 5.1.2). Es wäre daher denkbar, dass der kritische Schritt bei einer Rekonstitution von TatBC-Komplexen die Membraninsertion der TatC-Oligomere ist und fehlendes TatB spontan in den Komplex assemblieren könnte. Aus diesem Grund könnte auch die Verwendung des eigentlich TatB-dissoziierenden TX-100 für die Gradientenrekonstitution nach Althoff et al. (2012) ohne negative Folgen bleiben (vgl. Ergebnisse Abschnitt 3.3.1.1 „Triton X-100 und X-114“). Zusammengefasst bedeutet dies, dass mit der Rekonstitution des TatC-Oligomers bereits eine wesentliche Hürde auf dem Weg zu einem rekonstituierten Tat-System überwunden wurde.

Fazit:

Bei der Gewinnung von thylakoidären TatBC-Komplexen gelingt eine erhebliche Anreicherung der Tat-Untereinheiten und Abtrennung unerwünschter Proteine. Die Rekonstitution von TatC-Oligomeren, die die strukturelle Grundlage der TatBC-Komplexe darstellen, war erfolgreich. Daher sollte die Rekonstitution thylakoidärer TatBC-Komplexe in absehbarer Zukunft möglich sein.

## 5.5 Schlussfolgerungen aus dem Konzept der Komplexdissoziation – Eine Abschätzung der TatBC-Protomerzahl

Der folgende Abschnitt ist eine weiterführende Datenanalyse mit eigenem Diskussionsteil, die eine Betrachtung zahlreicher Aspekte der vorliegenden Arbeit voraussetzt.

Die Anzahl von TatBC-Heterodimeren (sog. Protomeren) im TatBC-Komplex ist eine intensiv diskutierte Fragestellung (siehe Einleitung Abschnitt 1.5.2). Abgesehen von der Analyse mittels Elektronenmikroskopie (Tarry et al., 2009), wurde diese häufig indirekt über die Ermittlung des Molekulargewichtes der Komplexe abgeschätzt. Eine solche Abschätzung mittels BN-PAGE- oder Größenausschlusschromatographie-Analyse (ebenfalls Einleitung Abschnitt 1.5.2) unterliegt bei Membranproteinen jedoch Beschränkungen: So tragen gebundene Lipide und Coomassie zum Partikelvolumen bzw. dem Molekulargewicht bei (Crichton et al., 2013; Heuberger et al., 2002; le Maire et al., 2000; I. Wittig et al., 2010). Auch nicht ideale Eigenschaften, wie die unproportionale

Bindung von Coomassie-Farbstoff (Tal et al., 1985) oder die Partikelform, verändern das apparente Molekulargewicht.

Beispielsweise ermittelten Celedon & Cline (2012) anhand von BN-PAGE-Daten die Protomerzahl eines ca. 700 kDa großen Erbsen-TatBC-Komplexes. Sie bezogen dabei einen auch weiter unten im Text erklärten Korrekturfaktor von 1,8 ein und schlossen auf eine Protomerzahl von 7,5. Multipliziert man das Molekulargewicht von Erbsen-TatC (siehe Abb. D7) jedoch mit 7,5 und dem Faktor 1,8 ergibt sich für ein TatC-Oligomer eine Größe von ca. 450 kDa, was der in Abb. E1 und E5 ersichtlichen apparenten Komplexmasse von 250-300 kDa deutlich widerspricht. Daher wirkt die Protomerzahl 7,5 unwahrscheinlich.

Da die in dieser Arbeit beobachteten Komplexspezies durch die TatB-Menge allerdings in definierter Beziehung zueinander stehen, müssen auch ihre Molekulargewichte gewissen Regeln folgen. Ziel des folgenden Abschnitts ist daher die Abschätzung der Protomerzahl der intakten TatBC-Komplexe unter Einbeziehung der zusätzlichen Informationen aus der Komplexdissoziation.

Nach dem Modell der Komplexdissoziation lassen sich für die TatBC-Komplexspezies folgende Hypothesen aufstellen:

1. Die Basis aller TatBC-Komplexe ist ein stabiles TatC-Oligomer, also ein Vielfaches des Molekulargewichtes von TatC. Dieses enthält so viel TatC, wie im intakten Komplex TatBC-Protomere vorliegen.
2. Beim Übergang zum jeweils nächstkleineren Komplex ist die Menge an dissoziiertem TatB stets dieselbe, sie bleibt also konstant.

Dazu, aus der Literatur:

3. Der größte TatBC-Komplex besteht aus  $TatB_1C_1$ -Protomeren und hat daher ein TatB:TatC-Verhältnis von 1:1. (vgl. Einleitung Abschnitt 1.5.2, besonders Bolhuis et al., 2001).

Man kann daraus eine mathematische Funktion zur Berechnung des Molekulargewichtes der Komplexe bilden. Die pro Dissoziationsschritt verlorene Anzahl TatB heißt  $k$ , die Anzahl dieser Schritte  $i$  und die Protomerzahl  $n$  (Formel 1).



Ausgehend von einem  $(\text{TatBC})_n$  bzw.  $\text{TatB}_n\text{C}_n$ -Komplex mit einer Anzahl von  $\text{TatB} = \text{TatC} = n$ , hat der nächstkleinere Komplex beim ersten Dissoziationsschritt ( $i = 1$ )  $1k$ -mal  $\text{TatB}$  verloren. Der wiederum nächstkleinere Komplex hat beim zweiten Schritt ( $i = 2$ )  $2k$ -mal  $\text{TatB}$  verloren usw. Die Reihe der Komplexe  $\{\text{TatB}_n\text{TatC}_n, \text{TatB}_{n-1k}\text{TatC}_n, \text{TatB}_{n-2k}\text{TatC}_n, \dots, \text{TatB}_{n-ik}\text{TatC}_n\}$  endet, wenn  $i \cdot k = n$   $\text{TatB}$  dissoziiert ist, also  $\text{TatB}_0\text{C}_n$  vorliegt – das  $\text{TatC}$ -Oligomer.

Beispiel: Enthält der intakte  $\text{TatBC}$ -Komplex  $n = 3$   $\text{TatBC}$ -Protomere und es gehen pro Dissoziation  $k = 1$   $\text{TatB}$  verloren, enthält der nächstkleinere Komplex ( $i = 1$ ) 3  $\text{TatC}$  und  $n - i \cdot k = 3 - 1 \cdot 1 = 2$   $\text{TatB}$ . Bei dem darauffolgenden Komplex ( $i = 2$ ) wären 3  $\text{TatC}$  und  $3 - 2 \cdot 1 = 1$   $\text{TatB}$  enthalten.

Dementsprechend berechnet sich das theoretische Molekulargewicht aller  $\text{TatBC}$ -Komplexe in Abhängigkeit von der Anzahl der Dissoziationsschritte  $i$  (siehe auch Abb. D5):

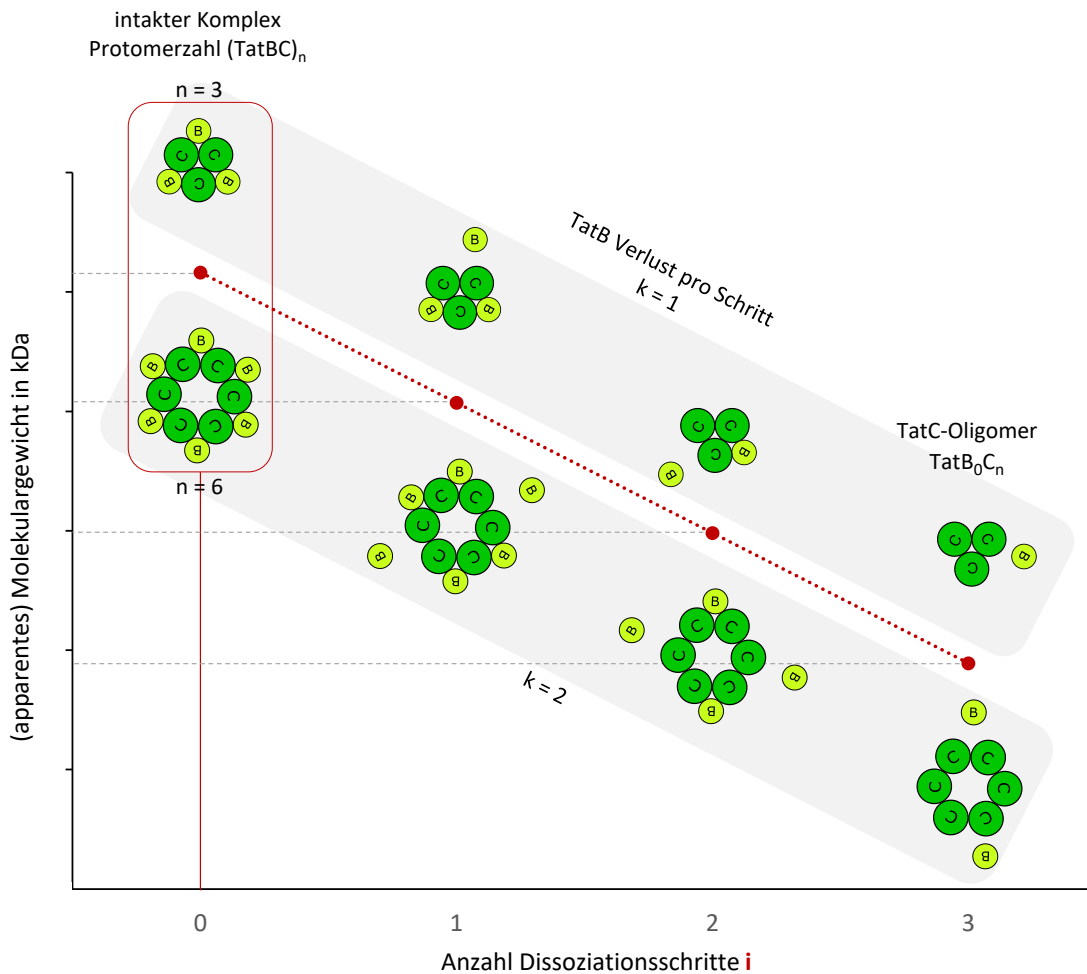
$$\text{Komplex} = \text{TatC Oligomer} + \text{Summe TatB}$$

$$\text{Formel 1} \quad m_{\text{TatBC}}(i) = n \cdot m_{\text{TatC}} + (n - ik) \cdot m_{\text{TatB}}$$

$m_{\text{TatBC}}(i)$	... Molekulargewicht (MW) eines $i$ -mal dissoziierten $\text{TatBC}$ -Komplexes
$m_{\text{TatC}}, m_{\text{TatB}}$	... theoretisches $\text{TatB}$ - bzw. $\text{TatC}$ -MW nach Aminosäuresequenz
$n$	... Anzahl $\text{TatB}$ und $\text{TatC}$ (als $\text{TatBC}$ -Protomere) im intakten Komplex
$k$	... pro Dissoziationsschritt verlorene Menge $\text{TatB}$
$i$	... Anzahl erfolgter Dissoziationsschritte

In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen der Komplexdissoziation vier verschiedene Komplexspezies beobachtet (zu einem bislang nicht charakterisierten mutmaßlichen fünften Komplex siehe Abschnitt 5.3.5). Wie in Abschnitt 5.1.1 bereits erwähnt, führten Ma et al. mit thylakoidärem  $\text{TatBC}$  (Erbsen) einen Versuch zum schrittweisen Austausch von authentischem  $\text{TatB}$  durch C-terminal verkürztes  $\text{TatB}$  durch, wodurch die Komplexe kleiner wurden. Die spezifische Detektion von  $\text{TatC}$  zeigte dabei bis zu vier Signale und die Autoren nahmen an, dass der kleinste Komplex nur noch verkürztes  $\text{TatB}$  trug (Ma et al., 2018, Fig. 3).

$i$  nimmt dementsprechend nur die Werte 0, 1, 2, 3 an. In der Literatur wurden außerdem Protomerzahlen von höchstens 8 berichtet ((Alcock et al., 2016; Aldridge et al., 2014; Blümmel et al., 2015; Celedon & Cline, 2012; Maurer et al., 2010; Oates et al., 2005; Tarry et al., 2009)). Damit bei  $i = 3$  ein reines  $\text{TatC}$ -Oligomer mit einem  $\text{TatB}$ -Verlust von  $3 \cdot k$  vorliegt, sind nur die Kombinationen von  $n = 3$  und  $k = 1$ , sowie  $n = 6$  und  $k = 2$  möglich (siehe Abb. D5).  $k = 3$  würde bereits Komplexe mit  $n = 9$   $\text{TatBC}$ -Protomeren erfordern, wofür es keine Anhaltspunkte gibt.



**Abbildung D5: Schema zur Berechnung des TatBC-Komplex-Molekulargewichtes und die  $(TatBC)_3$ - und  $(TatBC)_6$ -Modelle zur Erklärung der Komplexdissoziation.** Die roten Punkte und Linie sind die Funktion (Formel 1) zu der die zwei Fälle TatB-Verlust pro Schritt  $k = 1$  (darüber) und  $k = 2$  (darunter) dargestellt sind. Dies sind die theoretisch möglichen Szenarien (siehe Text weiter unten). Die Teilstriche der y-Achse sind lediglich repräsentativ zu verstehen.

Mit Hilfe der ermittelten Funktion Formel 1 sollte nun versucht werden, die Protomerzahl von Erbsen- und Spinat-TatBC-Komplexen anhand ihres Molekulargewichtes abzuschätzen. Als repräsentative Beispieldaten wurden dazu die apparenten Molekulargewichte der TatBC-Komplexe aus Abb. E5 bestimmt und in Abb. D6 zusammengefasst.

	apparentes Molekulargewicht (kDa)	
	Erbse	Spinat
TatB <sub>3</sub> C	627	669
TatB <sub>2</sub> C	496	520
TatB <sub>1</sub> C	388	373
TatC-Oli	299	243

**Abbildung D6: Apparente Molekulargewichte der TatBC-Komplexe von Erbse und Spinat aus Abb. E5.**

Die apparenten Molekulargewichte wurden mit den aus Abb. E5 ermittelten elektrophoretischen Laufweiten durch eine lineare Regressionsanalyse berechnet (Methoden Abschnitt 3.6.1). Der Größenstandard *High Molecular Weight Native Protein Marker* diente dabei als Referenz.

In dem betrachteten Experiment wurden die TatBC-Komplexe mit radioaktiv markiertem tQTP<sup>CF</sup> beladen. Daher soll Formel 1 um die Masse der Substratmoleküle ergänzt werden. Da solubilisierte TatBC-Komplexe aber anscheinend nur wenig Substratmoleküle tragen (vgl. Abschnitt 5.3.1) wurde nur das Molekulargewicht eines einzelnen Substratproteins ( $1 \cdot m_{\text{Substrat}}$ ) eingefügt (Formel 1a).

Formel 1a 
$$m_{\text{TatBC}}(i) = n \cdot m_{\text{TatC}} + (n - ik) \cdot m_{\text{TatB}} + m_{\text{Substrat}}$$

$m_{\text{Substrat}}$  ... Molekulargewicht eines komplexgebundenen Tat-Substrates

Durch computergestützte Regressionsanalyse wurden anschließend Werte für  $n$  ermittelt, mit denen Formel 1a die Daten aus Abb. D6 möglichst gut beschreibt. Die Fälle  $k = 1$  und  $k = 2$  wurden dabei separat betrachtet.  $n$  wurde jeweils durch Näherungsverfahren so lange verändert, bis die Abweichung der gemessenen Molekulargewichte von den mit der Funktion aus  $i$  berechneten Molekulargewichten ein Minimum erreichte bzw. das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  maximal wurde. Der finale Wert von  $n$  wurde ausgegeben. Die in die Formel eingesetzten Molekulargewichte der Einzelproteine sind in Abb. D7 aufgeführt. Sowohl für Erbse als auch Spinat ergibt sich für  $k = 1$  und  $k = 2$  nur ein sehr geringes Bestimmtheitsmaß und  $n \approx 9$  (Abb. D8, jeweils Zeile 1).

		Molekulargewicht in kDa	
		Erbse	Spinat
		Masse	Masse
TatB		18,9	22,8
TatC		33,3	31,4
tQTP <sup>CF</sup>			13,2

**Abbildung D7: Theoretisches Molekulargewicht von TatB, TatC und tQTP<sup>CF</sup>.** Die theoretischen Molekulargewichte der Proteine sind hier zum besseren Überblick aus Material Abschnitt 2.10 Abb. M2 zusammengefasst.

Wie eingangs erwähnt kann ein löslicher Größenstandard das elektrophoretische Laufverhalten von solubilierten Membranproteinkomplexen in der BN-PAGE nicht exakt widerspiegeln. Zur Herleitung des tatsächlichen Molekulargewichtes aus dem apparenten ermittelten Heuberger et al. (2002) deshalb einen Korrekturfaktor von 1,8 für das Molekulargewicht des an die Proteine gebundenen Coomassie. Wittig et al. (2010) führten ihrerseits einen detaillierten Vergleich des elektrophoretischen Laufverhaltens von löslichen und Membranproteinkomplexen durch. Hierbei wurde der Faktor 1,43 (im Artikel als Reziprok 0,7 genannt) abgeleitet. Danach wird das Molekulargewicht von Membranproteinkomplexen im Vergleich zu löslichen Proteinstandards um den Faktor 1,43 zu hoch interpretiert. Mit beiden Faktoren wurden Regressionsanalysen durchgeführt. Da mit dem Faktor 1,8 aber höhere Bestimmtheitsmaße erreicht wurden, sind nur

diese Daten gezeigt (Abb. D8 jeweils Zeile 2). Für zukünftige Experimente ist der Einsatz eines Membranproteingrößenstandards empfehlenswert (I. Wittig et al., 2010).

Dementsprechend wurde die Formel zur Berechnung des apparenten Molekulargewichtes  $m_{app}$  in der BN-PAGE erweitert:

Formel 2 
$$m_{app\ TatBC}(i) = 1,8 \cdot (n \cdot m_{TatC} + (n - ik) \cdot m_{TatB} + m_{Substrat})$$

$m_{app\ TatBC}(i)$  ... apparentes (BN-PAGE) Molekulargewicht eines TatBC-Komplexes

k = 1 Molekül TatB

Formel	Korrekturfaktor	Protomerzahl n		Abwg. Masse TatB $d_{TatB}$		Bestimmtheitsmaß $R^2$	
		Erbse	Spinat	Erbse	Spinat	Erbse	Spinat
<b>1a</b>		9	8,7			0,314	0,294
<b>2</b>	1,8	5,1	5			0,523	0,493
<b>3</b>	1,8	4,8	4,6	10,1 kDa	13,2 kDa	0,641	0,616
<b>3</b>	1,8	3,5	3,2	75,0 kDa	101,4 kDa	0,993	0,999
<b>3</b>	1,8	3,4 (gemeinsam)		85,5 kDa	91,5 kDa	0,98	0,992

k = 2 Moleküle TatB

Formel	Korrekturfaktor	Protomerzahl n		Abwg. Masse TatB $d_{TatB}$		Bestimmtheitsmaß $R^2$	
		Erbse	Spinat	Erbse	Spinat	Erbse	Spinat
<b>1a</b>		9,5	9,3			0,569	0,537
<b>2</b>	1,8	5,7	5,6			0,852	0,82
<b>3</b>	1,8	5,4	5,3	10,1 kDa	13,2 kDa	0,957	0,942
<b>3</b>	1,8	5,2	5	20,5 kDa	30,2 kDa	0,993	0,999
<b>3</b>	1,8	5,1 (gemeinsam)		22,7 kDa	28,2 kDa	0,989	0,997

**Abbildung D8: Abschätzung der Protomerzahl intakter TatBC-Komplexe durch Regressionsanalyse der Daten von Abb. E5 bzw. D6.** Für Erklärungen siehe zu Formeln gehörende Textabschnitte. Mit den ermittelten apparenten Molekulargewichten der TatBC-Komplexspezies (Abb. D6) wurden nach den Formeln 1a-3 Regressionsanalysen durchgeführt. Die Regression erfolgte für grün markierte Parameter. Kursive Werte wurden zuvor festgelegt. Die Abweichung  $d_{TatB}$  ist der Unterschied zwischen theoretischem und apparentem Molekulargewicht von TatB (siehe Abb. D9). Bei „gemeinsam“ wurden für die Funktionen von Erbse und Spinat nicht getrennte n, sondern ein gemeinsamer Wert ermittelt (siehe dazu Abb. D10). Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  gibt im Bereich von 0-1 an, wie gut die Funktion mit den erhaltenen Parametern zu den Messwerten passt. Graue  $R^2$  sind mit schwarzen nicht vergleichbar, da die Regression mit zwei Variablen anstatt einer durchgeführt wurde. Weitere Details Methoden Abschnitt 3.6.2.

Mit Korrekturfaktor steigen die Bestimmtheitsmaße deutlich an, die Funktion passt besser zu den Messwerten. Für  $k = 1$  wird bei beiden Pflanzen  $n \approx 5$ , für  $k = 2$  wird  $n \approx 5,7$  (Abb. D8 jeweils Zeile 2).

Ein weiteres Phänomen, das Einfluss auf das apparente Molekulargewicht von TatBC-Komplexen haben könnte ist der Umstand, dass Proteine der TatAB-Familie oftmals ein abweichendes Verhalten in Elektrophoresen zeigen. Für TatB wurde dies bereits 1997 von Settles et al.<sup>7</sup> beschrieben. Wie in Abb. D9 zusammengefasst, migrieren die TatB-Proteine von Erbse und Spinat in der SDS-PAGE etwa 10,1 kDa bzw. 13,2 kDa höher als erwartet. In CTAB-PAGE, einem alternativen denaturierenden Elektrophoresesystem, migriert TatB aus Erbse sogar oberhalb von TatC (Daten nicht gezeigt). Die verringerte elektrophoretische Mobilität ist wahrscheinlich auf eine Störung der Detergensbindung durch die APH zurückzuführen (Pettersson et al., 2018); sie zeigt sich auch ohne die TMH (Jakob et al., 2009; H. Mori et al., 1999). Man kann davon ausgehen, dass dies auch die Coomassiebindung beeinträchtigt (vgl. auch Tal et al., 1985). Des Weiteren beschrieben Wittig et al. (2010), dass lösliche Proteine generell dazu neigen, weniger Coomassie zu binden, was sich vermutlich auf den großen löslichen Anteil von TatB übertragen lässt.

	Molekulargewicht in kDa	
	Erbse	Spinat
TatB (theor.)	18,9	22,8
TatB (app. SDS-PAGE)	26-32	35-37
Differenz $d_{\text{TatB}}$	ca. 10,1	ca. 13,2

**Abbildung D9: Theoretisches und apparentes Molekulargewicht von TatB.** Das apparente Molekulargewicht von TatB in der SDS-PAGE unterscheidet sich vom theoretischen. Für eine bessere Übersicht sind die Werte aus Abb. M4 hier erneut dargestellt.

Man kann vermuten, dass TatB auch in der BN-PAGE überproportional zum apparenten Molekulargewicht beitragen könnte. Des Weiteren könnte sich so die breitere Streuung der TatBC-Komplexe aus Spinat im Vergleich zu denen aus Erbse erklären. TatC aus Spinat hat ein geringeres Molekulargewicht als das Erbsenprotein, während Spinat-TatB ein größeres apparentes Molekulargewicht als sein Pendant besitzt. Daher wurde die Konstante TatB-Abweichung ( $d_{\text{TatB}}$  in kDa) in der Funktion ergänzt. Als Wert wurde die Abweichung entsprechend den SDS-PAGE-Daten verwendet.  $d_{\text{TatB}}$  wird mit der momentanen Anzahl von TatB-Molekülen ( $n \cdot i \cdot k$ ) multipliziert:

$$\text{Formel 3: } m_{\text{app TatBC}}(i) = 1,8 \cdot (n \cdot m_{\text{TatC}} + (n - ik) \cdot m_{\text{TatB}} + m_{\text{Substrat}}) + (n - ik) \cdot d_{\text{TatB}}$$

$d_{\text{TatB}}$  ... Abweichung des TatB- Molekulargewichtes in PAGE-Analysen

<sup>7</sup> nach „Note 21“, einem nachgestellten Kommentar zur Publikation

Die zusätzliche Korrektur verbessert die Bestimmtheitsmaße wiederum (siehe Abb. D8 Zeile 3). Mit  $R^2 \approx 0,95$  passt das  $k = 2$  Modell schon recht gut zu den beobachteten Daten. Da in der BN-PAGE-Analyse aber andere Bedingungen vorliegen als bei der SDS-PAGE, ist die mutmaßliche TatB-Abweichung  $d_{\text{TatB}}$  in den beiden Analysemethoden vermutlich nicht gleich. Aus diesem Grund wurde bei der Regressionsanalyse im nächsten Schritt neben  $n$  auch ein optimales  $d_{\text{TatB}}$  ermittelt (Abb. D8 Zeile 4).

Vor der weiteren Diskussion der Daten soll die letzte Modifikation erklärt werden: Es ist anzunehmen, dass für Erbse und Spinat dieselbe Protomerzahl  $n$  vorliegt. Deshalb wurde in den jeweiligen Funktionen anstelle separater  $n$  dasselbe  $n_{\text{gemeinsam}}$  eingesetzt (vgl. Abb. D10). Alle anderen Werte entsprachen weiterhin denen des jeweiligen Organismus. Die ermittelten Werte für  $n_{\text{gemeinsam}}$  und  $d_{\text{TatB}}$  sind in Abb. D8 Zeile 5 notiert.

separate Protomerzahl  $n$ :

$$\begin{aligned} \text{Erbse} \quad m_{\text{app TatBC}}(i) &= 1,8 \cdot (n_E \cdot m_{\text{TatC}} + (n_E - ik) \cdot m_{\text{TatB}} + m_{\text{Substrat}}) + (n_E - ik) \cdot d_{\text{TatB}} \\ \text{Spinat} \quad m_{\text{app TatBC}}(i) &= 1,8 \cdot (n_S \cdot m_{\text{TatC}} + (n_S - ik) \cdot m_{\text{TatB}} + m_{\text{Substrat}}) + (n_S - ik) \cdot d_{\text{TatB}} \end{aligned}$$

$n_{\text{Erbse}} \rightarrow \text{Regression} \rightarrow \text{Wert 1 für Erbse}$   
 $n_{\text{Spinat}} \rightarrow \text{Regression} \rightarrow \text{Wert 2 für Spinat}$

gemeinsame Protomerzahl  $n$ :

$$\begin{aligned} \text{Erbse} \quad m_{\text{app TatBC}}(i) &= 1,8 \cdot (n_g \cdot m_{\text{TatC}} + (n_g - ik) \cdot m_{\text{TatB}} + m_{\text{Substrat}}) + (n_g - ik) \cdot d_{\text{TatB}} \\ \text{Spinat} \quad m_{\text{app TatBC}}(i) &= 1,8 \cdot (n_g \cdot m_{\text{TatC}} + (n_g - ik) \cdot m_{\text{TatB}} + m_{\text{Substrat}}) + (n_g - ik) \cdot d_{\text{TatB}} \end{aligned}$$

$n_{\text{gemeinsam}} \rightarrow \text{Regression} \rightarrow \text{gemeinsamer Wert 3}$

**Abbildung D10: Illustration zur Regressionsanalyse für getrennte oder eine gemeinsame Protomerzahl für Erbse und Spinat.** Nach Formel 3. Details siehe Text.

Für die Schrittgröße  $k = 1$  ergibt sich damit die Protomerzahl  $n = 3,4$  und bei  $k = 2$  ergibt sich  $n = 5,1$ . Wie zuvor beschrieben, kommen bei dieser Analyse nur die Protomerzahlen 3 und 6 in Betracht. Daher beschreiben die zwei resultierenden Modelle TatBC-Komplexe mit 3 bzw. 6 TatBC-Protomeren – das  $(\text{TatBC})_3$ - und das  $(\text{TatBC})_6$ -Modell. Die Abweichungen zwischen den durch Regression ermittelten Protomerzahlen und den theoretisch möglichen Wert sind vermutlich nicht ausgesprochen hoch, da ein konstanter Korrekturfaktor für das apparente Molekulargewicht oftmals nur eine grobe Näherung an die tatsächlichen Molekulargewichte der Komplexe erlaubt (I. Wittig et al., 2010). Wurden die Regressionsanalysen zu Kontrollzwecken mit anderen BN-PAGE-Ergebnissen aus meiner Arbeitszeit, verschiedenen Daten der Arbeitsgruppe Klösigen (bspw. Dissertation Schlesier, 2015 und Dissertation Waclawek, 2016) und publizierten Analysen von Ma & Cline (2013) durchgeführt, ergaben sich im Wesentlichen übereinstimmende Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).-

Es besteht nun die Frage, welches der beiden vorgeschlagenen Modelle am ehesten der Realität entspricht.

Die mit Formel 3 ermittelte Abweichung  $d_{\text{TatB}}$  des TatB- Molekulargewichtes ist beim  $(\text{TatBC})_6$ -Modell (Abb. D8, k = 2 Zeile 5) mit 22,7 kDa (Erbse) und 28,2 kDa (Spinat) nur etwa doppelt so hoch wie die für SDS-PAGEs beobachteten Werte. Die Größenunterschiede der verschiedenen Komplexe ließen sich in einem  $(\text{TatBC})_6$ -Modell also überwiegend durch den Verlust von TatB erklären. Entsprechend wird, anders als beim  $(\text{TatBC})_3$ -Modell weiter unten, nicht unbedingt ein zusätzlicher Beitrag von anderen verlorengelassenen Komponenten wie bspw. Lipiden für diese Erklärung benötigt. Das Modell erscheint dadurch sehr realistisch. Ein weiteres Argument für das  $(\text{TatBC})_6$ -Modell sind Daten von Behrendt & Brüser: TatC wurde in einem *E. coli*-Stamm, der keine eigenen Tat-Proteine besitzt, synthetisiert und mit Digitonin oder dem weniger milden  $\text{C}_{12}\text{E}_9$  solubilisiert. Mit Digitonin zeigte sich ein einziger Komplex von rund 260 kDa (apparentes Molekulargewicht ermittelt nach Methoden Abschnitt 3.6.1). Bei der Verwendung von  $\text{C}_{12}\text{E}_9$  erschienen insgesamt sechs Signale mit apparenten Molekulargewichten zwischen ca. 280 und 45 kDa (Behrendt & Brüser, 2014, Fig. 4 „ $\alpha\text{TatC}$ “). Die Autoren schlussfolgerten, dass diese eine aufsteigende Assoziierung von TatC-Molekülen bis hin zu einem TatC-Hexamer widerspiegeln. Es ist wahrscheinlich, dass die zuvor erläuterten Zusammenhänge zwischen tatsächlichem und apparentem Molekulargewicht in der BN-PAGE auch hier gelten. Daher kann man die apparenten Molekulargewichte mit 1,8 dividieren und dann wiederum durch die vermutete TatC-Anzahl von eins (Monomer) bis sechs (Hexamer) teilen, um wieder auf das Molekulargewicht des monomeren Proteins zurückzurechnen. Die Ergebnisse liegen im Bereich von 23 bis 26 kDa und damit nahe am theoretischen Wert des *E. coli* TatC- Molekulargewichtes mit 28,9 kDa (berechnet nach Sequenz, NCBI: VWQ03362.1), was die Hypothese der Autoren unterstützt. Allerdings zeigten Orriss et al. in einem ähnlichen Experiment nur vier TatC-Komplexe (Orriss et al., 2007, Fig. 4).

Für das  $(\text{TatBC})_3$ -Modell (Abb. D8, k = 1 Zeile 5) ergaben sich  $d_{\text{TatB}}$ -Werte von 85,5 kDa (Erbse) und 91,5 kDa (Spinat). Es ist eher unwahrscheinlich, dass TatB allein eine so große Abweichung bewirkt. Ein  $(\text{TatBC})_3$ -Modell könnte durch andere Bestandteile des TatBC-Komplexes erklärt werden, die zusammen mit TatB dissoziieren. Wojnowska et al. (2018) verwendeten zur Isolierung von TatBC-Komplexen aus *E. coli* das Digitonin-ähnliche Glycodiosgenin und wiesen pro Komplex ca. 129 Moleküle Phosphatidylethanolamin nach. Da das Molekulargewicht von bspw. Dipalmitoyl-Phosphatidylethanolamin ( $\text{C}_{37}\text{H}_{74}\text{NO}_8\text{P}$ ) etwa 0,7 kDa beträgt, könnte es etwa  $129 \cdot 0,7 \text{ kDa} \approx 90 \text{ kDa}$  zum Molekulargewicht des größten TatBC-Komplexes beitragen. Lipide könnten ihrerseits noch Coomassie oder Detergenzien binden und das Molekulargewicht weiter erhöhen. Es ist

allerdings schwer vorstellbar, dass diese Zusätze die erhebliche Abweichung zwischen  $\text{TatB}_3\text{C}_3$  und  $\text{TatB}_0\text{C}_3$ , also  $3 \cdot d_{\text{TatB}}$ , mit ca. 256,5 (Erbse) oder 274,5 kDa (Spinat) gänzlich erklären könnten.

Ein zusätzlicher Beitrag von Lipiden könnte natürlich auch das  $(\text{TatBC})_6$ -Modell ergänzen. Bei zwei  $\text{TatB}$ , die pro Schritt verloren gehen, beträgt die  $\text{TatB}$ -Abweichung  $2 \cdot d_{\text{TatB}} = 45,4$  kDa (Erbse) bzw. 56,4 kDa (Spinat). Ginge mit jedem der drei Dissoziationsschritte ein Anteil der beispielhaften 90 kDa Lipide verloren ohne, dass das  $\text{TatC}$ -Oligomer gänzlich frei von Lipiden wäre, so würde ein Unterschied des Molekulargewichtes von weniger als 30 kDa pro Schritt entstehen. Die errechnete  $\text{TatB}$ -Abweichung von  $3 \cdot 45,4$  kDa = 136,2 kDa könnte sich also aus der Summe des anormalen elektrophoretischen Laufverhaltens von  $\text{TatB}$  und dem Beitrag der Lipide zusammensetzen (Summe „ $d_{\text{TatB}}$ “ = 136,2 kDa = Beitrag  $\text{TatB}$  + Beitrag Lipide).

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass eine gerade Anzahl von  $\text{TatC}$  im  $\text{TatBC}$ -Komplex vorliegt (Dilks et al., 2005; Ghosh et al., 2019; Maldonado et al., 2011). Daher erscheint das  $(\text{TatBC})_6$ -Modell als das wahrscheinlichere.

Allerdings ergibt sich aus dem dazugehörigen  $k = 2$  zwangsläufig die Frage, warum pro Dissoziationsschritt zwei Moleküle  $\text{TatB}$  verloren gehen. Grundsätzlich ist  $\text{TatB}$  in der Lage, mit anderen  $\text{TatB}$ -Molekülen zu interagieren und zu oligomerisieren. Allerdings gibt es keine auffällige Häufung von Hinweisen auf eine besondere Stellung von  $\text{TatB}$ -Paaren bzw. -Dimeren. Fröbel et al. (2019) beschrieben, dass vermutlich alle  $\text{TatB}$ -Moleküle eines  $\text{TatBC}$ -Komplexes als gemeinsames Oligomer vorliegen und somit keine bevorzugte Organisation als separate Dimere stattfindet. Allerdings könnte die angerissene mutmaßliche Elliptizität der  $\text{TatBC}$ -Komplexe möglicherweise zu einer bevorzugten Dissoziation bestimmter  $\text{TatB}$ -Moleküle führen (Abschnitt 4.2.3).

Fazit:

Die Komplexdissoziation erklärt die Beziehung der  $\text{TatBC}$ -Komplexspezies zueinander. Mit den daraus folgenden und im Text erörterten zusätzlichen Beschränkungen lassen sich aus BN-PAGE-Daten verlässlichere Aussagen zur Protomerzahl der Komplexe ableiten. In Thylakoiden liegen wahrscheinlich  $(\text{TatBC})_6$ -Komplexe vor, von denen vermutlich bei jedem Schritt der Komplexdissoziation zwei Moleküle  $\text{TatB}$  verloren gehen. Es ist unklar, warum ausgerechnet diese Anzahl des Proteins dissoziiert.



## Danksagung

Mit ziemlicher Sicherheit kann ich mit nicht bei allen Menschen bedanken, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit Dank verdient hätten. Einen Versuch ist es trotzdem wert.

Zuallererst bedanke ich mich bei Prof. Dr. Ralf Bernd Klösger, meinem Doktorvater. Danke für die Möglichkeit, einige Steinchen des faszinierenden Tat-Gebirges in seinem Bergwerk analysieren zu dürfen. Danke für Zeit, Mühe, Material, die Unterstützung, das Interesse an meiner Arbeit, die Ungezwungenheit in Kommunikation und Organisation, für die gesunde Diskussionskultur, das Querdenken (im ursprünglichen Sinne, nicht der Unsinn, für den der Begriff in Tagen von Corona missbraucht wird) und definitiv für den Freiraum, den ich in sämtlichen Aspekten der wissenschaftlichen Arbeit genießen durfte. Stolz kann ich sagen, dass ich mich in der Zeit mit dir und in deiner Arbeitsgruppe sowohl fachlich als auch persönlich enorm weiterentwickelt habe. Ich freue mich auf die weitere Zusammenarbeit, wie auch immer die nun konkret aussehen mag. (Und natürlich auch Danke für die Anfertigung des Erstgutachtens).

Ich bedanke mich herzlich bei Jun.-Prof. Dr. Carla Schmidt und Prof. Dr. Robert Tampé für die Anfertigung des Zweit- und Drittgutachten. Allen Gutachtern außerdem besonderer Dank für die Ausdauer beim Lesen - und auch eine kleine Entschuldigung dafür, dass die Arbeit so umfangreich und möglicherweise nicht die optimale Abendlektüre ist. Ich wollte etwas schaffen. Und ich fürchte, diese Absicht merkt man auch.

Herzlichen Dank noch mal an Jun.-Prof. Dr. Carla Schmidt sowie Caroline Haupt und Julian Bender für die Vorbereitung und Durchführung der massenspektrometrischen Analyse.

Allerbesten Dank an Dr. Mario Jakob und Birgit Kretschmann für die unmittelbare Betreuung meiner Wenigkeit. Mario, eigentlich ist dahingehend schon alles gesagt, aber es schadet sicher nicht, das noch mal festzuhalten: Deine fachliche Kompetenz ist unerhört und deine Ausdauer und Motivation im Austüfteln von Problemen theoretischer und praktischer Natur ist für mich schlicht ein hohes Ziel. Deine unerschütterlich ruhige Art ist für mich ebenso vorbildhaft und essentieller Bestandteil des guten Arbeitsklimas, in dem ich werkeln durfte. Auch an dich geht der Dank, dass du mir bei der Arbeit in deinem Projekt so viel Freiraum gelassen hast. Danke auch für den Umgang auf Augenhöhe.

Wenn Mario Blau ist (die Farbe, wohlgemerkt), dann ist Frau Kretschmann Orange. Wenn sich Kompetenzen ergänzen. Ein unschlagbares Team. Das passt wie ... naja, so in der Richtung eben. Frau Kretschmann: Ich glaube behaupten zu können, dass ich mit Ihnen den größten Teil der Zeit in der Arbeitsgruppe verbracht habe. Ihre Fachkompetenz, meisterliches Handwerk, umfassendes Wissen über diese Details, die immer mit Bleistift am Rand stehen (die wirklich wichtigen!), exzellente Organisation und ein Gespür für das Angemessene (in sämtlichen Aspekten) haben Sie mit mir geteilt, wofür ich Ihnen sehr dankbar bin. Danke für das große Interesse an meiner Arbeit und die unheimliche Fähigkeit, immer noch eine Idee mehr zu haben! Sie haben mir sehr viel beigebracht.

Zu den zwischenmenschlichen Aspekten würde ich mal so etwas sagen wie „Dabei sein ist mehr als tausend Worte“. Danke für die unvergessliche Zeit in der 253!

Wenn ich mir hier noch mehr schwülstige Phrasen abringe, als ich es schon für eure Verteidigungen mache, dann steigt euch das womöglich noch zu Kopf, Sarah und Jana. Naja, was solls. Danke, Danke und nochmals Danke dafür, dass zwei so kluge, vielschichtige, interessante, liebenswerte und ehrliche Menschen nicht nur meine lieben Kolleginnen waren, sondern auch Teil meines Lebens sind. Wie schon zuvor ist es auch hier nicht ganz leicht, weitere Worte zu finden. Wie wär's mit: „Der Mensch ist ein Produkt seiner Umwelt“. Na, da hatte ich aber Glück mit der Vegetation.

Alle anderen (Ex-) Mitglieder der Arbeitsgruppe möchte ich hier ausdrücklich auf eine Stufe stellen, damit ich niemanden bevorzuge oder vergesse. Geht ja auch viel schneller so. Wenn du dich gerne in der Danksagung gesehen hättest, sei bitte nicht enttäuscht. Dir sei hiermit in *vollem Ernst* gesagt: „Schön, dass es dich gibt und Danke für das gemeinsam Erlebte!“ Eingeschlossen seien hier auch alle Bienen, die im Biologicum umhersurren oder sich irgendwo anders in meinem Arbeits-Dunstkreis aufhielten.

Ganz ähnlich möchte ich die Geschichte für meine Freunde und meine Familie aufziehen. Fühlt euch bitte in der obigen Formulierung eingeschlossen! Insbesondere sollen sich die Freunde angesprochen fühlen, die ich erst seit relativ kurzer Zeit kenne, die ich aber aus verschiedenen Gründen nicht auch noch namentlich nennen möchte. Ja, du bist gemeint!

An der Bezeichnung einiger besonderer Organismen komme ich letztlich jedoch nicht vorbei: Selbstverständlich danke ich meinen Eltern. Zum einen: Ich liebe euch. Zum anderen: Gut gemacht! ;). Dank an meine herzallerliebste Schwesti. Mit dir schöpfe ich metaphysisch aus dem Vollen! Dank gilt natürlich Alex (die tausendjährige WG), Christian (die tausendste Autotour), Jenny (tausendmal so schnell wie ich) und Franzl (die mich zum tausendsten Mal auf die Palme bringt), liebenswerten und allesamt charakterstarken Weggefährten für ihre langjährige wertvolle Freundschaft.

Danke an die fleißigen Korrekturleser! Und Danke auch an alle Musikmacher!

Lots of gratitude to all people who did and do research (and do desperation) on Tat! Besonderen Dank an die Mitglieder der (ehemaligen) Tat-AGs in Deutschland für wertvollen Input bei den lustigen kleinen aber leider seltenen Tat-Gipfelkonferenzen. Ach, und überhaupt thanks to the whole scientific community! Your ambitions and endeavours are a beacon of hope against ignorance and hate.

So, das war's. Danke fürs Lesen!

Halle (Saale), 18.11.2020, 1.15 Uhr

## Literaturverzeichnis

- Agne, B., Meindl, N. M., Niederhoff, K., Einwächter, H., Rehling, P., Sickmann, A., Meyer, H. E., Girzalsky, W. & Kunau, W. H. (2003). Pex8p: An intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Molecular Cell*, *11*(3), 635–646. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00062-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00062-5)
- Alami, M., Lütke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H.-G., Brunner, J. & Müller, M. (2003). Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Molecular Cell*, *12*(4), 937–946. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00398-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00398-8)
- Albertini, M., Rehling, P., Erdmann, R., Girzalsky, W., Kiel, J. A., Veenhuis, M. & Kunau, W. H. (1997). Pex14p, a peroxisomal membrane protein binding both receptors of the two PTS-dependent import pathways. *Cell*, *89*(1), 83–92. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80185-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80185-3)
- Alcock, F., Baker, M. A. B., Greene, N. P., Palmer, T., Wallace, M. I. & Berks, B. C. (2013). Live cell imaging shows reversible assembly of the TatA component of the twin-arginine protein transport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(38), E3650–E3659. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306738110>
- Alcock, F., Damen, M. P., Levring, J. & Berks, B. C. (2017). In vivo experiments do not support the charge zipper model for Tat translocase assembly. *eLife*, *6*. <https://doi.org/10.7554/eLife.30127>
- Alcock, F., Stansfeld, P. J., Basit, H., Habersetzer, J., Baker, M. A., Palmer, T., Wallace, M. I. & Berks, B. C. (2016). Assembling the Tat protein translocase. *eLife*, *5*, e20718. <https://doi.org/10.7554/eLife.20718>
- Alder, N. N. & Theg, S. M. (2003a). Protein transport via the cpTat pathway displays cooperativity and is stimulated by transport-incompetent substrate. *FEBS Letters*, *540*(1–3), 96–100. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00231-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00231-X)
- Alder, N. N. & Theg, S. M. (2003b). Energetics of protein transport across biological membranes. A study of the thylakoid DeltapH-dependent/cpTat pathway. *Cell*, *112*(2), 231–242. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00032-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00032-1)
- Aldridge, C., Ma, X., Gerard, F. & Cline, K. (2014). Substrate-gated docking of pore subunit Tha4 in the TatC cavity initiates Tat translocase assembly. *The Journal of Cell Biology*, *205*(1), 51–65. <https://doi.org/10.1083/jcb.201311057>
- Aldridge, C., Spence, E., Kirkilionis, M. A., Frigerio, L. & Robinson, C. (2008). Tat-dependent targeting of Rieske iron-sulphur proteins to both the plasma and thylakoid membranes in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Molecular Microbiology*, *70*(1), 140–150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06401.x>
- Aldridge, C., Storm, A., Cline, K. & Dabney-Smith, C. (2012). The Chloroplast Twin Arginine Transport (Tat) Component, Tha4, Undergoes Conformational Changes Leading to Tat Protein Transport. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(41), 34752–34763. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.385666>
- Allen, S. C. H., Barrett, C. M. L., Ray, N. & Robinson, C. (2002). Essential Cytoplasmic Domains in the *Escherichia coli* TatC Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(12), 10362–10366. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109135200>
- Althoff, T., Davies, K. M., Schulze, S., Joos, F. & Kühlbrandt, W. (2012). GRecon: A Method for the Lipid Reconstitution of Membrane Proteins. *Angewandte Chemie International Edition*, *51*(33), 8343–8347. <https://doi.org/10.1002/anie.201202094>
- Anderson, J. M. & Boardman, N. K. (1966). Fractionation of the photochemical systems of photosynthesis. I. Chlorophyll contents and photochemical activities of particles isolated from spinach chloroplasts. *Bibliotek for Laeger*, *112*(3), 403–421. [https://doi.org/10.1016/0926-6585\(66\)90244-5](https://doi.org/10.1016/0926-6585(66)90244-5)
- Annweiler, A., Hipskind, R. A. & Wirth, T. (1991). A strategy for efficient *in vitro* translation of cDNAs using the rabbit f-globin leader sequence. 1.
- Arenas, R. C., Danielczak, B., Martel, A., Porcar, L., Breyton, C., Ebel, C. & Keller, S. (2017). Fast Collisional Lipid Transfer Among Polymer-Bounded Nanodiscs. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep45875>

- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A. & Schägger, H. (1998). Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: Identification of three dimer-specific subunits. *The EMBO Journal*, 17(24), 7170–7178. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7170>
- Arnon, D. I. (1949). Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. *Plant Physiology*, 24(1), 1–15. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Asai, T., Shinoda, Y., Nohara, T., Yoshihisa, T. & Endo, T. (1999). Sec-dependent Pathway and  $\Delta$ pH-dependent Pathway Do Not Share a Common Translocation Pore in Thylakoidal Protein Transport. *Journal of Biological Chemistry*, 274(29), 20075–20078. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.29.20075>
- Azevedo, J. E. & Schliebs, W. (2006). Pex14p, more than just a docking protein. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1763(12), 1574–1584. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.002>
- Bageshwar, U. K. & Musser, S. M. (2007). Two electrical potential-dependent steps are required for transport by the Escherichia coli Tat machinery. *The Journal of Cell Biology*, 179(1), 87–99. <https://doi.org/10.1083/jcb.200702082>
- Bageshwar, U. K., Whitaker, N., Liang, F.-C. & Musser, S. M. (2009). Interconvertibility of lipid- and translocon-bound forms of the bacterial Tat precursor pre-Sufl. *Molecular Microbiology*, 74(1), 209–226. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06862.x>
- Baglieri, J., Beck, D., Vasisht, N., Smith, C. J. & Robinson, C. (2012). Structure of TatA paralog, TatE, suggests a structurally homogeneous form of Tat protein translocase that transports folded proteins of differing diameter. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(10), 7335–7344. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.326355>
- Balsera, M., Goetze, T. A., Kovács-Bogdán, E., Schürmann, P., Wagner, R., Buchanan, B. B., Soll, J. & Bölter, B. (2009). Characterization of Tic110, a Channel-forming Protein at the Inner Envelope Membrane of Chloroplasts, Unveils a Response to Ca<sup>2+</sup> and a Stromal Regulatory Disulfide Bridge. *Journal of Biological Chemistry*, 284(5), 2603–2616. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807134200>
- Barber, J. & Chow, W. S. (1979). A mechanism for controlling the stacking and unstacking of chloroplast thylakoid membranes. *FEBS Letters*, 105(1), 5–10. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)80875-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80875-3)
- Barnett, J. P., Eijlander, R. T., Kuipers, O. P. & Robinson, C. (2008). A Minimal Tat System from a Gram-positive Organism A BIFUNCTIONAL TatA SUBUNIT PARTICIPATES IN DISCRETE TatAC AND TatA COMPLEXES. *Journal of Biological Chemistry*, 283(5), 2534–2542. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708134200>
- Barnett, J. P., van der Ploeg, R., Eijlander, R. T., Nenninger, A., Mendel, S., Rozeboom, R., Kuipers, O. P., van Dijl, J. M. & Robinson, C. (2009). The twin-arginine translocation (Tat) systems from Bacillus subtilis display a conserved mode of complex organization and similar substrate recognition requirements. *The FEBS Journal*, 276(1), 232–243. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06776.x>
- Barrett, C. M. L., Freudl, R. & Robinson, C. (2007). Twin arginine translocation (Tat)-dependent export in the apparent absence of TatABC or TatA complexes using modified Escherichia coli TatA subunits that substitute for TatB. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36206–36213. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704127200>
- Barrett, C. M. L., Mangels, D. & Robinson, C. (2005). Mutations in subunits of the Escherichia coli twin-arginine translocase block function via differing effects on translocation activity or tat complex structure. *Journal of Molecular Biology*, 347(2), 453–463. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.01.026>
- Barrett, C. M. L. & Robinson, C. (2005). Evidence for interactions between domains of TatA and TatB from mutagenesis of the TatABC subunits of the twin-arginine translocase. *The FEBS Journal*, 272(9), 2261–2275. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04654.x>
- Barros-Barbosa, A., Ferreira, M. J., Rodrigues, T. A., Pedrosa, A. G., Grou, C. P., Pinto, M. P., Fransen, M., Francisco, T. & Azevedo, J. E. (2019). Membrane topologies of PEX13 and PEX14 provide new insights on the mechanism of protein import into peroxisomes. *The FEBS Journal*, 286(1), 205–222. <https://doi.org/10.1111/febs.14697>
- Beck, D., Vasisht, N., Baglieri, J., Monteferrante, C. G., van Dijl, J. M., Robinson, C. & Smith, C. J. (2013). Ultrastructural characterisation of Bacillus subtilis TatA complexes suggests they are too small to

- form homooligomeric translocation pores. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(8), 1811–1819. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.028>
- Beck, M. & Hurt, E. (2017). The nuclear pore complex: Understanding its function through structural insight. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 18(2), 73–89. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.147>
- Behrendt, J. & Brüser, T. (2014). The TatBC complex of the Tat protein translocase in *Escherichia coli* and its transition to the substrate-bound TatABC complex. *Biochemistry*, 53(14), 2344–2354. <https://doi.org/10.1021/bi500169s>
- Behrendt, J., Lindenstrauß, U. & Brüser, T. (2007). The TatBC complex formation suppresses a modular TatB-multimerization in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 581(21), 4085–4090. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.07.045>
- Bell, A. J., Frankel, L. K. & Bricker, T. M. (2015). High Yield Non-detergent Isolation of Photosystem I-Light-harvesting Chlorophyll II Membranes from Spinach Thylakoids. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(30), 18429–18437. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.663872>
- Bennewitz, B., Sharma, M., Tannert, F. & Klösgen, R. B. (2020). *Dual targeting of TatA points to a chloroplast-like Tat pathway in plant mitochondria* [Preprint]. Cell Biology. <https://doi.org/10.1101/2020.04.06.026997>
- Berghöfer, J. & Klösgen, R. B. (1999). Two distinct translocation intermediates can be distinguished during protein transport by the TAT ( $\Delta$ ph) pathway across the thylakoid membrane. *FEBS Letters*, 460(2), 328–332. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01365-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01365-4)
- Berks, B. C. (1996). A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Molecular Microbiology*, 22(3), 393–404. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.00114.x>
- Berks, B. C., Sargent, F., De Leeuw, E., Hinsley, A. P., Stanley, N. R., Jack, R. L., Buchanan, G. & Tracy Palmer. (2000). A novel protein transport system involved in the biogenesis of bacterial electron transfer chains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1459(2), 325–330. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00168-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00168-7)
- Berks, B. C., Sargent, F. & Palmer, T. (2000). The Tat protein export pathway. *Molecular Microbiology*, 35(2), 260–274. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01719.x>
- Blaudeck, N., Kreutzenbeck, P., Müller, M., Sprenger, G. A. & Freudl, R. (2005). Isolation and characterization of bifunctional *Escherichia coli* TatA mutant proteins that allow efficient tat-dependent protein translocation in the absence of TatB. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3426–3432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411210200>
- Blümmel, A.-S., Drepper, F., Knapp, B., Eimer, E., Warscheid, B., Müller, M. & Fröbel, J. (2017). Structural features of the TatC membrane protein that determine docking and insertion of a twin-arginine signal peptide. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(52), 21320–21329. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.812560>
- Blümmel, A.-S., Haag, L. A., Eimer, E., Müller, M. & Fröbel, J. (2015). Initial assembly steps of a translocase for folded proteins. *Nature Communications*, 6, 7234. <https://doi.org/10.1038/ncomms8234>
- Bogsch, E. G., Sargent, F., Stanley, N. R., Berks, B. C., Robinson, C. & Palmer, T. (1998). An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18003–18006. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.29.18003>
- Bolhuis, A. (2002). Protein transport in the halophilic archaeon *Halobacterium* sp. NRC-1: A major role for the twin-arginine translocation pathway? *Microbiology*, 148(11), 3335–3346. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3335>
- Bolhuis, A., Bogsch, E. G. & Robinson, C. (2000). Subunit interactions in the twin-arginine translocase complex of *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 472(1), 88–92. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01428-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01428-9)
- 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*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20213–20219. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100682200>

- Bottger, G., Barnett, P., Klein, A. T., Kragt, A., Tabak, H. F. & Distel, B. (2000). Saccharomyces cerevisiae PTS1 receptor Pex5p interacts with the SH3 domain of the peroxisomal membrane protein Pex13p in an unconventional, non-PXXP-related manner. *Molecular Biology of the Cell*, 11(11), 3963–3976. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.11.3963>
- Brady, N. G., Li, M., Ma, Y., Gumbart, J. C. & Bruce, B. D. (2019). Non-detergent isolation of a cyanobacterial photosystem I using styrene maleic acid alternating copolymers. *RSC Advances*, 9(54), 31781–31796. <https://doi.org/10.1039/C9RA04619D>
- Braun, N. A., Davis, A. W. & Theg, S. M. (2007). The chloroplast Tat pathway utilizes the transmembrane electric potential as an energy source. *Biophysical Journal*, 93(6), 1993–1998. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.098731>
- Braun, V. & Hantke, K. (2020). Novel Tat-dependent protein secretion. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.00058-20>
- Braverman, N., Dodt, G., Gould, S. J. & Valle, D. (1998). An Isoform of Pex5p, the Human PTS1 Receptor, is Required for the Import of PTS2 Proteins Into Peroxisomes. *Human Molecular Genetics*, 7(8), 1195–1205. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.8.1195>
- Braverman, N., Steel, G., Obie, C., Moser, A., Moser, H., Gould, S. J. & Valle, D. (1997). Human PEX7 encodes the peroxisomal PTS2 receptor and is responsible for rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Nature Genetics*, 15(4), 369–376. <https://doi.org/10.1038/ng0497-369>
- Brink, S., Bogsch, E. G., Edwards, W. R., Hynds, P. J. & Robinson, C. (1998). Targeting of thylakoid proteins by the delta pH-driven twin-arginine translocation pathway requires a specific signal in the hydrophobic domain in conjunction with the twin-arginine motif. *FEBS Letters*, 434(3), 425–430. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01028-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01028-x)
- Brocard, C. & Hartig, A. (2006). Peroxisome targeting signal 1: Is it really a simple tripeptide? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1565–1573. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.022>
- Brocard, C., Lametschwandtner, G., Koudelka, R. & Hartig, A. (1997). Pex14p is a member of the protein linkage map of Pex5p. *The EMBO Journal*, 16(18), 5491–5500. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.18.5491>
- Brock, I. W., Mills, J. D., Robinson, D. & Robinson, C. (1995). The pH-driven, ATP-independent Protein Translocation Mechanism in the Chloroplast Thylakoid Membrane KINETICS AND ENERGETICS. *Journal of Biological Chemistry*, 270(4), 1657–1662. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.4.1657>
- Brüser, T. & Sanders, C. (2003). An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiological Research*, 158(1), 7–17. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00176>
- Buchanan, G., de 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. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1457–1470. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02853.x>
- Carrie, C., Weißenberger, S. & Soll, J. (2016). Plant mitochondria contain the protein translocase subunits TatB and TatC. *Journal of Cell Science*, 129(20), 3935–3947. <https://doi.org/10.1242/jcs.190975>
- Carvalho, A. F., Costa-Rodrigues, J., Correia, I., Costa Pessoa, J., Faria, T. Q., Martins, C. L., Fransen, M., Sá-Miranda, C. & Azevedo, J. E. (2006). The N-terminal Half of the Peroxisomal Cycling Receptor Pex5p is a Natively Unfolded Domain. *Journal of Molecular Biology*, 356(4), 864–875. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.002>
- Carvalho, A. F., Pinto, M. P., Grou, C. P., Alencastre, I. S., Fransen, M., Sá-Miranda, C. & Azevedo, J. E. (2007). Ubiquitination of mammalian Pex5p, the peroxisomal import receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(43), 31267–31272. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706325200>
- Celedon, J. M. & Cline, K. (2012). Stoichiometry for binding and transport by the twin arginine translocation system. *The Journal of Cell Biology*, 197(4), 523–534. <https://doi.org/10.1083/jcb.201201096>
- Chaddock, A. M., Mant, A., Karnauchov, I., Brink, S., Herrmann, R. G., Klösgen, R. B. & Robinson, C. (1995). A new type of signal peptide: Central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *The EMBO Journal*, 14(12), 2715–2722.

- Chan, C. S., Haney, E. F., Vogel, H. J. & Turner, R. J. (2011). Towards understanding the Tat translocation mechanism through structural and biophysical studies of the amphipathic region of TatA from *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta*, 1808(9), 2289–2296. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.05.024>
- Chanal, A., Santini, C.-L. & Wu, L.-F. (1998). Potential receptor function of three homologous components, TatA, TatB and TatE, of the twin-arginine signal sequence-dependent metalloenzyme translocation pathway in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 30(3), 674–676. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01095.x>
- Chigri, F., Hörmann, F., Stamp, A., Stammers, D. K., Bölter, B., Soll, J. & Vothknecht, U. C. (2006). Calcium regulation of chloroplast protein translocation is mediated by calmodulin binding to Tic32. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(43), 16051–16056. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607150103>
- Chigri, F., Soll, J. & Vothknecht, U. C. (2005). Calcium regulation of chloroplast protein import. *The Plant Journal*, 42(6), 821–831. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02414.x>
- Clark, S. A. & Theg, S. M. (1997). A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes. *Molecular Biology of the Cell*, 8(5), 923–934.
- Clausmeyer, S., Klösgen, R. B. & Herrmann, R. G. (1993). Protein import into chloroplasts. The hydrophilic luminal proteins exhibit unexpected import and sorting specificities in spite of structurally conserved transit peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 268(19), 13869–13876.
- Cléon, F., Habersetzer, J., Alcock, F., Kneuper, H., Stansfeld, P. J., Basit, H., Wallace, M. I., Berks, B. C. & Palmer, T. (2015). The TatC component of the twin-arginine protein translocase functions as an obligate oligomer. *Molecular Microbiology*, 98(1), 111–129. <https://doi.org/10.1111/mmi.13106>
- Cline, K., Ettinger, W. F. & Theg, S. M. (1992). Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two luminal proteins are transported in the absence of ATP. *Journal of Biological Chemistry*, 267(4), 2688–2696.
- Cline, K. (2015). Mechanistic Aspects of Folded Protein Transport by the Twin Arginine Translocase (Tat). *The Journal of Biological Chemistry*, 290(27), 16530–16538. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.626820>
- Cline, K. & Mori, H. (2001). Thylakoid  $\Delta$ pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC–Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *Journal of Cell Biology*, 154(4), 719–730. <https://doi.org/10.1083/jcb.200105149>
- Coombs, D. H. & Watts, N. R. (1985). Generating sucrose gradients in three minutes by tilted tube rotation. *Analytical Biochemistry*, 148(1), 254–259. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90654-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90654-2)
- Cournia, Z., Allen, T. W., Andricioaei, I., Antonny, B., Baum, D., Brannigan, G., Buchete, N.-V., Deckman, J. T., Delemotte, L., del Val, C., Friedman, R., Gkeka, P., Hege, H.-C., Hénin, J., Kasimova, M. A., Kolocouris, A., Klein, M. L., Khalid, S., Lemieux, M. J., ... Bondar, A.-N. (2015). Membrane Protein Structure, Function, and Dynamics: A Perspective from Experiments and Theory. *The Journal of Membrane Biology*, 248(4), 611–640. <https://doi.org/10.1007/s00232-015-9802-0>
- Crichton, P. G., Harding, M., Ruprecht, J. J., Lee, Y. & Kunji, E. R. S. (2013). Lipid, Detergent, and Coomassie Blue G-250 Affect the Migration of Small Membrane Proteins in Blue Native Gels. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(30), 22163–22173. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484329>
- Cristóbal, S., de Gier, J. W., Nielsen, H. & von Heijne, G. (1999). Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 18(11), 2982–2990. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.11.2982>
- Dabney-Smith, C., Mori, H. & Cline, K. (2003). Requirement of a Tha4-conserved transmembrane glutamate in thylakoid Tat translocase assembly revealed by biochemical complementation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 43027–43033. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307923200>
- Dabney-Smith, C., Mori, H. & Cline, K. (2006). Oligomers of Tha4 Organize at the Thylakoid Tat Translocase during Protein Transport. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5476–5483. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512453200>

- Dammai, V. & Subramani, S. (2001). The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell*, *105*(2), 187–196. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00310-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00310-5)
- De Keersmaecker, S., Vrancken, K., Van Mellaert, L., Anné, J. & Geukens, N. (2007). The Tat pathway in *Streptomyces lividans*: Interaction of Tat subunits and their role in translocation. *Microbiology (Reading, England)*, *153*(Pt 4), 1087–1094. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003053-0>
- de Leeuw, E., Granjon, T., Porcelli, I., Alami, M., Carr, S. B., Müller, M., Sargent, F., Palmer, T. & Berks, B. C. (2002). Oligomeric properties and signal peptide binding by *Escherichia coli* Tat protein transport complexes. *Journal of Molecular Biology*, *322*(5), 1135–1146. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)00820-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)00820-3)
- De Leeuw, E., Porcelli, I., Sargent, F., Palmer, T. & Berks, B. C. (2001). Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway. *FEBS Letters*, *506*(2), 143–148. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02904-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02904-0)
- Dilks, K., Giménez, M. I. & Pohlschröder, M. (2005). Genetic and Biochemical Analysis of the Twin-Arginine Translocation Pathway in Halophilic Archaea. *Journal of Bacteriology*, *187*(23), 8104–8113. <https://doi.org/10.1128/JB.187.23.8104-8113.2005>
- Distel, B., Erdmann, R., Gould, S. J., Blobel, G., Crane, D. I., Cregg, J. M., Dodt, G., Fujiki, Y., Goodman, J. M., Just, W. W., Kiel, J. A., Kunau, W. H., Lazarow, P. B., Mannaerts, G. P., Moser, H. W., Osumi, T., Rachubinski, R. A., Roscher, A., Subramani, S., ... Veenhuis, M. (1996). A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *Journal of Cell Biology*, *135*(1), 1–3. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.1.1>
- Dittmar, J., Schlesier, R. & Klösgen, R. B. (2014). Tat transport of a Sec passenger leads to both completely translocated as well as membrane-arrested passenger proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1843*(2), 446–453. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.11.025>
- Dodt, G., Braverman, N., Wong, C., Moser, A., Moser, H. W., Watkins, P., Valle, D. & Gould, S. J. (1995). Mutations in the PTS1 receptor gene, PXR1, define complementation group 2 of the peroxisome biogenesis disorders. *Nature Genetics*, *9*(2), 115–125. <https://doi.org/10.1038/ng0295-115>
- Dodt, G. & Gould, S. J. (1996). Multiple PEX genes are required for proper subcellular distribution and stability of Pex5p, the PTS1 receptor: Evidence that PTS1 protein import is mediated by a cycling receptor. *The Journal of Cell Biology*, *135*(6 Pt 2), 1763–1774. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.6.1763>
- Dodt, G., Warren, D., Becker, E., Rehling, P. & Gould, S. J. (2001). Domain mapping of human PEX5 reveals functional and structural similarities to *Saccharomyces cerevisiae* Pex18p and Pex21p. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(45), 41769–41781. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106932200>
- Dolata, K. M., Montero, I. G., Miller, W., Sievers, S., Sura, T., Wolff, C., Schlüter, R., Riedel, K. & Robinson, C. (2019). Far-reaching cellular consequences of tat deletion in *Escherichia coli* revealed by comprehensive proteome analyses. *Microbiological Research*, *218*, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.008>
- Dörr, J. M., Scheidelaar, S., Koorengel, M. C., Dominguez, J. J., Schäfer, M., van Walree, C. A. & Killian, J. A. (2016). The styrene-maleic acid copolymer: A versatile tool in membrane research. *European Biophysics Journal: EBJ*, *45*(1), 3–21. <https://doi.org/10.1007/s00249-015-1093-y>
- Duquesne, K. & Sturgis, J. N. (2010). Membrane protein solubilization. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *601*, 205–217. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-344-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-344-2_13)
- Dyer, J. M., McNew, J. A. & Goodman, J. M. (1996). The sorting sequence of the peroxisomal integral membrane protein PMP47 is contained within a short hydrophilic loop. *The Journal of Cell Biology*, *133*(2), 269–280. <https://doi.org/10.1083/jcb.133.2.269>
- Eijlander, R. T., Kolbusz, M. A., Berendsen, E. M. & Kuipers, O. P. (2009). Effects of altered TatC proteins on protein secretion efficiency via the twin-arginine translocation pathway of *Bacillus subtilis*. *Microbiology (Reading, England)*, *155*(Pt 6), 1776–1785. <https://doi.org/10.1099/mic.0.027987-0>
- Einwächter, H., Sowinski, S., Kunau, W.-H. & Schliebs, W. (2001). *Yarrowia lipolytica* Pex20p, *Saccharomyces cerevisiae* Pex18p/Pex21p and mammalian Pex5pL fulfil a common function in the early steps of



- the peroxisomal PTS2 import pathway. *EMBO Reports*, 2(11), 1035–1039. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve228>
- Eisenberg, D., Weiss, R. M. & Terwilliger, T. C. (1984). The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(1), 140–144. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.1.140>
- Eisenberg, David, Weiss, R. M. & Terwilliger, T. C. (1982). The helical hydrophobic moment: A measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*, 299(5881), 371–374. <https://doi.org/10.1038/299371a0>
- El Magraoui, F., Bäumer, B. E., Platta, H. W., Baumann, J. S., Girzalsky, W. & Erdmann, R. (2012). The RING-type ubiquitin ligases Pex2p, Pex10p and Pex12p form a heteromeric complex that displays enhanced activity in an ubiquitin conjugating enzyme-selective manner. *The FEBS Journal*, 279(11), 2060–2070. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08591.x>
- Elgersma, Y., Elgersma-Hooisma, M., Wenzel, T., McCaffery, J. M., Farquhar, M. G. & Subramani, S. (1998). A mobile PTS2 receptor for peroxisomal protein import in *Pichia pastoris*. *The Journal of Cell Biology*, 140(4), 807–820. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.4.807>
- Elgersma, Y., Kwast, L., Klein, A., Voorn-Brouwer, T., van den Berg, M., Metzger, B., America, T., Tabak, H. F. & Distel, B. (1996). The SH3 domain of the *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal membrane protein Pex13p functions as a docking site for Pex5p, a mobile receptor for the import PTS1-containing proteins. *The Journal of Cell Biology*, 135(1), 97–109. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.1.97>
- Elgersma, Ype, Vos, A., Berg, M. van den, Roermund, C. W. T. van, Sluijs, P. van der, Distel, B. & Tabak, H. F. (1996). Analysis of the Carboxyl-terminal Peroxisomal Targeting Signal 1 in a Homologous Context in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(42), 26375–26382. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.42.26375>
- Erdmann, R. & Blobel, G. (1996). Identification of Pex13p a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor. *The Journal of Cell Biology*, 135(1), 111–121. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.1.111>
- Esmaili, M. & Overduin, M. (2018). Membrane biology visualized in nanometer-sized discs formed by styrene maleic acid polymers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(2), 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.10.019>
- Everberg, H., Leiding, T., Schiöth, A., Tjerneld, F. & Gustavsson, N. (2006). Efficient and non-denaturing membrane solubilization combined with enrichment of membrane protein complexes by detergent/polymer aqueous two-phase partitioning for proteome analysis. *Journal of Chromatography. A*, 1122(1–2), 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.04.020>
- Fan, E. (2008). *Analysis of the dynamic property of Tat translocase and the fate of Tat signal peptides* [Dissertation]. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Fan, E., Jakob, M. & Klösgen, R. B. (2010). One signal is enough: Stepwise transport of two distinct passenger proteins by the Tat pathway across the thylakoid membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398(3), 438–443. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.095>
- Fan, H. Y., Das, D. & Heerklotz, H. (2016). “Staying Out” Rather than “Cracking In”: Asymmetric Membrane Insertion of 12:0 Lysophosphocholine. *Langmuir*, 32(44), 11655–11663. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03292>
- Fan, H. Y. & Heerklotz, H. (2017). Digitonin does not flip across cholesterol-poor membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 504, 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.05.034>
- Feissner, R., Xiang, Y. & Kranz, R. G. (2003). Chemiluminescent-based methods to detect subpicomole levels of c-type cytochromes. *Analytical Biochemistry*, 315(1), 90–94. [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(02\)00658-9](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(02)00658-9)
- Finazzi, G., Chasen, C., Wollman, F.-A. & de Vitry, C. (2003). Thylakoid targeting of Tat passenger proteins shows no delta pH dependence in vivo. *The EMBO Journal*, 22(4), 807–815. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg081>
- Fincher, V. (2001). *PROTEIN TRANSLOCATION ON THE DELTA pH-DEPENDENT PATHWAY OF CHLOROPLASTS*. [Dissertation]. University of Florida.

- Fincher, V., Dabney-Smith, C. & Cline, K. (2003). Functional assembly of thylakoid  $\Delta$ pH-dependent/Tat protein transport pathway components *in vitro*: *In vitro* assembly of thylakoid Tat pathway components. *European Journal of Biochemistry*, 270(24), 4930–4941. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03894.x>
- Fincher, V., McCaffery, M. & Cline, K. (1998). Evidence for a loop mechanism of protein transport by the thylakoid Delta pH pathway. *FEBS Letters*, 423(1), 66–70. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00066-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00066-0)
- Fodor, K., Wolf, J., Erdmann, R., Schliebs, W. & Wilmanns, M. (2012). Molecular Requirements for Peroxisomal Targeting of Alanine-Glyoxylate Aminotransferase as an Essential Determinant in Primary Hyperoxaluria Type 1. *PLoS Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001309>
- Francisco, T., Rodrigues, T. A., Dias, A. F., Barros-Barbosa, A., Bicho, D. & Azevedo, J. E. (2017). Protein transport into peroxisomes: Knowns and unknowns. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 39(10). <https://doi.org/10.1002/bies.201700047>
- Frielingsdorf, S., Jakob, M. & Klösgen, R. B. (2008). A Stromal Pool of TatA Promotes Tat-dependent Protein Transport across the Thylakoid Membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 33838–33845. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806334200>
- Frielingsdorf, S. & Klösgen, R. B. (2007). Prerequisites for terminal processing of thylakoidal Tat substrates. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24455–24462. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702630200>
- Fröbel, J., Blümmel, A.-S., Drepper, F., Warscheid, B. & Müller, M. (2019). Surface-exposed domains of TatB involved in the structural and functional assembly of the Tat translocase in Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(38), 13902–13914. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009298>
- Fröbel, J., Rose, P., Lausberg, F., Blümmel, A.-S., Freudl, R. & Müller, M. (2012). Transmembrane insertion of twin-arginine signal peptides is driven by TatC and regulated by TatB. *Nature Communications*, 3, 1311. <https://doi.org/10.1038/ncomms2308>
- Fröbel, J., Rose, P. & Müller, M. (2011). Early contacts between substrate proteins and TatA translocase component in twin-arginine translocation. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(51), 43679–43689. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.292565>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In J. M. Walker (Hrsg.), *The Proteomics Protocols Handbook* (S. 571–607). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Gatto, G. J., Geisbrecht, B. V., Gould, S. J. & Berg, J. M. (2000). Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nature Structural Biology*, 7(12), 1091–1095. <https://doi.org/10.1038/81930>
- GE Healthcare. (2020, August 3). *Affinity Chromatography Vol. 2: Tagged Proteins*.
- Geise, H. (2019). *Studien zur Assemblierung der Tat-Translokase von Escherichia coli* [Dissertation]. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
- Geise, H., Heidrich, E. S., Nikolin, C. S., Mehner-Breitfeld, D. & Brüser, T. (2019). A Potential Late Stage Intermediate of Twin-Arginine Dependent Protein Translocation in Escherichia coli. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1482. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01482>
- Gérard, F. & Cline, K. (2006). Efficient Twin Arginine Translocation (Tat) Pathway Transport of a Precursor Protein Covalently Anchored to Its Initial cpTatC Binding Site. *Journal of Biological Chemistry*, 281(10), 6130–6135. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512733200>
- Gérard, F. & Cline, K. (2007). The thylakoid proton gradient promotes an advanced stage of signal peptide binding deep within the Tat pathway receptor complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5263–5272. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610337200>
- Ghosh, D., Boral, D., Vankudoth, K. R. & Ramasamy, S. (2019). Analysis of haloarchaeal twin-arginine translocase pathway reveals the diversity of the machineries. *Heliyon*, 5(5). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01587>
- Girzalsky, W., Rehling, P., Stein, K., Kipper, J., Blank, L., Kunau, W. H. & Erdmann, R. (1999). Involvement of Pex13p in Pex14p localization and peroxisomal targeting signal 2-dependent protein import into

- peroxisomes. *The Journal of Cell Biology*, 144(6), 1151–1162. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.6.1151>
- Glover, J. R., Andrews, D. W. & Rachubinski, R. A. (1994). Saccharomyces cerevisiae peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22), 10541–10545. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10541>
- Gohlke, U., Pullan, L., McDevitt, C. A., Porcelli, I., de Leeuw, E., Palmer, T., Saibil, H. R. & Berks, B. C. (2005). The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), 10482–10486. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503558102>
- Goosens, V. J., De-San-Eustaquio-Campillo, A., Carballido-López, R. & van Dijl, J. M. (2015). A Tat ménage à trois—The role of Bacillus subtilis TatAc in twin-arginine protein translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(10, Part A), 2745–2753. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.07.022>
- Gouffi, K., Gérard, F., Santini, C.-L. & Wu, L.-F. (2004). Dual topology of the Escherichia coli TatA protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11608–11615. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313187200>
- Gouffi, K., Santini, C.-L. & Wu, L.-F. (2002). Topology determination and functional analysis of the Escherichia coli TatC protein. *FEBS Letters*, 525(1), 65–70. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03069-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03069-7)
- Gould, S. J., Kalish, J. E., Morrell, J. C., Bjorkman, J., Urquhart, A. J. & Crane, D. I. (1996). Pex13p is an SH3 protein of the peroxisome membrane and a docking factor for the predominantly cytoplasmic PTs1 receptor. *The Journal of Cell Biology*, 135(1), 85–95. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.1.85>
- Gould, S. J., Keller, G. A., Hosken, N., Wilkinson, J. & Subramani, S. (1989). A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *Journal of Cell Biology*, 108(5), 1657–1664. <https://doi.org/10.1083/jcb.108.5.1657>
- Gould, S. J., Keller, G. A., Schneider, M., Howell, S. H., Garrard, L. J., Goodman, J. M., Distel, B., Tabak, H. & Subramani, S. (1990). Peroxisomal protein import is conserved between yeast, plants, insects and mammals. *The EMBO Journal*, 9(1), 85–90.
- Gould, S. J., Keller, G. A. & Subramani, S. (1987). Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *The Journal of Cell Biology*, 105(6 Pt 2), 2923–2931. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.6.2923>
- Gouveia, A. M., Guimarães, C. P., Oliveira, M. E., Reguenga, C., Sá-Miranda, C. & Azevedo, J. E. (2003). Characterization of the Peroxisomal Cycling Receptor, Pex5p, Using a Cell-free in Vitro Import System. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 226–232. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209498200>
- Gouveia, A. M. M., Reguenga, C., Oliveira, M. E. M., Sá-Miranda, C. & Azevedo, J. E. (2000). Characterization of Peroxisomal Pex5p from Rat Liver: Pex5p IN THE Pex5p-Pex14p MEMBRANE COMPLEX IS A TRANSMEMBRANE PROTEIN. *Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 32444–32451. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004366200>
- Greene, N. P., Porcelli, I., Buchanan, G., Hicks, M. G., Schermann, S. M., Palmer, T. & Berks, B. C. (2007). Cysteine scanning mutagenesis and disulfide mapping studies of the TatA component of the bacterial twin arginine translocase. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 23937–23945. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702972200>
- Habersetzer, J., Moore, K., Cherry, J., Buchanan, G., Stansfeld, P. J. & Palmer, T. (2017). Substrate-triggered position switching of TatA and TatB during Tat transport in Escherichia coli. *Open Biology*, 7(8), 170091. <https://doi.org/10.1098/rsob.170091>
- Hąc-Wydro, K., Mateja, A., Ożóg, A. & Miśkowiec, P. (2017). Influence of metal ions on the aggregation of anionic surfactants. Studies on the interactions between environmental pollutants in aqueous solutions. *Journal of Molecular Liquids*, 240, 514–521. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.05.112>

- Hageman, J., Robinson, C., Smeekens, S. & Weisbeek, P. (1986). A thylakoid processing protease is required for complete maturation of the lumen protein plastocyanin. *Nature*, 324(6097), 567–569. <https://doi.org/10.1038/324567a0>
- Hagen, S., Drepper, F., Fischer, S., Fodor, K., Passon, D., Platta, H. W., Zenn, M., Schliebs, W., Girzalsky, W., Wilmanns, M., Warscheid, B. & Erdmann, R. (2015). Structural Insights into Cargo Recognition by the Yeast PTS1 Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(44), 26610–26626. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.657973>
- Hamsanathan, S., Anthonymuthu, T. S., Bageshwar, U. K. & Musser, S. M. (2017). A Hinged Signal Peptide Hairpin Enables Tat-Dependent Protein Translocation. *Biophysical Journal*, 113(12), 2650–2668. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.09.036>
- Hamsanathan, S. & Musser, S. M. (2018). The Tat protein transport system: Intriguing questions and conundrums. *FEMS Microbiology Letters*, 365(12). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny123>
- Hatzixanthis, K., Palmer, T. & Sargent, F. (2003). A subset of bacterial inner membrane proteins integrated by the twin-arginine translocase. *Molecular Microbiology*, 49(5), 1377–1390. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03642.x>
- Hauer, R. S., Freudl, R., Dittmar, J., Jakob, M. & Klösgen, R. B. (2017). How to achieve Tat transport with alien TatA. *Scientific Reports*, 7(1), 8808. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08818-w>
- Hauer, R. S., Schlesier, R., Heilmann, K., Dittmar, J., Jakob, M. & Klösgen, R. B. (2013). Enough is enough: TatA demand during Tat-dependent protein transport. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1833(5), 957–965. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.01.030>
- Häusler, T., Stierhof, Y. D., Wirtz, E. & Clayton, C. (1996). Import of a DHFR hybrid protein into glycosomes in vivo is not inhibited by the folate-analogue aminopterin. *The Journal of Cell Biology*, 132(3), 311–324. <https://doi.org/10.1083/jcb.132.3.311>
- Heidrich, E. S. (2019). *Aktivierung des Psp-Systems durch TatA-induzierten Membranstress in Escherichia coli* [Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover]. <http://dx.doi.org/10.15488/4469>
- Henry, R., Carrigan, M., McCaffrey, M., Ma, X. & Cline, K. (1997). Targeting determinants and proposed evolutionary basis for the Sec and the Delta pH protein transport systems in chloroplast thylakoid membranes. *The Journal of Cell Biology*, 136(4), 823–832. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.4.823>
- Hensel, A., Beck, S., El Magraoui, F., Platta, H. W., Girzalsky, W. & Erdmann, R. (2011). Cysteine-dependent Ubiquitination of Pex18p Is Linked to Cargo Translocation across the Peroxisomal Membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(50), 43495–43505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.286104>
- Heuberger, E. H. M. L., Veenhoff, L. M., Duurkens, R. H., Friesen, R. H. E. & Poolman, B. (2002). Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation. *Journal of Molecular Biology*, 317(4), 591–600. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2002.5416>
- Hicks, M. G., Lee, P. A., Georgiou, G., Berks, B. C. & Palmer, T. (2005). Positive Selection for Loss-of-Function tat Mutations Identifies Critical Residues Required for TatA Activity. *Journal of Bacteriology*, 187(8), 2920–2925. <https://doi.org/10.1128/JB.187.8.2920-2925.2005>
- Hicks, M. G., Leeuw, E. de, Porcelli, I., Buchanan, G., Berks, B. C. & Palmer, T. (2003). The Escherichia coli twin-arginine translocase: Conserved residues of TatA and TatB family components involved in protein transport. *FEBS Letters*, 539(1–3), 61–67. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00198-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00198-4)
- Hochmal, A. K., Schulze, S., Trompelt, K. & Hippler, M. (2015). Calcium-dependent regulation of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847(9), 993–1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.010>
- Hofmann, N. R. & Theg, S. M. (2003). Physcomitrella patens as a model for the study of chloroplast protein transport: Conserved machineries between vascular and non-vascular plants. *Plant Molecular Biology*, 53(5), 643–654. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000019065.31490.06>
- Holzappel, E., Eisner, G., Alami, M., Barrett, C. M. L., Buchanan, G., Lüke, I., Betton, J.-M., Robinson, C., Palmer, T., Moser, M. & Müller, M. (2007). The entire N-terminal half of TatC is involved in twin-arginine precursor binding. *Biochemistry*, 46(10), 2892–2898. <https://doi.org/10.1021/bi062205b>

- Hou, B., Frielingsdorf, S. & Klösgen, R. B. (2006). Unassisted membrane insertion as the initial step in DeltapH/Tat-dependent protein transport. *Journal of Molecular Biology*, 355(5), 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.029>
- Hou, B., Heidrich, E. S., Mehner-Breitfeld, D. & Brüser, T. (2018). The TatA component of the twin-arginine translocation system locally weakens the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* upon protein substrate binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(20), 7592–7605. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002205>
- Hu, X., Dong, Q., Yang, J. & Zhang, Y. (2016). Recognizing metal and acid radical ion-binding sites by integrating *ab initio* modeling with template-based transferals. *Bioinformatics*, 32(21), 3260–3269. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw396>
- Hu, Y., Zhao, E., Li, H., Xia, B. & Jin, C. (2010). Solution NMR structure of the TatA component of the twin-arginine protein transport system from gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Journal of the American Chemical Society*, 132(45), 15942–15944. <https://doi.org/10.1021/ja1053785>
- Huang, Q., Alcock, F., Kneuper, H., Deme, J. C., Rollauer, S. E., Lea, S. M., Berks, B. C. & Palmer, T. (2017). A signal sequence suppressor mutant that stabilizes an assembled state of the twin arginine translocase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(10), E1958–E1967. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615056114>
- Huang, Q. & Palmer, T. (2017). Signal Peptide Hydrophobicity Modulates Interaction with the Twin-Arginine Translocase. *MBio*, 8(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00909-17>
- Hust, B. (2007). *Zur Rolle der Rezeptorkomponenten der Toc159-Familie in den Proteintransportkomplexen der äußeren Hüllmembran von Plastiden* [Dissertation]. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 273(52), 34868–34874. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.52.34868>
- Ilgü, H., Jeckelmann, J.-M., Gachet, M. S., Boggavarapu, R., Ucurum, Z., Gertsch, J. & Fotiadis, D. (2014). Variation of the Detergent-Binding Capacity and Phospholipid Content of Membrane Proteins When Purified in Different Detergents. *Biophysical Journal*, 106(8), 1660–1670. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.02.024>
- Imanaka, T., Small, G. M. & Lazarow, P. B. (1987). Translocation of acyl-CoA oxidase into peroxisomes requires ATP hydrolysis but not a membrane potential. *The Journal of Cell Biology*, 105(6 Pt 2), 2915–2922. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.6.2915>
- Islinger, M., Li, K. W., Seitz, J., Völkl, A. & Lüers, G. H. (2009). Hitchhiking of Cu/Zn superoxide dismutase to peroxisomes—Evidence for a natural piggyback import mechanism in mammals. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10(11), 1711–1721. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00966.x>
- Izawa, S. & Good, N. E. (1966a). Effect of salts and electron transport on the conformation of isolated chloroplasts. I. Light-scattering and volume changes. *Plant Physiology*, 41(3), 533–543. <https://doi.org/10.1104/pp.41.3.533>
- Izawa, S. & Good, N. E. (1966b). Effect of Salts and Electron Transport on the Conformation of Isolated Chloroplasts. II. Electron Microscopy. *Plant Physiology*, 41(3), 544–552. <https://doi.org/10.1104/pp.41.3.544>
- Ize, B., Porcelli, I., Lucchini, S., Hinton, J. C., Berks, B. C. & Palmer, T. (2004). Novel phenotypes of *Escherichia coli* tat mutants revealed by global gene expression and phenotypic analysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 47543–47554. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406910200>
- 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. *Journal of Bacteriology*, 183(5), 1801–1804. <https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1801-1804.2001>
- Jakob, M., Kaiser, S., Gutensohn, M., Hanner, P. & Klösgen, R. B. (2009). Tat subunit stoichiometry in *Arabidopsis thaliana* challenges the proposed function of TatA as the translocation pore. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1793(2), 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.09.006>

- Jamshad, M., Grimard, V., Idini, I., Knowles, T. J., Dowle, M. R., Schofield, N., Sridhar, P., Lin, Y., Finka, R., Wheatley, M., Thomas, O. R. T., Palmer, R. E., Overduin, M., Govaerts, C., Ruyschaert, J.-M., Edler, K. J. & Dafforn, T. R. (2015). Structural analysis of a nanoparticle containing a lipid bilayer used for detergent-free extraction of membrane proteins. *Nano Research*, 8(3), 774–789. <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0560-6>
- Järvi, S., Suorsa, M., Paakkari, V. & Aro, E.-M. (2011). Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: Novel super- and mega-complexes. *Biochemical Journal*, 439(2), 207–214. <https://doi.org/10.1042/BJ20102155>
- Jones, J. M., Morrell, J. C. & Gould, S. J. (2004). PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *The Journal of Cell Biology*, 164(1), 57–67. <https://doi.org/10.1083/jcb.200304111>
- Jongbloed, J. D. H., Grieger, U., Antelmann, H., Hecker, M., Nijland, R., Bron, S. & van Dijl, J. M. (2004). Two minimal Tat translocases in Bacillus. *Molecular Microbiology*, 54(5), 1319–1325. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04341.x>
- Kadner, R. J. (1996). Cytoplasmic membrane. In Neidhardt, F. C. & Curtiss, R. (1996) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Seite 58-87. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, USA.
- Kerssen, D., Hambruch, E., Klaas, W., Platta, H. W., de Kruijff, B., Erdmann, R., Kunau, W.-H. & Schliebs, W. (2006). Membrane association of the cycling peroxisome import receptor Pex5p. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(37), 27003–27015. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509257200>
- Kerth, A., Brehmer, T., Meister, A., Hanner, P., Jakob, M., Klösgen, R. B. & Blume, A. (2012). Interaction of a Tat substrate and a Tat signal peptide with thylakoid lipids at the air-water interface. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 13(2), 231–239. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100458>
- Kiel, J. A. K. W., Emmrich, K., Meyer, H. E. & Kunau, W.-H. (2005). Ubiquitination of the peroxisomal targeting signal type 1 receptor, Pex5p, suggests the presence of a quality control mechanism during peroxisomal matrix protein import. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(3), 1921–1930. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403632200>
- Kim, P. K. & Hettema, E. H. (2015). Multiple Pathways for Protein Transport to Peroxisomes. *Journal of Molecular Biology*, 427(6), 1176–1190. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.005>
- Kirchhoff, H., Mukherjee, U. & Galla, H.-J. (2002). Molecular Architecture of the Thylakoid Membrane: Lipid Diffusion Space for Plastoquinone. *Biochemistry*, 41(15), 4872–4882. <https://doi.org/10.1021/bi011650y>
- Klein, A. T. J., van den Berg, M., Bottger, G., Tabak, H. F. & Distel, B. (2002). Saccharomyces cerevisiae acyl-CoA oxidase follows a novel, non-PTS1, import pathway into peroxisomes that is dependent on Pex5p. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25011–25019. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203254200>
- Klösgen, R. B., Brock, I. W., Herrmann, R. G. & Robinson, C. (1992). Proton gradient-driven import of the 16 kDa oxygen-evolving complex protein as the full precursor protein by isolated thylakoids. *Plant Molecular Biology*, 18(5), 1031–1034. <https://doi.org/10.1007/BF00019226>
- Kneuper, H., Maldonado, B., Jäger, F., Krehenbrink, M., Buchanan, G., Keller, R., Müller, M., Berks, B. C. & Palmer, T. (2012). Molecular dissection of TatC defines critical regions essential for protein transport and a TatB–TatC contact site. *Molecular Microbiology*, 85(5), 945–961. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08151.x>
- Knowles, T. J., Finka, R., Smith, C., Lin, Y.-P., Dafforn, T. & Overduin, M. (2009). Membrane Proteins Solubilized Intact in Lipid Containing Nanoparticles Bounded by Styrene Maleic Acid Copolymer. *Journal of the American Chemical Society*, 131(22), 7484–7485. <https://doi.org/10.1021/ja810046q>
- Koch, S., Fritsch, M. J., Buchanan, G. & Palmer, T. (2012). Escherichia coli TatA and TatB proteins have N-out, C-in topology in intact cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(18), 14420–14431. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.354555>

- Koochak, H., Puthiyaveetil, S., Mullendore, D. L., Li, M. & Kirchhoff, H. (2019). The structural and functional domains of plant thylakoid membranes. *The Plant Journal*, 97(3), 412–429. <https://doi.org/10.1111/tpj.14127>
- Kopf, A. H., Dörr, J. M., Koorengevel, M. C., Antoniciello, F., Jahn, H. & Killian, J. A. (2020). Factors influencing the solubilization of membrane proteins from *Escherichia coli* membranes by styrene-maleic acid copolymers. *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1862(2), 183125. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183125>
- Korotkov, K. V. & Sandkvist, M. (2019). Architecture, Function, and Substrates of the Type II Secretion System. *EcoSal Plus*, 8(2). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0034-2018>
- Korotych, O., Mondal, J., Gattás-Asfura, K. M., Hendricks, J. & Bruce, B. D. (2019). Evaluation of commercially available styrene-co-maleic acid polymers for the extraction of membrane proteins from spinach chloroplast thylakoids. *European Polymer Journal*, 114, 485–500. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.10.035>
- Kragler, F., Langeder, A., Raupachova, J., Binder, M. & Hartig, A. (1993). Two independent peroxisomal targeting signals in catalase A of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 120(3), 665–673. <https://doi.org/10.1083/jcb.120.3.665>
- Kragt, A., Voorn-Brouwer, T., van den Berg, M. & Distel, B. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal import receptor Pex5p is monoubiquitinated in wild type cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7867–7874. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413553200>
- Krause, F. (2006). Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis*, 27(13), 2759–2781. <https://doi.org/10.1002/elps.200600049>
- Kreimer, G., Melkonian, M., Holtum, J. A. M. & Latzko, E. (1988). Stromal Free Calcium Concentration and Light-Mediated Activation of Chloroplast Fructose-1,6-Bisphosphatase. *Plant Physiology*, 86(2), 423–428. <https://doi.org/10.1104/pp.86.2.423>
- Kreimer, G., Surek, B., Woodrow, I. E. & Latzko, E. (1987). Calcium binding by spinach stromal proteins. *Planta*, 171(2), 259–265. <https://doi.org/10.1007/BF00391103>
- Kreutzenbeck, P., Kröger, C., Lausberg, F., Blaudeck, N., Sprenger, G. A. & Freudl, R. (2007). *Escherichia coli* twin arginine (Tat) mutant translocases possessing relaxed signal peptide recognition specificities. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(11), 7903–7911. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610126200>
- Kungel, J. (2020). *Transport- und Assemblierungsverhalten der Rieske Fe/S-Proteine in Chloroplasten und Mitochondrien* [Dissertation]. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lange, C., Müller, S. D., Walther, T. H., Bürck, J. & Ulrich, A. S. (2007). Structure analysis of the protein translocating channel TatA in membranes using a multi-construct approach. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1768(10), 2627–2634. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.06.021>
- Lanyon-Hogg, T., Warriner, S. L. & Baker, A. (2010). Getting a camel through the eye of a needle: The import of folded proteins by peroxisomes. *Biology of the Cell*, 102(4), 245–263. <https://doi.org/10.1042/BC20090159>
- Lausberg, F., Fleckenstein, S., Kreutzenbeck, P., Fröbel, J., Rose, P., Müller, M. & Freudl, R. (2012). Genetic evidence for a tight cooperation of TatB and TatC during productive recognition of twin-arginine (Tat) signal peptides in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 7(6), e39867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039867>
- Lazarow, P. B. & Fujiki, Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annual Review of Cell Biology*, 1, 489–530. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.01.110185.002421>

- le Maire, M., Champeil, P. & Møller, J. V. (2000). Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1508(1), 86–111. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00010-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00010-1)
- Leake, M. C., Greene, N. P., Godun, R. M., Granjon, T., Buchanan, G., Chen, S., Berry, R. M., Palmer, T. & Berks, B. C. (2008). Variable stoichiometry of the TatA component of the twin-arginine protein transport system observed by in vivo single-molecule imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15376–15381. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806338105>
- Lee, M. S., Mullen, R. T. & Trelease, R. N. (1997). Oilseed isocitrate lyases lacking their essential type 1 peroxisomal targeting signal are piggybacked to glyoxysomes. *The Plant Cell*, 9(2), 185–197. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.2.185>
- Lee, P. A., Buchanan, G., Stanley, N. R., Berks, B. C. & Palmer, T. (2002). Truncation analysis of TatA and TatB defines the minimal functional units required for protein translocation. *Journal of Bacteriology*, 184(21), 5871–5879. <https://doi.org/10.1128/jb.184.21.5871-5879.2002>
- Lee, P. A., Orriss, G. L., Buchanan, G., Greene, N. P., Bond, P. J., Punginelli, C., Jack, R. L., Sansom, M. S. P., Berks, B. C. & Palmer, T. (2006). Cysteine-scanning mutagenesis and disulfide mapping studies of the conserved domain of the twin-arginine translocase TatB component. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(45), 34072–34085. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607295200>
- Lee, Y.-C., Bååth, J. A., Bastle, R. M., Bhattacharjee, S., Cantoria, M. J., Dornan, M., Gamero-Estevez, E., Ford, L., Halova, L., Kernan, J., Kürten, C., Li, S., Martinez, J., Sachan, N., Sarr, M., Shan, X., Subramanian, N., Rivera, K., Pappin, D. & Lin, S.-H. (2018). Impact of Detergents on Membrane Protein Complex Isolation. *Journal of Proteome Research*, 17(1), 348–358. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00599>
- Léon, S. & Subramani, S. (2007). A Conserved Cysteine Residue of *Pichia pastoris* Pex20p Is Essential for Its Recycling from the Peroxisome to the Cytosol. *The Journal of biological chemistry*, 282(10), 7424–7430. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611627200>
- Li, L. (2011). *Overexpression purification and reconstitution of Tat subunits.pdf* [Dissertation]. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Lüke, I., Handford, J. I., Palmer, T. & Sargent, F. (2009). Proteolytic processing of *Escherichia coli* twin-arginine signal peptides by LepB. *Archives of Microbiology*, 191(12), 919–925. <https://doi.org/10.1007/s00203-009-0516-5>
- Ma, Q., Fite, K., New, C. P. & Dabney-Smith, C. (2018). Thylakoid-integrated recombinant Hcf106 participates in the chloroplast twin arginine transport system. *Plant Direct*, 2(10). <https://doi.org/10.1002/pld3.90>
- Ma, X. & Cline, K. (2010). Multiple precursor proteins bind individual Tat receptor complexes and are collectively transported. *The EMBO Journal*, 29(9), 1477–1488. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.44>
- Ma, X. & Cline, K. (2013). Mapping the Signal Peptide Binding and Oligomer Contact Sites of the Core Subunit of the Pea Twin Arginine Protein Translocase. *The Plant Cell*, 25(3), 999–1015. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.107409>
- Madeira, F., Park, Y. mi, Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D. & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- Maillard, J., Spronk, C. A. E. M., Buchanan, G., Lyall, V., Richardson, D. J., Palmer, T., Vuister, G. W. & Sargent, F. (2007). Structural diversity in twin-arginine signal peptide-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40), 15641–15646. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703967104>
- Maldonado, B., Buchanan, G., Müller, M., Berks, B. C. & Palmer, T. (2011). Genetic evidence for a TatC dimer at the core of the *Escherichia coli* twin arginine (Tat) protein translocase. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20(3), 168–175. <https://doi.org/10.1159/000329076>



- Mangels, D., Mathers, J., Bolhuis, A. & Robinson, C. (2005). The core TatABC complex of the twin-arginine translocase in *Escherichia coli*: TatC drives assembly whereas TatA is essential for stability. *Journal of Molecular Biology*, 345(2), 415–423. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.043>
- Marques, J. P., Schattat, M. H., Hause, G., Dudeck, I. & Klösgen, R. B. (2004). In vivo transport of folded EGFP by the  $\Delta$ pH/TAT-dependent pathway in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 55(403), 1697–1706. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh191>
- Martin, J. R., Harwood, J. H., McCaffery, M., Fernandez, D. E. & Cline, K. (2009). Localization and integration of thylakoid protein translocase subunit cpTatC. *The Plant Journal*, 58(5), 831–842. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03816.x>
- Marzioch, M., Erdmann, R., Veenhuis, M. & Kunau, W. H. (1994). PAS7 encodes a novel yeast member of the WD-40 protein family essential for import of 3-oxoacyl-CoA thiolase, a PTS2-containing protein, into peroxisomes. *The EMBO Journal*, 13(20), 4908–4918.
- Matsumura, T., Otera, H. & Fujiki, Y. (2000). Disruption of the interaction of the longer isoform of Pex5p, Pex5pL, with Pex7p abolishes peroxisome targeting signal type 2 protein import in mammals. Study with a novel Pex5-impaired Chinese hamster ovary cell mutant. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21715–21721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000721200>
- Maurer, C., Panahandeh, S., Jungkamp, A.-C., Moser, M. & Müller, M. (2010). TatB Functions as an Oligomeric Binding Site for Folded Tat Precursor Proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 21(23), 4151–4161. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-07-0585>
- McCammon, M. T., McNew, J. A., Willy, P. J. & Goodman, J. M. (1994). An internal region of the peroxisomal membrane protein PMP47 is essential for sorting to peroxisomes. *The Journal of Cell Biology*, 124(6), 915–925. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.6.915>
- McCollum, D., Monosov, E. & Subramani, S. (1993). The pas8 mutant of *Pichia pastoris* exhibits the peroxisomal protein import deficiencies of Zellweger syndrome cells—The PAS8 protein binds to the COOH-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal, and is a member of the TPR protein family. *The Journal of Cell Biology*, 121(4), 761–774. <https://doi.org/10.1083/jcb.121.4.761>
- McDevitt, C. A., Buchanan, G., Sargent, F., Palmer, T. & Berks, B. C. (2006). Subunit composition and in vivo substrate-binding characteristics of *Escherichia coli* Tat protein complexes expressed at native levels. *The FEBS Journal*, 273(24), 5656–5668. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05554.x>
- McDevitt, C. A., Hicks, M. G., Palmer, T. & Berks, B. C. (2005). Characterisation of Tat protein transport complexes carrying inactivating mutations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329(2), 693–698. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.02.038>
- McNew, J. A. & Goodman, J. M. (1994). An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *The Journal of Cell Biology*, 127(5), 1245–1257. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.5.1245>
- Mehner, D., Osadnik, H., Lünsdorf, H. & Brüser, T. (2012). The Tat system for membrane translocation of folded proteins recruits the membrane-stabilizing Psp machinery in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(33), 27834–27842. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374983>
- Meinecke, M., Cizmowski, C., Schliebs, W., Krüger, V., Beck, S., Wagner, R. & Erdmann, R. (2010). The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nature Cell Biology*, 12(3), 273–277. <https://doi.org/10.1038/ncb2027>
- Mikhaleva, N. I., Santini, C.-L., Giordano, G., Nesmeyanova, M. A. & Wu, L.-F. (1999). Requirement for phospholipids of the translocation of the trimethylamine N-oxide reductase through the Tat pathway in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 463(3), 331–335. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01661-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01661-0)
- Molik, S., Karnauchov, I., Weidlich, C., Herrmann, R. G. & Klösgen, R. B. (2001). The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/f complex in chloroplasts: Missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? *The Journal of Biological Chemistry*, 276(46), 42761–42766. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106690200>
- Molik, S. (2005). *Das plastidäre Rieske Fe/S-Protein: Analyse des Transport- und Assemblierungsprozesses* [Dissertation]. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Mori, H., Summer, E. J. & Cline, K. (2001). Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid ( $\Delta$ pH)-dependent protein transport. *FEBS Letters*, *501*(1), 65–68. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02626-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02626-6)
- Mori, H., Summer, E. J., Ma, X. & Cline, K. (1999). Component specificity for the thylakoidal Sec and  $\Delta$ pH-dependent protein transport pathways. *The Journal of Cell Biology*, *146*(1), 45–56. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.1.45>
- Mori, H. & Cline, K. (2002). A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid  $\Delta$ pH/Tat translocase. *The Journal of Cell Biology*, *157*(2), 205–210. <https://doi.org/10.1083/jcb.200202048>
- Morrissey, P. J., McCauley, S. W. & Melis, A. (1986). Differential detergent-solubilization of integral thylakoid membrane complexes in spinach chloroplasts. Localization of photosystem II, cytochrome b6-f complex and photosystem I. *European Journal of Biochemistry*, *160*(2), 389–393. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09983.x>
- Motohashi, R., Nagata, N., Ito, T., Takahashi, S., Hobo, T., Yoshida, S. & Shinozaki, K. (2001). An essential role of a TatC homologue of a  $\Delta$ pH-dependent protein transporter in thylakoid membrane formation during chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(18), 10499–10504. <https://doi.org/10.1073/pnas.181304598>
- Mould, R. M. & Robinson, C. (1991). A proton gradient is required for the transport of two lumenal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(19), 12189–12193.
- Mukai, S., Ghaedi, K. & Fujiki, Y. (2002). Intracellular localization, function, and dysfunction of the peroxisome-targeting signal type 2 receptor, Pex7p, in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(11), 9548–9561. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108635200>
- Müller, S. D., De Angelis, A. A., Walther, T. H., Grage, S. L., Lange, C., Opella, S. J. & Ulrich, A. S. (2007). Structural characterization of the pore forming protein TatAd of the twin-arginine translocase in membranes by solid-state  $^{15}\text{N}$ -NMR. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1768*(12), 3071–3079. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2007.09.008>
- Murakami, S. & Packer, L. (1971). The role of cations in the organization of chloroplast membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *146*(1), 337–347. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(71\)80072-3](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(71)80072-3)
- Musser, S. M. & Theg, S. M. (2000a). Characterization of the early steps of OE17 precursor transport by the thylakoid  $\Delta$ pH/Tat machinery. *European Journal of Biochemistry*, *267*(9), 2588–2598. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01269.x>
- Musser, S. M. & Theg, S. M. (2000b). Proton transfer limits protein translocation rate by the thylakoid  $\Delta$ pH/Tat machinery. *Biochemistry*, *39*(28), 8228–8233. <https://doi.org/10.1021/bi000115f>
- Nair, D. M., Purdue, P. E. & Lazarow, P. B. (2004). Pex7p translocates in and out of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, *167*(4), 599–604. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407119>
- Nakatani, H. Y., Barber, J. & Minski, M. J. (1979). The influence of the thylakoid membrane surface properties on the distribution of ions in chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *545*(1), 24–35. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(79\)90110-5](https://doi.org/10.1016/0005-2728(79)90110-5)
- Natale, P., Brüser, T. & Driessen, A. J. M. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—Distinct translocases and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1778*(9), 1735–1756. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2007.07.015>
- Neuberger, G., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Hartig, A. & Eisenhaber, F. (2003). Motif Refinement of the Peroxisomal Targeting Signal 1 and Evaluation of Taxon-specific Differences. *Journal of Molecular Biology*, *328*(3), 567–579. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00318-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00318-8)
- Neufeld, C., Filipp, F. V., Simon, B., Neuhaus, A., Schüller, N., David, C., Kooshapur, H., Madl, T., Erdmann, R., Schliebs, W., Wilmanns, M. & Sattler, M. (2009). Structural basis for competitive interactions of Pex14 with the import receptors Pex5 and Pex19. *The EMBO Journal*, *28*(6), 745–754. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.7>

- Neuhoff, V., Stamm, R. & Eibl, H. (1985). Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *ELECTROPHORESIS*, 6(9), 427–448. <https://doi.org/10.1002/elps.1150060905>
- New, C. P., Ma, Q. & Dabney-Smith, C. (2018). Routing of thylakoid lumen proteins by the chloroplast twin arginine transport pathway. *Photosynthesis Research*, 138(3), 289–301. <https://doi.org/10.1007/s11120-018-0567-z>
- Niederhoff, K., Meindl-Beinker, N. M., Kerssen, D., Perband, U., Schäfer, A., Schliebs, W. & Kunau, W.-H. (2005). Yeast Pex14p possesses two functionally distinct Pex5p and one Pex7p binding sites. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35571–35578. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502460200>
- Nielsen, V. S., Mant, A., Knoetzel, J., Møller, B. L. & Robinson, C. (1994). Import of barley photosystem I subunit N into the thylakoid lumen is mediated by a bipartite presequence lacking an intermediate processing site. Role of the delta pH in translocation across the thylakoid membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(5), 3762–3766.
- Nito, K., Hayashi, M. & Nishimura, M. (2002). Direct interaction and determination of binding domains among peroxisomal import factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*, 43(4), 355–366. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf057>
- Oates, J., Barrett, C. M. L., Barnett, J. P., Byrne, K. G., Bolhuis, A. & Robinson, C. (2005). The *Escherichia coli* twin-arginine translocation apparatus incorporates a distinct form of TatABC complex, spectrum of modular TatA complexes and minor TatAB complex. *Journal of Molecular Biology*, 346(1), 295–305. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.047>
- Oates, J., Mathers, J., Mangels, D., Kühlbrandt, W., Robinson, C. & Model, K. (2003). Consensus structural features of purified bacterial TatABC complexes. *Journal of Molecular Biology*, 330(2), 277–286. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00621-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00621-1)
- Ojakian, G. K. & Satir, P. (1974). Particle movements in chloroplast membranes: Quantitative measurements of membrane fluidity by the freeze-fracture technique. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(5), 2052–2056. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.5.2052>
- Oliveira, M. E., Gouveia, A. M., Pinto, R. A., Sá-Miranda, C. & Azevedo, J. E. (2003). The energetics of Pex5p-mediated peroxisomal protein import. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(41), 39483–39488. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305089200>
- Oluwole, A. O., Danielczak, B., Meister, A., Babalola, J. O., Vargas, C. & Keller, S. (2017). Solubilization of Membrane Proteins into Functional Lipid-Bilayer Nanodiscs Using a Diisobutylene/Maleic Acid Copolymer. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(7), 1919–1924. <https://doi.org/10.1002/anie.201610778>
- Omasits, U., Ahrens, C. H., Müller, S. & Wollscheid, B. (2014). Protter: Interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*, 30(6), 884–886. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt607>
- Orriss, G. L., Tarry, M. J., Ize, B., Sargent, F., Lea, S. M., Palmer, T. & Berks, B. C. (2007). TatBC, TatB, and TatC form structurally autonomous units within the twin arginine protein transport system of *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 581(21), 4091–4097. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.07.044>
- Osumi, T., Tsukamoto, T., Hata, S., Yokota, S., Miura, S., Fujiki, Y., Hijikata, M., Miyazawa, S. & Hashimoto, T. (1991). Amino-terminal presequence of the precursor of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase is a cleavable signal peptide for peroxisomal targeting. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 181(3), 947–954. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)92028-I](https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)92028-I)
- Otera, H., Harano, T., Honsho, M., Ghaedi, K., Mukai, S., Tanaka, A., Kawai, A., Shimizu, N. & Fujiki, Y. (2000). The mammalian peroxin Pex5pL, the longer isoform of the mobile peroxisome targeting signal (PTS) type 1 transporter, translocates the Pex7p.PTS2 protein complex into peroxisomes via its initial docking site, Pex14p. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21703–21714. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000720200>

- Ouyang, M., Li, X., Zhang, J., Feng, P., Pu, H., Kong, L., Bai, Z., Rong, L., Xu, X., Chi, W., Wang, Q., Chen, F., Lu, C., Shen, J. & Zhang, L. (2020). Liquid-Liquid Phase Transition Drives Intra-chloroplast Cargo Sorting. *Cell*, *180*(6), 1144-1159.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.045>
- Overduin, M. & Esmaili, M. (2019). Memtein: The fundamental unit of membrane-protein structure and function. *Chemistry and Physics of Lipids*, *218*, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.11.008>
- Pal, D., Fite, K. & Dabney-Smith, C. (2013). Direct interaction between a precursor mature domain and transport component Tha4 during twin arginine transport of chloroplasts. *Plant Physiology*, *161*(2), 990–1001. <https://doi.org/10.1104/pp.112.207522>
- Palmer, T. & Stansfeld, P. J. (2020). Targeting of proteins to the twin-arginine translocation pathway. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/mmi.14461>
- Pan, D., Nakatsu, T. & Kato, H. (2013). Crystal structure of peroxisomal targeting signal-2 bound to its receptor complex Pex7p–Pex21p. *Nature Structural & Molecular Biology*, *20*(8), 987–993. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2618>
- Panahandeh, S., Maurer, C., Moser, M., DeLisa, M. P. & Müller, M. (2008). Following the path of a twin-arginine precursor along the TatABC translocase of Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(48), 33267–33275. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804225200>
- Papish, A. L., Ladner, C. L. & Turner, R. J. (2003). The twin-arginine leader-binding protein, DmsD, interacts with the TatB and TatC subunits of the Escherichia coli twin-arginine translocase. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(35), 32501–32506. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301076200>
- Passmore, I. J., Dow, J. M., Coll, F., Cuccui, J., Palmer, T. & Wren, B. W. (2020). The ferric citrate regulator, FecR, is translocated across the bacterial inner membrane via a unique Twin-arginine transport dependent mechanism. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.00541-19>
- Patel, R., Vasilev, C., Beck, D., Monteferrante, C., Hunter, C., Smith, C. & Robinson, C. (2014). A mutation leading to super-assembly of twin-arginine translocase (Tat) protein complexes. *Biochimica et biophysica acta*, *1843*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.009>
- Petriv, O. I., Tang, L., Titorenko, V. I. & Rachubinski, R. A. (2004). A New Definition for the Consensus Sequence of the Peroxisome Targeting Signal Type 2. *Journal of Molecular Biology*, *341*(1), 119–134. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.064>
- Pettersson, P., Ye, W., Jakob, M., Tannert, F., Klösgen, R. B. & Mäler, L. (2018). Structure and dynamics of plant TatA in micelles and lipid bilayers studied by solution NMR. *The FEBS Journal*, *285*(10), 1886–1906. <https://doi.org/10.1111/febs.14452>
- Pires, J. R., Hong, X., Brockmann, C., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J., Oschkinat, H. & Erdmann, R. (2003). The ScPex13p SH3 domain exposes two distinct binding sites for Pex5p and Pex14p. *Journal of Molecular Biology*, *326*(5), 1427–1435. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00039-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00039-1)
- Platta, H. W., Magraoui, F. E., Schlee, D., Grunau, S., Girzalsky, W. & Erdmann, R. (2007). Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. *The Journal of Cell Biology*, *177*(2), 197–204. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611012>
- Pollock, N. L., Rai, M., Simon, K. S., Hesketh, S. J., Teo, A. C. K., Parmar, M., Sridhar, P., Collins, R., Lee, S. C., Stroud, Z. N., Bakker, S. E., Muench, S. P., Barton, C. H., Hurlbut, G., Roper, D. I., Smith, C. J. I., Knowles, T. J., Spickett, C. M., East, J. M., ... Dafforn, T. R. (2019). SMA-PAGE: A new method to examine complexes of membrane proteins using SMALP nano-encapsulation and native gel electrophoresis. *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*, *1861*(8), 1437–1445. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.05.011>
- Pop, O. I., Westermann, M., Volkmer-Engert, R., Schulz, D., Lemke, C., Schreiber, S., Gerlach, R., Wetzker, R. & Müller, J. P. (2003). Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatAd indicates protein-mediated targeting of the Tat export in Bacillus subtilis. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(40), 38428–38436. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306516200>
- Porcelli, I., de Leeuw, E., Wallis, R., van den Brink-van der Laan, E., de Kruijff, B., Wallace, B. A., Palmer, T. & Berks, B. C. (2002). Characterization and membrane assembly of the TatA component of the

- Escherichia coli twin-arginine protein transport system. *Biochemistry*, 41(46), 13690–13697. <https://doi.org/10.1021/bi026142i>
- Portis, A. R. & Heldt, H. W. (1976). Light-dependent changes of the Mg<sup>2+</sup> concentration in the stroma in relation to the Mg<sup>2+</sup> dependency of CO<sub>2</sub> fixation in intact chloroplasts. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 449(3), 434–436. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(76\)90154-7](https://doi.org/10.1016/0005-2728(76)90154-7)
- Punginelli, C., Maldonado, B., Grahl, S., Jack, R., Alami, M., Schröder, J., Berks, B. C. & Palmer, T. (2007). Cysteine scanning mutagenesis and topological mapping of the Escherichia coli twin-arginine translocase TatC Component. *Journal of Bacteriology*, 189(15), 5482–5494. <https://doi.org/10.1128/JB.00647-07>
- Purdue, P. E., Yang, X. & Lazarow, P. B. (1998). Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway. *The Journal of Cell Biology*, 143(7), 1859–1869. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.7.1859>
- Ramasamy, S., Abrol, R., Suloway, C. J. M. & Clemons, W. M. (2013). The glove-like structure of the conserved membrane protein TatC provides insight into signal sequence recognition in twin-arginine translocation. *Structure (London, England: 1993)*, 21(5), 777–788. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.03.004>
- Rantala, M., Tikkanen, M. & Aro, E.-M. (2017). Proteomic characterization of hierarchical mega-complex formation in Arabidopsis thylakoid membrane. *The Plant Journal*, 92(5), 951–962. <https://doi.org/10.1111/tpj.13732>
- Rathmann, C., Schlösser, A. S., Schiller, J., Bogdanov, M. & Brüser, T. (2017). Tat transport in Escherichia coli requires zwitterionic phosphatidylethanolamine but no specific negatively charged phospholipid. *FEBS Letters*, 591(18), 2848–2858. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12794>
- Reguenga, C., Oliveira, M. E., Gouveia, A. M., Sá-Miranda, C. & Azevedo, J. E. (2001). Characterization of the mammalian peroxisomal import machinery: Pex2p, Pex5p, Pex12p, and Pex14p are subunits of the same protein assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 29935–29942. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104114200>
- Rehling, P., Marzioch, M., Niesen, F., Wittke, E., Veenhuis, M. & Kunau, W. H. (1996). The import receptor for the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2) in Saccharomyces cerevisiae is encoded by the PAS7 gene. *The EMBO Journal*, 15(12), 2901–2913.
- Richter, S. & Brüser, T. (2005). Targeting of Unfolded PhoA to the TAT Translocon of Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 280(52), 42723–42730. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509570200>
- Richter, S., Lindenstrauss, U., Lücke, C., Bayliss, R. & Brüser, T. (2007). Functional Tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33257–33264. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703303200>
- Rigaud, J.-L. & Lévy, D. (2003). Reconstitution of Membrane Proteins into Liposomes. In *Methods in Enzymology* (Bd. 372, S. 65–86). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)72004-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)72004-7)
- Rodrigue, A., Chanal, A., Beck, K., Müller, M. & Wu, L. F. (1999). Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(19), 13223–13228. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13223>
- Rodriguez, F., Rouse, S. L., Tait, C. E., Harmer, J., De Riso, A., Timmel, C. R., Sansom, M. S. P., Berks, B. C. & Schnell, J. R. (2013). Structural model for the protein-translocating element of the twin-arginine transport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(12), E1092–E1101. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219486110>
- Roffey, R. A. & Theg, S. M. (1996). Analysis of the Import of Carboxyl-Terminal Truncations of the 23-Kilodalton Subunit of the Oxygen-Evolving Complex Suggests That Its Structure Is an Important Determinant for Thylakoid Transport. *Plant Physiology*, 111(4), 1329–1338. <https://doi.org/10.1104/pp.111.4.1329>
- Rollauer, S. E., Tarry, M. J., Graham, J. E., Jääskeläinen, M., Jäger, F., Johnson, S., Krehenbrink, M., Liu, S.-M., Lukey, M. J., Marcoux, J., McDowell, M. A., Rodriguez, F., Roversi, P., Stansfeld, P. J., Robinson, C. V., Sansom, M. S. P., Palmer, T., Högbom, M., Berks, B. C. & Lea, S. M. (2012). Structure of the

- TatC core of the twin-arginine protein transport system. *Nature*, 492(7428), 210–214. <https://doi.org/10.1038/nature11683>
- Romano, F. B., Blok, N. B. & Rapoport, T. A. (2019). Peroxisome protein import recapitulated in *Xenopus* egg extracts. *The Journal of Cell Biology*, 218(6), 2021–2034. <https://doi.org/10.1083/jcb.201901152>
- Rose, P., Fröbel, J., Graumann, P. L. & Müller, M. (2013). Substrate-dependent assembly of the Tat translocase as observed in live *Escherichia coli* cells. *PLoS One*, 8(8), e69488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069488>
- Rose, R. W., Brüser, T., Kissinger, J. C. & Pohlschröder, M. (2002). Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Molecular Microbiology*, 45(4), 943–950. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03090.x>
- Roy, L. M. & Barkan, A. (1998). A SecY homologue is required for the elaboration of the chloroplast thylakoid membrane and for normal chloroplast gene expression. *The Journal of Cell Biology*, 141(2), 385–395. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.2.385>
- Saffian, D., Grimm, I., Girzalsky, W. & Erdmann, R. (2012). ATP-dependent assembly of the heteromeric Pex1p-Pex6p-complex of the peroxisomal matrix protein import machinery. *Journal of Structural Biology*, 179(2), 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.06.002>
- Saidowsky, J., Dodt, G., Kirchberg, K., Wegner, A., Nastainczyk, W., Kunau, W. H. & Schliebs, W. (2001). The di-aromatic pentapeptide repeats of the human peroxisome import receptor PEX5 are separate high affinity binding sites for the peroxisomal membrane protein PEX14. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(37), 34524–34529. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104647200>
- Salomons, F. A., Kiel, J. A., Faber, K. N., Veenhuis, M. & van der Kleij, I. J. (2000). Overproduction of Pex5p stimulates import of alcohol oxidase and dihydroxyacetone synthase in a *Hansenula polymorpha* Pex14 null mutant. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(17), 12603–12611. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.17.12603>
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual (3rd lab edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- San Miguel, M., Marrington, R., Rodger, P. M., Rodger, A. & Robinson, C. (2003). An *Escherichia coli* twin-arginine signal peptide switches between helical and unstructured conformations depending on the hydrophobicity of the environment. *European Journal of Biochemistry*, 270(16), 3345–3352. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03710.x>
- Sanders, C., Wethkamp, N. & Lill, H. (2001). Transport of cytochrome c derivatives by the bacterial Tat protein translocation system. *Molecular Microbiology*, 41(1), 241–246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02514.x>
- Santini, C. L., Ize, B., Chanal, A., Müller, M., Giordano, G. & Wu, L. F. (1998). A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 17(1), 101–112. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.1.101>
- 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. *The EMBO Journal*, 17(13), 3640–3650. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.13.3640>
- Sargent, F., Stanley, N. R., Berks, B. C. & Palmer, T. (1999). Sec-independent Protein Translocation in *Escherichia coli* A DISTINCT AND PIVOTAL ROLE FOR THE TatB PROTEIN. *Journal of Biological Chemistry*, 274(51), 36073–36082. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.51.36073>
- Schäfer, A., Kerksen, D., Veenhuis, M., Kunau, W.-H. & Schliebs, W. (2004). Functional Similarity between the Peroxisomal PTS2 Receptor Binding Protein Pex18p and the N-Terminal Half of the PTS1 Receptor Pex5p. *Molecular and Cellular Biology*, 24(20), 8895–8906. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.20.8895-8906.2004>
- Schäfer, K., Künzler, P., Klingl, A., Eubel, H. & Carrie, C. (2020). The Plant Mitochondrial TAT Pathway Is Essential for Complex III Biogenesis. *Current Biology*, 0(0). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.01.001>

- Schägger, H., Cramer, W. A. & von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 217(2), 220–230. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1112>
- Schägger, H. & Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, 19(8), 1777–1783. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1777>
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry*, 199(2), 223–231. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90094-A](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90094-A)
- Schell-Steven, A., Stein, K., Amoros, M., Landgraf, C., Volkmer-Engert, R., Rottensteiner, H. & Erdmann, R. (2005). Identification of a novel, intraperoxisomal pex14-binding site in pex13: Association of pex13 with the docking complex is essential for peroxisomal matrix protein import. *Molecular and Cellular Biology*, 25(8), 3007–3018. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.8.3007-3018.2005>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. & Cardona, A. (2012). Fiji—An Open Source platform for biological image analysis. *Nature methods*, 9(7). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schlesier, R. (2015). *Zum Tat-abhängigen Proteintransport an der Thylakoidmembran: Membraninteraktion, Rezeptorbindung und Translokation des chimären 16/23 Proteins* [Dissertation]. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Schlesier, R. & Klösgen, R. B. (2010). Twin arginine translocation (Tat)-dependent protein transport: The passenger protein participates in the initial membrane binding step. *Biological Chemistry*, 391(12), 1411–1417. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.138>
- Schlesier, R. & Klösgen, R. B. (2015). C-terminal truncation of a Tat passenger protein affects its membrane translocation by interfering with receptor binding. *Biological Chemistry*, 396(4), 349–357. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0249>
- Schliebs, W. & Kunau, W.-H. (2006). PTS2 co-receptors: Diverse proteins with common features. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1763(12), 1605–1612. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.051>
- Schrödinger, LLC. (2015). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3.4*.
- Schünemann, D. (2007). Mechanisms of protein import into thylakoids of chloroplasts. *Biological Chemistry*, 388(9), 907–915. <https://doi.org/10.1515/BC.2007.111>
- Seddon, A. M., Curnow, P. & Booth, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1666(1), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.04.011>
- Sello, S., Moscaticello, R., Mehlmer, N., Leonardelli, M., Carraretto, L., Cortese, E., Zanella, F. G., Baldan, B., Szabò, I., Vothknecht, U. C. & Navazio, L. (2018). Chloroplast Ca<sup>2+</sup> Fluxes into and across Thylakoids Revealed by Thylakoid-Targeted Aequorin Probes. *Plant Physiology*, 177(1), 38–51. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00027>
- Settles, A. M., Yonetani, A., Baron, A., Bush, D. R., Cline, K. & Martienssen, R. (1997). Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5342), 1467–1470. <https://doi.org/10.1126/science.278.5342.1467>
- Shanmugham, A., Wong Fong Sang, H. W., Bollen, Y. J. M. & Lill, H. (2006). Membrane Binding of Twin Arginine Preproteins as an Early Step in Translocation. *Biochemistry*, 45(7), 2243–2249. <https://doi.org/10.1021/bi052188a>
- Sikdar, R. & Doerrler, W. T. (2010). Inefficient Tat-Dependent Export of Periplasmic Amidases in an Escherichia coli Strain with Mutations in Two DedA Family Genes. *Journal of Bacteriology*, 192(3), 807–818. <https://doi.org/10.1128/JB.00716-09>
- Simone, D., Bay, D. C., Leach, T. & Turner, R. J. (2013). Diversity and evolution of bacterial twin arginine translocase protein, TatC, reveals a protein secretion system that is evolving to fit its environmental niche. *PLoS One*, 8(11), e78742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078742>

- Singer, S. J. & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, N.Y.)*, 175(4023), 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>
- Skalitzky, C. A., Martin, J. R., Harwood, J. H., Beirne, J. J., Adamczyk, B. J., Heck, G. R., Cline, K. & Fernandez, D. E. (2011). Plastids Contain a Second Sec Translocase System with Essential Functions. *Plant Physiology*, 155(1), 354–369. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166546>
- Small, G. M., Szabo, L. J. & Lazarow, P. B. (1988). Acyl-CoA oxidase contains two targeting sequences each of which can mediate protein import into peroxisomes. *The EMBO Journal*, 7(4), 1167–1173.
- Smith, S. M., Yarwood, A., Fleck, R. A., Robinson, C. & Smith, C. J. (2017). TatA complexes exhibit a marked change in organisation in response to expression of the TatBC complex. *The Biochemical Journal*, 474(9), 1495–1508. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160952>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 275(16), 11591–11596. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.16.11591>
- Stanley, W. A., Filipp, F. V., Kursula, P., Schüller, N., Erdmann, R., Schliebs, W., Sattler, M. & Wilmanns, M. (2006). Recognition of a functional peroxisome type 1 target by the dynamic import receptor pex5p. *Molecular Cell*, 24(5), 653–663. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.10.024>
- Stoppe, S. (2014). *Expression, Reinigung und Charakterisierung von chloroplastidären Transitpeptiden* [Bachelorarbeit]. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Strauch, E.-M. & Georgiou, G. (2007). Escherichia coli tatC mutations that suppress defective twin-arginine transporter signal peptides. *Journal of Molecular Biology*, 374(2), 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.09.050>
- Stuart, M. C. A. & Boekema, E. J. (2007). Two distinct mechanisms of vesicle-to-micelle and micelle-to-vesicle transition are mediated by the packing parameter of phospholipid–detergent systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(11), 2681–2689. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.06.024>
- Summer, E. J., Mori, H., Settles, A. M. & Cline, K. (2000). The Thylakoid ΔpH-dependent Pathway Machinery Facilitates RR-independent N-Tail Protein Integration. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 23483–23490. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004137200>
- Sun, C., Benlekbir, S., Venkatakrisnan, P., Wang, Y., Hong, S., Hosler, J., Tajkhorshid, E., Rubinstein, J. L. & Gennis, R. B. (2018). Structure of the Alternative Complex III in a supercomplex with cytochrome oxidase. *Nature*, 557(7703), 123–126. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0061-y>
- Sünkel, S., Brennicke, A. & Knoop, V. (1994). RNA editing of a conserved reading frame in plant mitochondria increases its similarity to two overlapping reading frames in Escherichia coli. *Molecular & General Genetics: MGG*, 242(1), 65–72. <https://doi.org/10.1007/bf00277349>
- Swainsbury, D. J. K., Scheidelaar, S., Foster, N., van Grondelle, R., Killian, J. A. & Jones, M. R. (2017). The effectiveness of styrene-maleic acid (SMA) copolymers for solubilisation of integral membrane proteins from SMA-accessible and SMA-resistant membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1859(10), 2133–2143. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.07.011>
- Swinkels, B. w., Gould, S. j., Bodnar, A. g., Rachubinski, R. a. & Subramani, S. (1991). A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *The EMBO Journal*, 10(11), 3255–3262. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04889.x>
- Tal, M., Silberstein, A. & Nusser, E. (1985). Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(18), 9976–9980.
- Tarry, M. J., Schäfer, E., Chen, S., Buchanan, G., Greene, N. P., Lea, S. M., Palmer, T., Saibil, H. R. & Berks, B. C. (2009). Structural analysis of substrate binding by the TatBC component of the twin-arginine protein transport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(32), 13284–13289. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901566106>
- Taubert, J., Hou, B., Risselada, H. J., Mehner, D., Lünsdorf, H., Grubmüller, H. & Brüser, T. (2015). TatBC-independent TatA/Tat substrate interactions contribute to transport efficiency. *PloS One*, 10(3), e0119761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119761>



- Taw, M. N., Boock, J. T., Kim, D., Rocco, M. A., Waraho-Zhmayev, D. & DeLisa, M. P. (2020). *Twin-arginine translocase component TatB performs folding quality control via a general chaperone activity* [Preprint]. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.089458>
- Teter, S. A. & Klionsky, D. J. (1999). How to get a folded protein across a membrane. *Trends in Cell Biology*, *9*(11), 428–431. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(99\)01652-9](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(99)01652-9)
- Teter, S. A. & Theg, S. M. (1998). Energy-transducing thylakoid membranes remain highly impermeable to ions during protein translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(4), 1590–1594.
- Titorenko, V. I., Smith, J. J., Szilard, R. K. & Rachubinski, R. A. (1998). Pex20p of the Yeast *Yarrowia lipolytica* Is Required for the Oligomerization of Thiolase in the Cytosol and for Its Targeting to the Peroxisome. *The Journal of Cell Biology*, *142*(2), 403–420.
- Tsukamoto, T., Hata, S., Yokota, S., Miura, S., Fujiki, Y., Hijikata, M., Miyazawa, S., Hashimoto, T. & Osumi, T. (1994). Characterization of the signal peptide at the amino terminus of the rat peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase precursor. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(8), 6001–6010.
- Ulfig, A. & Freudl, R. (2018). The early mature part of bacterial twin-arginine translocation (Tat) precursor proteins contributes to TatBC receptor binding. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(19), 7281–7299. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002576>
- Ulfig, A., Fröbel, J., Lausberg, F., Blümmel, A.-S., Heide, A. K., Müller, M. & Freudl, R. (2017). The h-region of twin-arginine signal peptides supports productive binding of bacterial Tat precursor proteins to the TatBC receptor complex. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(26), 10865–10882. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.788950>
- Unseld, M., Marienfeld, J. R., Brandt, P. & Brennicke, A. (1997). The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genetics*, *15*(1), 57–61. <https://doi.org/10.1038/ng0197-57>
- van der Leij, I., Franse, M. M., Elgersma, Y., Distel, B. & Tabak, H. F. (1993). PAS10 is a tetratricopeptide-repeat protein that is essential for the import of most matrix proteins into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(24), 11782–11786. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11782>
- Varadarajan, A., Oswald, F., Lill, H., Peterman, E. J. G. & Bollen, Y. J. M. (2020). *Rapid diffusion of large TatA complexes detected using single particle tracking microscopy* [Preprint]. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/2020.05.14.095463>
- Varela, L., Hendry, A. C., Medina-Carmona, E., Cantoni, D. & Ortega-Roldan, J. L. (2019). *Membrane insertion of soluble CLIC1 into active chloride channels is triggered by specific divalent cations* (S. 638080). Cold Spring Harbor Laboratory. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/638080v2>
- Voelker, R. & Barkan, A. (1995). Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid. *The EMBO Journal*, *14*(16), 3905–3914.
- von Heijne, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *Journal of Molecular Biology*, *184*(1), 99–105. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(85\)90046-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(85)90046-4)
- Waclawek, M. (2016). *Spinat als alternatives Modellsystem zur Analyse des Tat-abhängigen Membrantransports von Proteinen* [Dissertation]. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Walker, M. B., Roy, L. M., Coleman, E., Voelker, R. & Barkan, A. (1999). The Maize *tha4* Gene Functions in Sec-Independent Protein Transport in Chloroplasts and Is Related to *hcf106*, *tatA*, and *tatB*. *Journal of Cell Biology*, *147*(2), 267–276. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.2.267>
- Walter, T. & Erdmann, R. (2019). Current Advances in Protein Import into Peroxisomes. *The Protein Journal*, *38*(3), 351–362. <https://doi.org/10.1007/s10930-019-09835-6>
- Walther, T. H., Gottselig, C., Grage, S. L., Wolf, M., Vargiu, A. V., Klein, M. J., Vollmer, S., Prock, S., Hartmann, M., Afonin, S., Stockwald, E., Heinzmann, H., Nolandt, O. V., Wenzel, W., Ruggerone, P. & Ulrich, A. S. (2013). Folding and Self-Assembly of the TatA Translocation Pore Based on a Charge Zipper Mechanism. *Cell*, *152*(1), 316–326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.017>
- Walther, T. H., Grage, S. L., Roth, N. & Ulrich, A. S. (2010). Membrane Alignment of the Pore-Forming Component TatAd of the Twin-Arginine Translocase from *Bacillus subtilis* Resolved by Solid-State

- NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 132(45), 15945–15956. <https://doi.org/10.1021/ja106963s>
- Walton, P. A., Hill, P. E. & Subramani, S. (1995). Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Molecular Biology of the Cell*, 6(6), 675–683. <https://doi.org/10.1091/mbc.6.6.675>
- Wang, D., Visser, N. V., Veenhuis, M. & van der Klei, I. J. (2003). Physical interactions of the peroxisomal targeting signal 1 receptor pex5p, studied by fluorescence correlation spectroscopy. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 43340–43345. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307789200>
- Warren, G., Oates, J., Robinson, C. & Dixon, A. M. (2009). Contributions of the Transmembrane Domain and a Key Acidic Motif to Assembly and Function of the TatA Complex. *Journal of Molecular Biology*, 388(1), 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.02.060>
- Webb, M. S. & Green, B. R. (1991). Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1060(2), 133–158. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(09\)91002-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(09)91002-7)
- Weiner, J. H., Bilous, P. T., Shaw, G. M., Lubitz, S. P., Frost, L., Thomas, G. H., Cole, J. A. & Turner, R. J. (1998). A Novel and Ubiquitous System for Membrane Targeting and Secretion of Cofactor-Containing Proteins. *Cell*, 93(1), 93–101. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81149-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81149-6)
- Wendland, M. & Subramani, S. (1993). Cytosol-dependent peroxisomal protein import in a permeabilized cell system. *The Journal of Cell Biology*, 120(3), 675–685. <https://doi.org/10.1083/jcb.120.3.675>
- Whitaker, N., Bageshwar, U. K. & Musser, S. M. (2012). Kinetics of precursor interactions with the bacterial Tat translocase detected by real-time FRET. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(14), 11252–11260. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.324525>
- Will, G. K., Soukupova, M., Hong, X., Erdmann, K. S., Kiel, J. A., Dodt, G., Kunau, W. H. & Erdmann, R. (1999). Identification and characterization of the human orthologue of yeast Pex14p. *Molecular and Cellular Biology*, 19(3), 2265–2277. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.3.2265>
- Williams, C., van den Berg, M., Panjikar, S., Stanley, W. A., Distel, B. & Wilmanns, M. (2012). Insights into ubiquitin-conjugating enzyme/ co-activator interactions from the structure of the Pex4p:Pex22p complex. *The EMBO Journal*, 31(2), 391–402. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.411>
- Wittig, I., Beckhaus, T., Wumaier, Z., Karas, M. & Schägger, H. (2010). Mass Estimation of Native Proteins by Blue Native Electrophoresis. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 9(10), 2149–2161. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900526-MCP200>
- Wittig, S., Haupt, C., Hoffmann, W., Kostmann, S., Pagel, K. & Schmidt, C. (2019). Oligomerisation of Synaptobrevin-2 Studied by Native Mass Spectrometry and Chemical Cross-Linking. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 30(1), 149–160. <https://doi.org/10.1007/s13361-018-2000-4>
- Wojnowska, M., Gault, J., Yong, S. C., Robinson, C. V. & Berks, B. C. (2018). Precursor–Receptor Interactions in the Twin Arginine Protein Transport Pathway Probed with a New Receptor Complex Preparation. *Biochemistry*, 57(10), 1663–1671. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00026>
- Woodward, A. W. & Bartel, B. (2005). The Arabidopsis peroxisomal targeting signal type 2 receptor PEX7 is necessary for peroxisome function and dependent on PEX5. *Molecular Biology of the Cell*, 16(2), 573–583. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-05-0422>
- Wu, L. F., Ize, B., Chanal, A., Quentin, Y. & Fichant, G. (2000). Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: Evolution and mechanism. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2(2), 179–189.
- Xue, M., Cheng, L., Faustino, I., Guo, W. & Marrink, S. J. (2018). Molecular Mechanism of Lipid Nanodisk Formation by Styrene-Maleic Acid Copolymers. *Biophysical Journal*, 115(3), 494–502. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.06.018>
- Yang, Z., Wang, C., Zhou, Q., An, J., Hildebrandt, E., Aleksandrov, L. A., Kappes, J. C., DeLucas, L. J., Riordan, J. R., Urbatsch, I. L., Hunt, J. F. & Brouillette, C. G. (2014). Membrane protein stability can be compromised by detergent interactions with the extramembranous soluble domains. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 23(6), 769–789. <https://doi.org/10.1002/pro.2460>

- Yen, M.-R., Tseng, Y.-H., Nguyen, E. H., Wu, L.-F. & Saier, M. H. (2002). Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. *Archives of Microbiology*, 177(6), 441–450. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0408-4>
- Yi, L., Jiang, F., Chen, M., Cain, B., Bolhuis, A. & Dalbey, R. E. (2003). YidC Is Strictly Required for Membrane Insertion of Subunits a and c of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP Synthase and SecE of the SecYEG Translocase †. *Biochemistry*, 42(35), 10537–10544. <https://doi.org/10.1021/bi034309h>
- Zhang, J. W. & Lazarow, P. B. (1995). PEB1 (PAS7) in *Saccharomyces cerevisiae* encodes a hydrophilic, intraperoxisomal protein that is a member of the WD repeat family and is essential for the import of thiolase into peroxisomes. *The Journal of Cell Biology*, 129(1), 65–80. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.1.65>
- Zhang, J. W. & Lazarow, P. B. (1996). Peb1p (Pas7p) is an intraperoxisomal receptor for the NH<sub>2</sub>-terminal, type 2, peroxisomal targeting sequence of thiolase: Peb1p itself is targeted to peroxisomes by an NH<sub>2</sub>-terminal peptide. *The Journal of Cell Biology*, 132(3), 325–334. <https://doi.org/10.1083/jcb.132.3.325>
- Zhang, L., Liu, L., Maltsev, S., Lorigan, G. A. & Dabney-Smith, C. (2013). Solid-state NMR investigations of peptide–lipid interactions of the transmembrane domain of a plant-derived protein, Hcf106. *Chemistry and Physics of Lipids*, 175–176, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.09.002>
- Zhang, L., Liu, L., Maltsev, S., Lorigan, G. A. & Dabney-Smith, C. (2014). Investigating the interaction between peptides of the amphipathic helix of Hcf106 and the phospholipid bilayer by solid-state NMR spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1838(1 Pt B), 413–418. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.10.007>
- Zhang, R., Sahu, I. D., Bali, A. P., Dabney-Smith, C. & Lorigan, G. A. (2017). Characterization of the structure of lipid-coated nanoparticles in the presence of KCNE1 by dynamic light scattering and transmission electron microscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, 203, 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.12.003>
- Zhang, X. C. & Li, H. (2019). Interplay between the electrostatic membrane potential and conformational changes in membrane proteins. *Protein Science*, 28(3), 502–512. <https://doi.org/10.1002/pro.3563>
- Zhang, Y., Hu, Y., Li, H. & Jin, C. (2014). Structural Basis for TatA Oligomerization: An NMR Study of *Escherichia coli* TatA Dimeric Structure. *PLOS ONE*, 9(8), e103157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103157>
- Zhang, Y., Wang, L., Hu, Y. & Jin, C. (2014). Solution structure of the TatB component of the twin-arginine translocation system. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1838(7), 1881–1888. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.03.015>
- Zhu, L., Klenner, C., Kuhn, A. & Dalbey, R. E. (2012). Both YidC and SecYEG are required for translocation of the periplasmic loops 1 and 2 of the multispanning membrane protein TatC. *Journal of Molecular Biology*, 424(5), 354–367. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.09.026>
- Zinecker, S. (2020). *Funktionelle Rekonstitution von TatB in die thylakoidäre Tat-Translokase* [Dissertation]. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Zinecker, S., Jakob, M. & Klösgen, R. B. (2020). Functional reconstitution of TatB into the thylakoidal Tat translocase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(2), 118606. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118606>
- Zoufaly, S., Fröbel, J., Rose, P., Flecken, T., Maurer, C., Moser, M. & Müller, M. (2012). Mapping precursor-binding site on TatC subunit of twin arginine-specific protein translocase by site-specific photo cross-linking. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(16), 13430–13441. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.343798>

## Anhang

Der Anhang beinhaltet im ersten Teil einen zusätzlichen Abschnitt des Ergebnisteils zu methodischen Besonderheiten beim *Western Blotting* von TatC. Der zweite Teil besteht aus ergänzenden Abbildungen zu verschiedenen anderen Themen.

### Anhang Abschnitt 1 - Kritische Aspekte bei der Analyse von TatBC-Komplexen

Dieser Abschnitt soll das Kapitel Material und Methoden ergänzen. Bei der Optimierung des Nachweises von insbesondere TatC in digitoninsolubilisierten Proben mittels *Western Blotting* nach BN-PAGE wurden kritische Punkte identifiziert, die hier näher erläutert sind.

#### Eine denaturierende Behandlung von BN-PA-Gelen vor dem *Western Blotting* führt zur Abschwächung TatC-spezifischer Signale

Das ursprüngliche Problem trat bereits in der der Promotion vorangehenden Masterarbeit (Reimers, 2015) auf: Die damals verwendete Methode des elektrophoretischen Proteintransfers war *Tank Blotting* (4 h, 50 V, SDS-Laufpuffer + 10 % (v/v) Methanol, 10 cm Elektrodenabstand) auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran mit 0,45 µm Porendurchmesser. Dies wurde später auf 0,2 µm PVDF geändert (siehe auch Jakob et al., 2019). Zuvor wurden die BN-Gele denaturierend behandelt (90 % SDS-Laufpuffer, 10 % einer 10 %igen SDS-Lösung und 0,1 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 40 °C, 5-10 min), was die Transfereffizienz vieler Proteine verbessern kann. Wie sich später herausstellte schien diese denaturierende Behandlung im speziellen Fall des *Western Blotting* von Erbsen-TatC nach BN-PAGE jedoch zu Problemen zu führen (siehe weiter unten).

Die mit dem beschriebenen Protokoll erhaltenen Signalintensitäten waren recht gering. Die üblichen Expositionszeiten lagen bei mehreren Stunden, wobei TatB generell intensivere Signale als TatC zeigte. Ein Nachweis mit dem Antiserum  $\alpha$ -TatB brachte allerdings stärkere Kreuzreaktionen, v. a. mit Photosystem I direkt oberhalb des größten „Tat<sub>3</sub>C“-Komplexes, als TatB-spezifische Signale hervor. Abgesehen davon ist das *Tank Blotting*-Protokoll mit recht hohem Zeit- und Materialaufwand verbunden. Das Transferprotokoll wurde daher geändert.

Als Alternative wurde eine Variante des *Semidry Blotting* getestet (siehe Methoden Abschnitt 3.4.6). Auch hier wurden die BN-Gele zuvor denaturierend behandelt. Es zeigte sich allerdings, dass zwar für TatB wesentlich intensivere Signale als zuvor auftraten (Expositionszeit im Bereich von einigen bis Dutzenden Sekunden), TatC-Signale jedoch im Vergleich dazu sehr schwach ausfielen. Um die Möglichkeit zu prüfen, dass die Dauer des Transfers für TatC nicht ausreichend ist, wurde ein BN-Gel zwei aufeinanderfolgenden *Blotting*-Durchgängen unterzogen. Die zweite Membran zeigte allerdings keine Signale, die Vermutung traf also nicht zu (Daten nicht gezeigt).

Schließlich wurde festgestellt, dass durch das Weglassen des Denaturierungsschrittes die TatC-Signalintensität drastisch gesteigert werden konnte (Expositionszeit ca. 1 - 10 min), während TatB davon unbeeinflusst war (Abb. 29). Die Dauer der nachfolgenden Inkubation mit dem *Semidry Blotting*-Kathodenpuffer hatte darauf anscheinend keinen Einfluss (vgl. Methoden Abschnitt 3.4.6).

Die bei Abb. E19 C beobachtete Abnahme des TatC-spezifischen Signals bei hohen Temperaturen könnte ebenfalls mit dem beschriebenen Sachverhalt zusammenhängen. Möglicherweise führt die Wärmeeinwirkung zur Denaturierung eines für den Nachweis per *Western Blotting* wichtigen Epitops.

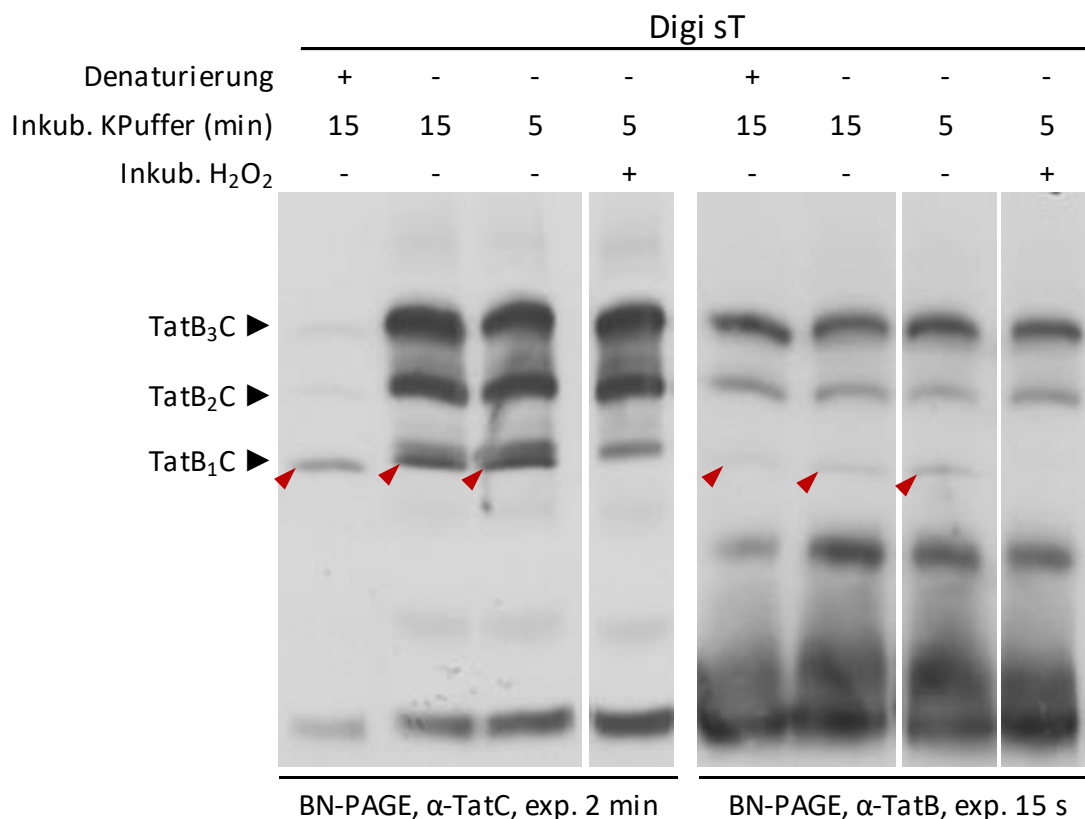


Abbildung A1: **Probleme beim *Western Blotting*-Nachweis von TatC nach BN-PAGE.** Identische Proben von digitoninsolubilierten Thylakoiden (Digi sT) wurden für BN-PAGE eingesetzt. Vor dem elektrophoretischen Proteintransfer im Rahmen des *Western Blotting* wurden die Gele zerteilt und die Proben zum Teil der denaturierenden Behandlung oder unterschiedlich langer Inkubation in Kathodenpuffer (KPuffer) unterzogen (Methoden Abschnitt 3.4.6). Nach dem Proteintransfer folgte die Immunodetektion mit α-TatB und α-TatC. Dabei wurden manche Anteile der PVDF-Membran im Blockierungsschritt mit 0,09 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt (Methoden Abschnitt 3.4.8). ► bezeichnet das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive Signal (siehe Text).

Zusätzlich wurde festgestellt, dass ein sowohl bei Verwendung von  $\alpha$ -TatB als auch bei  $\alpha$ -TatC auftretendes Signal (in Abb. A1 markiert durch rote Pfeile) unterdrückt werden konnte, wenn in den Puffer des auf den Transfer folgenden Blockierungsschrittes 0,09 % (v/v)  $H_2O_2$  beigemischt wurden (Methoden Abschnitt 3.4.8). Dies zeigte, dass es sich bei diesem knapp unterhalb des zweitkleinsten Komplexes „TatB<sub>1</sub>C“ liegenden Signal um ein nicht antikörperspezifisches Phänomen handelt, da die Tat-Signale von der  $H_2O_2$ -Behandlung unbeeinflusst blieben. Diese Modifikationen des *Semidry Blotting* Protokolls wurden auf alle in der Arbeit gezeigten Experimente angewandt.

#### Weitere Probleme beim *Western Blotting*-Nachweis von TatC

Im Folgenden werden weitere spezifischere Fälle beschrieben, bei denen der Nachweis von TatC misslang:	Solubilisierung % (w/v)	Digi	NaDDSar				
			1,5	0,34	0,42	0,55	0,71
CHAPS ist in der Lage, TatC zu solubilisieren, führt in BN-PAGE jedoch zu geringen Signalintensitäten (vgl. Abb. E10 sowie Abb. A3). Ähnliches gilt für die Verwendung von Triton X-100 oder -114 (TX-100/-114). Lieferte die entsprechende Detektion in der Anfangsphase der Arbeit noch gute Ergebnisse (vgl. Abb. E9), ließ ihre Effektivität jedoch in späteren Versuchen stark nach (vgl. Abb. A3). Die Gründe hierfür sind unbekannt. NaDDSar-solubilierte Proben zeigten mit digitoninsolubilierten Proben vergleichbare TatC-Signale (Abb. E11). Eine Erhöhung der Konzentration des Detergens führte allerdings zu einem Verschwinden dieser, für das es bislang keine Erklärung gibt (Abb. A2). Jedoch fällt auf, dass dies im gleichen Maße geschieht, wie die elektrophoretische Auflösung anderer Komplexe in der Analyse steigt.							

CHAPS ist in der Lage, TatC zu solubilisieren, führt in BN-PAGE jedoch zu geringen Signalintensitäten (vgl. Abb. E10 sowie Abb. A3). Ähnliches gilt für die Verwendung von Triton X-100 oder -114 (TX-100/-114). Lieferte die entsprechende Detektion in der Anfangsphase der Arbeit noch gute Ergebnisse (vgl. Abb. E9), ließ ihre Effektivität jedoch in späteren Versuchen stark nach (vgl. Abb. A3). Die Gründe hierfür sind unbekannt. NaDDSar-solubilierte Proben zeigten mit digitoninsolubilierten Proben vergleichbare TatC-Signale (Abb. E11). Eine Erhöhung der Konzentration des Detergens führte allerdings zu einem Verschwinden dieser, für das es bislang keine Erklärung gibt (Abb. A2). Jedoch fällt auf, dass dies im gleichen Maße geschieht, wie die elektrophoretische Auflösung anderer Komplexe in der Analyse steigt.

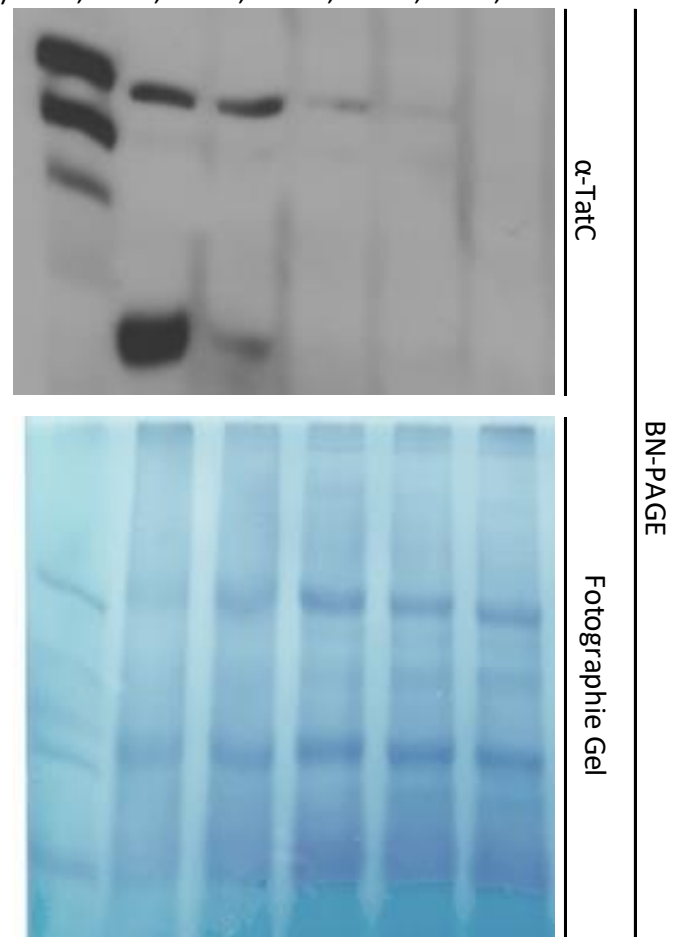


Abbildung A2: **Probleme beim Nachweis von TatC in NaDDSar-solubilierten Thylakoiden.** Thylakoide wurden mit NaDDSar solubilisiert und die Proben mit BN-PAGE (Fotografie Gel unten) und *Western Blotting* (oben) gegen TatC analysiert.

Einen großen Einfluss zeigt auch die im Rahmen der Arbeit übliche Lagerung von Versuchsmaterial. Präparierte Thylakoide können bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in HM-Puffer (siehe Methoden Abschnitt 3.3.3) aufbewahrt werden. Wie sich herausstellte, sinkt allerdings die Intensität von TatC-Signalen der damit erzeugten solubilisierten Proben sowohl in BN- als auch SDS-PAGE und unabhängig vom verwendeten Detergens (Abb. A3, sehr lange Lagerung von über zwei Monaten zu Testzwecken). Summiert sich dieser Effekt mit den ohnehin schwachen Signalen von TX-100, TX-114- oder CHAPS-solubilisierten Proben erklärt sich, warum diese Analysen oftmals negativ ausfielen. Die Detektion von TatB ist von diesen Effekten nicht betroffen (Daten nicht gezeigt). Die Lagerung von Thylakoiden sollte die Dauer von ca. einer Woche nicht überschreiten.

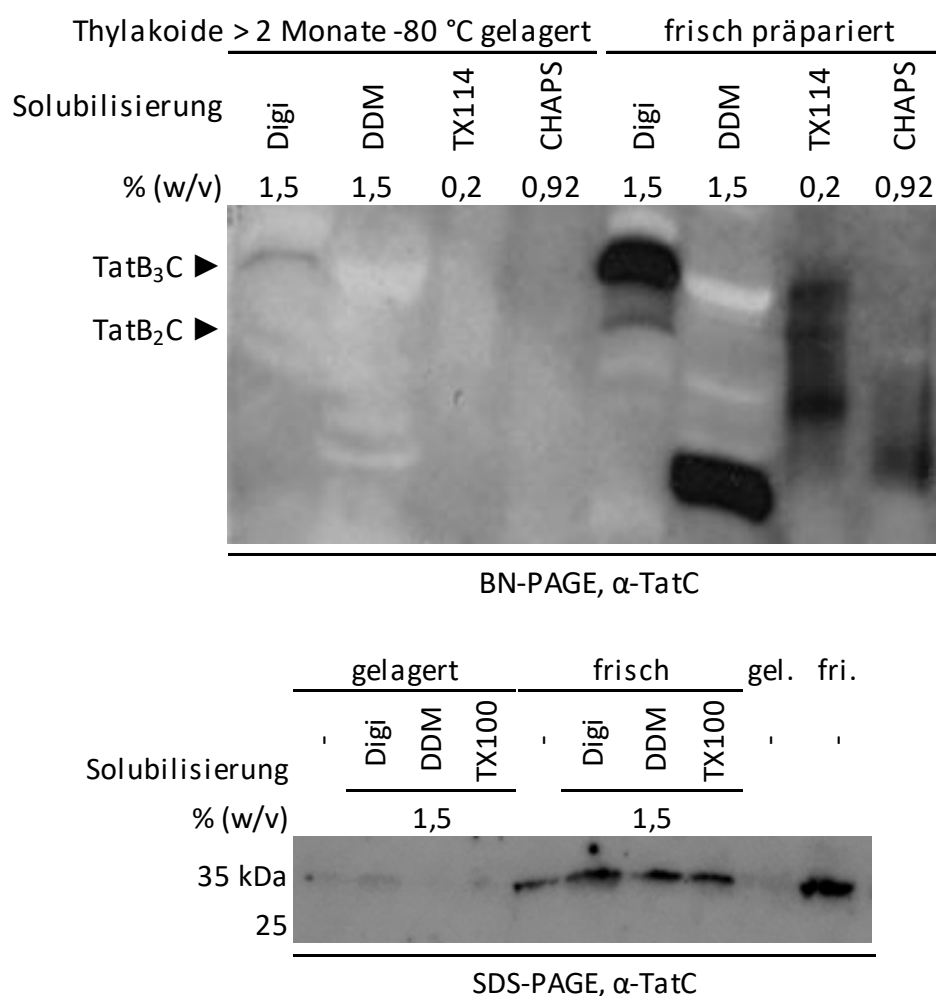


Abbildung A3: **Mit der Lagerung von präparierten Thylakoiden nimmt die Nachweisbarkeit von TatC mit BN-PAGE und *Western Blotting* ab.** Über 2 Monate bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerte oder frisch präparierte Thylakoide wurden mit Digitonin, DDM, TX-114 oder CHAPS solubilisiert und die Proben mit BN-PAGE (oben) oder SDS-PAGE (unten) und jeweils *Western Blotting* gegen TatC analysiert. „Solubilisierung -“ steht für unsolubilierte Thylakoidproben, die lediglich mit Laemmli-Probenpuffer versetzt wurden. Für die SDS-PAGE sind die Massen des *PageRuler Prestained Protein Ladder*-Größenstandards links notiert.

Der thylakoidäre Cytochrom- $b_6/f$ -Komplex kann falsch positive Ergebnisse bei der BN-PAGE- und *Western Blotting*-Analyse hervorrufen.

Abschließend soll das Phänomen des  $H_2O_2$ -sensitiven unspezifischen Signals näher beleuchtet werden. Es zeigte sich, dass dieses unabhängig von der beim *Western Blotting* durchgeführten Antikörperbehandlung auftritt: Eine nach dem elektrophoretischen Proteintransfer lediglich gewaschene Membran (siehe Methoden Abschnitt 3.4.8.2) mit einer Probe Digi sT nach BN-PAGE wurde der Detektionsprozedur (*enhanced chemiluminescence* (ECL) und Röntgenfilmexposition, vgl. Methoden Abschnitt 3.4.8.2) unterzogen (Abb. A4 A). Das intensive Signal ist sehr wahrscheinlich dasselbe wie das in Abb. 29 rot markierte. Trotz des in Abb. A4 A fehlenden Größenstandards kann man aus der Tatsache, dass der kleinste noch TatB-tragende „TatB<sub>1</sub>C“-Komplex sehr eng am Cytochrom- $b_6/f$ -Komplex migriert (siehe bspw. Abb. E1, intensiv blaue Bande bei ca. 310 kDa) schlussfolgern, dass es sich um diesen handelt. Als Teil der photosynthetischen Elektronentransportkette ist er hochabundant und beinhaltet zwei Proteine, Cytochrom  $b_6$  (PetB) und Cytochrom f (PetA), die den Cofaktor Häm tragen.

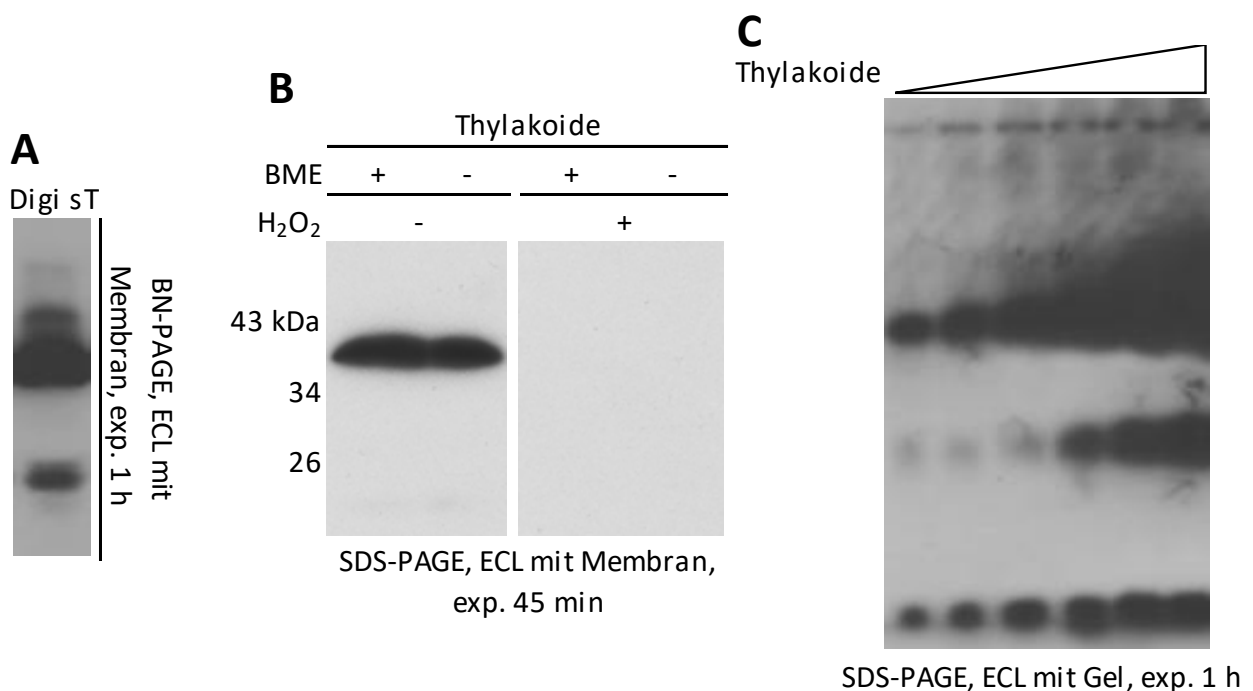


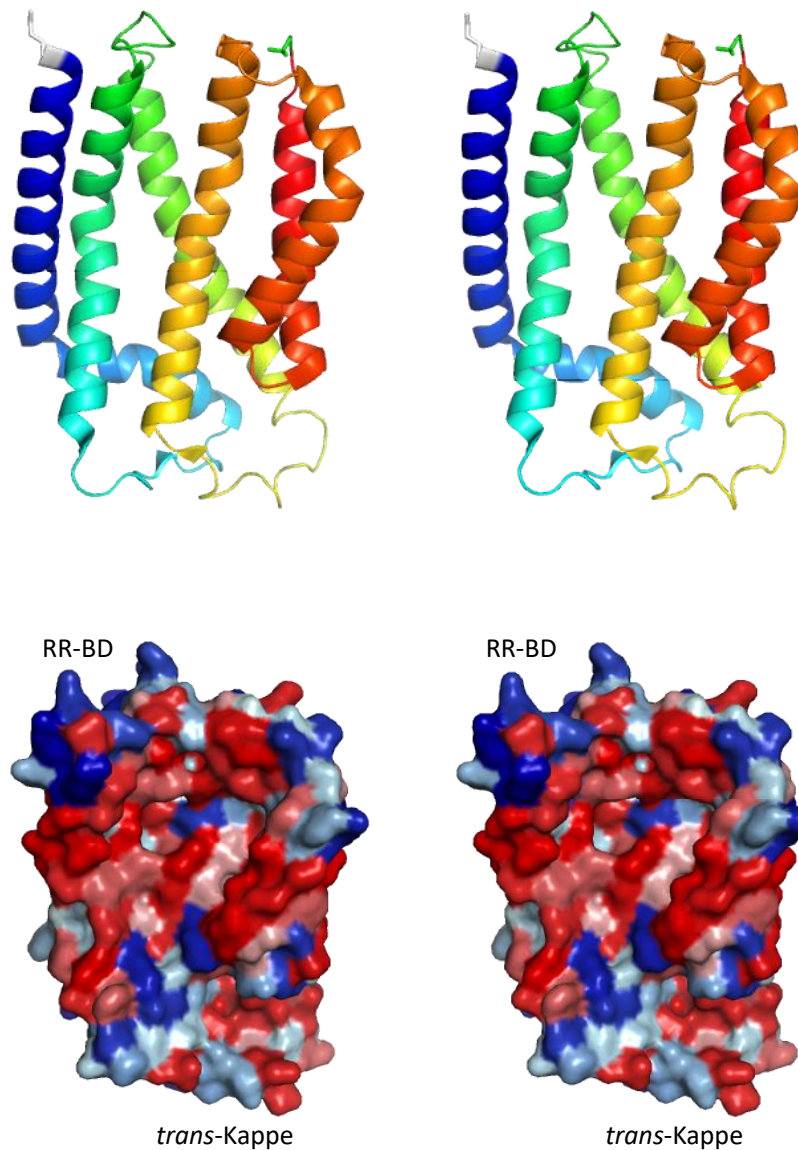
Abbildung A4: **Charakteristische unspezifische *Western Blotting*-Signale von (digitoninsolubilierten) Thylakoiden.** Thylakoide wurden digitoninsolubiliert für BN-PAGE oder unbehandelt für SDS-PAGE eingesetzt. **A** BN-PAGE, dann *Western Blotting* der Proteine auf PVDF-Membran, dann ohne weitere Behandlung Detektionsreaktion *enhanced chemiluminescence* (ECL), siehe auch Methoden Abschnitt 3.4.8.2. **B** Analog zu A, aber Analyse mit SDS-PAGE. Links sind die Massen des *PageRuler Prestained Protein Ladder*-Größenstandards notiert. **C**: Gel nach SDS-PAGE gewaschen und direkt für ECL eingesetzt (siehe auch Methoden Abschnitt 3.4.8.2).



Dieser katalysiert, wie auch das bei der *enhanced chemiluminescence*-Detektion genutzte Enzym Meerrettichperoxidase, die Reaktion von  $H_2O_2$  mit Luminol (Feissner et al., 2003). Abb. A4 B und C zeigen *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Signale von Thylakoidproben nach SDS-PAGE, die wie bei Abb. A4 A ohne Behandlung mit Antikörpern oder sogar ohne Transfer der Proteine auf eine Membran auftreten. Hierbei könnte es sich um Cytochrom  $b_6$  und f handeln.

Zusammengefasst führt die Anwesenheit von  $H_2O_2$  im Blockierungsschritt vermutlich zur Inaktivierung des Häm-Cofaktors der Cytochrome, was erklären würde, wieso die Behandlung von *Western*-Membranen zur Unterdrückung des Signals führt.

## Anhang Abschnitt 2 - Bildteil



**Abbildung A5: Stereoskopische Darstellung von TatC.** Darstellung von *Aquifex aeolicus* TatC mit Sicht in die TatC-Grube nach Daten von Rollauer et al. (2012), PDB Eintrag 4B4A. Oben ist das Molekül in als Bändermodell zur Hervorhebung der Transmembranhelices gezeigt. Der N-Terminus ist hier weiß, der C-Terminus grün hervorgehoben. Unten ist die Oberfläche des Proteins dargestellt. Nach der Hydrophobizitätsskala von Kyte & Doolittle (1982) sind dabei sehr hydrophobe Aminosäurereste rot und sehr hydrophile Reste blau gefärbt. Die ungefähre Position der Regionen RR-Bindedomäne (RR-BD) und *trans*-Kappe sind bezeichnet. Die Membran ist nicht dargestellt Die Bilder wurden mithilfe des Programmes PyMol erstellt (Schrödinger LLC, 2015) und sind zur stereoskopischen Betrachtung in Parallelsicht vorgesehen. Für weitere Details siehe Abb. N4.



pET-30a-c(+) Vectors

TB095 12/98

	Cat. No.
pET-30a DNA	69909-3
pET-30b DNA	69910-3
pET-30c DNA	69911-3

The pET-30a-c(+) vectors carry an N-terminal His•Tag<sup>®</sup>/thrombin/S•Tag<sup>™</sup>/enterokinase configuration plus an optional C-terminal His•Tag sequence. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

pET-30a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	419-435
T7 transcription start	418
His•Tag coding sequence	327-344
S•Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites	
( <i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-217
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	826-1905
pBR322 origin	3339
Kan coding sequence	4048-4860
f1 origin	4956-5411

The maps for pET-30b(+) and pET-30c(+) are the same as pET-30a(+) (shown) with the following exceptions: pET-30b(+) is a 5421bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-30c(+) is a 5423bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*H I at 198.

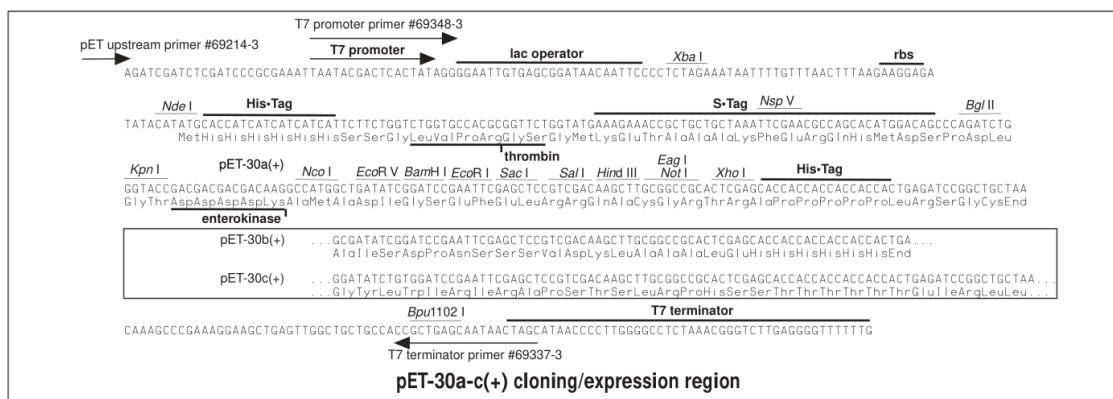
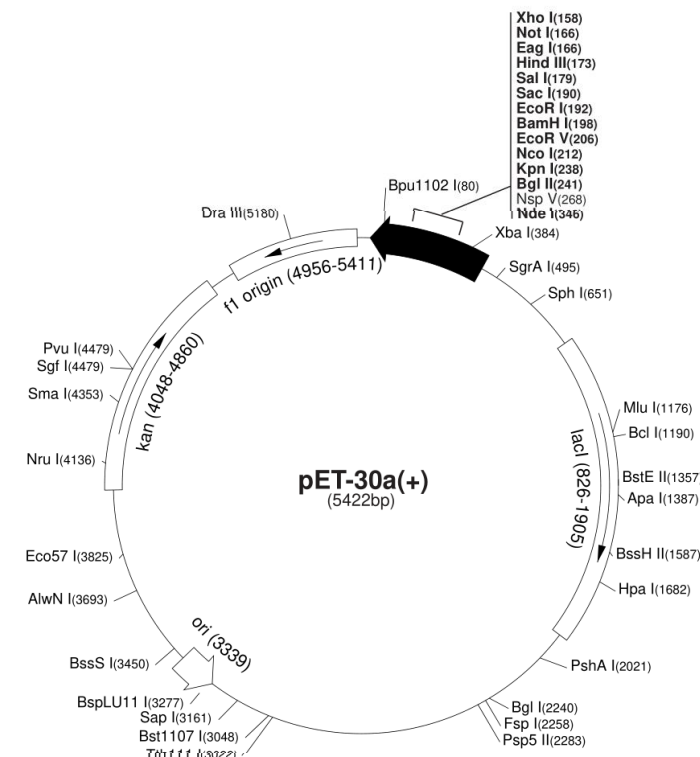
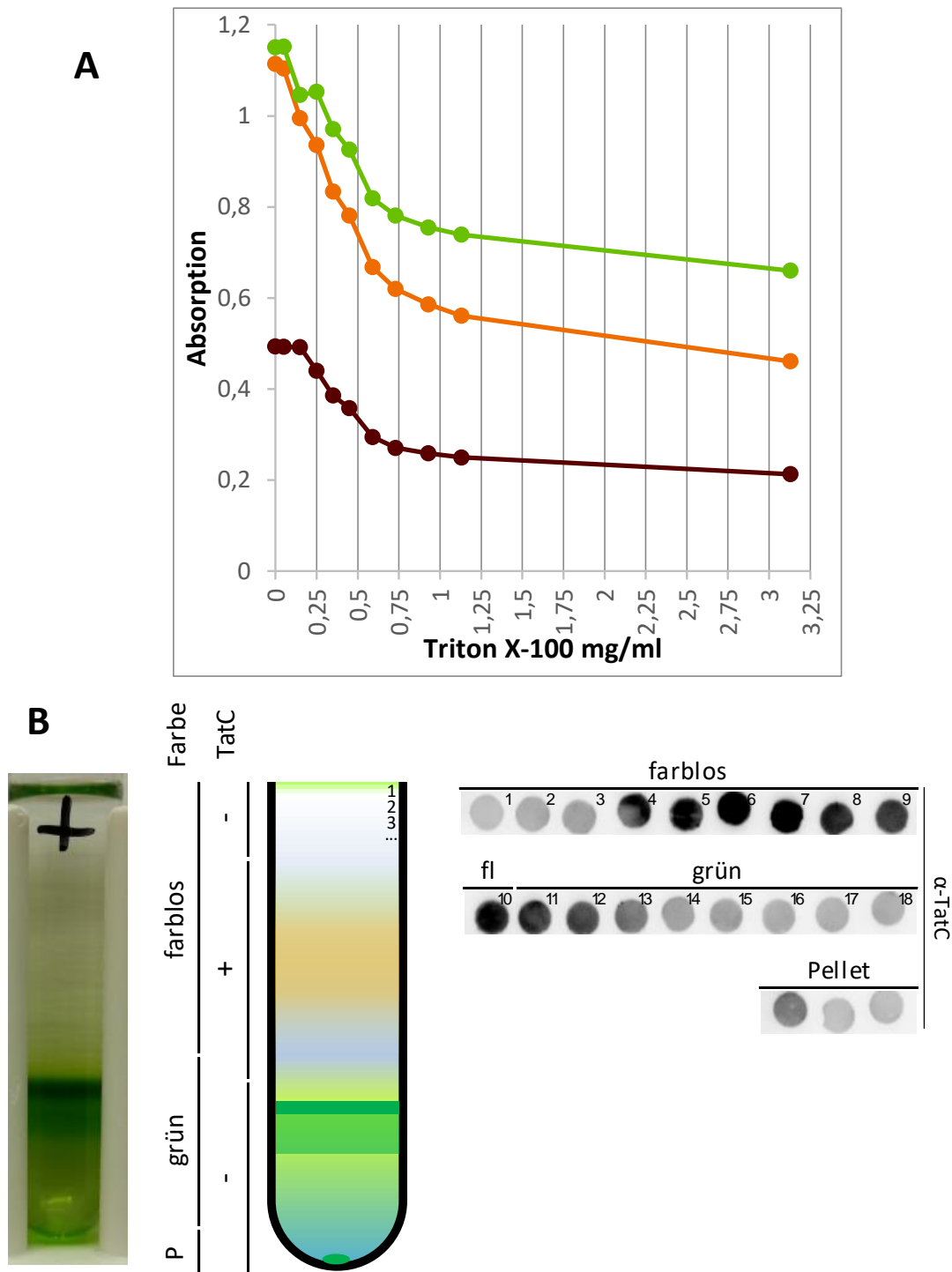
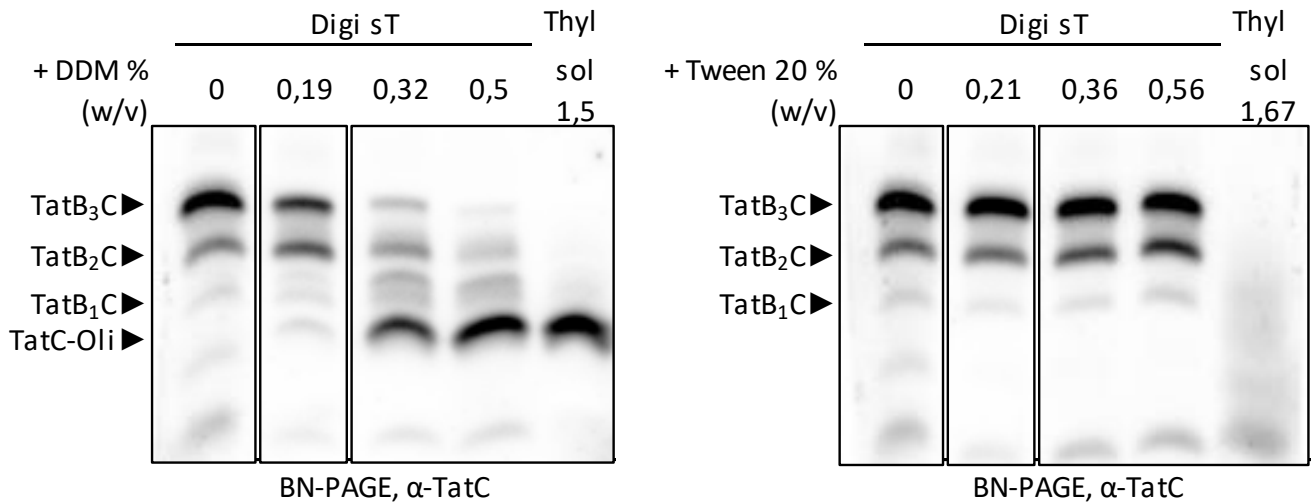


Abbildung A6: Vektorkarte und Eigenschaften des Plasmids pET30a (+).  
 Nach <http://www.synthesisgene.com/vector/pET-30a.pdf>.

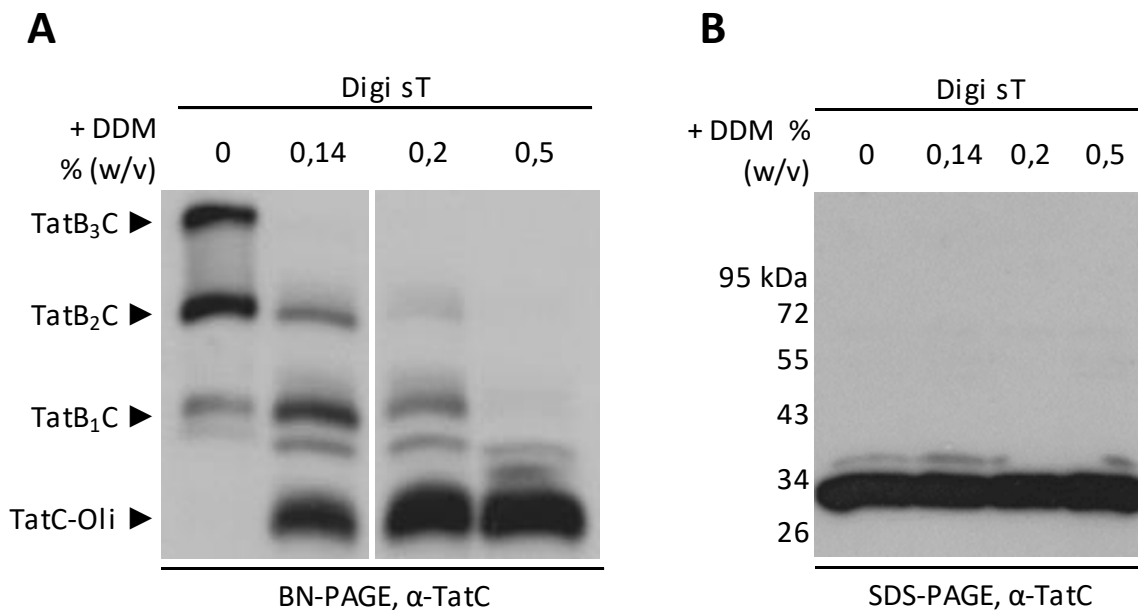


**Abbildung A7: Zur Rekonstitution von TatBC-Komplexen in Thylakoidvesikel.** **A** Destabilisierung von ultraschallbehandelten Thylakoidvesikeln. Abhängigkeit der photometrischen Absorption (560, 700 und 850 nm) einer Probe mit 5 ml Thylakoidvesikeln (50 µg/ml Chlorophyll, siehe auch Methoden Abschnitt 3.5.2) von der TX-100 Konzentration bei ca. 25 °C. Für weitere Details siehe Abb. E26 A.

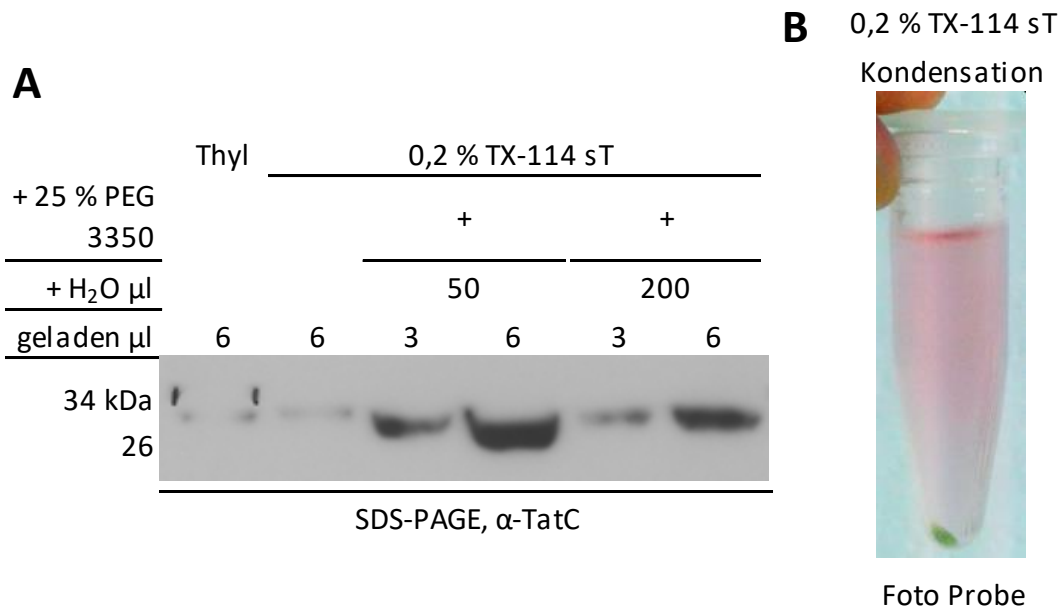
**B Versuch der Gradientenrekonstitution von angereicherten TatBC-Komplexen in Thylakoidvesikel** Angereicherte TatBC-Komplexe wurden für eine Gradientenrekonstitution eingesetzt (siehe Methoden Abschnitt 3.5.4). Saccharosegradient 20-65 % (w/v), Chlorophyll im Gradienten max. 50 µg/ml). **Links** dargestellt sind eine Fotografie und eine schematische Darstellung der Probe nach Rekonstitution. Beschriftung nach sichtbarer Zonierung mit (grün) oder ohne Thylakoidvesikel (farblos), bzw. Sediment (Pellet, P). Im Schema ist außerdem die ungefähre Position der TatC-positiven Fraktionen aus **B** orange markiert und an der Seite beschriftet. Für weitere Details siehe Abb. E27 **Rechts:** Die Gradientenrekonstitutionsprobe wurde von oben nach unten fraktioniert und auf Nitrocellulosemembran-Stücke getropft (siehe Methoden Abschnitt 3.4.7), getrocknet und eine Detektion mit α-TatC analog zum *Western Blotting* durchgeführt. Für weitere Details siehe Abb. E27 B.



**Abbildung A8:** Anders als DDM kann Tween 20 TatBC-Komplexe nicht solubilisieren und digitoninsolubilisierete TatBC-Komplexe nicht dissoziieren. Digitoninsolubilisierete Thylakoide (Digi sT) wurden mit unterschiedlichen Mengen von DDM oder Tween 20 versetzt und per BN-PAGE und *Western Blotting* gegen TatC analysiert. Außerdem wurden präparierte Thylakoide mit 1,5 % (w/v) DDM oder 1,67 % (w/v) Tween 20 solubilisiert (jeweils rechte Spur). Für weitere Details siehe Ergebnisse Abschnitt 4.2.

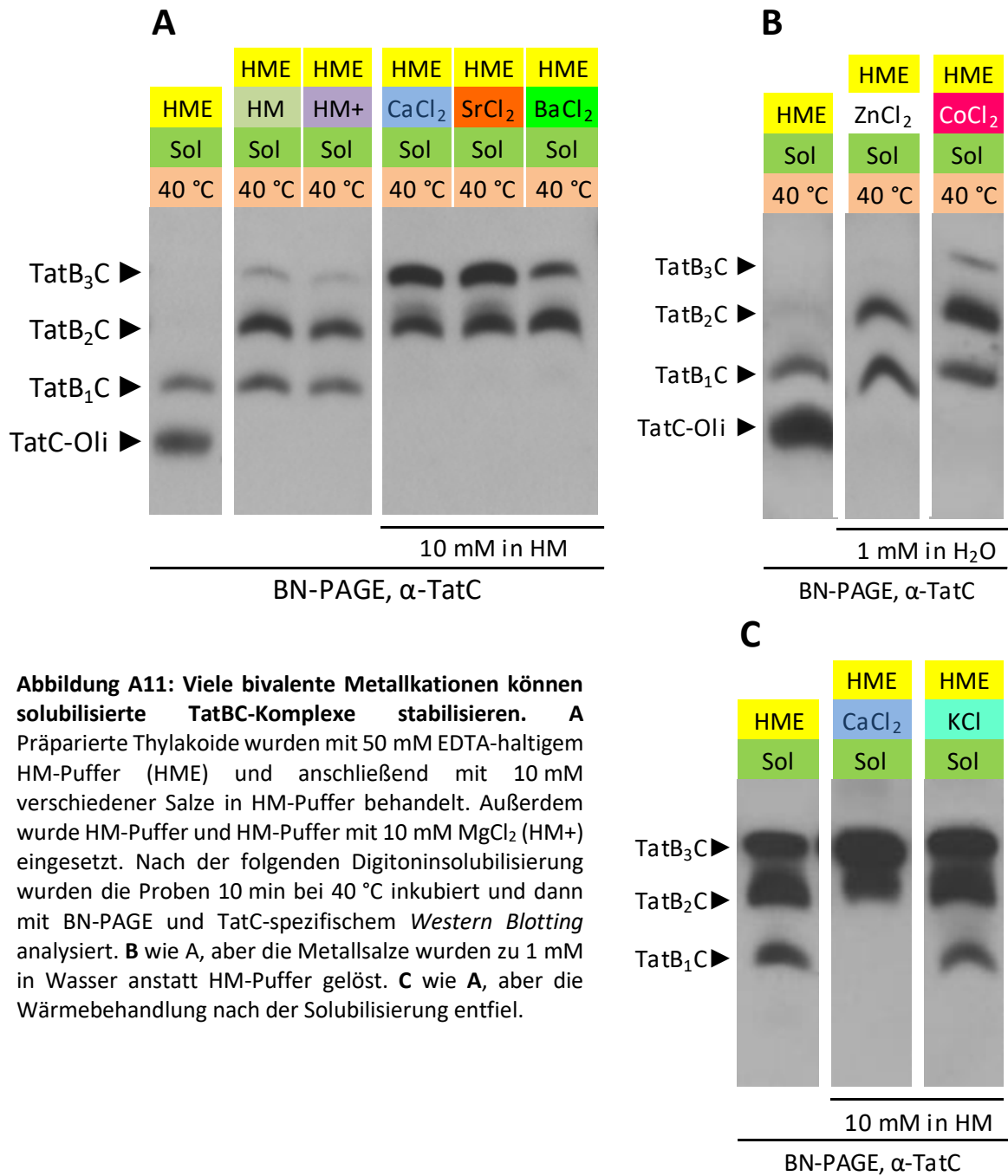


**Abbildung A9:** Die bei der Dissoziation von TatBC-Komplexen entstehenden kleineren Komplexe sind keine unlöslichen Aggregate. Digitoninsolubilisierete Thylakoide (Digi sT) wurden mit DDM versetzt und mit BN-PAGE (A) oder SDS-PAGE (B) und *Western Blotting* gegen TatC analysiert. Die Molekulargewichte des für die SDS-PAGE verwendeten Größenstandards *PageRuler Prestained Protein Ladder* sind links angegeben. Für weitere Details siehe Ergebnisse Abschnitt 4.2.

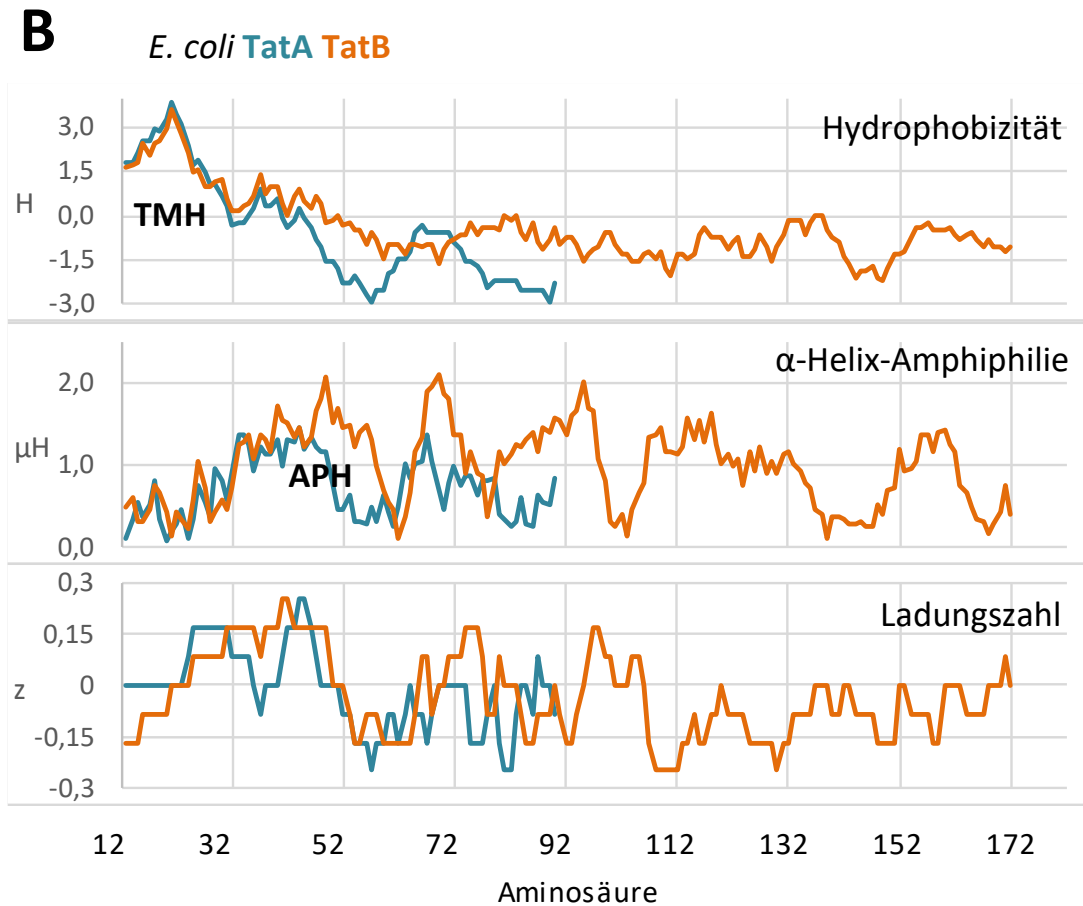


**Abbildung A10: Konzentrierung von Triton X-114 (TX-114) solubilisiertem thylakoidärem TatC durch Phasentrennung.** A Mit 0,2 % (w/v) TX-114 solubilierte Thylakoide (sT) wurden zu einer Endkonzentration von 25 % (w/v) mit einer Polyethylenglykol (PEG) 3350-Lösung vermischt. Dies hebt den *cloud point* der TX-114-Lösung stark an, so dass eine ausgeprägte Phasentrennung stattfindet. Die Proben wurden mit SDS-PAGE und *Western Blotting* zum Nachweis von TatC analysiert. Dafür eingesetzt wurden unsolubilierte Thylakoide (Thyl), sT ohne Zusatz von PEG und PEG-versetzte sT mit Lösung des Kondensats in 50 oder 200  $\mu$ l Wasser.

B Fotografie einer repräsentativen Probe zur *cloud point* Phasentrennung mit TX-114. Es handelt sich um eine Elutionsfraktion aus dem Versuch einer TatBC-Komplexanreicherung auf Basis von TX-114. Das Kondensat am Boden des Röhrchens enthält den Großteil der hydrophoben Proteine der gesamten Probe, so auch TatC. Die grünliche Färbung kommt von der Anwesenheit kontaminierender chlorophyllhaltiger Proteine. Der Überstand enthält nur wenig hydrophobe Proteine. Die rötliche Färbung durch das aus anderen Gründen enthaltene  $\text{CoCl}_2$  macht die Lösung besser sichtbar. Für weitere Details siehe Ergebnisse Abschnitt 4.3.1 „Triton X-100 und X-114“.



**Abbildung A11: Viele bivalente Metallkationen können solubilisierte TatBC-Komplexe stabilisieren.** **A** Präparierte Thylakoide wurden mit 50 mM EDTA-haltigem HM-Puffer (HME) und anschließend mit 10 mM verschiedener Salze in HM-Puffer behandelt. Außerdem wurde HM-Puffer und HM-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> (HM+) eingesetzt. Nach der folgenden Digitoninsolubilisierung wurden die Proben 10 min bei 40 °C inkubiert und dann mit BN-PAGE und TatC-spezifischem *Western Blotting* analysiert. **B** wie **A**, aber die Metallsalze wurden zu 1 mM in Wasser anstatt HM-Puffer gelöst. **C** wie **A**, aber die Wärmebehandlung nach der Solubilisierung entfiel.



**Abbildung A12: Eigenschaften von *E. coli* TatA und TatB.** Darstellung des gleitenden Durchschnitts der Hydrophobizität  $H$ , der Ladungszahl  $z$  und des  $\alpha$ -helikalen hydrophoben Moments  $\mu H$  als Maß der Amphiphilie nach Eisenberg et al., 1982 (jeweils Fensterbreite 12) von Erbsen-TatA und TatB. Hydrophathieskala nach Kyte & Doolittle, (1982). TMH - Transmembranhelix, APH - amphipathische Helix. Für weitere Details siehe Abb. N3.



Uniprot Protein IDs ( <i>Cicer arietinum</i> )	first name	Majority protein Ids (Uniprot)	Sequence coverage [%]	Unique + razor sequence coverage [%]	Unique sequence coverage [%]	Fraction average	Score	Intensity	iBAQ	MS/MS count	Only identified by site
<b>Spinacia_oleracea_tQCF</b>	tQTPCF	tQTP <sup>CF</sup>	85,8	85,8	85,8	6,28	323,31	5618700000	802670000	84	
A0A1S2XR64 (probable lysophospholipase BODYGUARD 4)	probable lysophospholipase BODYGUARD 4	A0A1S2XR64	3,9	3,9	3,9	6	-2	7299400000	347590000	2 +	
<b>Pisum_sativum_TatC_mature_delENK;Pisum_sativum_TatC_mature;A0A1S2XZJ2</b>	Ps TatC	Pisum_sativum_TatC_mature; A0A1S2XZJ2	7,7	7,7	7,7	9,57	13,919	363720000	33066000	7	
<b>Pisum_sativum_TatB_mature;A0A1S2XYK3</b>	Ps TatB	Pisum_sativum_TatB_mature; A0A1S2XYK3	19,4	19,4	19,4	8,5	33,119	151110000	13737000	9	
A0A1S2YE48 (photosystem I reaction center subunit N, chloroplastic)	photosystem I reaction center subunit N, chloroplastic	A0A1S2YE48	5,9	5,9	5,9	5	8,0285	62559000	8937000	1	
<b>A0A1S2YBQ2(photosystem II 22 kDa protein, chloroplastic)</b>	photosystem II 22 kDa protein, chloroplastic	A0A1S2YBQ2	11,9	11,9	11,9	8	21,993	96281000	8752800	5	
A0A1S2Z0J3 (AP-3 complex subunit delta [maybe clathrin associated])	AP-3 complex subunit delta [maybe clathrin associated]	A0A1S2Z0J3	2,1	2,1	2,1	6	7,8915	362480000	7249500	1	
A0A1S2XD12;REV__A0A1S2YV25 (photosystem I reaction center subunit III, chloroplastic)	photosystem I reaction center subunit III, chloroplastic	A0A1S2XD12	12,6	12,6	12,6	7,2	19,191	63723000	6372300	6	
B5LMR7(30S ribosomal protein S7, chloroplastic)	30S ribosomal protein S7, chloroplastic	B5LMR7	6,5	6,5	6,5	8	6,9603	45906000	5738200	1	
<b>A0A1S2Z6N3 (Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic);A0A1S2Z6N7</b>	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	A0A1S2Z6N3;A0A1S2Z6N7	7,1	7,1	7,1	8	19,719	44891000	5611300	6	
A0A1S2Z2L2(Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic)	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	A0A1S2Z2L2	6,7	6,7	6,7	8	15,195	51821000	5182100	1	
<b>A0A3Q7K7Y7(photosystem I reaction center subunit XI, chloroplastic)</b>	photosystem I reaction center subunit XI, chloroplastic	A0A3Q7K7Y7	9,8	9,8	9,8	7,5	15,814	27915000	3987800	2	
<b>A0A1S2YJD6(scarecrow-like protein 23)</b>	scarecrow-like protein 23	A0A1S2YJD6	2,9	2,9	2,9	7	8,9476	15797000	718040	1	
A0A1S2YRX0(LOW QUALITY PROTEIN: light-harvesting complex-like protein 3 isotype 2, chloroplastic)	LOW QUALITY PROTEIN: light-harvesting complex-like protein 3 isotype 2, chloroplastic	A0A1S2YRX0	3,9	3,9	3,9	9	7,2426	7853300	490830	1	
A0A3Q7XRA7(Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit chloroplastic, similar to ATH-PetC)	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit	A0A3Q7XRA7	17,8	17,8	17,8	8,5	11,541	3716400	412930	2	
<b>A0A3Q7YFX3 (uncharacterized protein LOC113787047 [maybe ATP-Synthase])</b>	uncharacterized protein LOC113787047 [maybe ATP-Synthase]	A0A3Q7YFX3	4,7	4,7	4,7	14,5	14,087	15144000	409300	2	
<b>A0A1S2XGU1(coatomer subunit zeta-3-like [retrograde vesicle transport golgi ER])</b>	coatomer subunit zeta-3-like [retrograde vesicle transport golgi ER]	A0A1S2XGU1	6,1	6,1	6,1	8	-2	2014100	402830	1 +	
A0A1S3E8T8 (actin-like);A0A1S2Y3F5;E5DCK1;B2YGW1;A0A1S3E926;A0A1S2XRW4;A0A1S2XNR4;A0A1S2XG V9;A0A1S2X9D4	actin-like	A0A1S3E8T8;A0A1S2Y3F5;E5DCK1;B2YGW1;A0A1S3E926;A0A1S2XRW4;A0A1S2XNR4;A0A1S2XG V9;A0A1S2X9D4	7,4	7,4	7,4	10,5	12,801	8017100	381770	2	
A0A1S2YR44(G patch domain-containing protein TGH)	G patch domain-containing protein TGH	A0A1S2YR44	1,2	1,2	1,2	11	6,5965	20015000	377650	2	
<b>A0A1S2YXG4 (uncharacterized, [2Fe2S cluster binding, Nitrite reductase NAD(P)H activity])</b>	uncharacterized, [2Fe2S cluster binding, Nitrite reductase NAD(P)H activity Psb33-like	A0A1S2YXG4	4,4	4,4	4,4	9	7,8344	5111100	300650	1	
<b>A0A1S2Z5E3(oxygen-evolving enhancer protein 3, chloroplastic-like)</b>	PsbQ, OEC16, oxygen-evolving enhancer protein 3, chloroplastic-like	A0A1S2Z5E3	8,9	8,9	8,9	7	6,7402	2980500	229270	1	
<b>A0A1S2Y0A5 (COBW domain-containing protein 1-like)</b>	COBW domain-containing protein 1-like	A0A1S2Y0A5	3,1	3,1	3,1	15	6,7947	4907400	223060	1	
<b>A0A1S2YL48;A0A3Q7XTQ6 (unknown GO: activation of protein kinase, mitotic spindle organization)</b>	unknown GO: activation of protein kinase, mitotic spindle organization	A0A1S2YL48;A0A3Q7XTQ6	2,5	2,5	2,5	7	-2	4493300	204240	0 +	
<b>A0A1S2XFW1(NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase)</b>	NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase	A0A1S2XFW1	3	3	3	12	7,0504	4625800	201120	0	
<b>A0A1S3E9E8;A0A1S2YHH8(K(+)) efflux antiporter 3, chloroplastic isoform X2)</b>	K(+) efflux antiporter 3, chloroplastic isoform X2	A0A1S3E9E8;A0A1S2YHH8	1,6	1,6	1,6	15	6,4282	1918600	59955	1	

**Abbildung A13: Details zur massenspektrometrischen Analyse der Probe „2E“ angereicherter TatBC-Komplexe.** Die Tabelle basiert auf dem Vergleich der Messdaten mit einer Proteomdatenbank von Kichererbse (*Cicer arietinum*) sowie den Aminosäuresequenzen von tQTP<sup>CF</sup>, Erbsen-TatA, TatB und TatC. Für Erklärungen siehe Ergebnisse Abschnitt 4.6.2, Text zu Abb. E23-25 und besonders Abb. E24.

## Publikationsliste

Herzberg, M., Schütttau, M., Reimers, M., Große, C., Schlegel, H.-G., Nies, D. H. (2015). Synthesis of nickel-iron hydrogenase in *Cupriavidus metallidurans* is controlled by metal-dependent silencing and un-silencing of genomic island. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 7(4), 632-649. <https://doi.org/10.1039/c4mt00297k>

Reimers, M., Jakob, M., Stoppe, S., Klösgen, R. B. (in Vorbereitung). Dissociation of thylakoidal TatBC receptor complexes reveals a scaffolding TatC oligomer.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Matthias Reimers  
Geburtsdatum: 01.06.1991  
Geburtsort: Wolfen  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Ausbildung:

seit Oktober 2020 Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg:  
Bioinformatik Master (120 LP)

seit Januar 2016 Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg:  
„Charakterisierung thylakoidärer TatBC-Rezeptorkomplexe“  
Institut für Biologie, Abteilung Allgemeine Botanik  
Betreuer: Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen

Oktober 2013 -  
Dezember 2015 Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg:  
Biologie Master (120 LP), molekularbiologische Ausrichtung,  
insbesondere Pflanzen und Prokaryoten.  
Abschlussarbeit: „Isolierung thylakoidärer Tat-  
Translokasekomplexe aus *Pisum sativum*“  
Abteilung Allgemeine Botanik  
Betreuer: Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen

Oktober 2010 -  
September 2013 Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg:  
Biologie Bachelor (180LP)  
Abschlussarbeit: „Autotrophes Wachstum von *Cupriavidus*  
*metallidurans*“  
Abteilung Molekulare Mikrobiologie  
Betreuer: Prof. Dr. Dietrich Heinrich Nies

Januar 2010 -  
September 2010 Zivildienst im Amt für Umwelt- und Naturschutz  
Dessau-Roßlau

Juni 2009 Schulabschluss: Abitur am Gymnasium „Walter Gropius“  
Dessau-Roßlau

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Matthias Reimers

Halle (Saale),