

**Untersuchung der für einen Tat-Transport in
Escherichia coli erforderlichen Substrateigenschaften**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Silke Richter
geb. am 09.04.1975 in Suhl

Gutachter:

PD Dr. Thomas Brüser

Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen

Prof. Dr. Roland Freudl

verteidigt in Halle (Saale) am 30.03.2009

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Proteintranslokation in Gram-negativen Bakterien	1
1.2 Der Sec-Transport in <i>E. coli</i>	3
1.2.1 Posttranslationaler Sec-abhängiger Transport	3
1.2.2 Cotranslationaler Sec-abhängiger Transport	5
1.3 Der Tat-Transport in <i>E. coli</i>	5
1.3.1 Tat-Signalpeptide.....	7
1.3.2 Die Komponenten des Tat-Systems	8
1.3.3 Strukturelle Organisation der Tat-Translokase und Mechanismus der Translokation	9
1.4 Qualitätskontrolle der Faltung von Tat-Substraten	11
1.5 Zielsetzung.....	12
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Bakterienstämme und Plasmide	13
2.2 Kultivierungsbedingungen.....	20
2.2.1 Nährmedien und Zusätze	20
2.2.2 Anzucht und Zellernte.....	21
2.2.3 Stammhaltung	22
2.3 Molekulargenetische Arbeiten.....	22
2.3.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	22
2.3.2 Miniplasmidpräparation	22
2.3.3 DNA-Gelelektrophorese	22
2.3.4 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	23
2.3.5 Reinigung und Konzentrierung von DNA	23
2.3.6 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	23
2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten	24
2.3.8 Transformation nach der CaCl ₂ -Methode	24
2.3.8.1 Herstellung von CaCl ₂ -kompetenten Zellen.....	24
2.3.8.2 Herstellung von superkompetenten Zellen nach Sambrook & Russell (2001).....	24
2.3.8.3 Transformation.....	25
2.3.9 PCR (Polymerasen-Kettenreaktion).....	25
2.3.9.1 Standard-PCR.....	25
2.3.9.2 <i>Quik-Change</i> TM <i>Site-Directed</i> -Mutagenese (Stratagene, La Jolla, USA).....	27
2.3.10 DNA-Sequenzierung	29
2.4 Proteinbiochemische Methoden	30
2.4.1 Proteinbestimmung nach Lowry	30
2.4.2 SDS-PAGE	31
2.4.3 Coomassie-Färbung von Proteingelen	32
2.4.4 Western-Blot.....	32
2.4.4.1 <i>Semi-Dry</i> -Blot.....	32
2.4.4.2 Proteinnachweis durch Immunodetektion	32
2.4.5 Fraktionierung von Periplasma, Membranen und Cytoplasma ohne Lysozym	34

2.4.6	Herstellung invertierter Vesikel	34
2.4.7	Fluoreszenz-Quenching.....	35
2.4.8	Präparation von HiPIP- <i>Inclusion Bodies</i>	35
2.4.9	Faltung und Rekonstitution von <i>precursor</i> -HiPIP (Brüser <i>et al.</i> , 2003)	36
2.4.10	Proteinreinigung über eine His-tag-Säule	37
2.4.11	Circulardichroismus (Aufnahme eines CD-Spektrums).....	37
2.4.12	<i>In vitro</i> -Targeting-Assay	38
2.4.13	<i>In vitro</i> -Protease-Assay	39
2.4.14	<i>Blue-Native</i> -Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE)	39
2.4.15	Pull-down	40
2.5	Versuche zum Zellwachstum	41
2.5.1	Wachstumsversuche in Flüssigmedien.....	41
2.5.2	SDS-Sensitivitätsmessung (Ize <i>et al.</i> , 2003).....	41
2.5.3	Wachstum auf TMAO	42
2.6	Enzymologische Methoden	42
2.6.1	PhoA-Aktivität (nach Brickman & Beckwith, 1975).....	42
2.6.2	Nachweis der TMAO-Reduktase in nativen Gelen (nach Silvestro <i>et al.</i> , 1989).....	42
2.7	Mikroskopische Techniken.....	43
2.7.1	Durchlichtmikroskopie	43
2.7.2	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	43
2.8	Geräte und Chemikalien.....	44
2.8.1	Geräte.....	44
2.8.2	Zentrifugen und Rotoren	45
2.8.3	Chemikalien und Enzyme.....	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	Tat-Transport von fehlgefalteten HIPIP-Derivaten.....	46
3.2	Tat-Transport mit ungefaltetem PhoA	49
3.2.1	Das HiPIP-Signalpeptid wird vom Sec-System erkannt.....	50
3.2.2	Einführung verschiedener <i>Sec-avoidance</i> -Motive in das HiPIP-Signalpeptid.....	51
3.2.3	Test der Beteiligung verschiedener Proteine an der Qualitätskontrolle der Faltung.....	54
3.2.4	Die Rolle von FtsH bei der Qualitätskontrolle der Faltung von Tat-Substraten	55
3.2.4.1	FtsH – eine Protease mit vielen verschiedenen Aufgaben.....	55
3.2.4.2	FtsH prozessiert das HiPIP-Signalpeptid bei blockiertem Transport.....	57
3.2.5	RR-PhoA übt einen cyto-statischen Effekt auf wachsende Kulturen aus	60
3.2.5.1	Konstitutive Expression	60
3.2.5.2	Induzierbare Expression	63
3.2.6	Reduzierung der Anzahl der Plasmidkopien als Antwort auf den cyto-statischen Effekt.....	66
3.2.7	Das Targeting von RR-PhoA zum Tat-Translokon schwächt den Protonengradienten über der Cytoplasmamembran	67
3.2.8	RR-PhoA blockiert nicht das Translokon	68
3.2.9	Direkter Nachweis der Interaktion zwischen RR-PhoA und dem Tat-System mittels BN- PAGE.....	72
3.3	Tat-Transport von ungefalteten FG-repeats aus Nsp1p	78
3.3.1	Das Nucleoporin Nsp1p als Teil des Kernporenkomplexes	78
3.3.2	Die FG-repeat-Domäne wird bis zu einer Größe von ca. 23 kDa Tat-abhängig transportiert	79
3.3.3	5 FG-repeats werden auch mit <i>E. coli</i> -Tat-Signalpeptiden transportiert.....	83

3.3.4	Exponierte hydrophobe Aminosäuren im maturen Protein verhindern den Tat-abhängigen Transport der FG-repeats-Domänen	84
3.3.4.1	Übertragung einer hydrophoben Aminosäuresequenz von PhoA in die FG-repeats	84
3.3.4.2	FG5 und FG5 Φ liegen unstrukturiert in der Zelle vor	86
3.3.4.3	Die exponierte hydrophobe Aminosäuresequenz blockiert den Transport und inhibiert das Zellwachstum	87
3.3.4.4	RR-FG5 Φ und RR-FG17 Φ führen nicht zu so einem starken Protonen-leakage an der Cytoplasmamembran wie RR-PhoA	88
3.3.4.5	Die Lage der hydrophoben Aminosäuresequenz NILLI scheint keinen Einfluss zu haben ...	89
3.3.4.6	Lokalisation der FG-repeats-Domänen in der Zelle	91
4	DISKUSSION	94
4.1	Das Signalpeptid von Tat-Substraten.....	94
4.1.1	Unterschiede zwischen Tat- und Sec-Signalpeptiden	94
4.1.2	Die n-Region von Tat-Signalpeptiden	96
4.1.3	Das Tat-unabhängige Membrantargeting von Tat-Substraten	97
4.2	Die Rolle von FtsH beim Tat-abhängigen Transport.....	98
4.3	Das Targeting von ungefalteten Substraten – Existiert eine generelle Qualitätskontrolle der Faltung von Tat-Substraten?	100
4.4	Der Tat-Transport von ungefalteten Substraten – Welche Eigenschaften der Substrate verhindern den Tat-Transport?.....	104
4.5	Der Mechanismus des Tat-Transportes – Ein-Schritt-Mechanismus oder Prozessiver Mechanismus?	107
4.6	Die Tat-Komplexe	109
4.7	Zusammenfassendes Modell des Tat-Transportes	111
4.8	Ausblick	113
5	ZUSAMMENFASSUNG	115
6	LITERATURVERZEICHNIS	116
7	ANHANG.....	130
	PUBLIKATIONSLISTE.....	130
	DANKSAGUNG.....	131
	ERKLÄRUNG	132
	LEBENSLAUF.....	133

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AK	Antikörper
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bidest.	doppelt destilliert (Reinstwasser)
BN	<i>Blue Native</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CD	Circulardichroismus
cfu	<i>colonie forming units</i>
Cm	Chloramphenicol
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
G	Guanin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
IB	<i>Inclusion Bodies</i>
IgG	Immunoglobulin G
INV	invertierte Membranvesikel
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
Km	Kanamycin
LB	Luria Bertani (Komplexmedium)
Ni-NTA	Ni ²⁺ -Nitrilotriessigsäure
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PMF	<i>proton motive force</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)

RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec-Weg	<i>general secretion pathway</i>
T	Thymin
Tat	<i>twin-arginine translocation</i>
Tc	Tetracyclin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMAO	Trimethylaminoxid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität / 1 U = 1 μ mol Substrat/min)
UV/Vis	ultraviolettes/sichtbares Licht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
XP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
Δ pH	Protonengradient
$\Delta\psi$	Membranpotential

HÄUFIG VERWANDTE PROTEINE, PROTEINKOMPLEXE UND KONSTRUKTE

AmiA	Murein-Amidase A (Tat-Substrat), Funktion bei der Zellteilung
AmiC	Murein-Amidase C (Tat-Substrat), Funktion bei der Zellteilung
CueO	Multikupfer-Oxidase (Tat-Substrat), Cu-Homöostase
DmsA	Untereinheit der DMSO-Reduktase (Tat-Substrat)
DmsD	spezifisches Chaperon mit Affinität zum DmsA-Signalpeptid
DnaK	cytoplasmatisches Chaperon
FdnG	Untereinheit der Formiat-Dehydrogenase-N (Tat-Substrat)
FdoG	Untereinheit der Formiat-Dehydrogenase-O (Tat-Substrat)
FtsH	membrangebundene Protease der AAA-Familie
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GroEL	cytoplasmatisches Chaperon
HiPIP	<i>High potential iron-sulfur protein</i> aus <i>Allochromatium vinosum</i> (Tat-Substrat)
HyaA	kleine Untereinheit der Hydrogenase-1 (Tat-Substrat)
HybO	kleine Untereinheit der Hydrogenase-2 (Tat-Substrat)
KK-FGn	Fusion aus HiPIP-Signalpeptid mit RR>KK-Austausch und n FG-repeats aus Nsp1p
KK-PhoA	Fusion aus HiPIP-Signalpeptid mit RR>KK-Austausch und maturem PhoA
LepB	Signalpeptidase (prozessiert Sec- und Tat-Signalpeptide)
NapA	Untereinheit der Nitrat-Reduktase (Tat-Substrat)
NapG	Untereinheit der Nitrat-Reduktase (Tat-Substrat)
NrfC	Untereinheit der Formiat-abhängigen Nitrit-Reduktase (Tat-Substrat)
Nsp1p	Nucleoporin (Protein des Kernporenkomplexes) aus Hefe
OE17	17 kDa-große Untereinheit des <i>oxygen-evolving complex</i> aus Thylakoiden (Erbse)
OE23/23K	23 kDa-große Untereinheit des <i>oxygen-evolving complex</i> aus Thylakoiden (Erbse)
OmpA	<i>Outer membrane protein A</i> (Sec-Substrat)
PhoA	Alkalische Phosphatase (Sec-Substrat)
RR-FGn	Fusion aus HiPIP-Signalpeptid und n FG-repeats aus Nsp1p

RR-PhoA	Fusion aus HiPIP-Signalpeptid und maturem PhoA
SecA	ATPase des Sec-Systems, Translokationsenergetisierung bei löslichen Proteinen
SecB	Chaperon des Sec-Systems bei Proteobakterien
SecYEG	Sec-Translokon
SlyD	Chaperon mit zusätzlicher Prolin-cis/trans-Isomerase-Aktivität, bindet an Tat-Signalpeptiden (Sly: <i>sensitivity to lysis</i>)
SufI	Tat-Substrat, wahrscheinlich an der Zellteilung beteiligt
TatABC	Tat-Translokon
TorA	TMAO-Reduktase (Tat-Substrat)
TorD	spezifisches Chaperon mit Affinität zum TorA-Signalpeptid
YcdB	Tat-Substrat mit unbekannter Funktion (Häm-Cofaktor, Peroxidaseaktivität)

EIN- UND DREI-BUCHSTABENCODE DER AMINOSÄUREN

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asp	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalain	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Iso	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1 EINLEITUNG

1.1 Proteintranslokation in Gram-negativen Bakterien

Die Translokation von Proteinen über Membranen ist ein essentieller Vorgang in allen Organismen. Etwa ein Drittel aller im Cytoplasma synthetisierten Proteine werden in andere Zell-kompartimente transportiert, in eukaryotischen Zellen z.B. in das Endoplasmatische Retikulum, den Zellkern, die Peroxisomen oder die verschiedenen Kompartimente in Mitochondrien und Plastiden. Aber auch Bakterienzellen sind durch Membranen in verschiedene Reaktionsräume geteilt. Gram-positive Bakterien besitzen nur eine Membran, die Cytoplasmamembran. Bei Gram-negativen Bakterien, wie *Escherichia coli*, ist das umgebende Medium durch eine weitere Membran, die Äußere Membran abgetrennt, so dass ein weiteres Kompartiment, das Peri-plasma, zwischen Cytoplasmamembran und Äußerer Membran existiert. Zielorte für zu transportierende cytoplasmatische Proteine sind somit: die Cytoplasmamembran, das Periplasma, die Äußere Membran und das extrazelluläre Medium. Prinzipiell benötigt man für einen Proteintransport - in oder über eine Membran - ein Translokon, welches ein zu transportierendes Protein erkennt, und Energie (z.B. ATP). Während des gesamten Transportprozesses muss sichergestellt sein, dass keine Solute die Membran unkontrolliert überqueren können.

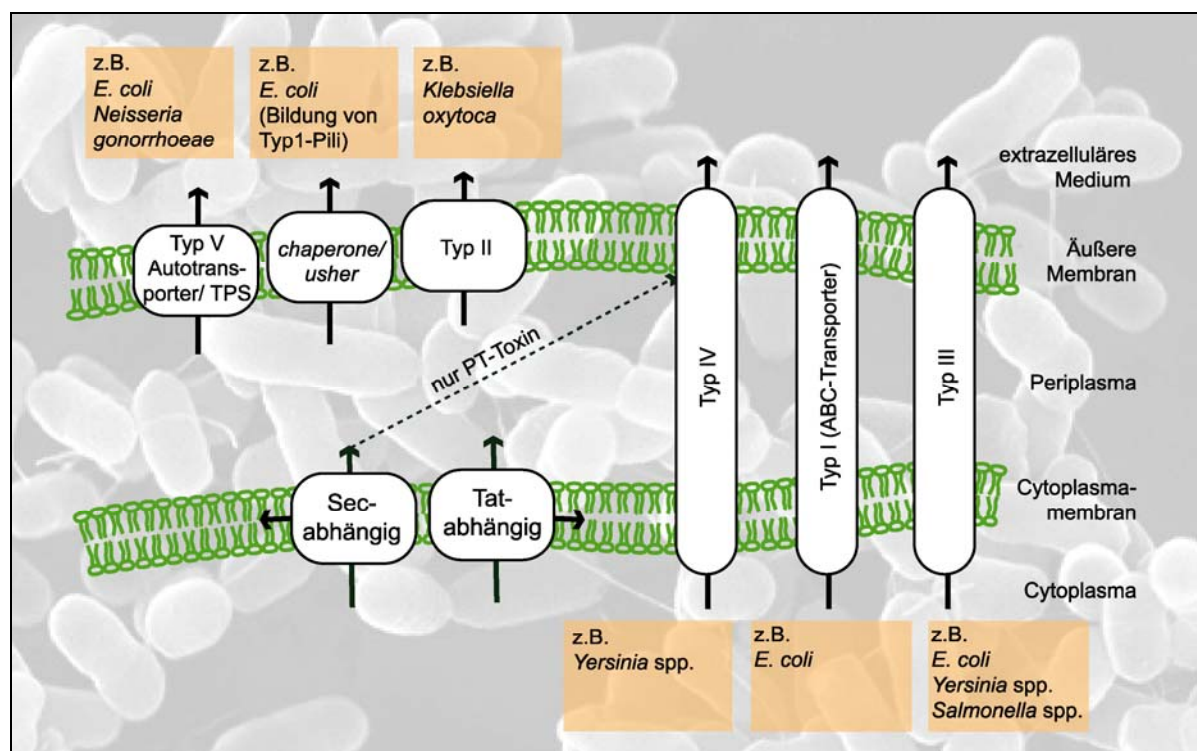


Abb. 1-1: Schematische Übersicht über die bekannten Proteintranslokationswege Gram-negativer Bakterien.

Die vielen bereits bekannten Protein-Transportwege Gram-negativer Bakterien (Abb. 1-1) lassen sich in drei Klassen zusammenfassen (Holland, 2004). Die Klasse 1 wird von den Transportwegen gebildet, die Proteine oder Proteindomänen über die Cytoplasmamembran translozieren. Dabei werden verschiedene Translokons genutzt: für ungefaltete Proteine SecYEG (Kap. 1.2) und für gefaltete Proteine TatABC (Kap. 1.3).

Zur Klasse 2 können die Transportwege zusammengefasst werden, die Proteine vom Periplasma ausgehend über die äußere Membran transportieren. Diese Klasse schließt einige sehr verschiedene Wege ein (Typ II, Typ V, *chaperone/usher*-Weg), deren Translokons aus nur einer Proteindomäne (Typ V) oder aus bis zu 16 unterschiedlichen Proteinen (Typ II) bestehen können (Holland, 2004).

Zu der Typ V-Translokation gehört der Autotransporter-Weg, bei dem der C-Terminus (β -Domäne) des Proteins eine Pore in der äußeren Membran bildet, durch die die zu transportierende Domäne die Membran überquert (Henderson *et al.*, 1998). Zu dieser Gruppe ist ebenfalls der *two-partner-secretion*-Weg (TPS) zu zählen, bei dem zum Transport außer dem Substrat ein einziges spezifisches *outer-membrane*-Transporterprotein der TpsB-Familie notwendig ist (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004).

Für den *chaperone/usher*-Weg, der für die Bildung von Typ 1-Pili verantwortlich ist, sind zwei Proteine notwendig. Das ist zum einen ein periplasmatisches Chaperon, welches das Substrat bindet und zum anderen ein Protein in der äußeren Membran, das *usher* genannt wird und den Kanal bildet (Thanassi & Hultgren, 2000).

Die Typ II-Translokation ist sehr eng mit der Biogenese von Typ 4-Pili verwandt. Extracytoplasmatische Enzyme und Toxine werden mittels eines Sekretions über die äußere Membran transportiert, welches aus 12 - 16 verschiedenen Proteinen, vor allem aus der Sekretin-Familie, besteht (Pugsley *et al.*, 1997).

Transportsysteme der Klasse 3 transportieren ungefaltete Proteine direkt vom Cytoplasma über beide Membranen in das umgebende Medium (Typ I, Typ III und in den meisten Fällen Typ IV). Zur Klasse 3 der Translokationswege gehören im Prinzip auch der Geißelapparat (Transport der Flagellinproteine) und die Freisetzung filamentöser Bakteriophagen, wobei bei letzterem gefaltete Proteine transportiert werden (Holland, 2004).

Bei der Typ I-Translokation, die bei vielen Gram-negativen Bakterien zu finden ist, erfolgt der Transport von Proteasen, Lipasen und Toxinen mit Hilfe eines ABC-Transporters (*ATP-binding cassette*) in der Cytoplasmamembran. Aus dem ABC-Transporter, einem *membrane fusion protein* (MFP) und einem *outer membrane protein* (OMP) wird ein Transportsystem gebildet, das ATP-abhängig Proteine direkt über beide Membranen transportiert (Thanassi & Hultgren, 2000).

Einige Gram-negative pflanzen- und tierpathogene Bakterien (z.B. *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* spp., *Rhizobium* spp.) haben ein Typ III-Translokationssystem entwickelt, welches evolutionär mit dem Geißel-Apparat verwandt ist. Hierbei durchspannt ein sogenannter Nadel-

Komplex, welcher im Aufbau an den Basalkörper der Bakteriengeißel erinnert, gleichzeitig die Cytoplasmamembran und die Äußere Membran, und es werden je nach Bakterium unterschiedliche Effektor-Proteine direkt vom Cytoplasma in die Wirtszelle oder das umgebende Medium sekretiert (Müller *et al.*, 2008). Die codierenden Gene für diese Effektor-Proteine (z.B. Virulenzfaktoren) finden sich im Chromosom oft auf sogenannten „Pathogenitäts-Inseln“ oder auf Plasmiden (Saier, 2006).

Die Typ IV-Sekretion ist homolog zu den bakteriellen Konjugationssystemen IncP und IncN und dem VirB-System von *Agrobacterium tumefaciens*, welches onkogene T-DNA in Pflanzenzellen überträgt (Holland, 2004). Mittels dieses Transportsystems werden Proteine und Protein-DNA-Komplexe direkt in andere Bakterien, Hefen, Pflanzen oder ins umgebende Medium transloziert (Saier, 2006). Der Aufbau des Translokons ist weitgehend ungeklärt. Das hexamere D4-Protein erkennt die Substrate und soll auch eine direkte Funktion beim Transport über die Cytoplasmamembran haben. Das eigentliche Translokons (*mating pore*) besteht aus 11 Proteinen (Holland, 2004). Eine Ausnahme bildet der Transport des Pertussis-Toxins aus *Bordetella pertussis* (Erreger des Keuchhustens). Das PT-Toxin wird Sec-abhängig ins Periplasma transportiert und erreicht dann über das Typ IV-Translokons der äußeren Membran den extrazellulären Raum (Holland, 2004).

1.2 Der Sec-Transport in *E. coli*

Alle bisher entdeckten lebenden Organismen besitzen einen *general secretion pathway*, das Sec-System (Saier, 2006). Ca. 10% der in *E. coli* synthetisierten Proteine werden in oder über die Cytoplasmamembran transportiert (<http://www.cf.ac.uk:80/biosi/staffinfo/ehrmann/tools/ecce/ecce.htm>). Die meisten dieser Proteine verlassen das Cytoplasma über den Sec-Weg.

Die Substrate für den Sec-Transport werden im Cytoplasma als *precursor* (Vorläufer-Protein) mit einem N-terminalen Signalpeptid mit einer Länge von zumeist 18 - 30 Aminosäuren synthetisiert. Das Signalpeptid ist notwendig für das Targeting des Substrats zum Translokons und wird meist während oder nach der Translokation entfernt. Die Sec-Signalpeptide unterschiedlicher Proteine zeigen keine konservierten Motive, enthalten aber immer eine kurze positiv geladene N-terminale Region (n-Region), gefolgt von einer hydrophoben Region (h-Region) und einer meist leicht polaren Erkennungsregion für die Signalpeptidase LepB (c-Region) (von Heijne, 1998; Cristóbal *et al.*, 1999).

1.2.1 Posttranslationaler Sec-abhängiger Transport

Der posttranslationale Sec-abhängige Transport (Abb. 1-2) erfolgt nach der vollständigen Entlassung des *precursors* ins Cytoplasma. Dabei wird eine Faltung des Proteins durch die Bindung des homotetrameren Chaperons SecB und anderen Chaperonen, wie GroEL und DnaK,

verhindert. SecB ist durch seine Fähigkeit zur Interaktion mit SecA auch verantwortlich für die Vermittlung der Interaktion zwischen *precursor* und Translokon (Pugsley, 1993; Hartl *et al.*, 1990).

Das Sec-Translokon besteht aus den Membranproteinen SecY, SecE und SecG, welche die Pore bilden, und einem Homodimer aus dem damit assoziierten Protein SecA (Pugsley, 1993). SecA ist eine ATPase mit einer hohen Affinität zu SecY (Hendrick & Wickner, 1991). Der SecB-*precursor*-Komplex bindet an SecA, welches sowohl membrangebunden (über eine Interaktion mit SecY), als auch löslich im Cytoplasma vorliegen kann (Cabelli *et al.*, 1991). Durch die Interaktion des Signalpeptids mit SecA wird der *precursor* an SecA übergeben (Fekkes *et al.*, 1997). SecB wird von diesem Komplex entlassen, sobald SecA durch ATP-Bindung die Translokation initiiert. Die Hydrolyse von ATP ist an die stückweise Translokation des Proteins durch die Pore gekoppelt (Hunt *et al.*, 2002).

Die Membranproteine SecD, SecF und YajC sind in eine effiziente Translokation involviert, aber nicht essentiell. Diese Proteine bilden einen heterotrimeren Komplex und stehen in Interaktion mit SecYEG (Duong & Wickner, 1997a). Die genaue Funktion des SecDFYajC-Komplexes ist bisher nicht bekannt. Es wird vermutet, dass er an der Regulation der katalytischen Aktivität von SecA (Duong & Wickner, 1997b) und an der Entlassung von Proteinen in die Membran beteiligt ist (Arkowitz & Wickner, 1994). Er spielt aber keine Rolle bei der Erhaltung der protonenmotorischen Kraft (Nouwen *et al.*, 2001).

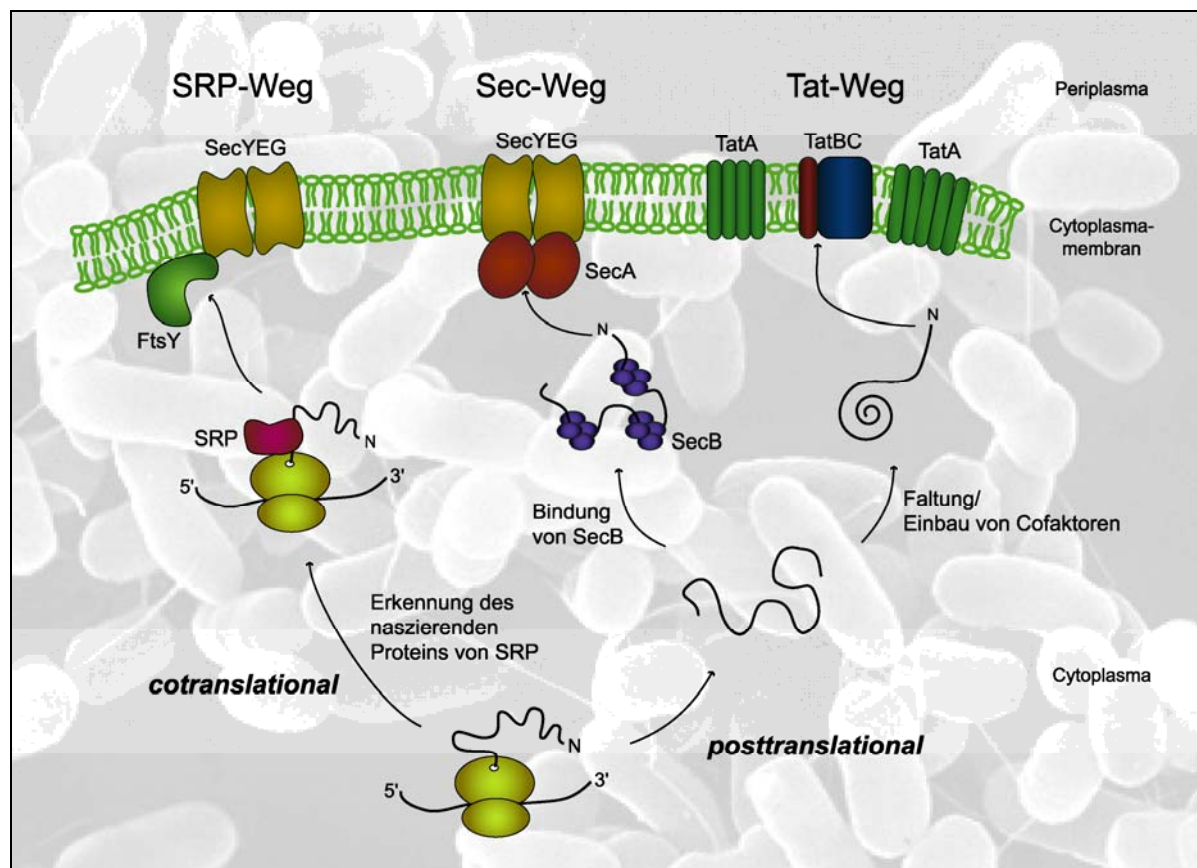


Abb. 1-2: Schematische Darstellung der Proteintranslokationswege in der Cytoplasmamembran von *E. coli*

1.2.2 Cotranslationaler Sec-abhängiger Transport

Integrale Membranproteine werden in der Regel cotranslational transportiert (Müller *et al.*, 2001) (Abb. 1-2). Nachdem etwa 70 Aminosäuren des *precursors* translatiert wurden, ragt der N-Terminus des naszierenden Proteins aus dem Ribosom heraus, und das Signalpeptid wird von einem Signal-Erkennungspartikel (SRP) erkannt. Das *E. coli*-SRP besteht aus einer 48 kDa großen GTPase (Ffh) und einer 4.5S RNA (*ffs*) (Herskovits *et al.*, 2000). Als SRP-Rezeptor fungiert FtsY, eine lösliche GTPase, die auch mit der Oberfläche der Cytoplasmamembran interagieren kann. Durch die Bindung von GTP wird der Translationsapparat an das SecYEG-Translokon übergeben und das Protein wird während der weiteren Translation durch die Pore transportiert. Durch die Hydrolyse von GTP wird die Interaktion zwischen FtsY und SRP wieder aufgehoben. Eine wichtige Rolle bei der Integration der hydrophoben Segmente in die Cytoplasmamembran scheint das Membranprotein YidC zu spielen (Beck *et al.*, 2001).

Für den Transport einiger Membranproteine ist auch SecA essentiell. Wenn sehr lange hydrophile Domänen (ab 60 Aminosäuren) auf die periplasmatische Seite der Cytoplasmamembran transportiert werden müssen, ist das Mitwirken von SecA unter der Hydrolyse von ATP notwendig (Dalbey & Chen, 2004).

Die Entscheidung zwischen co- und posttranslationalem Targeting erfolgt anhand des Signalpeptids. SRP bindet an langen hydrophoben Signalsequenzen (Lee & Bernstein, 2001). Die Erkennung von weniger hydrophoben Signalsequenzen durch SRP wird durch das Ribosom-assoziierte Chaperon *trigger*-Faktor verhindert (Beck *et al.*, 2000). Adams *et al.* (2002) zeigten aber, dass nicht nur die Hydrophobizität des Signalpeptids entscheidend ist, sondern auch die Sekundärstruktur, vor allem der Hang zur Bildung von Helices.

1.3 Der Tat-Transport in *E. coli*

Die meisten Bakterien besitzen ein zweites System für den posttranslationalen Transport von Proteinen über die Cytoplasmamembran (Abb. 1-2). Dieser Weg ist unabhängig von Sec-Komponenten (Berks, 1996; Weiner *et al.*, 1998) und wurde nach dem essentiellen RR-Motiv in den Signalpeptiden Tat-Weg (für *twin-arginine translocation*) genannt (Sargent *et al.*, 1998). Das bakterielle Tat-System entspricht in Struktur und Mechanismus zu großen Teilen dem Δ pH-Weg pflanzlicher Chloroplasten zum Import von Proteinen aus dem Stroma in das Lumen der Thylakoide (Settles *et al.*, 1997; Mori & Cline, 1998; Wexler *et al.*, 1998), welcher daher nun auch Tat-Weg genannt wird.

Der bedeutendste Unterschied der Tat-Translokase zur Sec-Translokase ist, dass das Tat-System gefaltete Substrate, zum Teil mit gebundenem Cofaktor, transportiert. Bisher wurde der Tat-abhängige Transport für 27 vorhergesagte *E. coli* Tat-Substrate experimentell bestätigt (Tullman-Ercek *et al.*, 2007). Viele der Tat-Substrate enthalten einen Redox-Cofaktor. Die

meisten dieser Redox-Proteine üben wichtige Funktionen in der Atmungskette aus. *E. coli* ist sehr flexibel in seinen Elektronentransportprozessen und kann in anaeroben Atmungen z.B. TMAO oder DMSO als terminalen Elektronenakzeptor und Formiat oder Wasserstoff als Elektronendonator nutzen. Für diese vier beispielhaft genannten Redoxreaktionen sind komplexe Cofaktor-enhaltende Enzyme (TMAO-Reduktase, DMSO-Reduktase, Formiat-Dehydrogenase N/O, Hydrogenase 1/2) auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran notwendig (Jack *et al.*, 2004), wobei die Cofaktorassemblierung und die korrekte Faltung der Enzyme oder der Enzym-Untereinheiten nur im Cytoplasma erfolgen kann. Somit können diese nur im gefalteten Zustand mit Hilfe des Tat-Systems über die Cytoplasmamembran transportiert werden. Gründe für den Tat-abhängigen Transport bei Proteinen ohne Cofaktor (z.B. AmiA und AmiC) könnten sein, dass diese zu schnell und zu fest falten, um vom Sec-System transportiert werden zu können oder dass cytoplasmatische Faktoren für die Faltung notwendig sind (Berks *et al.*, 2000a). Die Größe von Tat-Substraten, vor allem deren Durchmesser im gefalteten Zustand, ist sehr unterschiedlich. Der größte bekannte Proteinkomplex, der Tat-abhängig in *E. coli* transportiert wird, sind die assemblierten FdnGH-Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenase N mit einer Größe von 142 kDa und einem geschätzten Durchmesser von 70 Å (Berks *et al.*, 2000a). Das kleinste etablierte bakterielle Tat-Substrat ist HiPIP aus *Allochromatium vinosum* (9 kDa) mit einem Durchmesser von 20 Å (Berks *et al.*, 2000a).

Ein weiterer Unterschied zum Sec-System ist, dass für den Transport des Substrates über die Membran kein ATP benötigt wird. Die Tat-Translokase bezieht ihre Energie allein aus der protonenmotorischen Kraft (PMF - *proton motive force*). Diese setzt sich zusammen aus dem Membranpotential ($\Delta\psi$) und dem Protonengradienten (ΔpH) über der Membran. Aus den ersten Studien an Thylakoiden schlussfolgerte man, dass der Tat-Transport alleine vom ΔpH getrieben wird (Mould & Robinson, 1991; Cline *et al.*, 1992; Brock *et al.*, 1995). In späteren Arbeiten zeigte sich, dass der ΔpH nicht zwingend notwendig ist (Finazzi *et al.*, 2003) und dass der Tat-Transport in Thylakoiden auch $\Delta\psi$ -abhängig erfolgen kann (Braun *et al.*, 2007). Bageshwar & Musser (2007) konnten mittels *in vitro*-Transportstudien an invertierten Membranvesikeln nachweisen, dass der Tat-Transport in *E. coli* zu großen Teilen, wenn nicht sogar ausschließlich, $\Delta\psi$ -abhängig erfolgt. Die Autoren fanden keinen Hinweis darauf, dass die *E. coli* Tat-Translokase Energie aus dem ΔpH bezieht.

Hatzixanthis *et al.* (2003) zeigten, dass das Tat-System auch an der Biogenese von integralen Membranproteinen beteiligt ist. Die Autoren fanden fünf *E. coli* Proteine mit C-terminalen Transmembranhelices, deren Integration in die Cytoplasmamembran Tat-abhängig und YidC-unabhängig erfolgte.

1.3.1 Tat-Signalpeptide

Tat-Substrate werden genauso wie Sec-Substrate als *precursor* mit einem N-terminalen Signalpeptid synthetisiert und weisen dieselbe Aufteilung in n-, h- und c-Region auf (Abb. 1-3). Es gibt aber doch bedeutende Unterschiede. Tat-Signalpeptide sind im Durchschnitt um 14 Aminosäuren länger, was vor allem auf eine längere n-Region zurückzuführen ist (Cristóbal et al., 1999). Man findet eine konservierte Sequenz (S-R-R-X-F-L-K) in der n-Region (Berks, 1996) (Abb. 1-3), in welcher das RR-Motiv (mit wenigen Ausnahmen, die nicht aus *E. coli* stammen) invariabel ist. In mehreren Untersuchungen wurde gezeigt, dass dieses RR-Motiv notwendig für ein Targeting zum Tat-System ist (Halbig et al., 1999a; Cristóbal et al., 1999; Gross et al., 1999; Alami et al., 2002; Brüser et al., 2003). Ein Austausch der Arginine zu anderen positiv geladenen Aminosäuren (z.B. Lysin) verhindert mit hoher Effizienz den Tat-Transport. Andererseits kann alleine durch ein RR-Motiv nicht auf ein Tat-Substrat geschlossen werden.

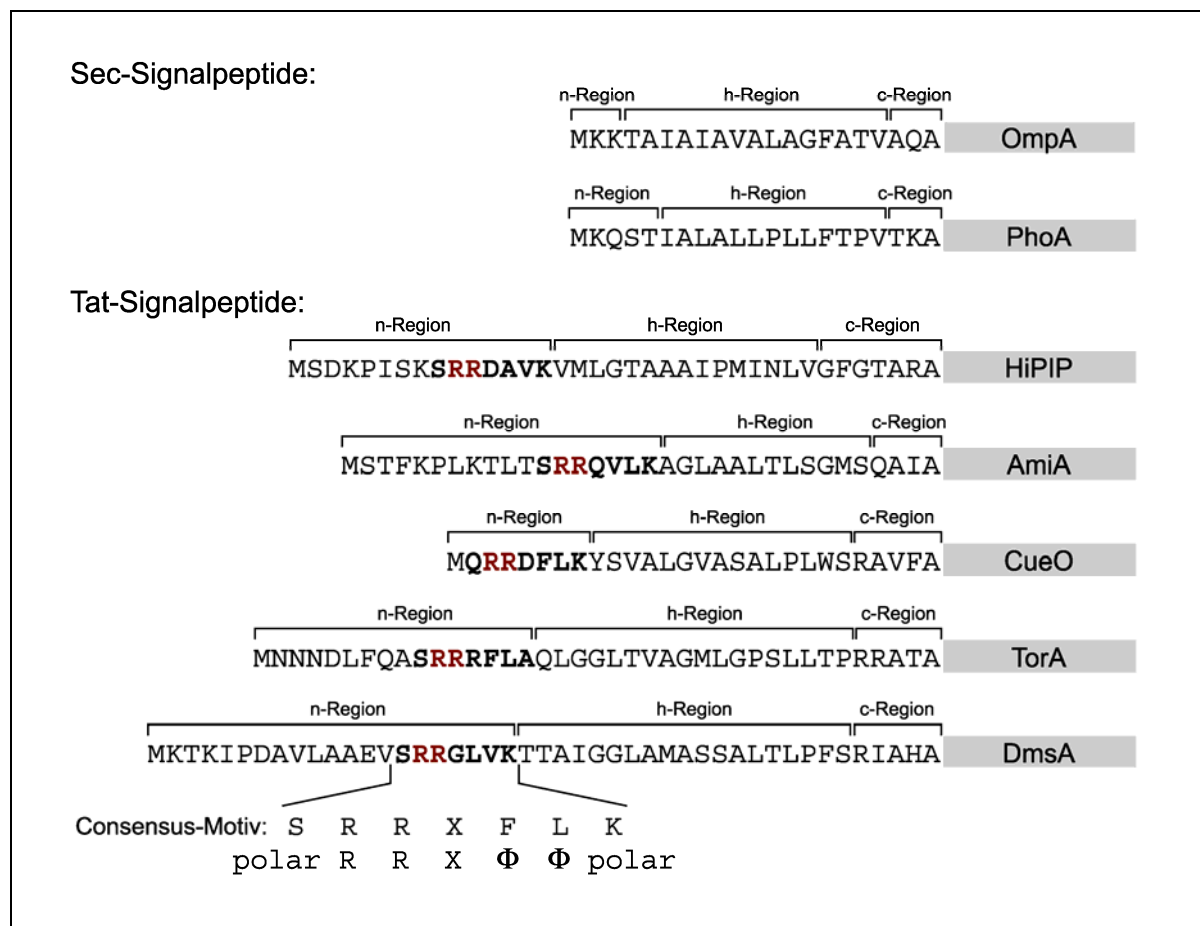


Abb. 1-3: Vergleich der Signalpeptide von Sec- und Tat-Substraten. OmpA und PhoA sind Sec-Substrate aus *E. coli*. HiPIP ist ein Tat-Substrat aus *Allochromatium vinosum*, wird aber von *E. coli* als Tat-Substrat akzeptiert (Brüser et al., 2003). AmiA, CueO, TorA und DmsA sind *E. coli*-Tat-Substrate. Φ steht für eine hydrophobe Aminosäure.

Weiterhin ist die h-Region von Tat-Signalpeptiden in der Regel signifikant weniger hydrophob als bei Sec-Signalpeptiden (Cristóbal et al., 1999), und die meisten Tat-Signalpeptiden weisen

eine oder mehrere geladene Aminosäuren in der c-Region, nahe der Schnittstelle der Signalpeptidase auf (Blaudeck et al., 2003; Bogsch et al., 1997), wo sie zur Tat-Spezifität des Targetings beitragen (Sec-avoidance-Motive).

1.3.2 Die Komponenten des Tat-Systems

Im Chromosom von *E. coli* wurden vier Gene identifiziert, die für die bisher bekannten Komponenten des Tat-Systems codieren. Die Gene *tatA*, *tatB* und *tatC* befinden sich gemeinsam mit *tatD* in einem Operon bei 86.6 min (Berks et al., 2000b), wobei das Protein TatD eine cytoplasmatische Nuklease ist, die bisher keine Relevanz für das Tat-System aufweist (Wexler et al., 2000). Das *tatABCD*-Operon wurde von Weiner et al. (1998) identifiziert und zunächst *mttABC*-Operon (für *m*embrane *t*argeting and *t*ranslocation) bezeichnet. Das vierte Gen, *tatE*, bildet eine eigene Transkriptionseinheit bei 14.2 min (Berks et al., 2000b) (Abb. 1-4).

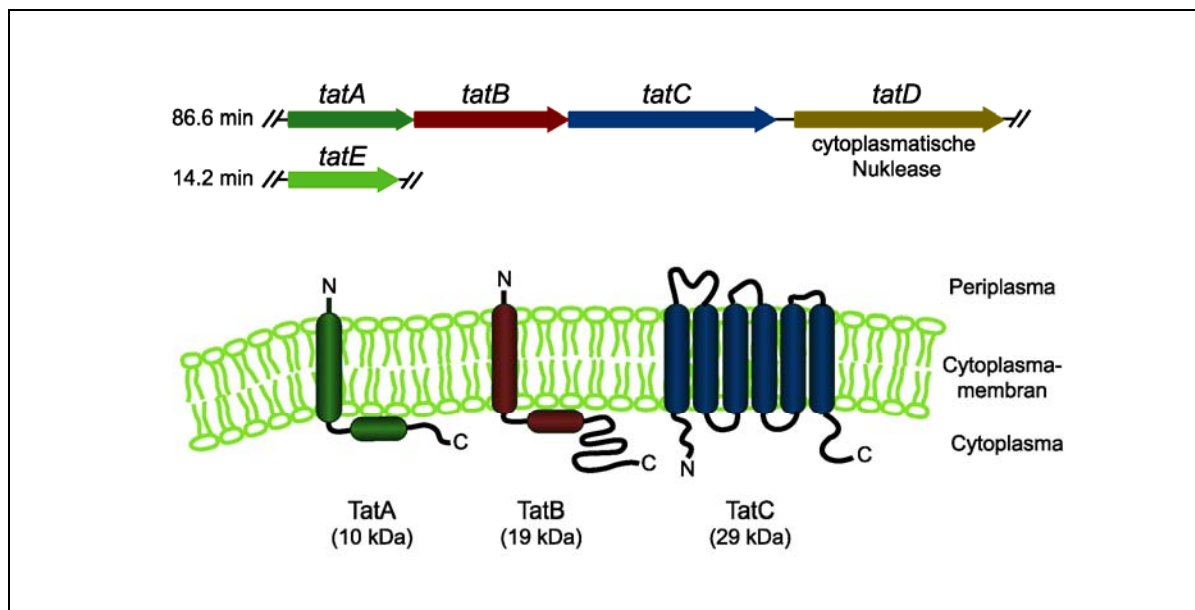


Abb. 1-4: Organisation der *tat*-Gene und Anordnung der Tat-Proteine in der CPM von *E. coli*.

Die Proteine TatA, TatB und TatE sind integrale Membranproteine mit jeweils einem Membrandurchgang, gefolgt von einer kurzen *hinge*-Region, einer vorrausgesagten amphipathischen Helix und einem unterschiedlich langen C-Terminus im Cytoplasma (Barrett & Robinson, 2005) (Abb. 1-4). TatA und TatE sind in ihrer Sequenz zu 60% identisch, und es konnte gezeigt werden, dass sie sich gegenseitig funktionell ersetzen können (Sargent et al., 1998). Wahrscheinlich ist TatE das Produkt einer kryptischen Genduplikation (Jack et al., 2001). Obwohl TatA/E und TatB eine Sequenzübereinstimmung von ca. 25% zeigen (Berks et al., 2000a), erfüllen sie unterschiedliche Aufgaben und sind beide in *E. coli* essentiell. In vielen anderen Bakterien, vor allem außerhalb der Proteobakterien, fehlt TatB (Dilks et al., 2003).

Auch in *E. coli* ist es Blaudeck *et al.* (2005) gelungen, Mutanten von TatA zu isolieren, die durch einzelne Aminosäureaustausche im N-Terminus TatB komplett ersetzen können. Durch gezielte Mutagenese in TatA konnte gezeigt werden, dass einzelne Aminosäuren in der amphipatischen Helix und in der *hinge*-Region essentiell für den Tat-Transport sind (Hicks *et al.*, 2003; Greene *et al.*, 2007). Dagegen haben einzelne Aminosäureaustausche in TatB keinen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz des Tat-Transportes (Lee *et al.*, 2006). Da die amphipatische Helix von TatB aber essentiell für den Transport ist (Lee *et al.*, 2002), wird vermutet, dass diese eine eher strukturelle Funktion ausübt (Greene *et al.*, 2007). TatB besitzt ein hochkonserviertes Glutamat-8 in der Transmembranhelix, wobei aber eine Substitution durch Cystein (Lee *et al.*, 2002) oder Alanin (Hicks *et al.*, 2003; Barrett *et al.*, 2003), die Funktion nicht beeinträchtigt.

TatC ist ebenfalls ein integrales Membranprotein, welches aber sechs Membrandurchgänge bildet, wobei sich sowohl der N- als auch der C-Terminus im Cytoplasma befinden (Bolhuis *et al.*, 2001; Behrendt *et al.*, 2004). Der gezielte Austausch konservierter Aminosäuren in TatC zeigte, dass einige Reste im N-Terminus und in der cytoplasmatischen Domäne zwischen dem zweiten und dritten Membrandurchgang essentiell sind (Allen, S.C. *et al.*, 2002). In den anderen Domänen wird die Funktion von TatC durch Punktmutationen nicht beeinträchtigt (Punginelli *et al.*, 2007).

Für ein effizient funktionierendes Tat-System in *E. coli* sind drei Komponenten notwendig, d.h. TatB, TatC und TatA oder TatE (Sargent *et al.*, 1998 und 1999; Bogsch *et al.*, 1998).

In der Thylakoidmembran von Chloroplasten gibt es Homologe zu den Tat-Komponenten in *E. coli*. Tha4, Hcf106 und cpTatC übernehmen hier die Aufgaben von TatA, TatB und TatC (Cline & Mori, 2001).

1.3.3 Strukturelle Organisation der Tat-Translokase und Mechanismus der Translokation

Der genaue Aufbau der Tat-Translokase und der Mechanismus der Translokation sind bisher nicht geklärt. Mit unterschiedlichen Detergenzien und Methoden wurden bereits einige verschiedene Tat-Komplexe aus *E. coli* und Thylakoidmembranen isoliert (Berghöfer & Klösigen, 1999; Sargent *et al.*, 2001; Bolhuis *et al.*, 2001; Cline & Mori, 2001; Oates *et al.*, 2003). Die Größe der Komplexe und die Anteile an TatA, TatB und TatC variieren dabei sehr stark. Aus den vielen Ergebnissen scheint sich abzuzeichnen, dass zwei Typen von Komplexen in der Cytoplasmamembran von *E. coli* existieren: TatA-Komplexe (Sargent *et al.*, 2001; Porcelli *et al.*, 2002; Gohlke *et al.*, 2005) und TatBC-Komplexe (Bolhuis *et al.*, 2001; Oates *et al.*, 2005), die erst zu einem aktiven Translokation assemblieren müssen. Ähnliche Komplexe wurden auch in Thylakoiden nachgewiesen (Cline & Mori, 2001).

Durch *cross-linking*-Studien *in vitro* konnte gezeigt werden, dass Tat-precursor mit TatBC interagieren (Cline & Mori, 2001; Alami et al., 2003), so dass man mittlerweile davon ausgeht, dass die Bildung eines TatBC-Substrat-Komplexes der initiiierende Schritt der Assemblierung des Translokons ist. Ebenfalls mittels *cross-linking* wurde nachgewiesen, dass die stärkste Interaktion zwischen TatC und den Aminosäureresten in der Nähe des konservierten RR-Motives stattfindet (Alami et al., 2003; Gérard & Cline, 2007; Holzapfel et al., 2007). An diesen Schritt schließt sich wahrscheinlich die Bindung von TatA-Oligomeren an, wodurch ein aktives Translokation gebildet wird. Bei *in vitro*-Untersuchungen am Δ pH-System von Thylakoiden konnte festgestellt werden, dass TatA erst nach Substratbindung an dem TatBC-Substrat-Komplex bindet und dass für diesen Schritt ein Protonengradient (Δ pH) notwendig ist (Cline & Mori, 2001; Mori & Cline, 2002; Dabney-Smith et al., 2006). Von TatA wird angenommen, dass es einen Translokations-Kanal (*protein-conducting-channel*) bildet (Sargent et al., 2006). Durch *single particle*-Elektronenmikroskopie konnten Gohlke et al. (2005) TatA-Komplexe mit sehr verschiedenen Durchmessern in der Membran nachweisen. Als Grund für diese Variabilität wurde die unterschiedliche Größe der verschiedenen Tat-Substrate vermutet. Völlig unklar ist, ob es sich bei diesem Translokationskanal um eine wassergefüllte Pore handelt, die durch die cytoplasmatischen Domänen von TatA verschlossen wird. Dieses Modell wird von Musser & Theg (2000), Berks et al. (2000a) und Wu et al. (2000) favorisiert. Beim Modell des *membrane weakening and pulling*-Mechanismus (Brüser & Sanders, 2003) wird keine wassergefüllte Pore benötigt. Die Autoren gehen davon aus, dass durch die Assemblierung von mehreren TatA-Kopien an den TatBC-Substrat-Komplex die Membranstruktur punktuell so geschwächt werden könnte, dass TatC als Motor eines *pulling*-Mechanismuses das Tat-Substrat durch die Membran ziehen kann.

Eine sehr interessante Beobachtung machten Gérard & Cline (2006). Sie zeigten, dass ein Tat-Substrat, welches über das Signalpeptid (im Bereich des RR-Motivs) kovalent mittels *cross-linking* an TatC gebunden ist, noch transportiert wird. Das bedeutet, dass die erste Interaktion zwischen TatC und dem *precursor* während des gesamten Transportprozesses bestehen bleibt. Nach erfolgter Translokation schneidet die Signalpeptidase LepB (Yahr & Wickner, 2001) an ihrer Erkennungsstelle (AXA-Motiv) (von Heijne, 1990), und das mature Protein erreicht das Periplasma. Anhand von *in vitro*-Transportstudien an Thylakoiden gibt es Hinweise darauf, dass das Substrat vor der Prozessierung lateral in die Membran entlassen wird (Frielingsdorf & Klösigen, 2007). Es wird davon ausgegangen, dass das Translokation nach erfolgtem Transport zerfällt und für jeden Transportzyklus neu assembliert (Mori & Cline, 2002).

Mittels GFP-Fusionen wurde die Lokalisation von TatA, TatB und TatC in *E. coli* untersucht (Berthelmann & Brüser, 2004). Dabei wurde festgestellt, dass TatB vor allem an den Polen zu finden ist. TatA dagegen ist weniger polar in der Membran verteilt, was mit einer Assemblierung für jeden Transportzyklus korreliert. Somit scheint es möglich zu sein, dass der Tat-Transport an den Zellpolen stattfindet.

1.4 Qualitätskontrolle der Faltung von Tat-Substraten

Im Unterschied zum Sec-System kann das Tat-System gefaltete Substrate transportieren. Auf die Notwendigkeit eines Transportsystems für gefaltete Proteine wurde bereits unter 1.3 eingegangen. Alder & Theg (2003) bestimmten *in vitro*, dass für den Tat-Transport von nur einem Protein in das Thylakoidlumen 80 000 Protonen verbraucht werden. Betrachtet man diese Menge an Energie, kann man sich vorstellen, dass die Zelle Vorsichtsmaßnahmen getroffen hat, um nur wirklich korrekt gefaltete Substrate Tat-abhängig zu transportieren. Um Fehler in der Faltung zu erkennen, könnte sie ein Qualitätskontrollsystem eingerichtet haben, welches falsch gefaltete Substrate erkennt und deren Targeting zum Translokon verhindert.

Bekräftigt wurde diese Vermutung durch *in vivo*-Untersuchungen, die zeigen dass ungefaltete Substrate nicht Tat-abhängig transportiert werden (Santini *et al.*, 1998; Halbig *et al.*, 1999b; Sanders *et al.*, 2001; DeLisa *et al.* 2003). Die Interpretation der Daten ging bei DeLisa *et al.* (2003) am weitesten. Eine Fusion aus maturem PhoA und dem TorA-Signalpeptid wurde erst dann Tat-abhängig transportiert, wenn das Protein gefaltet vorlag. Erreicht werden konnte die Faltung von PhoA, eigentlich ein Sec-Substrat, durch eine Expression in Stämmen, in denen die Bildung von Disulfidbrücken im Cytoplasma möglich war.

Brüser & Sanders (2003) vermuteten eine Qualitätskontrolle der Faltung im Anschluß an ein Tat-unabhängiges Membrantargeting der Tat-Substrate. Eine solche Qualitätskontrolle könnte durch eine membrangebundene Protease wie FtsH realisiert werden. Sie könnte aber auch eine intrinsische Eigenschaft von TatA, TatB oder TatC sein, wie von DeLisa *et al.* (2003) postuliert.

Viele Cofaktor-enthaltende Tat-Substrate, z.B. TorA und DmsA, besitzen spezifische Chaperone, die eine wichtige Rolle bei der Cofaktorassemblierung und der korrekten Faltung spielen (Berks *et al.*, 2005). Die Bindung des Signalpeptides durch Chaperone, welche erst nach einer Faltung einen Proteintransport zulassen, wird auch *proofreading* genannt. Es wurde postuliert dass diese zwei Systeme - das *proofreading* und eine sich anschließende Qualitätskontrolle der Faltung am Translokon - den Transport von nicht komplett gefalteten oder unassemblierten Substraten verhindern (Palmer *et al.*, 2005).

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, geeignete ungefaltete oder unstrukturierte Modell-Tat-Substrate zu finden und mit deren Hilfe und verschiedener biochemischer und molekulargenetischer Methoden folgende Fragen zu klären:

1. Was sind die erforderlichen Eigenschaften eines *E. coli* Tat-Substrates?
2. Was macht ein Substrat zum Tat-Substrat? Was unterscheidet es von einem Sec-Substrat?
3. Werden nur gefaltete Proteine Tat-abhängig transportiert? Was ist der Grund dafür?
4. Existiert eine Qualitätskontrolle der Faltung von Tat-Substraten? Ist sie eine intrinsische Funktion von TatA, TatB oder TatC, oder sind noch andere Proteine daran beteiligt?
5. Lassen sich aus den Ergebnissen Aussagen über den Mechanismus des Tat-Transportes treffen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 2.1: Escherichia coli-Stämme

Stamm	Genotyp/ Charakteristika	Herkunft / Referenz
MC4100	F ⁻ Δ lacU169 araD139 rpsL150 relA1 ptsF rbsR fliB5301, Wildtypstamm	Casadaban & Cohen, 1979
MC4100 DE3 ara ^R	P _{T7} ; P _{ara} geeignet für T7- und Arabinose-abhängige Expression	Yahr & Wickner, 2001
BL21 DE3	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B r _B) gal dcm met (DE3), geeignet für T7-abhängige Expression	Novagen (Schwalbach) Derman et al., 1993
XL1 Blue MRF ⁻ Km	F ⁻ Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F ⁻ proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn5 (Km ^R)]	Stratagene (La Jolla, USA)
(ftsH-WT) AR3289	F ⁻ IN(rrnD-rrnE)1 sfhC21 zad220::Tn10 (Tc ^R)	Tatsuta et al., 1998
(Δ ftsH) AR3291	F ⁻ IN(rrnD-rrnE)1 Δ ftsH3::kan sfhC21 zad220::Tn10 (Tc ^R , Km ^R)	Tatsuta et al., 1998
CC118 (Δ phoA)	araD139 Δ (ara, leu)7697 Δ lacX74 phoA Δ 20 galE galK thi rpsE rpoB argE _{am} recA1	Lee & Manoil, 1994
B1LKO (Δ tatC)	MC4100 Δ tatC	Bogsch et al., 1998
DADE	MC4100 Δ tatABCD Δ tatE	Wexler et al., 2000
dnaKJ-WT (BR 4391)	Derivat von BR4501 Δ (srIR-recA)306::Tn10 (Tc ^R)	Sozhamannan & Chattoraj, 1993
Δ dnaKJ (BR 4392)	Derivat von BR3660 Δ dnaKJ::mini-Km ^F (srIR-recA)306::Tn10 (Tc ^R , Km ^R)	Sozhamannan & Chattoraj, 1993

Tabelle 2.2: Plasmide

Plasmid		Charakteristika	Herkunft/ Referenz
pRK-tatABC	Tc ^R	pRK415 mit tatABC-Fragment	Brüser <i>et al.</i> , 2003
pABS-tatABC	Cm ^R	pACYC184 mit tatABC-Fragment	Berthelmann & Brüser, 2004
pABS-tatABCstrep	Cm ^R	pABS-tatABC mit Strep-tagII aus pASK-2 (IBA, Göttingen) am C-Terminus von TatC	Berthelmann & Brüser, 2004
pBAD-tatABCstrep	Ap ^R	Expression von tatA, tatB und tatC-strep unter Kontrolle des induzierbaren P _{ara} -Promotor	Behrendt & Brüser, unveröffentlicht
pABS-tatABC-hip-tac	Cm ^R	pABS-tatABC mit hip-tac-Fragment, d.h. zusätzliche konstitutive Expression von hip unter Kontrolle von P _{tac}	diese Arbeit
pABS-tatABC-hip-KK-tac	Cm ^R	pABS-tatABC-hip-tac mit RR>KK Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit
pET22b(+)	Ap ^R	Expressionsvektor (IPTG-induzierbarer T7-Promotor) mit His-tag	Novagen (Schwalbach)
pEXH5	Ap ^R	hip-Expressionsvektor, hip in pET22b(+) incl. hip-Terminator	Brüser <i>et al.</i> , 1998
pEXH7	Ap ^R	hip-Expressionsvektor, hip in pET22b(+) ohne hip-Terminator, mit C-terminalem His-tag	Brüser <i>et al.</i> , 1998
pEXH5-KK	Ap ^R	Austausch von RR zu KK im Signalpeptid von precursor-HiPIP	Brüser <i>et al.</i> , 2003
pEXH5-tac	Ap ^R	pTB-DG-Derivat mit hip aus pEXH5 (XbaI/HindIII) unter Kontrolle von P _{tac}	Richter & Brüser, 2005
pEXH5-KK-tac	Ap ^R	pTB-DG-Derivat mit hip aus pEXH5-KK (XbaI/HindIII) unter Kontrolle von P _{tac}	Richter & Brüser, 2005
pTB-DG	Ap ^R	DmsA-Signalpeptid fusioniert mit GFP unter Kontrolle von P _{tac} , Derivat von pCS906 (Sanders <i>et al.</i> , 2001)	Berthelmann & Brüser, 2004
pEXH5-(C43D)-tac	Ap ^R	pEXH5-tac mit dem Austausch C43D im murenen HiPIP	Richter <i>et al.</i> , 2007
pEXH5-(C43,46D)-tac	Ap ^R	pEXH5-tac mit den Austauschen C43D und C46D im murenen HiPIP	Richter <i>et al.</i> , 2007
pEXH5-(C43,77D)-tac	Ap ^R	pEXH5-tac mit den Austauschen C43D und C77D im murenen HiPIP	Richter <i>et al.</i> , 2007
pEXH5-(C43,46,77D)-tac	Ap ^R	pEXH5-tac mit den Austauschen C43D, C46D und C77D im murenen HiPIP	Richter <i>et al.</i> , 2007

Plasmid		Charakteristika	Herkunft/ Referenz
pEXH5-(C43,63,77D)-tac	Ap ^R	pEXH5-tac mit den Austauschen C43D, C63D und C77D im murenen HiPIP	Richter <i>et al.</i> , 2007
pEXH5-(C43,46,63,77D)-tac	Ap ^R	pEXH5-tac mit den Austauschen C43D, C46D, C63D und C77D im murenen HiPIP	Richter <i>et al.</i> , 2007
pEXH5-KK-(C43D)-tac	Ap ^R	pEXH5-(C43D)-tac mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pEXH5-KK-(C43,46D)-tac	Ap ^R	pEXH5-(C43,46D)-tac mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pEXH5-KK-(C43,77D)-tac	Ap ^R	pEXH5-(C43,77D)-tac mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pEXH5-KK-(C43,46,77D)-tac	Ap ^R	pEXH5-(C43,46,77D)-tac mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pEXH5-KK-(C43,63,77D)-tac	Ap ^R	pEXH5-(C43,63,77D)-tac mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pEXH5-KK-(C43,46,63,77D)-tac	Ap ^R	pEXH5-(C43,46,63,77D)-tac mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pEXH5-BamHI ^{SP}	Ap ^R	pEXH5 mit BamHI-Schnittstelle innerhalb des 7. Codons der murenen Domäne von <i>hip</i>	diese Arbeit Richter & Brüser, 2005
pEXH5-tac-BamHI ^{SP}	Ap ^R	pEXH5-tac mit BamHI-Schnittstelle innerhalb des 7. Codons der murenen Domäne von <i>hip</i>	diese Arbeit Richter & Brüser, 2005
pEXH5-KK-tac-BamHI ^{SP}	Ap ^R	pEXH5-tac-BamHI ^{SP} mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit Richter & Brüser, 2005
pTFD342	Ap ^R	<i>phoA</i> -Expressionsvektor	Kumagai <i>et al.</i> , 1997
pEX- <i>hip</i> ^{SP} - <i>phoA</i>	Ap ^R	pEXH5-BamHI ^{SP} mit eingefügtem <i>phoA</i> -Fragment aus pTFD342 (BamHI/HindIII); Expression von <i>hip</i> ^{SP} - <i>phoA</i>	diese Arbeit Richter & Brüser, 2005
pEX- <i>hip</i> ^{SP} - <i>phoA</i> -tac	Ap ^R	pEXH5-BamHI ^{SP} -tac mit eingefügtem <i>phoA</i> -Fragment (mature Domäne) aus pTFD342 (BamHI/HindIII); konstitutive Expression von <i>hip</i> ^{SP} - <i>phoA</i>	diese Arbeit Richter & Brüser, 2005
pEX- <i>hip</i> ^{SP} -KK- <i>phoA</i> -tac	Ap ^R	pEX- <i>hip</i> ^{SP} - <i>phoA</i> -tac mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid	diese Arbeit Richter & Brüser, 2005
pEX- <i>phoA</i> -tac	Ap ^R	pEXH5-tac mit <i>phoA</i> -Fragment aus genomischer DNA (NdeI/HindIII), Expression von <i>precursor-phoA</i>	diese Arbeit Richter & Brüser, 2005
pEX-mat. <i>phoA</i> -tac	Ap ^R	pEXH5-tac mit maturem <i>phoA</i> -Fragment aus genomischer DNA (NdeI/HindIII), Expression von maturem <i>phoA</i> ohne Signalpeptid	diese Arbeit
pEXH5-short n-tac	Ap ^R	Expression von <i>hip</i> ; verkürzte n-Region des Signalpeptids	diese Arbeit

Plasmid		Charakteristika	Herkunft/ Referenz
pEXH5-ftsH-tac	Ap ^R	Derivat von pEXH5-tac mit eingefügtem <i>ftsH</i> -Fragment, konstitutive Expression von <i>hip</i> und <i>ftsH</i> unter Kontrolle von P _{tac}	diese Arbeit
pEXH5-KK-ftsH-tac	Ap ^R	pEXH5-ftsH-tac, RR>KK-Austausch im HiPIP-Signalpeptid	diese Arbeit
pEXH5-RR-tac	Ap ^R	pEXH5-tac mit FG>RR-Austausch in der c-Region des HiPIP-Signalpeptides	diese Arbeit
pEXH5-KK-RR-tac	Ap ^R	pEXH5-RR-tac mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HIPIP	diese Arbeit
pEX-hip ^{SP} -RR-phoA-tac	Ap ^R	pEX-hip ^{SP} -phoA-tac mit FG>RR-Austausch in der c-Region des HIPIP-Signalpeptides	diese Arbeit
pEX-hip ^{SP} -KK-RR-phoA-tac	Ap ^R	pEX-hip ^{SP} -RR-phoA-tac mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HIPIP	diese Arbeit
pEXH5-DD-tac	Ap ^R	pEXH5-tac mit FG>DD-Austausch in der c-Region des HiPIP-Signalpeptides	diese Arbeit
pEXH5-KK-DD-tac	Ap ^R	pEXH5-DD-tac mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HIPIP	diese Arbeit
pEX-hip ^{SP} -DD-phoA-tac	Ap ^R	pEX-hip ^{SP} -phoA-tac mit FG>DD-Austausch in der c-Region des HIPIP-Signalpeptides	diese Arbeit
pEX-hip ^{SP} -KK-DD-phoA-tac	Ap ^R	pEX-hip ^{SP} -DD-phoA-tac mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HIPIP	diese Arbeit
pEXH5-h-reg.-tac	Ap ^R	pEXH5-tac mit MI>AA-Austausch in der h-Region des HiPIP-Signalpeptides	diese Arbeit
pEXH5-KK-h-reg.-tac	Ap ^R	pEXH5-KK-h-reg.-tac mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HIPIP	diese Arbeit
pEX-hip ^{SP} -h-reg.-phoA-tac	Ap ^R	pEX-hip ^{SP} -phoA-tac mit MI>AA-Austausch in der h-Region des HIPIP-Signalpeptides	diese Arbeit
pEX-hip ^{SP} -KK-h-reg.-phoA-tac	Ap ^R	pEX-hip ^{SP} -h-reg.-phoA-tac mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HIPIP	diese Arbeit
pEXH5-RR+h-reg.-tac	Ap ^R	pEXH5-tac mit FG>RR-Austausch in der c-Region und MI>AA-Austausch in der h-Region des HIPIP-Signalpeptides	diese Arbeit
pEXH5-KK-RR+h-reg.-tac	Ap ^R	pEXH5-RR+h-reg.-tac mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HIPIP	diese Arbeit
pEX-hip ^{SP} -RR+h-reg.-phoA-tac	Ap ^R	pEX-hip ^{SP} -phoA-tac mit FG>RR-Austausch in der c-Region und MI>AA-Austausch in der h-Region des HIPIP-Signalpeptides	diese Arbeit
pEX-hip ^{SP} -KK-RR+h-reg.-phoA-tac	Ap ^R	pEX-hip ^{SP} -RR+h-reg.-phoA-tac mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HIPIP	diese Arbeit

Plasmid		Charakteristika	Herkunft/ Referenz
pBAD22	Ap ^R	Expressionsvektor für Arabinose-regulierbare Expression (P _{BAD} des <i>araBAD</i> -Operons)	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pBAD- <i>hip</i> ^{SP} - <i>phoA</i>	Ap ^R	pBAD22 mit <i>hip</i> ^{SP} - <i>phoA</i> -Fragment aus pEX- <i>hip</i> ^{SP} - <i>phoA</i> - <i>tac</i> (NcoI/XbaI); Expression von <i>hip</i> ^{SP} - <i>phoA</i> unter Kontrolle von P _{ara}	diese Arbeit Richter & Brüser, 2005
pBAD- <i>hip</i> ^{SP} -KK- <i>phoA</i>	Ap ^R	pBAD- <i>hip</i> ^{SP} - <i>phoA</i> mit RR>KK-Austausch im HiPIP-Signalpeptid	diese Arbeit Richter & Brüser, 2005
pJOE2702	Ap ^R	Expressionsvektor für L-Rhamnose-regulierbare Expression	Vloff <i>et al.</i> , 1996
pJOE- <i>hip</i> ^{SP} - <i>phoA</i>	Ap ^R	pJOE2702 mit <i>hip</i> ^{SP} - <i>phoA</i> -Fragment aus pEX- <i>hip</i> ^{SP} - <i>phoA</i> - <i>tac</i> (NdeI/HindIII); Expression von <i>hip</i> ^{SP} - <i>phoA</i> unter Kontrolle von P _{RhaBAD}	diese Arbeit Richter & Brüser, 2005
pJOE- <i>hip</i> ^{SP} -KK- <i>phoA</i>	Ap ^R	pJOE- <i>hip</i> ^{SP} - <i>phoA</i> mit RR>KK-Austausch im HiPIP-Signalpeptid	diese Arbeit Richter & Brüser, 2005
pNsp1pFF18	Ap ^R	Expression von Nsp1p (18 FG-repeats) aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Clarkson <i>et al.</i> , 1996
pBW22	Ap ^R	Expressionsvektor für L-Rhamnose-regulierbare Expression	Wilms <i>et al.</i> , 2001
pBW- <i>hip</i> -H6-BamHI	Ap ^R	pBW22 mit <i>hip</i> -Fragment (NdeI/ScaI) aus pEXH5-BamHI; BamHI-Schnittstelle nach dem 8. Codon des muren Bereiches von <i>hip</i>	diese Arbeit
pBW- <i>hip</i> -KK-H6-BamHI	Ap ^R	pBW- <i>hip</i> -H6-BamHI mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit
pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR1</i> -H6	Ap ^R	pBW- <i>hip</i> -H6-BamHI mit <i>nspR1</i> -Fragment (BamHI/XhoI); Expression von 1 FG-repeat von <i>nsp1p</i> mit <i>hip</i> -Signalpeptid und His-tag	diese Arbeit
pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR2</i> -H6	Ap ^R	pBW- <i>hip</i> -H6-BamHI mit <i>nspR2</i> -Fragment (BamHI/XhoI); Expression von 2 FG-repeats von <i>nsp1p</i> mit <i>hip</i> -Signalpeptid und His-tag	diese Arbeit
pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR3</i> -H6 (=pBW-R3)	Ap ^R	pBW- <i>hip</i> -H6-BamHI mit <i>nspR3</i> -Fragment (BamHI/XhoI); Expression von 3 FG-repeats von <i>nsp1p</i> mit <i>hip</i> -Signalpeptid und His-tag	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR5</i> -H6 (=pBW-R5)	Ap ^R	pBW- <i>hip</i> -H6-BamHI mit <i>nspR5</i> -Fragment (BamHI/XhoI); Expression von 5 FG-repeats von <i>nsp1p</i> mit <i>hip</i> -Signalpeptid und His-tag	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR7</i> -H6 (=pBW-R7)	Ap ^R	pBW- <i>hip</i> -H6-BamHI mit <i>nspR7</i> -Fragment (BamHI/XhoI); Expression von 7 FG-repeats von <i>nsp1p</i> mit <i>hip</i> -Signalpeptid und His-tag	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR10</i> -H6 (=pBW-R10)	Ap ^R	pBW- <i>hip</i> -H6-BamHI mit <i>nspR10</i> -Fragment (BamHI/XhoI); Expression von 10 FG-repeats von <i>nsp1p</i> mit <i>hip</i> -Signalpeptid und His-tag	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR17</i> -H6 (=pBW-R17)	Ap ^R	pBW- <i>hip</i> -H6-BamHI mit <i>nspR17</i> -Fragment (BamHI/XhoI); Expression von 17 FG-repeats von <i>nsp1p</i> mit <i>hip</i> -Signalpeptid und His-tag	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pBW- <i>hip</i> ^{SP} -KK- <i>nspR1</i> -H6	Ap ^R	pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR1</i> -H6 mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit

Plasmid		Charakteristika	Herkunft/ Referenz
pBW-hip ^{SP} -KK-nspR2-H6	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR2-H6 mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit
pBW-hip ^{SP} -KK-nspR3-H6 (=pBW-R3-KK)	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR3-H6 mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pBW-hip ^{SP} -KK-nspR5-H6 (=pBW-R5-KK)	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR5-H6 mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pBW-hip ^{SP} -KK-nspR7-H6 (=pBW-R7-KK)	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR7-H6 mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pBW-hip ^{SP} -KK-nspR10-H6 (=pBW-R10-KK)	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR10-H6 mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pBW-hip ^{SP} -KK-nspR17-H6 (=pBW-R17-KK)	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR17-H6 mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pBW-hip ^{SP} -nspR3Φ-H6 (=pBW-R3-Φ)	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR3-H6 mit PAFSFG>NIILLI-Austausch im 3. FG-repeat von Nsp1p	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pBW-hip ^{SP} -nspR5Φ-H6 (=pBW-R5-Φ)	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR5-H6 mit PAFSFG>NIILLI-Austausch im 3. FG-repeat von Nsp1p	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pBW-hip ^{SP} -nspR7Φ-H6 (=pBW-R7-Φ)	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR7-H6 mit PAFSFG>NIILLI-Austausch im 3. FG-repeat von Nsp1p	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pBW-hip ^{SP} -nspR10Φ-H6 (=pBW-R10-Φ)	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR10-H6 mit PAFSFG>NIILLI-Austausch im 3. FG-repeat von Nsp1p	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pBW-hip ^{SP} -nspR17Φ-H6 (=pBW-R17-Φ)	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR17-H6 mit PAFSFG>NIILLI-Austausch im 3. FG-repeat von Nsp1p	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pBW-hip ^{SP} -KK-nspR3Φ-H6	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR3Φ-H6 mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit
pBW-hip ^{SP} -KK-nspR5Φ-H6	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR5Φ-H6 mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit
pBW-hip ^{SP} -KK-nspR7Φ-H6	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR7Φ-H6 mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit
pBW-hip ^{SP} -KK-nspR10Φ-H6	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR10Φ-H6 mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit
pBW-hip ^{SP} -KK-nspR17Φ-H6	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR17Φ-H6 mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit
pBW-hip ^{SP} -nspR5Φ _c -H6 (=pBW-R5-Φ _c)	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR5-H6 mit PAFSFG>NIILLI-Austausch im 5. FG-repeat von Nsp1p	diese Arbeit Richter <i>et al.</i> , 2007
pBW-hip ^{SP} -KK-nspR5Φ _c -H6	Ap ^R	pBW-hip ^{SP} -nspR5Φ _c -H6 mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit

Plasmid		Charakteristika	Herkunft/ Referenz
pBAD- <i>nspR3</i> -H6	Ap ^R	pBAD- <i>pspA</i> -H6 mit <i>nsp</i> -R3-Fragment (NcoI/XhoI); Expression von 3 FG-repeats von <i>nsp1p</i> mit His-tag	diese Arbeit
pBAD- <i>nspR5</i> -H6 (=pBAD-R5)	Ap ^R	pBAD- <i>pspA</i> -H6 mit <i>nsp</i> -R5-Fragment (NcoI/XhoI); Expression von 5 FG-repeats von <i>nsp1p</i> mit His-tag	diese Arbeit Richter et al., 2007
pBAD- <i>nspR17</i> -H6	Ap ^R	pBAD- <i>pspA</i> -H6 mit <i>nsp</i> -R17-Fragment (NcoI/XhoI); Expression von 17 FG-repeats von <i>nsp1p</i> mit His-tag	diese Arbeit
pBAD- <i>nspR3</i> Φ-H6	Ap ^R	pBAD- <i>nspR3</i> -H6 mit PAFSFG>NIILLI-Austausch im 3. FG-repeat von Nsp1p	diese Arbeit
pBAD- <i>nspR5</i> Φ-H6 (=pBAD-R5-Φ)	Ap ^R	pBAD- <i>nspR5</i> -H6 mit PAFSFG>NIILLI-Austausch im 3. FG-repeat von Nsp1p	diese Arbeit Richter et al., 2007
pBAD- <i>nspR17</i> Φ-H6	Ap ^R	pBAD- <i>nspR17</i> -H6 mit PAFSFG>NIILLI-Austausch im 3. FG-repeat von Nsp1p	diese Arbeit
pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR5</i> - <i>gfp</i> (=pBW-R5- <i>gfp</i>)	Ap ^R	pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR5</i> -H6 mit <i>gfp</i> -Fragment (SacII/XhoI) aus pTB-DG; Expression von <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR5</i> mit <i>gfp</i> -Fusion (C-terminal)	diese Arbeit Berthelmann et al., 2008
pBW- <i>hip</i> ^{SP} -KK- <i>nspR5</i> - <i>gfp</i> (=pBW-R5- <i>gfp</i> -KK)	Ap ^R	pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR5</i> - <i>gfp</i> mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit Berthelmann et al., 2008
pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR5</i> Φ- <i>gfp</i>	Ap ^R	pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR5</i> Φ-H6 mit <i>gfp</i> -Fragment (SacII/XhoI) aus pTB-DG; Expression von <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR5</i> Φ mit <i>gfp</i> -Fusion (C-terminal)	diese Arbeit
pBW- <i>hip</i> ^{SP} -KK- <i>nspR5</i> Φ- <i>gfp</i>	Ap ^R	pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR5</i> Φ- <i>gfp</i> mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP	diese Arbeit
pEX- <i>cueO</i> / <i>hip-tac</i>	Ap ^R	pEXH5- <i>tac</i> -BamHI ^{SP} mit <i>cueO</i> ^{SP} -Fragment (NdeI/BamHI); Expression von <i>hip</i> mit <i>cueO</i> -Signalpeptid	Lindenstrauß & Brüser (unveröffentlicht)
pEX- <i>amiA</i> / <i>hip-tac</i>	Ap ^R	pEXH5- <i>tac</i> -BamHI ^{SP} mit <i>amiA</i> ^{SP} -Fragment (NdeI/BamHI); Expression von <i>hip</i> mit <i>amiA</i> -Signalpeptid	Lindenstrauß & Brüser (unveröffentlicht)
pEX- <i>torA</i> / <i>hip-tac</i>	Ap ^R	pEXH5- <i>tac</i> -BamHI ^{SP} mit <i>torA</i> ^{SP} -Fragment (NdeI/BamHI); Expression von <i>hip</i> mit <i>torA</i> -Signalpeptid	Lindenstrauß & Brüser (unveröffentlicht)
pEX- <i>dmsA</i> / <i>hip-tac</i>	Ap ^R	pEXH5- <i>tac</i> -BamHI ^{SP} mit <i>dmsA</i> ^{SP} -Fragment (NdeI/BamHI); Expression von <i>hip</i> mit <i>dmsA</i> -Signalpeptid	Lindenstrauß & Brüser (unveröffentlicht)
pBW- <i>amiA</i> ^{SP} - <i>nspR5</i> -H6	Ap ^R	pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR5</i> -H6 mit <i>amiA</i> ^{SP} -Fragment (NdeI/BamHI); Expression von 5 FG-repeats von <i>nsp1p</i> mit <i>amiA</i> -Signalpeptid und His-tag	diese Arbeit
pBW- <i>cueO</i> ^{SP} - <i>nspR5</i> -H6	Ap ^R	pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR5</i> -H6 mit <i>cueO</i> ^{SP} -Fragment (NdeI/BamHI); Expression von 5 FG-repeats von <i>nsp1p</i> mit <i>cueO</i> -Signalpeptid und His-tag	diese Arbeit
pBW- <i>dmsA</i> ^{SP} - <i>nspR5</i> -H6	Ap ^R	pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR5</i> -H6 mit <i>dmsA</i> ^{SP} -Fragment (NdeI/BamHI); Expression von 5 FG-repeats von <i>nsp1p</i> mit <i>dmsA</i> -Signalpeptid und His-tag	diese Arbeit
pBW- <i>torA</i> ^{SP} - <i>nspR5</i> -H6	Ap ^R	pBW- <i>hip</i> ^{SP} - <i>nspR5</i> -H6 mit <i>torA</i> ^{SP} -Fragment (NdeI/BamHI); Expression von 5 FG-repeats von <i>nsp1p</i> mit <i>torA</i> -Signalpeptid und His-tag	diese Arbeit

2.2 Kultivierungsbedingungen

2.2.1 Nährmedien und Zusätze

Die aerobe Anzucht von *E. coli* erfolgte in der Regel in Luria-Bertani-Medium. Zur Herstellung von Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren Agar (15 g/l) zugesetzt. Für anaerobes Wachstum wurde Nitrat-Medium und zur Vorbereitung auf das TMAO-Wachstum M9-Minimalmedium verwendet. SOB-Medium wurde zur Anzucht von Zellen verwendet, die kompetent gemacht wurden (2.3.8.2). Die Nährmedien wurden durch Autoklavieren (121 °C, 20 min) sterilisiert. Hitzelabile Lösungen, wie Antibiotika, wurden sterilfiltriert (PVDF-Membranfilter, Porengröße 0.22 µm, Roth, Karlsruhe).

(1) LB-Medium (Sambrook et al., 1989)

10 g Pepton
5 g Hefe-Extrakt
10 g NaCl
ad 1 l H₂O_{bidest}

(2) Nitrat-Medium

LB-Medium + 0.5% Glycerin
0.4% NaNO₃

(3) M9-Minimalmedium

Das H₂O_{bidest} wurde mit den M9-Salzen autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden die restlichen Inhaltsstoffe aus sterilfiltrierten Stammlösungen zugegeben.

200 ml 5x M9-Salze
1 mM MgSO₄
0.001% (w/v) Thiamin
0.5% (w/v) Glucose
1 ml SL12 (bei Bedarf)
ad 1 l H₂O_{bidest}

5x M9-Salze:

170 mM Na₂HPO₄
110 mM KH₂PO₄
94 mM NH₄Cl
43 mM NaCl
0.1 mM CaCl₂
ad 1 l H₂O_{bidest}

SL12-Spurenelementlösung

8 mM	EDTA-Na ₂
3.5 mM	FeSO ₄
300 µM	ZnCl ₂
250 µM	MnCl ₂
4.9 mM	H ₂ BO ₃
800 µM	CoCl ₂
10 µM	CuCl ₂
100 µM	NiCl ₂
70 µM	Na ₂ MoO ₄
ad 1 l	H ₂ O _{bidest}

(4) SOB-Medium

20 g	Trypton
5 g	Hefe-Extrakt
0.5 g	NaCl
pH 7.0	
ad 1 l	H ₂ O _{bidest}

Nach dem Autoklavieren mussten noch 100 mM sterilfiltriertes MgCl₂ zugegeben werden.

(5) Antibiotika

In Tabelle 2.3 sind alle verwendeten Antibiotika aufgeführt. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 2.3: Antibiotika-Stammlösungen und Endkonzentrationen im Medium

Antibiotikum	Stammlösung (1:1000)	Endkonzentration im Medium
Ampicillin (Ap)	100 mg/ml H ₂ O	100 µg/ml
Kanamycin (Km)	25 mg/ml H ₂ O	25 µg/ml
Tetracyclin (Tc)	12 mg/ml 70% Ethanol (v/v)	12 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	20 mg/ml Methanol	20 µg/ml

2.2.2 Anzucht und Zellernte

Die aerobe Anzucht der *E. coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium, wobei zur Selektion die entsprechenden Antibiotika zugegeben wurden. Als Kulturgefäße dienten sterile Zentrifugenröhrchen und Erlenmeyerkolben mit und ohne Schikane. Die Anzucht der Flüssigkulturen erfolgte bei 30 °C oder 37 °C auf Schüttlern bei ca. 200 rpm. Für die anaerobe Zellanzucht wurden 50 ml-Greiner-Röhrchen verwendet. Das Zellwachstum wurde durch

Messung der optischen Dichte (OD_{600}) mit einem UV/Vis-Spektrophotometer verfolgt. Die Zellernte erfolgte entweder in einer Tischzentrifuge (13000 rpm, 30 s), in der Hettich *Universal 30 RF*-Zentrifuge (3800 x g, 10 min, 4 °C) oder in der Sorvall *RC-5C PLUS* (6800 x g, 10 min, 4 °C). Beimpfte Agar-Platten wurden aerob bei 30 °C oder 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.3 Stammhaltung

E. coli-Stämme wurden auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen kultiviert. Nach Inkubation bei 30 °C oder bei 37 °C erfolgte die Lagerung der Platten bei 4 °C. Spätestens alle vier Wochen wurden die Stämme auf frische Platten überimpft.

Von allen Stämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden Kulturen der spätexponentiellen Wachstumsphase 1:1 mit LB-Medium/30% Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

2.3 Molekulargenetische Arbeiten

2.3.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Da es für die Arbeit mit DNA notwendig ist vorhandene DNasen zu inaktivieren, wurden alle hitzebeständigen Geräte und Lösungen bei 121 °C autoklaviert. Alle hitzelabilen Lösungen wurden sterilfiltriert.

2.3.2 Miniplasmidpräparation

Zur Gewinnung von reiner Plasmid-DNA für verschiedene molekulargenetische Techniken wurde ein *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) oder ein *peq Gold Plasmid Miniprep Kit* (peqlab Biotechnologie, Erlangen) verwendet.

Die Plasmidpräparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 50 µl H_2O_{bidest} von der Silicagel-Membran der Säule eluiert und bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.3 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Flachbett-Elektrophoresekammern. Für die Trennung von großen Fragmenten wurde eine Agarosekonzentration von 1% (w/v) eingesetzt. Für kleinere Fragmente betrug die Agarosekonzentration 2% (w/v).

Als Elektrophorese-Puffer diente TAE-Puffer [40 mM Tris/Acetat pH 8,0, 1 mM EDTA]. Die Agarose wurde unter Kochen in TAE-Puffer gelöst und das Gel gegossen.

Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0.2 Volumina 6 x *Sample Buffer* (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Die aufgetragene Probenmenge betrug bei analytischen Gelen 5-15 µl und bei präparativen Gelen 30-80 µl. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-120 V ohne Stromlimitierung bis zur gewünschten Auftrennung.

Das Gel wurde anschließend in einer Ethidiumbromid-Lösung [1 µg Ethidiumbromid/ml TAE-Puffer] 10 - 30 min geschwenkt, um die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen.

Zur Bestimmung der Größe linearer DNA-Fragmente dienten die Marker *1kb-DNA-Ladder* und *DNA-Ladder-Mix* (beide Fermentas, St. Leon-Rot).

2.3.4 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10-20 µl (analytisch) und 50-100 µl (präparativ). Als Inkubationspuffer dienten die vom Hersteller der Enzyme mitgelieferten Puffer, die 10x konzentriert waren. Pro µg DNA wurden 10 U Restriktionsendonuklease zugegeben und der Ansatz in der Regel 1 - 3 Stunden bei der für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert. Die Überprüfung auf vollständige Spaltung erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (2.3.3).

2.3.5 Reinigung und Konzentrierung von DNA

DNA-Fragmente wurden mittels des *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) gereinigt. Dabei adsorbiert die DNA bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silicagel-Membran, während Verunreinigungen (z.B. Enzyme) ungehindert passieren können. Es wurde nach dem mitgelieferten Protokoll vorgegangen und die DNA mit dem gewünschten Volumen an sterilem H₂O_{bidest} eluiert.

Diese Methode diente zur Reinigung präparativer Restriktionen und von PCR-Produkten.

2.3.6 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu reinigenden DNA-Fragmente wurden in einem präparativen, ca. 1 cm dicken, Agarosegel aufgetrennt. Unter UV-Licht wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel geschnitten. Die Elution der DNA aus dem Agarosegelstück erfolgte mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden).

2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl im mitgelieferten Ligationspuffer mit 1 U T4-DNA Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) bei 16 °C für 4-16 Stunden. 2-5 µl des Ligationsansatzes wurden für die Transformation verwendet.

2.3.8 Transformation nach der CaCl₂-Methode

2.3.8.1 Herstellung von CaCl₂-kompetenten Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl₂-Methode wurde eine Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes herangezogen, 1:100 in 70 ml frisches LB-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.3 – 0.5 bei 37 °C wachsen gelassen. Die Zellen wurden geerntet (3600 x g, 10 min, 4 °C) und in 21 ml 70 mM CaCl₂/ 20 mM MgSO₄ resuspendiert. Dieser Ansatz wurde 30 - 45 min auf Eis inkubiert.

Es folgten wieder eine Zentrifugation (3600 x g, 10 min, 4 °C), eine Resuspendierung in 7 ml 70 mM CaCl₂/ 20 mM MgSO₄ und eine 30–45minütige Inkubation auf Eis. Die kompetenten Zellen wurden zu einer Endkonzentration von 25% (v/v) mit Glycerin versetzt, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen bis zu ihrer Verwendung erfolgte bei -80 °C.

2.3.8.2 Herstellung von superkompetenten Zellen nach Sambrook & Russell (2001)

Superkompetente Zellen wurden meist vom Klonierungsstamm XL1Blue benötigt und vor allem zu dessen Transformation mit Ligations- oder PCR-Produkten verwendet.

Zur Herstellung der superkompetenten Zellen wurde eine Vorkultur des entsprechenden Stammes in SOB-Medium (250-300 rpm, 37 °C) herangezogen und 1:100 in 250 ml SOB-Medium überführt. Diese Kultur wurde unter leichtem Schütteln bei 18-25 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0.55 wurden die Zellen zunächst 10 min auf Eis gekühlt und anschließend geerntet (3600 x g, 10 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 80 ml eiskaltem sterilfiltrierten Transformationspuffer [55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 10 mM PIPES pH 6.7) resuspendiert und wieder pelletiert (3600 x g, 10 min, 4 °C). Die Zellen wurden dann in nur noch 20 ml Transformationspuffer aufgenommen, mit 1.5 ml DMSO versetzt, 10 min auf Eis inkubiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.3.8.3 Transformation

100 µl der CaCl₂-kompetenten oder der superkompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 2-10 µl der DNA (Ligation, Plasmid-Präparation) 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock (60-120 s, 42 °C) und eine sofortige Abkühlung auf Eis (2 min). Anschließend wurden 750 µl auf 42 °C vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und die Zellen mindestens 60 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Selektion dienten LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen. Nach der Ausplattierung der Zellen auf diesen Platten erfolgte eine Inkubation über Nacht je nach Stamm bei 37 °C bzw. 30 °C.

2.3.9 PCR (Polymerasen-Kettenreaktion)

2.3.9.1 Standard-PCR

Diese Methode wurde verwendet um ausreichende Mengen von DNA-Abschnitten zur Klonierung aus Plasmiden oder aus genomischer *E. coli* -DNA zu amplifizieren. Die dafür verwendeten Primer, die von Metabion (Martinsried) bezogen wurden, sind in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4: Primer für Standard-PCR (Die Schnittstellen sind unterstrichen.)

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
<i>hip</i> -Anfang-NdeI-F	GGAGATATAC <u>CATATG</u> TCCGATAAGC	Amplifikation des <i>precursor-hip</i> -Fragmentes aus pEXH5 (bindet am Translationsstart)
<i>hip</i> -Ende-XhoI-R	GATCAGCCGGCCT <u>CGAGG</u> TCCAGGAAGC	Amplifikation des <i>precursor-hip</i> -Fragmentes aus pEXH5 (bindet am Stopcodon)
<i>ftsH</i> -HindIII-F	CGAA <u>AAGCTT</u> GAAAGATGCTGGATATAGAGTATCC	Amplifikation von <i>ftsH</i> aus genomischer <i>E. coli</i> -DNA
<i>ftsH</i> -XhoI-R	TTACT <u>CGAGG</u> CCTAACTGCTCTGACATGGTGTAC	Amplifikation von <i>ftsH</i> aus genomischer <i>E. coli</i> -DNA
<i>phoA</i> -Anfang-NdeI-F	GGAGAAAAT <u>CATATG</u> AAACAAAGCACTATTGCA	Amplifikation des <i>precursor-phoA</i> -Fragmentes aus genomischer <i>E. coli</i> -DNA (bindet am Translationsstart)
<i>phoA</i> -Ende-HindIII-R	GTTT <u>AAGCTT</u> GAGCGTATGCGCCGTGATCTG	Amplifikation von <i>phoA</i> -Fragmenten aus genomischer <i>E. coli</i> -DNA (bindet am Ende von <i>phoA</i>)
<i>phoA</i> -mature-XhoI-F	CGGACACT <u>CGAGAT</u> GCCTGTTCTGGAAAACCGG	Amplifikation des murenen <i>phoA</i> -Fragmentes aus genomischer <i>E. coli</i> -DNA (bindet am Start des murenen <i>phoA</i>)

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
<i>phoA</i> -mature-NdeI-F	CACCACATATGCCTGTTCTGGAAAACCG	Amplifikation des murenen <i>phoA</i> -Fragmentes aus genomischer <i>E. coli</i> -DNA (bindet am Start des murenen <i>phoA</i>)
<i>ftsH</i> -NcoI-forward	GAGTGCCATGGCGAAAAACCTAATACTCTGGC	Amplifikation des <i>ftsH</i> -Fragmentes aus pEXH5- <i>ftsH</i> -H6- <i>tac</i> , zur Klonierung von pBAD- <i>ftsH</i>
<i>ftsH</i> -XbaI-reverse	AGTTATTCTAGAGCGGTGGCAGCAGCCAATC	Amplifikation des <i>ftsH</i> -Fragmentes aus pEXH5- <i>ftsH</i> -H6- <i>tac</i> , zur Klonierung von pBAD- <i>ftsH</i>
Plac-PstI-forward	TCCGACTGCAGCGAATGGTGCAAACCTTTCG	Amplifikation des Fragmentes <i>Ptac-hip</i> aus pEXH5- <i>tac</i> , zur Klonierung von pABS- <i>tatABC-hip-tac</i>
<i>hip</i> -BamHI-reverse	TAGGCGGATCCCGAGGCCCTTTCGTCTTC	Amplifikation des Fragmentes <i>Ptac-hip</i> aus pEXH5- <i>tac</i> , zur Klonierung von pABS- <i>tatABC-hip-tac</i>
<i>hip-phoA</i> -NcoI-F	TATACCCATGGCCGATAAGCCAATCAGCAA	Amplifikation des Fragmentes <i>hip^{SP}-phoA</i> aus pEX- <i>hip^{SP}-phoA-tac</i> , zur Umklonierung in den Vektor pBAD22
<i>hip-phoA</i> -XbaI-R	CTCATTCTAGACAGCTTATCATCGATAAGC	Amplifikation des Fragmentes <i>hip^{SP}-phoA</i> aus pEX- <i>hip^{SP}-phoA-tac</i> , zur Umklonierung in den Vektor pBAD22
<i>nsp1p</i> -NcoI-F	GGGATCCATGGCAAACCCAGCCCTC	zur Klonierung verschiedener FG- <i>repeats</i> in pBAD-H6 (pBAD- <i>pspA</i> -H6), bindet am Start von <i>nsp1p</i> in pNsp1-FF18
<i>nsp1p</i> -NdeI-F	TGGGACATATGGCAAACCCAGCCCTCTC	zur Klonierung verschiedener FG- <i>repeats</i> in pEX-H6- <i>tac</i> (pEX- <i>pspA</i> -H6- <i>tac</i>), bindet am Start von <i>nsp1p</i> in pNsp1-FF18
<i>nsp1p</i> -BamHI-F	CATATGGATCCCATGGCAAACCA	zur Klonierung verschiedener FG- <i>repeats</i> in pBW- <i>hip</i> -H6-BamHI fusioniert an <i>hip^{SP}</i> , bindet am Start von <i>nsp1p</i> in pNsp1-FF18
<i>nsp1p</i> -XhoI-R1	CCAAACTCGAGACTGGGGTTGTGTTAGTTG	zur Amplifikation von einem <i>nsp1p</i> -Fragment mit 1 FG- <i>repeat</i> aus pNsp1-FF18, bindet am Ende des 1. <i>repeats</i>
<i>nsp1p</i> -XhoI-R2	CCGAACTCGAGGGCAGGCTTAGAAGTAGCAC	zur Amplifikation von einem <i>nsp1p</i> -Fragment mit 2 FG- <i>repeats</i> aus pNsp1-FF18, bindet am Ende des 2. <i>repeats</i>
<i>nsp1p</i> -XhoI-R3	CCAAACTCGAGAGCTGGTTTTGAGGAATTATC	zur Amplifikation von einem <i>nsp1p</i> -Fragment mit 3 FG- <i>repeats</i> aus pNsp1-FF18, bindet am Ende des 3. <i>repeats</i>
<i>nsp1p</i> -XhoI-R5	CCAAACTCGAGTGCCGGCTTGAGGTTTCATTG	zur Amplifikation von einem <i>nsp1p</i> -Fragment mit 5 FG- <i>repeats</i> aus pNsp1-FF18, bindet am Ende des 5. <i>repeats</i>
<i>nsp1p</i> -XhoI-R7	CCGAACTCGAGGGCAGGCTTAGAAGTAGCAC	zur Amplifikation von einem <i>nsp1p</i> -Fragment mit 7 FG- <i>repeats</i> aus pNsp1-FF18, bindet am Ende des 7. <i>repeats</i>
<i>nsp1p</i> -XhoI-R10	CCAAACTCGAGTGCCGGCTTGAAGTTTCATTG	zur Amplifikation von einem <i>nsp1p</i> -Fragment mit 10 FG- <i>repeats</i> aus pNsp1-FF18, bindet am Ende des 10. <i>repeats</i>

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
<i>nsp1p</i> -XhoI-R17	CCAA <u>ACTCGAG</u> CGCTGGCTTGCTCGTATCAC	zur Amplifikation von einem <i>nsp1p</i> -Fragment mit 17 FG-repeats aus pNsp1-FF18, bindet am Ende des 17. repeats
<i>gfp</i> -SacII-F-st	AGGGCC <u>CGCGG</u> GTAAGGAGAAGAAGCTTTTCAC	zur Amplifikation des <i>gfp</i> -Fragmentes aus pTB-DG
<i>gfp</i> -XhoI-R-st	GTCTG <u>CTCGAG</u> TATTGTATAGTTCATCCATGCC	zur Amplifikation des <i>gfp</i> -Fragmentes aus pTB-DG

Das Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes betrug 50 µl und enthielt die folgenden Komponenten:

- 1 x *Pfu*-Polymerase-Puffer
- 10 - 100 ng dsDNA-*template*
- je 10 - 20 pmol Primer F / R
- 10 nmol dNTP's
- 5% (v/v) DMSO
- 2.5 U *Pfu*-DNA-Polymerase

Die Reaktionen wurden in einem *Trio-Thermoblock*TM (Biometra, Göttingen) nach folgendem Schema durchgeführt:

Schritt 1:	30 s	95 °C		
Schritt 2:	30 s	95 °C	Denaturierung	
Schritt 3:	1 min	50-65 °C	Annealing	
Schritt 4:	1-2 min	68 °C	Extension	
Schritt 5:		4 °C		

Die *Annealing*-Temperatur wurde dem entsprechendem Primer-Paar angepasst. Die Dauer der Extension richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes (ca. 1 min/ 1kb).

2.3.9.2 *Qulk-Change*TM Site-Directed-Mutagenese (Stratagene, La Jolla, USA)

Diese Methode wurde zum Austausch einzelner Aminosäuren, kurzer Aminosäuresequenzen oder zur Einführung von Restriktionsschnittstellen in Vektoren verwendet. Die zu mutierende Sequenz muss in einem doppelsträngigen, *supercoiled* Vektor vorliegen, der aus einem *dam*⁺-*E. coli*-Stamm isoliert wird. Zwei zueinander komplementäre Mutagenese-Primer, je einer für einen Strang, dienen der Einführung der jeweiligen Mutation. Die Verlängerung der Oligonukleotid-Primer erfolgt mit Hilfe der *Pfu*-DNA-Polymerase in einer PCR-Reaktion. Anschließend wird der Ansatz mit DpnI behandelt. Die Endonuklease DpnI verdaut spezifisch

methylierte und hemimethylierte DNA, so dass nur die *dam*-methylierte parentale DNA abgebaut wird. Dieser Ansatz kann ohne Ligation zur Transformation eingesetzt werden, da der lineare Vektor in *E. coli* rezirkularisiert wird.

In Tabelle 2.5 sind die verwendeten Oligonukleotid-Primer aufgelistet. Sie wurden nach Anleitung des *Quik-Change™ Site-Directed-Mutagenese-Protokolls* ausgewählt und von Metabion (Martinsried) bezogen.

Tabelle 2.5: Verwendete Mutagenese-Primer (Die auszutauschenden Basen sind unterstrichen dargestellt.)

Name	Sequenz (5'→ 3')	Verwendung
<i>hip-sec-avoid-RR-F</i> <i>hip-sec-avoid-RR-R</i>	CAACCTGGTCGGT <u>CGCCGC</u> ACCGCCCGTGCC GGCACGGGCGGTGC <u>GCG</u> ACCGACCAGGTTG	Austausch von GF > RR in der c-Region des HiPIP-Signalpeptids
<i>hip-sec-avoid-DD-F</i> <i>hip-sec-avoid-DD-R</i>	CAACCTGGTCGGT <u>GACGAC</u> ACCGCCCGTGCC GGCACGGGCGGT <u>GTCGTC</u> ACCGACCAGGTTG	Austausch von GF > DD in der c-Region des HiPIP-Signalpeptids
<i>hip-h-region F</i> <i>hip-h-region-R</i>	CCGCCATCCCG <u>GCGGCC</u> AACCTGGTCGGTTTC GAAACCGACCAGGTT <u>GGCCGC</u> CGGGATGGCGG	Austausch von MI > AA in der h-Region des HiPIP-Signalpeptids
<i>hip-KK-F</i> <i>hip-KK-R</i>	CGATAAGCCAATCAGCAAGAGCA <u>AAGAAA</u> GACGCTGTCAAAGTGATG CATCACTTTGACAGCGT <u>TTTCTT</u> GCTTTGCTGATTGGCTTATCG	Austausch des RR-Motivs in KK im HiPIP-Signalpeptid
<i>hip-n-NdeI-F</i> <i>hip-n-NdeI-R</i>	GTCCGATAAGCCAATCCATATGAGCCGTCGTGACGCTG CAGCGTCACGACGGCTCATATGGATTGGCTTATCGGAC	Einführung einer NdeI-Schnittstelle im HiPIP-Signalpeptid
<i>hip-BamHI-F</i> <i>hip-BamHI-R</i>	CGCCAATGCCGTGGATCCGGACGATGCGACCG CGGTGCGATCGTCCGGATCCACGGCATTGGCG	Einführung einer BamHI-Schnittstelle am Anfang des muren Bereiches von <i>hip</i>
Nsp1p-Aust-1F Nsp1p-Aust-1R	GCTGGTGCTACTTCTAAG <u>AATATCAT</u> TCTCATTCCGGTGCTAAGC GCTTAGCACCGAATGAGAT <u>GATAT</u> TCTTAGAAGTAGCACCAGC	Einführung von hydrophoben Aminosäuren in den 3. FG-repeat von Nsp1p
Nsp1p-Aust-2F Nsp1p-Aust-2R	CTTCTAAGAATATCATCTT <u>ATTGATT</u> GCTAAGCCAGAAGAAAAG CTTTCTTCTGGCTTAGCAATCAAT <u>AAGAT</u> GATATTCTTAGAAG	Einführung von hydrophoben Aminosäuren in den 3. FG-repeat von Nsp1p
Nsp1p-Hy-5-F1 Nsp1p-Hy-5-R1	CAAGATGGAACGGCTAAGA <u>AATATCAT</u> TCTCTTTGGTGCCAAGCCC GGGCTTGGCACCAAGGAGAT <u>GATAT</u> TCTTAGCCGTTCCATCTTG	Einführung von hydrophoben Aminosäuren in den 5. FG-repeat von Nsp1p
Nsp1p-Hy-5-F2 Nsp1p-Hy-5-R2	CGGCTAAGAATATCATCTT <u>ATTGATT</u> GCCAAGCCCGGGAG CTCCGCGGGCTGGCAATCAAT <u>AAGAT</u> GATATTCTTAGCCG	Einführung von hydrophoben Aminosäuren in den 5. FG-repeat von Nsp1p

Der Reaktionsansatz entsprach dem der Standard-PCR (2.3.9.1). Die Reaktionen wurden ebenfalls in einem *Trio-Thermoblock™* (Biometra, Göttingen) nach folgendem Schema durchgeführt:

Schritt 1:	30 s	95 °C		
Schritt 2:	30 s	95 °C	Denaturierung	← 17x
Schritt 3:	1 min	50-65 °C	Annealing	
Schritt 4:	15 min	68 °C	Extension	
Schritt 5:		4 °C		

Nach Beendigung der Reaktion wurde, durch die Zugabe von 20 U DpnI und eine Inkubation des Ansatzes für mindestens 2 h bei 37 °C, die parentale DNA abgebaut. Es wurde immer ein Kontrollansatz ohne dNTP's von der PCR bis zur Transformation mitgeführt. Somit konnte sichergestellt werden, dass der DpnI-Verdau vollständig erfolgte und keine parentale DNA transformiert wurde. Es schloss sich eine Transformation von ca. 5 µl des Ansatzes in superkompetente XL1Blue-Zellen an.

2.3.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde zur Kontrolle von Nukleotidbasen-Austauschen oder Klonierungen eingesetzt und erfolgte durch das Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977) mit Hilfe eines automatisierten Laser-Fluoreszenz-Sequenzierers. Bei dieser Methode verlängert die *Thermo SequenaseTM* DNA-Polymerase einen Oligonukleotid-Primer, der einen stabilen basengepaarten Komplex mit der Matrizen-DNA bildet, in 5'→3'-Richtung. Durch den zufälligen Einbau von ddNTP's wird das Kettenwachstum abrupt beendet. Dadurch entstehen unterschiedlich lange, komplementäre Kopien des zu sequenzierenden Matrizenstranges, die in einem Sequenzierungsgel elektrophoretisch getrennt werden. Die ddNTP's sind kovalent mit jeweils unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoffen verbunden, so dass die Banden, automatisiert durch Fluoreszenzspektroskopie, anhand der letzten eingebauten Base, nachgewiesen werden können. Die verwendeten Sequenzierungsprimer sind in Tabelle 2.6 aufgelistet.

Tabelle 2.6: Sequenzierungsprimer

Name	Sequenz (5'→ 3')	Bemerkung
hip-Seq-F	GACTCACTATAGGGGAATTG	<i>hip-forward</i> -Sequenzierungsprimer (bindet nach der XbaI-Schnittstelle)
hip-Seq-R	CCGTTTCGTCCCAATCCG	<i>hip-reverse</i> -Sequenzierungsprimer (bindet vor der HindIII-Schnittstelle)
Ptac vor XbaI-F	GCGCCGACATCATAACGGTTCTG	Sequenzierungsprimer für alle pEX-...-tac-Plasmide (bindet genau über der XbaI-Schnittstelle)
T7-Promotor	TAATACGACTCACTATAGG	T7-Promotor-Sequenzierungsprimer (<i>downstream</i>)
T7-Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	T7-Terminator-Sequenzierungsprimer (<i>upstream</i>)
PhoA-Fusion-Seq-R	AGCGGCAGTCTGATCACC	zur Sequenzierung <i>upstream</i> einer <i>phoA</i> -Fusion (bindet am Anfang vom murenen Teil von <i>phoA</i>)
Felix3_seq (GFP-R)	AGTGGAGAGGGTGAAGGTGATG	zur Sequenzierung <i>upstream</i> einer <i>gfp</i> -Fusion (bindet am Anfang von <i>gfp</i>)

Für die Sequenzierung wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

- 6 µl Plasmid-DNA (ca. 0.6 µg)
- 2 µl entsprechender Sequenzierungsprimer (20 pmol)
- 2 µl *ABI-Sequencing-Mix* (GE Healthcare, München)

Die Reaktion wurde in einem *Trio-Thermoblock*TM (Biometra, Göttingen) nach folgendem Schema durchgeführt:

Schritt 1:	30 s	95 °C	Denaturierung	← 32x
Schritt 2:	15 s	50 °C	Annealing	
Schritt 3:	2 min	60 °C	Extension	
Schritt 4:		4 °C		

Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von 2 µl 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 60 µl 95% (v/v) Ethanol gefällt. Durch Zentrifugation (20 min, 13000 rpm, RT) wurde die DNA sedimentiert. Nach Waschen des Pellets mit 70% (v/v) Ethanol wurde wieder zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, RT). Nach Abnahme des Überstandes wurde die DNA luftgetrocknet und bei -20 °C aufbewahrt. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurden die Proben in 4 µl Gelpuffer [5 Volumina Formamid und 1 Volumen 25 mM EDTA (pH 8.0)] aufgenommen und 2 min bei 90 °C denaturiert.

Die Sequenzreaktionen wurden am Laser-Fluoreszenz-Sequenzierers *ABI 377 Version 4.0* (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt). aufgetrennt.

Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe des im Internet frei verfügbaren Programmes *Chromas Lite* (Griffith University, Southport, Australia, <http://www.technelysium.com/au>) ausgewertet. Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe von *Clustal W* vom *European Biotechnology Institut* (EBI) erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration (z.B. von INV) wurde eine modifizierte Methode nach Lowry *et al.* (1951) angewandt. Folgende Lösungen waren notwendig:

- Reagenz A: 1 % Kupfersulfat
- Reagenz B: 2 % Natrium-Kaliumtartrat
- Reagenz C: 0.2 M Natriumhydroxid
- Reagenz D: 4 % Natriumcarbonat

Reagenz E wurde täglich frisch im Verhältnis A : B : C : D = 49 : 49 : 1 : 1 hergestellt. 200 µl einer geeigneten Verdünnung der Proteinprobe wurden mit 1 ml Lösung E versetzt und 15 min

bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Folin-Ciocalteau-Reagenz (verdünnt 1:1 mit H₂O_{bidest}) zugegeben und die Ansätze weitere 30 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Die Extinktion der Probe wurde bei 750 nm bestimmt.

Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurden Verdünnungen einer BSA-Stammlösung (0-200 µg/ml), gleichzeitig mitgeführt. Aus diesen Messdaten konnte eine Eichgerade erstellt werden.

2.4.2 SDS-PAGE

Für die Auftrennung der Proteine wurden lineare diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele nach Lämmli (1970) verwendet.

Die Polyacrylamid-Elektrophorese wurde mit Hilfe eines *Mini-Protean® 3 Elektro-phoresis-Systems* (Bio-Rad, Hercules, USA) durchgeführt. Die Größe der Gele (ohne Sammelgel) betrug 8.4 x 5.5 x 0.075 cm. Es kamen Trenngele mit einer Konzentration von 15%T¹ zum Einsatz, die mit einem ca. 1 cm langen Sammelgel (4.5%T) zur Auftrennung und Konzentration der Proteinproben überschichtet waren.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der Gelgemische für SDS-PAGE (für 2 Gele)

	Trenngel (15%T)	Sammelgel (4.5%T)
30%T Acrylamid, 0.8%C Bis-Acrylamid	6 ml	0.75 ml
H ₂ O	3 ml	3 ml
1.5 M Tris/HCl pH 8.8, 0.3% SDS	3 ml	-
0.5 M Tris/HCl pH 6.8, 0.4% SDS	-	1.25 ml
10% (w/v) APS	100 µl	50 µl
TEMED	10µl	5 µl

Das Gelgemisch des Trenngels wurde nach Mischen luftblasenfrei zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit H₂O überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das H₂O wieder entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegeben und ein Kamm zur Formung von Geltaschen eingesetzt.

Nach der vollständigen Polymerisation des Gels, wurde es in die Elektrophoresekammer eingesetzt, der Anoden- und Kathodenraum der Kammer mit Elektrodenpuffer [25 mM Tris/HCl pH 6.8, 0.2 M Glycin, 0.1 % (w/v) SDS] gefüllt und der Kamm entfernt.

Die Proteinproben wurden mindestens im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer [8 ml 0.5 M Tris/HCl pH 8.8, 10 ml Glycerin, 1.54 mg DTT, 2 g SDS, 12 mg Bromphenolblau, ad 50 ml H₂O]

¹ [%T] = Gesamt-Monomerkonzentration (w/v)

versetzt und 10 min bei 90 °C denaturiert. Nach der Abkühlung der Proben auf Eis erfolgte die Auftragung aufs Gel mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Als Protein-Marker wurde der *Prestained Protein Ladder* (10 - 180 kDa) von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 V ohne Stromlimitierung durchgeführt.

2.4.3 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden mindestens 30 min oder über Nacht leicht schwenkend in Coomassie-Färbelösung [0.2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 0.05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 20% Methanol, 10% Essigsäure] inkubiert. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte durch Schwenken in Entfärbelösung [20% Methanol, 10% Essigsäure].

2.4.4 Western-Blot

2.4.4.1 Semi-Dry-Blot

Der Transfer der Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte mittels einer *Trans-Blot® Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad, Hercules, USA) auf eine Nitrocellulosemembran *porablot NCP*, 0.45 µm Porengröße (Machery-Nagel, Düren).

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde 10 min in *Towbin*-Puffer [25 mM Tris, 170 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol] equilibriert. Sechs Lagen *Whatman-3MM*-Filterpapier und die Nitrocellulosemembran wurden auf Gelgröße zugeschnitten und mit *Towbin*-Puffer getränkt. Auf die Anode der Blot-Apparatur wurden drei Filterpapiere, die Nitrocellulosemembran, das Gel und abschließend wieder drei Filterpapiere luftblasenfrei gestapelt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei max. 15 V und 250 mA für 60 min.

2.4.4.2 Proteinnachweis durch Immunodetektion

Dieser Nachweis beruht auf der Reaktion eines primären Antikörpers (AK) mit seinem Antigen und der Bindung eines sekundären AK an diesen Komplex. Eine an den sekundären AK gekoppelte Peroxidase ermöglicht den Nachweis der gebildeten Immunokomplexe durch eine Farb- oder Lichtreaktion.

Die Nitrocellulosemembran mit den transferierten Proteinen wurde zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für mindestens 3 h oder über Nacht in PBS [137 mM NaCl, 3 mM KCl, 4 mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄] mit 5% Magermilchpulver bei RT geschwenkt. Nach dem Waschen der Membran, 3 x 5 min in PBS-Tween [0.5% Tween20 in PBS], folgte eine

einstündige Inkubation mit dem primären AK in der jeweiligen Verdünnung (Tabelle 2.8) in PBS-BSA [0.5% BSA in PBS]. Falls die Verdünnungen der AK zur mehrmaligen Verwendung aufbewahrt werden sollten, wurde der Lösung noch 0.02% (w/v) NaN_3 zugesetzt. Anschließend wurde die Membran wieder 3 x 5 min in PBS-Tween gewaschen, um ungebundene AK zu entfernen. Dann wurde die Membran 1 h mit dem Anti-IgG-HRP-Konjugat (1:1000 in PBS) inkubiert. Den folgenden Waschschrritten (2 x 10 min in PBS-Tween, 10 min in PBS) schloss sich der Nachweis der gebildeten Immunokomplexe an.

Tabelle 2.8: Verwendete Antikörper

Antikörper	AK-Typ	Antigen	Verdünnung	Herkunft
Anti-HiPIP-AK Anit-His ₆ -AK	Kaninchen-IgG (Serum)	<i>precursor-HiPIP</i>	1:1000	Laborbestand
Anti-TatA-AK	Kaninchen-IgG (Serum)	TatA (TatE)	1:2000	Tim Yahr (Iowa City, USA)
Anti-TatB-AK	Kaninchen-IgG (Serum)	TatB	1:2000	Tim Yahr (Iowa City, USA)
Anti-TatC-AK	Kaninchen-IgG (Serum)	TatC	1:2000	Matthias Müller (Freiburg)
Anti-PhoA-AK*	Kaninchen-IgG (Serum)	PhoA	1:2500	Rockland (Gilbertsville, USA)
Anti-GFP-AK	Kaninchen-IgG (Serum)	GFP	1:2000	ABR (Golden, USA)
Goat Anti-Rabbit IgG-HRP-Konjugat	(sekundärer AK)	Kaninchen-IgG	1:5000	Bio-Rad (Hercules, USA)

*) Die PhoA-AK-Lösung wurde mit gekochtem Zellaufschluß von CC118 (Δ *phoA*) durch Schütteln bei 4 °C über Nacht gereinigt, um cross-Reaktionen zu minimieren.

• Lichtreaktion (ECL-System)

Zum Nachweis der Immunokomplexe wurden auf die Nitrocellulosemembran gleichzeitig je 5 ml frische Detektionslösung A [100 mM Tris/HCl pH 8.0, 2.5 mM Luminol (Stammlösung in DMSO), 0.4 mM p-Cumarsäure (Stammlösung in DMSO)] und Detektionslösung B [100 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.018% (v/v) H_2O_2] gegeben, durch Schwenken gemischt und 1-2 min inkubiert. Anschließend wurde die feuchte Membran in eine aufgeschnittene Klarsichthülle gelegt und ein Film (*Chemiluminescent Detection Film*, Roche Diagnostics, Mannheim) 20 s bis 2 min exponiert. Der Film wurde bis zum Sichtbarwerden der Banden entwickelt, kurz in Wasser gespült, ca. 30 s fixiert und abschließend gründlich mit Wasser gewaschen (Fixierer T32-5 und Entwickler T32 von Calbe Chemie, Calbe).

• Farbreaktion mit 4-Chloro-1-naphtol

Zur Herstellung der Färbelösung wurden 30 mg 4-Chloro-1-naphtol in 5 ml eiskaltem Ethanol gelöst und mit 45 ml PBS gemischt. Nach der Zugabe von 20 µl 30% H₂O₂ wurde die Lösung auf den Blot gegeben. Die Färbung wurde nach 2-10 min durch kurzes Schwenken in H₂O gestoppt, und die Membran wurde luftgetrocknet.

2.4.5 Fraktionierung von Periplasma, Membranen und Cytoplasma ohne Lysozym

Von einer bis zur mittelspäten exponentiellen Phase gewachsenen *E. coli*-Kultur wurden 50 OD₆₀₀-Einheiten durch Zentrifugation (3800 x g, 10 min, 4 °C) geerntet. Die Zellen wurden in 20 ml TES [10 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 20% (w/v) Saccharose] resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder durch Zentrifugation (3800 x g, 10 min, 4 °C) sedimentiert, in 1 ml eiskalter 5 mM MgSO₄-Lösung aufgenommen und 20 min auf Eis inkubiert. Durch die folgende Zentrifugation (23000 x g, 10 min, 4 °C) konnte die Periplasmafraktion (Überstand) von der Cytoplasma-/Membranfraktion (Pellet) getrennt werden. Die Periplasmafraktion wurde vollständig abgenommen und das Pellet erneut in 1 ml 5 mM MgSO₄-Lösung aufgenommen. Es schloss sich eine Ultraschallbehandlung der auf Eis gekühlten Proben mit einem Desintegrator über 1 min bei 80% Leistung an. Durch eine Zentrifugation (23000 x g, 10 min, 4 °C) wurden Zelltrümmer abgetrennt. 900 µl des Überstandes (Cytoplasmafraktion und Membranen) wurden einer Ultrazentrifugation (130000 x g, 20 min, 4 °C) unterzogen. Der Überstand (Cytoplasmafraktion) wurde vollständig abgenommen und die Membranen in 900 µl 5 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert.

Alle Fraktionen wurden bis zu den enzymatischen Bestimmungen oder der Aufnahme von UV/Vis-Spektren auf Eis aufbewahrt. Proben für die SDS-PAGE wurden, sofort nach der Präparation, entnommen, 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei -20 °C gelagert. Durch das schnelle Einfrieren der Proben sollte ein möglicher Proteinabbau durch Proteasen verhindert werden.

2.4.6 Herstellung invertierter Vesikel

Die Herstellung der invertierten Vesikel (INV) erfolgte in Anlehnung an Müller & Blobel (1984) und Alami *et al.* (2002).

Das Zellmaterial wurde in 1 ml/g Feuchtgewicht EDTA-Vesikel-Puffer [50 mM Tris/Acetat pH 7.5, 25 mM Saccharose, 1 mM DTT, 1 mM EDTA] aufgenommen und mit DNase (1 mg/ml) versetzt. Die Zellsuspension wurde dann in einer *French-Press* bei 55 MPa (8000 psi) in zwei Durchgängen aufgeschlossen. Dieser Zellaufschluss wurde auf 35 ml mit EDTA-Vesikel-Puffer verdünnt, und die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (3800 x g, 20 min, 4 °C)

sedimentiert. Der Überstand wurde einer Ultrazentrifugation (83000 x g, 2 h, 4 °C) unterzogen. Das Zellpellet (Membranfraktion) wurde in 2 ml Vesikel-Puffer [50 mM Tris/Acetat pH 7.5, 25 mM Saccharose, 1 mM DTT] resuspendiert. Es schloss sich eine weitere Zentrifugation (23000 x g, 20 min, 4 °C) an, um eventuell noch vorhandene Zelltrümmer abzutrennen. Von der Suspension wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt und die Proteinkonzentration auf ca. 10 A₂₈₀-Einheiten eingestellt. Die INV-Suspension wurde wenn nötig in Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Die genaue Proteinkonzentration mit der Methode nach Lowry (2.4.1) bestimmt.

2.4.7 Fluoreszenz-Quenching

Die Methode des Fluoreszenz-Quenchings wurde verwendet um zu bestimmen, ob die nach 2.4.6 präparierten INV, in der Lage waren, einen Protonen-Gradienten über der Membran aufzubauen. Es ließen sich auch Aussagen darüber treffen, wie stabil dieser Δ pH war. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass die relative Fluoreszenz von Acridinorange (3,6-Bis-Dimethylaminoacridin) mit steigendem pH-Wert abnimmt.

Der Fluoreszenz-Quenching-Assay wurde bei 20 °C in einer Fluoreszenz-Quarzküvette in einem Spektrofluorometer *SFM 25* (Kontron Instruments, Eching) in einem Ansatz von 2 ml durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 494 nm. Die Fluoreszenzemission wurde bei 540 nm detektiert und mittels der Software *WIND (32-bit spectroscopy software for windows)*, Kontron Instruments, Eching) auf dem angeschlossenen PC dargestellt.

Der Assay enthielt 30 mM Kreatinphosphat, 100 µg/ml Kreatin-Kinase, 2 µM Acridinorange und 50 µg/ml INV (Proteinkonzentration) in STM-Puffer [50 mM Tris/Acetat pH 7.5, 250 mM Saccharose, 5 mM MgSO₄]. Dieser Ansatz wurde bei 20 °C vorinkubiert. Nachdem sich das Signal stabilisiert hatte, wurde mit der Zugabe von 1.25 mM ATP der Aufbau des Δ pH durch ATPasen gestartet. Das Entstehen des Δ pH ließ sich über die abnehmende Fluoreszenz verfolgen.

Der Δ pH über der Vesikelmembran konnte durch Zugabe von 100 µM des Entkopplers CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon) aufgehoben werden.

2.4.8 Präparation von HiPIP-Inclusion Bodies

Der *E. coli*-Stamm BL21 DE3 pEXH5 wurde in 1 l LB-Medium mit Ampicillin (100 mg/l) im Erlenmeyerkolben mit Schikane bei 37 °C unter Schütteln bei 220 rpm angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 1.0 wurde die Expression von HiPIP durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 3 h unter denselben Bedingungen wurden die Zellen geerntet (6800 x g, 20 min, 4 °C) und mit 50 ml kaltem 100 mM Tris/HCl pH 8.0 und einer Spatelspitze DNase

gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (3800 x g, 20 min, 4 °C) wurden die Zellen in 30 ml 100 mM Tris/HCl pH 8.0 aufgenommen und durch zwei *French-Press*-Passagen bei 138 MPa (20000 psi) aufgeschlossen. Durch die sich anschließende Zentrifugation (18000 x g, 20 min, 4 °C) wurden die *Inclusion Bodies* und auch Zelltrümmer sedimentiert. Dieses Sediment wurde zweimal durch Resuspension in 30 ml 100 mM Tris/HCl pH 8.0 und Zentrifugation (18000 x g, 20 min, 4 °C) gewaschen. Die *Inclusion Bodies* wurden anschließend durch 1 h Rühren bei 4 °C in 20 ml IB-Puffer [50 mM Tris/HCl pH 8.0, 2 mM DTT, 8 mM Harnstoff] gelöst. Bei der folgenden Zentrifugation wurden Zelltrümmer und andere unlösliche Bestandteile abgetrennt. Der klare Überstand enthielt das ungefaltete HiPIP in Lösung. Dieser wurde in Aliquots zu je 1 ml in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.4.9 Faltung und Rekonstitution von *precursor*-HiPIP (Brüser *et al.*, 2003)

Durch Zugabe von Fe²⁺ und S²⁻ unter reduzierenden und anoxischen Bedingungen bindet in Harnstoff gelöstes, ungefaltetes *precursor*-HiPIP seinen Cofaktor und nimmt seine native Konformation ein.

Dazu wurden 2 ml der HiPIP-*Inclusion Body*-Präparation (2.4.8) mit 8 ml IB-Puffer [50 mM Tris/HCl pH 8.0, 2 mM DTT, 8 mM Harnstoff] verdünnt. Der IB-Puffer wurde vor der Zugabe von DTT 30 min mit N₂ begast. Unter weiterer N₂-Begasung wurden 5 ml einer 0.7 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂-Lösung [in 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 2 mM DTT, N₂-begast] vorsichtig zugegeben und unter Schwenken gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT, unter weiterer N₂-Begasung, wurden 1 ml einer 20 mM NaS₂-Lösung [in 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 2 mM DTT, N₂-begast] zugegeben. Der Ansatz wurde verschlossen und gut gemischt.

Nach 20 min bei RT wurde die Lösung auf eine mit 20 mM Tris/HCl pH 9.0 equilibrierte *DEAE-Sephrose-(CL6B)*-Säule [2 ml Matrix-Volumen] (Pharmacia/Amersham, Freiburg) gegeben. Das gefaltete *precursor*-HiPIP bindet unter diesen Bedingungen nicht an diesem Ionenaustauscher, wird aber in der Front leicht konzentriert. Überschüssige Sulfide und kontaminierende Proteine dagegen können abgetrennt werden. Nach der Beladung der Säule wurde weiter 20 mM Tris/HCl pH 8.0 aufgegeben, bis die gelbliche HiPIP-Fraktion die Säule vollständig verlassen hatte.

Die HiPIP-Fraktion wurde zum Wechsel des Puffers über Nacht gegen 10 mM Tris/HCl pH 8.8 dialysiert. Dafür wurden Dialyseschläuche [*cut-off* ca. 10 kDa] *Servapor* (Serva, Heidelberg) mit einem Durchmesser von 16 mm verwendet. Diese wurden zuvor 10 min in H₂O_{bidest} gekocht und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Die HiPIP-Lösung wurde anschließend auf eine mit 20 mM Tris/HCl pH 8.8 equilibrierte *DEAE-Sephrose-(CL6B)*-Säule gegeben. Bei pH 8.8 bindet gefaltetes *precursor*-HiPIP auf der Säule.

Nachdem mit 4 ml 10 mM Tris/HCl pH 8.8 gewaschen wurde, konnte HiPIP (gelb-grüne Fraktion) sehr konzentriert mit 50 mM Ammoniumacetat pH 6.8 von der Säule eluiert werden. Anschließend erfolgte wieder eine Dialyse zum Wechsel des Puffers bei 4°C über Nacht, dieses Mal gegen 500 ml STM-Puffer [50 mM Tris/Acetate pH 7.5, 250 mM Saccharose, 5 mM MgSO₄]. Die Lagerung des gefalteten *precursor*-HiPIP in STM-Puffer erfolgte auf Eis.

2.4.10 Proteinreinigung über eine His-tag-Säule

Die Proteinreinigung über ein His-tag wurde eingesetzt um gereinigte Proteine für massenspektroskopische Analysen, Circular dichroismus oder Analytische Ultrazentrifugation zu erhalten.

Das entsprechende Zellmaterial wurde in 2 ml/g Feuchtwicht Equilibrierungspuffer [20 mM Tris/HCl pH 8.0, 400 mM NaCl, 5 mM Imidazol] resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels *French-Press* (2 Durchgänge, 138 MPa). Es schloss sich eine Zentrifugation (23000 x g, 20 min, 4°C) zum Abtrennen der Zelltrümmer an. Mit dem Überstand wurde eine zuvor mit 20 ml Equilibrierungspuffer equilibrierte His-tag-Säule (*Poly-Prep® Chromatography Columns* (Biolabs, Hercules, USA) mit einem Matrixvolumen von 2 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) beladen. Anschließend wurde die Säule mit 40 ml Waschpuffer [20 mM Tris/HCl pH 8.0, 400 mM NaCl] gewaschen, bevor mit dem Elutionspuffer [20 mM Tris/HCl pH 8.0, 400 mM NaCl, 250 mM Imidazol] eluiert wurde. Es wurden Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen und anschließend in einer SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt und über Nacht zur Entfernung des Imidazols gegen 10 mM Tris/HCl pH 8.0 dialysiert (2.4.9).

2.4.11 Circular dichroismus (Aufnahme eines CD-Spektrums)

Grundlage des Circular dichroismus ist die unterschiedliche Absorption von rechts- und linkszirkular-polarisiertem Licht im UV/Vis-Bereich an asymmetrischen optischen Zentren. Die Differenz der Absorptionen ($A_L - A_R$) in einem Wellenlängenbereich bildet das CD-Spektrum. Durch die Absorption der Peptidbindung zwischen 180 und 240 nm, ist es mit dieser Methode möglich, Sekundärstrukturen von Proteinen zu analysieren. Die verschiedenen Sekundärstrukturen zeigen charakteristische Verläufe von CD-Spektren (Kelly & Price, 2000).

Um Aussagen über die Struktur der FG-repeats treffen zu können, wurden am CD-Spektrometer *J-810* (Jasco International Co., Tokio, Japan) Spektren im Bereich 190 - 250 nm aufgenommen. Das gereinigte Protein lag in einer Konzentration von ca. 0.5 mg/ml in 20 mM K-Phosphat pH 7.0 vor. Es wurde eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0.5 mm eingesetzt. Um die Absorption von Sauerstoff bei unter 200 nm zu vermeiden wurde der Strahlengang stets mit Stickstoff begast.

Gemessen wurde die Elliptizität (Θ) in mdeg. Folgende Umrechnungen wurden verwendet um die benötigte molare Elliptizität und die mittlere residuelle Elliptizität (Θ_{MRW} = *mean residue weight ellipticity*) zu berechnen.

$$\Theta = 3300 (A_L - A_R)$$

$$[\Theta] = \Theta \cdot 100 \cdot M_r / (c \cdot d)$$

$$\Theta_{MRW} = [\Theta] / N$$

Θ	-	Elliptizität [deg]
$[\Theta]$	-	molare Elliptizität [deg·cm ² ·dmol ⁻¹]
Θ_{MRW}	-	mittlere residuelle Elliptizität [deg·cm ² ·dmol ⁻¹]
M_r	-	durchschnittliche Masse einer Aminosäure im Protein [g/mol]
c	-	Konzentration des Proteins [mg/ml]
d	-	Schichtdicke der Küvette [cm]
N	-	Zahl der Aminosäuren im Protein

2.4.12 *In vitro*-Targeting-Assay

Um Interaktionen von HiPIP mit der Cytoplasmamembran *in vitro* zu untersuchen, wurden Targeting-Assays mit *in vitro*-gefaltetem *precursor*-HiPIP und invertierten Vesikeln (INV) durchgeführt. Diese Assays fanden in der Regel in einem Gesamtvolumen von 200 μ l in STM-Puffer [50 mM Tris/Acetat pH 7.5, 250 mM Saccharose, 5 mM MgSO₄] statt und enthielten:

2 mM DTT
 1 mg/ml BSA
 5 mM ATP (Jeweils 10 mg ATP wurden mit 72.5 μ l 0.5 M Tris/HCl pH 9.0 auf pH 8.0 neutralisiert.)
 30 mM Kreatinphosphat
 0.1 mg/ml Kreatin-Kinase
 0.5 mg/ml INV (Proteinkonzentration)
 3 μ M *precursor*-HiPIP

Der Ansatz wurde 1 min bei 37 °C in einem Tischinkubator *Thermomixer 5436* (Eppendorf, Hamburg) inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von HiPIP gestartet wurde. Für die Dauer von 15 min wurde bei 37 °C leicht geschüttelt und anschließend auf Eis abgekühlt. Durch eine Zentrifugation (130000 x g, 15 min, 4 °C) wurden die INV vom Überstand getrennt. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteine mit 15% TCA (Trichloressigsäure) gefällt. Das Pellet wurde mit STM-Puffer gewaschen und anschließend in 30 μ l SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Analyse des mit der Membran interagierten HiPIP erfolgte mittels SDS-PAGE (2.4.2) und Western-Blot (2.4.4).

2.4.13 *In vitro*-Protease-Assay

Dieser Assay wurde verwendet um zu testen, ob die Proteaseaktivität, speziell gegenüber Tat-Substraten (HiPIP) erhöht war. Für diese Assays wurde Zellextrakt der entsprechenden Zellen benötigt. Zur Gewinnung wurden 100 OD₆₀₀-Einheiten einer bis zur mittelspäten exponentiellen Phase gewachsenen *E. coli*-Kultur durch Zentrifugation (3800 x g , 10 min, 4 °C) geerntet und in 5 ml 50 mM Tris/Acetat pH 7.5 aufgenommen. Der Aufschluß erfolgte durch einen Durchgang in der *French-Press* (55 MPa). Es schloß sich eine *low-speed*-Zentrifugation (15000 rpm, 10 min, 4 °C) zur Abtrennung der Zelltrümmer an.

Ein Assay (Gesamtvolumen 500 µl in 50 mM Tris/Acetat pH 7.5) enthielt:

- 300 µl Zellextrakt
- 30 mM Kreatinphosphat
- 0.1 mg/ml Kreatin-Kinase
- 5 mM ATP (Jeweils 10 mg ATP wurden mit 72.5 µl 0.5 M Tris/HCl pH 9.0 auf pH 8.0 neutralisiert.)
- ca. 3 µM *precursor*-HiPIP

Die Ansätze wurden unterschiedlich lange bei 37 °C inkubiert und anschließend in einer SDS-PAGE analysiert.

2.4.14 *Blue-Native*-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE)

Die Methode der *Blue-Native*-PAGE (nach Schägger & von Jagow, 1991) wurde zur Analyse von Membranproteinkomplexen verwendet.

Zur Gewinnung der Membranfraktion wurden 100 OD₆₀₀-Einheiten einer bis zur mittelspäten exponentiellen Phase gewachsenen *E. coli*-Kultur durch Zentrifugation (3800 x g , 10 min, 4 °C) geerntet und in 5 ml Aufschlußpuffer [20% (w/v) Saccharose, 50 mM Bis-Tris/HCl pH 7.0, 10 mM MgCl₂] aufgenommen. Eventuell wurden dem Aufschlußpuffer noch 0.5 mg/ml DNase und 1 mM β-Mercaptoethanol (zur Herstellung von Thiol-reduzierenden Bedingungen) zugesetzt. Direkt nach Zugabe von 2 mM PMSF zur Inaktivierung von Proteasen erfolgte der Aufschluß durch einen Durchgang in der *French-Press* (55 MPa). Es schloß sich eine *low-speed*-Zentrifugation 15000 rpm, 10 min, 4 °C) zur Abtrennung der Zelltrümmer an. 1.5 ml des erhaltenen Überstandes wurden einer Ultrazentrifugation (130000 x g, 20 min, 4 °C) unterzogen. Das erhaltene Membranpellet wurde in 100 µl Aufschußpuffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration in dieser Suspension betrug ca. 3 mg/ml.

Zur Solubilisierung wurde das milde Detergenz Digitonin (Fluka, Buchs, Schweiz) verwendet. Der Solubilisierungspuffer [Aufschlußpuffer + 1% (w/v) Digitonin] wurde zur Lösung des Digitonins 5 min bei 98 °C inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt und zur Abtrennung von ungelösten Rückständen des Digitonins zentrifugiert (22000 x g, 5 min, 4 °C). Zur

Solubilisierung wurde der Membransuspension Solubilisierungspuffer im Verhältnis 1:1 zugegeben und die Probe 1 h bei 4 °C leicht geschüttelt. Zur Abtrennung von nichtsolubilisierten Membranen schloß sich eine weitere Ultrazentrifugation (130000 x g, 20 min, 4 °C) an. Der Überstand wurde nun 1:10 mit BN-Probenpuffer [5% Coomassie G-250, 100 mM Bis-Tris/HCl pH 7.0, 500 mM Aminocaprinsäure 30% (w/v) Saccharose] versetzt und konnte dann auf das Gel aufgetragen werden. Zur Auftrennung der solubilisierten Membranen wurden Minigelgele mit einem Gradienten von 5% - 13.5% (Tabelle 2.9) verwendet.

Tabelle 2.9: Zusammensetzung der Gelgemische für die Minigradientengele für die BN-PAGE (für 2 Gele)

	Trenngel (5%T)	Trenngel (13.5%T)	Sammelgel (4.%T)
49.5%T Acrylamid, 1.5%C Bis-Acrylamid	0.212 ml	0.573 ml	0.242 ml
3 x Gelpuffer [150 mM Bis-Tris/HCl pH 7.0, 1.5 M 6-Aminocaprinsäure]	0.7 ml	0.7 ml	1.0 ml
75% (v/v) Glycerol	0.14 ml	0.56 ml	-
H ₂ O	1.028 ml	0.247 ml	1.72 ml
TEMED	2 µl	2 µl	6 µl
5% (w/v) APS	11 µl	11 µl	32 µl
Total	2.1 ml	2.1 ml	3 ml

Der Gellauf erfolgte zunächst ca. 3h bei 100V mit dem Anodenpuffer [0.5 M Bis-Tris/HCl pH 7.0] und einem Kathodenpuffer [0.05 M Tricin, 15 mM Bis-Tris/HCl pH 7.0] in dem 0.01% (w/v) Coomassie G-250 gelöst waren. Nachdem die blaue Front die Hälfte des Gels erreicht hatte, wurde der Coomassie-enthaltende Kathodenpuffer durch einen Coomassie-freien Kathoden-puffer ausgetauscht und die angelegte Spannung auf 30 V, über Nacht, erniedrigt. Als Marker wurden das Ferritin-Dimer (880 kDa), das Ferritin-Monomer (440 kDa) und die Aldolase (158 kDa) verwendet.

Das BN-Gel wurde anschließend in 50 ml Towbin-Puffer (2.4.4) mit 0.1% SDS für 10 min inkubiert. Dann erfolgte der Transfer der Proteinkomplexe auf eine PVDF-Membran *porablot PVDF*, 0.2 µm Porengröße (Machery-Nagel, Düren) mittels der Methode des *Semi-Dry Blot* (2.4.4.1). Der Nachweis der Proteine in den Komplexen erfolgte mit dem ECL-System (2.4.4.2).

2.4.15 Pull-down

Die Methode des *Pull-down* wurde verwendet um solubilierte Membranproteinkomplexe zu isolieren und Interaktionen direkt nachzuweisen. Hierfür wurde eine Kombination aus *Strep-tag*, *Strep-tag-AK* und *Strep-Tactin® Superflow®* (IBA, Göttingen) verwendet.

Zu 400 μ l mit Digitonin solubilierten Membranproteinen (2.4.14) wurden 2 μ l Strep-tag-AK gegeben und der Ansatz unter Schwenken über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurden 40 μ l der Protein-G-Sepharose-Suspension dazugegeben und weitere 2 h geschwenkt.

Es schloss sich eine Zentrifugation (1 min, 1000 x g, 4 °C) an. Damit wurden die Sepharose-beads mit den über die Antikörper gebundenen Membranproteinkomplexen, die ein Strep-tag-Protein enthalten, sedimentiert. Die beads wurden zweimal mit Waschpuffer [20% (w/v) Saccharose, 50 mM Bis-Tris/HCl pH 7.0, 10 mM MgCl₂, 0.5% Digitonin] gewaschen, in 100 ml SDS-Probenpuffer (2.4.2) aufgenommen und für 10 min unter Schütteln auf 95 °C erhitzt. Die so erhaltenen Proteinproben konnten dann mittels SDS-PAGE (2.4.2) und sich anschließendem Western Blot (2.4.4) analysiert werden.

2.5 Versuche zum Zellwachstum

2.5.1 Wachstumsversuche in Flüssigmedien

Zur Messung der Optischen Dichte wachsender Bakterienkulturen wurde das Klett-Summerson-Colorimeter (Klett MFG, New York, USA) eingesetzt. Zur Kalibrierung des Gerätes wurde unbeimpftes Medium (Nullwert) verwendet. Der Vorteil dieser Methode bestand darin, dass durch die Verwendung von Seitenarmkolben bei der Kultivierung der Bakterien keine Probenentnahme zur Messung notwendig war und somit Temperaturschwankungen verhindert werden konnten.

Für die Zelltrübungsmessungen wurden Seitenarmkolben mit 15 ml LB 1:100 mit der entsprechenden Vorkultur beimpft und bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase bei 37 °C im Wasserbad unter ständigem Schütteln mit 200 rpm inkubiert. Das Zellwachstum wurde kontinuierlich verfolgt.

2.5.2 SDS-Sensitivitätsmessung (Ize *et al.*, 2003)

Ize *et al.* (2003) zeigten, dass Zellen bei denen der Tat-Transport der Amidasen (AmiA und AmiC) gestört ist, sensitiver auf SDS reagieren als ein WT-Stamm, wobei die genaue Ursache dieser Beobachtung nicht geklärt ist. Dieser Test kann z.B. verwendet werden um Komplementationen von Tat-Komponenten nachzuweisen.

Für die SDS-Sensitivitätsmessung wurde LB-Medium mit verschiedenen Konzentrationen an SDS (0 – 4% (w/v)) hergestellt und sterilfiltriert. Jeweils 5 ml jeder Konzentration wurden mit 100 μ l einer gut durchmischten Kultur angeimpft und 3h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die OD₆₀₀ von allen Kulturen gemessen und durch den OD₆₀₀-Wert bei 0% SDS dividiert, da dieser Wert einem Wachstum von 100% gleichgesetzt wurde.

2.5.3 Wachstum auf TMAO

Das Verfolgen des Wachstums auf TMAO ist ein weiterer Test, der zeigt, wie gut der Tat-Transport funktioniert. Den Zellen wird bei anaeroben Bedingungen TMAO als einzige Energiequelle zur Verfügung gestellt. Da die TMAO-Reduktase (TorA) ein Tat-Substrat ist, ist ein Wachstum nur möglich, wenn TorA Tat-abhängig transportiert wurde.

Von den zu testenden Stämmen wurden Übernachtskulturen auf M9-Minimalmedium angezogen. Vollständig mit TMAO-Medium [M9-Minimalmedium + 1 μ M Na₂SeO₃ + 0.1M TMAO (Trimethyl-amin-N-oxid-dihydrat C₃H₉NO x 2 H₂O)] gefüllte Hungate-Röhrchen (ca. 15 ml) wurden mit 100 μ l der Übernachtskultur beimpft, fest verschlossen und bei 37° C inkubiert. Das Wachstum wurde über mehrere Tage mittels des Spektrophotometers *Spectronic 20+* (Milton Roy, Ivyland, USA) bei 600 nm verfolgt.

2.6 Enzymologische Methoden

2.6.1 PhoA-Aktivität (nach Brickman & Beckwith, 1975)

Die periplasmatische PhoA-Aktivität wurde mit ganzen Zellen bestimmt. 1 ml einer Zellkultur mit einer OD₆₀₀ von 0.3 - 0.7 wurde auf Eis gekühlt und pelletiert (13000 rpm, 30 s, RT). Das Zellpellet wurde in 2 ml gekühltem 1 M Tris/HCl pH 8.0 resuspendiert. Mit 1 ml der Zellsuspension wurde die OD₆₀₀ bestimmt. Zu dem Rest wurden 100 μ l der PNPP-Lösung [0.4% (w/v) PNPP (4-Nitrophenylphosphat) in 1 M Tris/HCl pH 8.0] gegeben und damit die Reaktion gestartet. Sobald die Ansätze eine tiefgelbe Färbung zeigten, wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l 1 M K₂HPO₄ gestoppt. Die Zellen wurden anschließend sedimentiert (13000 rpm, 2 min, RT) und vom Überstand wurde die Extinktion bei 420 nm bestimmt. Die PhoA-Aktivität wurde analog zu der Aktivität von β -Galaktosidase [Miller-units] nach folgender Formel berechnet:

$$\text{PhoA-Aktivität [units]} = 1000 \cdot \text{OD}_{420} / (\text{Reaktionszeit [min]} \cdot 0.5 \text{ ml} \cdot \text{OD}_{620})$$

2.6.2 Nachweis der TMAO-Reduktase in nativen Gelen (nach Silvestro *et al.*, 1989)

Für den Enzymnachweis der TMAO-Reduktase im Periplasma wurden 10 μ l einer Periplasmafraktion (2.4.5), 1:1 gemischt mit Beschwererlösung [250 μ l 0.5 M Tris/HCl pH 6.8, 460 μ l 86% Glycerin, 1 mg Bromphenolblau, ad 4 ml H₂O], auf ein natives Gel (Tabelle 2.10) aufgetragen. Als Laufpuffer wurde ein SDS-freier Puffer [25 mM Tris/HCl pH 8.8, 0.2 M Glycin] verwendet und eine Spannung von 100 V an die Gelkammer angelegt.

Tabelle 2.10: Zusammensetzung der Gelgemische für ein natives Gel (für 2 Gele)

	Trenngel (7.5%T)	Sammelgel (4.5%T)
30%T Acrylamid, 2.7%C Bis-Acrylamid	3 ml	0.75 ml
H ₂ O	6 ml	3 ml
1.5 M Tris/HCl pH 8.8	3 ml	-
0.5 M Tris/HCl pH 6.8	-	1.25 ml
10% (w/v) APS	100 µl	50 µl
TEMED	10µl	5 µl

Während des Laufes wurden 30 ml einer Methylviologen-Lösung [100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer pH 6.5, 2 mM Methylviologen] mindestens 1 h mit N₂ begast. Dazu wurden 15 µl einer 50 mM Natrium-Dithionit-Lösung gegeben. In diesem Puffer wurde das Gel für 10 min bis zu seiner Blaufärbung inkubiert. Anschließend wurde es in eine Schale mit 10 ml N₂-begaster TMAO-Lösung [100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer pH 6.5, 2 M TMAO] überführt. Sobald Banden sichtbar wurden, wurde das Gel fotografiert oder gescannt.

2.7 Mikroskopische Techniken

2.7.1 Durchlichtmikroskopie

Für die Durchlichtmikroskopie wurde ein *Axioskop 50* (Carl Zeiss, Jena) mit einem 63x oder 100x Ölimmersionsobjektiv verwendet. Bilder wurden mit einer aufmontierten *Camedia C-4040 Zoom* Digitalkamera (Olympus, Hamburg) aufgenommen.

2.7.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Zur Betrachtung der Verteilung der GFP-Fusionen innerhalb der Zelle wurde ein *Carl Zeiss Axiovert 100M/LSM510* mit einem *C-Apochromat 63x/1.20 W Korr.* Wasserimmersionsobjektiv (Carl Zeiss, Jena) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem *Zeiss LSM Image Browser Version 3.2* (Carl Zeiss, Jena).

Während in einem konventionellen Lichtmikroskop alle Punkte in einem Bild gleichzeitig (parallel) beobachtet werden, wird die Probe in einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) punktweise (seriell) bestrahlt. Ein Bild entsteht, indem ein fokussierter Laserstrahl die Probe zeilenweise abrastert. Ein *photomultiplier* detektiert dabei pixelweise die emittierte Strahlung. Dies ist der eigentliche Scanvorgang. Das komplette Bild wird erst vom Computer durch Aneinanderreihen der einzelnen Pixelinformationen zusammengesetzt. Um Bildrauschen zu vermindern, werden alle Bildpunkte eines Bildes meist mehrfach gescannt und

die erhaltenen Werte automatisch von der Software gemittelt. Da dadurch die Aufnahme eines Bildes aber auch entsprechend länger dauert, ist es entscheidend, dass die Zellen absolut ruhig liegen. Zur Fixierung der Zellen wurden Agar-Objektträger (*agar slides*) vorbereitet. Es wurde LB-Medium mit 2% (w/v) Agarose auf einen Objektträger pipettiert (100 µl) und rasch ein zweiter Objektträger leicht versetzt aufgelegt. Vor Gebrauch wurden diese vorsichtig voneinander getrennt, so dass man einen Objektträger mit einem sehr dünnen Agaroseüberzug erhält, auf den dann die Probe (3 - 5 µl einer LB-Kultur) aufpipettiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt wurde.

2.8 Geräte und Chemikalien

2.8.1 Geräte

Photometer

UV/Vis-Spektrophotometer	<i>Uvikon 941</i>	Kontron Instruments (Mailand, Italien)
Spektrophotometer	<i>Smart Spec™ 3000</i>	Bio-Rad (Hercules, USA)
Spektrophotometer	<i>Spectronic 20+</i>	Milton Roy (Ivlyland, USA)

Elektrophorese

Flachbett-Elektrophorese	<i>Easy Cast™ Elektrophoresis System</i>	OwL Scientific (Portsmouth, USA)
Protein-Elektrophorese	<i>Mini-Protean® 3 Elektrophoresis-Systems</i>	Bio-Rad (Hercules, USA)

Zellaufschluß

<i>French Press</i>	<i>French® Pressure Cell Press</i>	SLM Instruments (Silver Springs, USA)
Ultraschall / Desintegrator	<i>UW 60</i>	UniEquip Gerätebau (Martinsried)

Stromversorgung

<i>Power Supply</i>	<i>PHERO-stab.300</i>	Biotec-Fischer (Reiskirchen)
<i>Power Supply</i>	<i>E452 / EV243</i>	Consort (Turnhout, Belgien)

Sonstige

Western Blot	<i>Trans-Blot® Semi-Dry Elektrophoretic Transfer Cell</i>	Bio-Rad (Hercules, USA)
Thermoblock	<i>Trio-Thermoblock™</i>	Biometra (Göttingen)
Thermomixer	<i>KTMR-133</i>	HLC (Bovenden)
Videodokumentationssystem	<i>TFX-20.M</i>	MWG Biotech (München)

2.8.2 Zentrifugen und Rotoren

In Tabelle 2.11 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Zentrifugen und die entsprechenden Rotoren mit ihren wichtigsten Eigenschaften aufgelistet.

Tabelle 2.11: Verwendete Zentrifugen und Rotoren

Zentrifuge	Rotor	max. Volumen	r_{mittel} in mm	rpm_{max}	RCF in x g (für r_{mittel} bei rpm_{max})
Sorvall Discovery M120 SE	S100-AT4	6 x 3 ml	37.1	31 600	414 000
Sorvall RC-5C Plus	SLA-3000	6 x 500 ml	95.4	11 000	13 000
	SS-34	8 x 35 ml	69.9	20 000	31 000
Beckman L8-60M	SW 40 Ti	6 x 14 ml	112.7	40 000	202 000
	SW 28	6 x 39 ml	118.2	28 000	104 000
	TY 65	8 x 8 ml	85.1	65 000	402 000
Hettich Universal 30-RF	1424A	4 x 50 ml	137	5 000	3 800
	1412	24 x 2 ml	92	15 000	23 000

Außerdem wurden die Tischzentrifugen 5415C (Eppendorf, Hamburg) und Z160M (Hermle Labortechnik, Wehningen) mit variabler Geschwindigkeit von 1000 - 14000 rpm (ca. 110 - 22000 x g) eingesetzt.

2.8.3 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht gesondert aufgeführt, wurden die Chemikalien von folgenden Firmen bezogen:

- Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
- Carl Roth (Karlsruhe)
- AppliChem (Darmstadt)
- Serva (Heidelberg)
- Merck (Darmstadt)

Restriktionsendonukleasen und DNA-modifizierende oder -amplifizierende Enzyme stammen von den Firmen:

- Fermentas (St. Leon-Rot)
- New England BioLabs (Frankfurt)
- Stratagene (La Jolla, USA)
- Roche (Grenzach-Wyhlen).

3 ERGEBNISSE

3.1 Tat-Transport von fehlgefalteten HiPIP-Derivaten

Das *High potential iron-sulfur protein* (HiPIP) aus *Allochromatium vinosum* wird schon seit einigen Jahren als Modell-Tat-Substrat eingesetzt. HiPIP ist mit 9 kDa eines der kleinsten bekannten Tat-Substrate (Brüser *et al.*, 1997). Es konnte bereits gezeigt werden, dass HiPIP von *E. coli* als Tat-Substrat akzeptiert wird und in Abhängigkeit von *tatABC* ins Periplasma transportiert wird (Brüser *et al.*, 2003).

Allochromatium vinosum gehört zu der Familie der Chromatiaceae, phototrophen Schwefelbakterien aus der Gruppe der γ -Proteobacteria. HiPIP hat seine Aufgabe als Elektronencarrier im Periplasma und überträgt neben dem Cytochrom c_8 die Elektronen vom bc_1 -Komplex zurück zum photosynthetischen Reaktionszentrum (Verméglio *et al.*, 2002).

Die Struktur von HiPIP ist bekannt (Abb. 3-1). HiPIP bindet über vier Cysteine ein $[4Fe-4S]^{2+/3+}$ -Cluster (Carter *et al.*, 1974; Banci *et al.*, 1995). Die Biogenese von Fe/S-Cofaktoren findet bei Bakterien generell im Cytoplasma statt (Mühlenhoff & Lill; 2000). Das *precursor*-HiPIP muss also im Cytoplasma den Cofaktor binden und nimmt dadurch seine native Konformation ein (Natarajan & Cowan, 1997). Dann erst erfolgt die Translokation ins Periplasma, die aufgrund der Cofaktor-Bindung nur Tat-abhängig erfolgen kann.

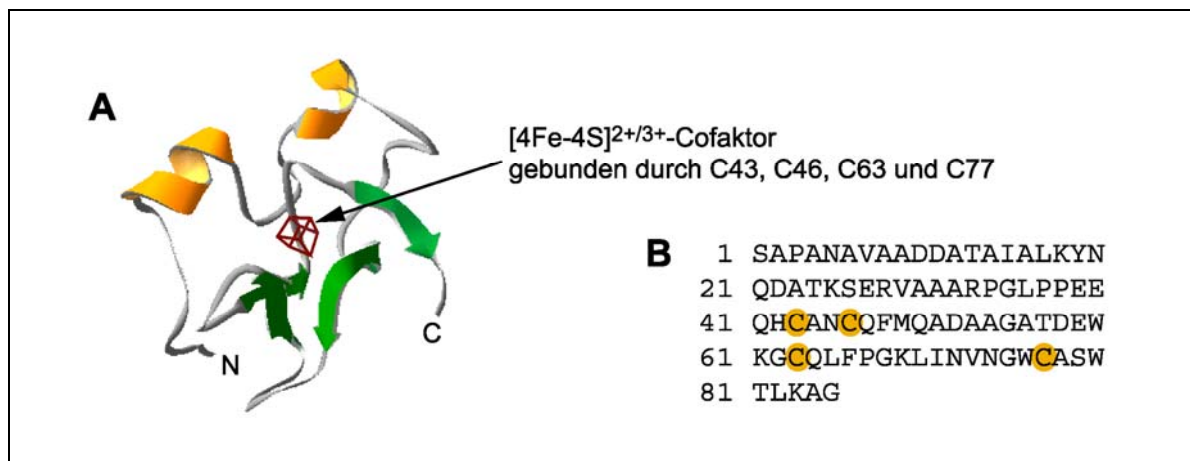


Abb. 3-1: Das *High potential iron-sulfur protein* (HiPIP) aus *Allochromatium vinosum*. A) Kristallstruktur des murenen HiPIPs (Carter *et al.*, 1974). B) Aminosäuresequenz des murenen HiPIPs; markiert wurden die Cofaktor-bindenden Cysteine.

Da die vier Cysteine für die Bindung des Cofaktors und damit auch für die Faltung des Proteins verantwortlich sind, müsste es theoretisch möglich sein durch die Entfernung der Cysteine ein ungefaltetes Tat-Substrat zu erhalten.

Im Laborbestand waren bereits Konstrukte vorhanden, bei denen die betreffenden Cysteine schrittweise gegen Aspartate ausgetauscht waren (Andreas Post, Diplomarbeit 2003). Somit bot es sich an, mit Hilfe dieser zu versuchen, folgende Fragen zu klären. (1) Kann man durch

einen schrittweisen Austausch der Cysteine in Aspartat ein stabiles ungefaltetes Tat-Substrat erhalten? (2) Wird dieses ungefaltete HiPIP noch Tat-abhängig transportiert, oder wird der Transport durch eine Qualitätskontrolle der Faltung verhindert? (3) Wird das ungefaltete Tat-Substrat eventuell vom Sec-System erkannt und ins Periplasma transportiert?

Das *hip*-Gen mit den entsprechenden Aminosäureaustauschen lag auf dem Plasmid pEXH5-*tac* unter der Kontrolle des konstitutiven *tac*-Promotors vor. Zunächst wurde getestet, ob mit allen Plasmiden *hip* exprimiert wurde. Dazu wurden aus dem Stamm MC4100 mit dem entsprechenden Plasmid in kleinem Maßstab *Inclusion bodies* (IB's) gereinigt (Abb. 3-2A). Es konnten IB's mit allen Austauschen gereinigt werden, wodurch gezeigt war, dass sich alle HiPIP-Derivate exprimieren ließen. Auffällig war das veränderte Laufverhalten der Proteine im SDS-Gel durch die eingeführten negativ geladenen Aspartate.

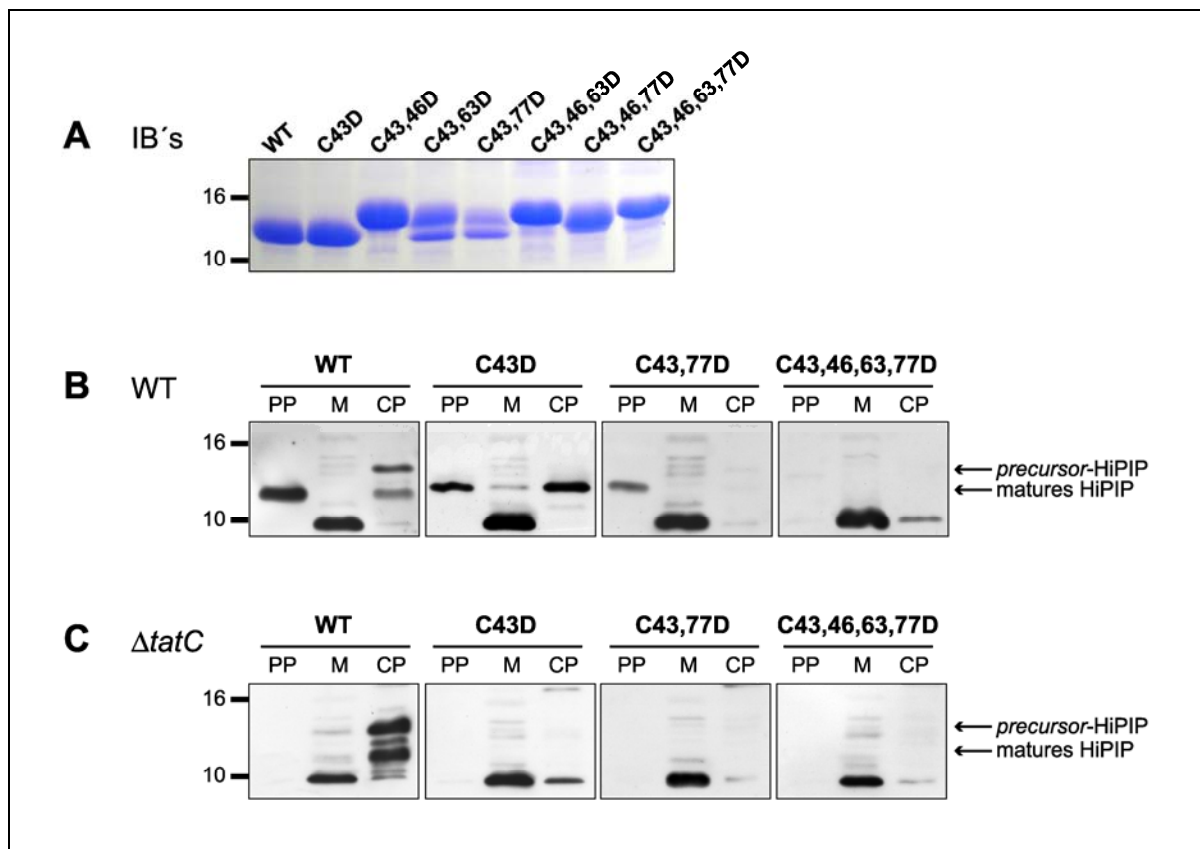


Abb. 3-2: *In vivo*-Transport der HiPIP-Derivate mit den durch Aspartat ersetzten Cysteinen. A) IB's aus MC4100 pEXH5-*tac* mit den angegebenen Aminosäureaustauschen (Induktion mit 1mM IPTG; 15% SDS-PAGE; Coomassie-gefärbt). B) Fraktionierung von Periplasma (PP), Cytoplasma (CP) und Membranen (M) von MC4100 pABS-*tatABC* pEXH5-*tac* mit den angegebenen Aminosäureaustauschen (15% SDS-PAGE, Western Blot, Detektion mit α -HiPIP-Serum und ECL-System). C) Fraktionierung von Periplasma (PP), Cytoplasma (CP) und Membranen (M) von B1LKO (Δ *tatC*) pEXH5-*tac* mit den angegebenen Aminosäureaustauschen (15% SDS-PAGE, Western Blot, Detektion mit α -HiPIP-Serum und ECL-System).

Anschließend wurde anhand einer Fraktionierung von Periplasma, Cytoplasma und Membranen getestet, ob die HiPIP-Derivate mit den schrittweise ausgetauschten Cysteinen noch transportiert wurden (Abb. 3-2B). Mit WT-HiPIP ließ sich *precursor* im Cytoplasma detektieren, sowie HiPIP von maturaer Größe, welches auf Abbau zurückzuführen ist. Aber ein großer Teil des

HiPIP's befand sich als matures Protein im Periplasma und wurde Tat-abhängig transportiert (Brüser *et al.*, 1997). Bei einer Laufhöhe von ca. 9 kDa wurde in der Membranfraktion deutlich eine Bande detektiert, die auf eine Kreuzreaktion des HiPIP-Antikörpers zurückzuführen ist. Diese Bande wurde auch detektiert, wenn kein *hip* exprimiert wurde. Eventuell erkennt der Antikörper die *twin-arginine*-Motive nicht abgebauter Signalpeptide anderer Tat-Substrate in der Membran, da auch das HiPIP-Signalpeptid erkannt wird.

Bei der Fraktionierung des Stammes mit dem HiPIP-Derivat, bei dem das Cystein-43 gegen Aspartat ausgetauscht wurde (C43D), zeigte sich, dass ein Cystein-Austausch keine große Veränderung zur Folge hatte. Das HiPIP-Derivat wurde transportiert, aber die Stabilität des *precursors* im Cytoplasma war leicht verringert. War zusätzlich auch noch das Cystein-77 ausgetauscht, ließ sich der *precursor* nicht mehr im Cytoplasma detektieren. Es befand sich aber matures Protein im Periplasma, welches über die Cytoplasmamembran transportiert wurde. Alle HiPIP-Derivate bei denen weitere Cystein-Austausche vorlagen, waren noch instabiler und konnten überhaupt nicht mehr detektiert werden (beispielhaft am 4er-Austausch gezeigt). Anscheinend vermitteln der Einbau des Cofaktors und die daraus resultierende korrekte Faltung erst die Stabilität von HiPIP im Cytoplasma. Beim HiPIP-Derivat C43D kann man nicht davon ausgehen, dass durch das Fehlen eines Cysteins das Protein ungefaltet vorliegt, weil im Cytoplasma ein Abbau auf mature Größe erfolgte. Das HiPIP-Derivat mit zwei fehlenden Cysteinen (C43,77D) wurde aber im Cytoplasma vollständig abgebaut, was darauf hindeutet, dass das Protein keine stabile Struktur mehr einnehmen kann.

Somit war unklar, ob der Transport von C43,77D über den Tat- oder den Sec-Weg erfolgte. Zur Klärung dieser Frage wurde die Fraktionierung in einem Δ *tatC*-Stamm wiederholt (Abb. 3-2C). WT-HiPIP wurde, wie zu erwarten war, nicht transportiert. Alle HiPIP-Derivate mit Cystein-Austauschen waren aber nicht mehr detektierbar. Anscheinend liegt im Δ *tatC*-Stamm eine erhöhte Proteaseaktivität vor. Um diese zu verringern, wurden Versuche, wie Variation der Wachstumsbedingungen und der Einsatz von Proteaseinhibitoren unternommen, die aber alle keine Erfolge brachten.

Um die erhöhte Proteaseaktivität im Δ *tatC*-Stamm zu umgehen, sollte durch die Mutation des RR-Motives der Tat-abhängige Transport gezeigt werden. Hierfür wurde mittels *QuikChange*TM-Mutagenese (Stratagene) und dem Primerpaar *hip*-KK-F/*hip*-KK-R das *twin-arginine*-Motiv im Signalpeptid aller HiPIP-Derivate gegen zwei Lysine ausgetauscht. Aber durch die hohe Instabilität der fehlgefalteten HiPIP-Derivate gelang es im Rahmen dieser Arbeit (siehe aber Kap. 4.3) nicht, den Tat-abhängigen Transport von C43,77D reproduzierbar nachzuweisen. Die ebenfalls bei den KK-HiPIP-Derivaten beobachtete Instabilität ließ aber vermuten, dass der Proteaseabbau direkt im Cytoplasma erfolgte und keine Folge einer eventuellen Tat-abhängigen Qualitätskontrolle der Faltung war.

Da die fehlgefalteten HiPIP-Derivate eine so hohe Instabilität aufwiesen, mussten besser geeignete Modellsubstrate für die Fragestellungen dieser Arbeit gefunden werden.

3.2 Tat-Transport mit ungefaltetem PhoA

Da HiPIP ohne die Cofaktor-bindenden Cysteine sehr instabil war und wahrscheinlich noch vor einem Membrantargeting zum großen Teil im Cytoplasma proteolytisch abgebaut wurde, war davon auszugehen, dass sich andere natürliche Tat-Substrate nach Mutagenese ähnlich verhalten würden. Besser geeignet als Modellsubstrat wäre ein natürlich im Cytoplasma vorkommendes, ungefaltetes Protein. Die Wahl fiel auf die Alkalische Phosphatase (PhoA). PhoA besitzt einige Eigenschaften, die es als Modell-Substrat interessant machen. PhoA ist ein Sec-Substrat, welches im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas inaktiv und unvollständig gefaltet vorliegt, da zur korrekten Faltung zwei Disulfid-Brücken gebildet werden müssen. Erst nach dem Sec-abhängigen Transport wird PhoA im Periplasma durch die Disulfid-Oxidoreduktase DsbA oxidiert, und das Enzym liegt stabil und aktiv vor (Sone *et al.*, 1997). Die Aktivität von PhoA kann dann relativ einfach quantitativ durch einen Enzymtest mit ganzen Zellen (Brickman & Beckwith, 1975) oder noch einfacher qualitativ durch Blaufärbung der Kolonien auf LB-Platten, die XP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat) enthalten, nachgewiesen werden. Ist PhoA funktionell, wandelt es die chromogene Substanz XP zu 5-Bromo-4-Chloroindoxyl um, das an der Luft zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichlorindigo oxidiert wird.

Es wurde bereits in mehreren Untersuchungen gezeigt, dass Fusionen aus maturem PhoA und Tat-Signalpeptiden nicht Tat-abhängig transportiert werden (Kebir & Kendall, 2002; Sambasivarao *et al.*, 1990; Stanley *et al.*, 2002; DeLisa *et al.*, 2003). DeLisa *et al.* (2003) konnten außerdem zeigen, dass in Stämmen, in denen die Bildung von Disulfidbrücken im Cytoplasma möglich ist, auch der Tat-abhängige Transport funktioniert. Diese Daten wurden zur Unterstützung der Hypothese einer Qualitätskontrolle der Faltung am Tat-System herangezogen.

Die Stabilität von PhoA, der bereits gezeigte fehlende Tat-Transport, der einfache enzymatische Nachweis und nicht zuletzt die Tatsache, dass ein PhoA-Antikörper käuflich zu erwerben ist, zeichneten PhoA als geeignetes Modell-Substrat für die Untersuchungen dieser Arbeit aus.

Als Tat-Signalpeptid, welches das Targeting des ungefalteten maturen PhoA an das Tat-Translokation vermitteln sollte, wurde das HiPIP-Signalpeptid ausgewählt, da es bereits gut untersucht war (Brüser *et al.*, 2003; Kipping *et al.*, 2003; Diplomarbeit Trautmann, 2003).

Zur Herstellung des Fusionsproteins aus HiPIP-Signalpeptid und maturem PhoA wurde zunächst mittels *QuikChange*TM-Mutagenese (Stratagene) und dem Primerpaar *hip*-BamHI-F und *hip*-BamHI-R eine BamHI-Schnittstelle in das siebte Codon des maturen Bereiches des *hip*-Genes von pEXH5-*tac* eingeführt, woraus das Plasmid pEXH5-*tac*-BamHI^{SP} resultierte. *phoA* wurde mittels BamHI und HindIII aus pTFD342 ausgeschnitten und über die gleichen Schnittstellen in pEXH5-*tac*-BamHI^{SP} eingefügt, wodurch das Plasmid pEX-*hip*^{SP}-*phoA*-*tac* erhalten wurde, welches die konstitutive Expression von *hip*^{SP}-*phoA* unter Kontrolle des P_{*tac*}-Promotors erlaubte.

Mittels *QuikChange*TM-Mutagenese (Stratagene), dem Primerpaar *hip*-KK-F/*hip*-KK-R und pEXH5-*tac* als *template* wurde das *twin-arginine*-Motiv im Signalpeptid von HiPIP gegen zwei Lysine ausgetauscht, resultierend in pEXH5-KK-*tac*. Es folgte ebenfalls die Einfügung des *phoA*-Fragmentes über BamHI/HindIII, so dass das Plasmid pEX-*hip*^{SP}-KK-*phoA-tac* entstand. Um *precursor-PhoA* zu erhalten wurde *phoA* aus genomischer *E. coli*-DNA mit Hilfe der Primer *phoA*-Anfang-NdeI-F und *phoA*-Ende-HindIII-R amplifiziert und über die Schnittstellen NdeI/HindIII in pEXH5-*tac* eingefügt, resultierend in pEX-*phoA-tac*.

Somit lagen Plasmide vor, mit denen *hip*^{SP}-*phoA*, *hip*^{SP}-KK-*phoA* und *precursor-phoA* konstitutiv exprimiert werden konnten und die Proteine Hip^{SP}-PhoA, Hip^{SP}-KK-PhoA und PhoA (Abb. 3-3) erhalten wurden. Hip^{SP}-PhoA und Hip^{SP}-KK-PhoA werden im Folgenden vereinfacht RR-PhoA und KK-PhoA genannt.

3.2.1 Das HiPIP-Signalpeptid wird vom Sec-System erkannt

Zunächst musste getestet werden, ob das Fusionsprotein aus maturem PhoA und HiPIP-Signalpeptid (RR-PhoA) Tat-abhängig transportiert wurde. Hierzu wurde der PhoA-Aktivitätstest mit ganzen Zellen genutzt. Alle PhoA-Aktivitätsbestimmungen wurden in dem Δ *phoA*-Stamm CC118 durchgeführt.

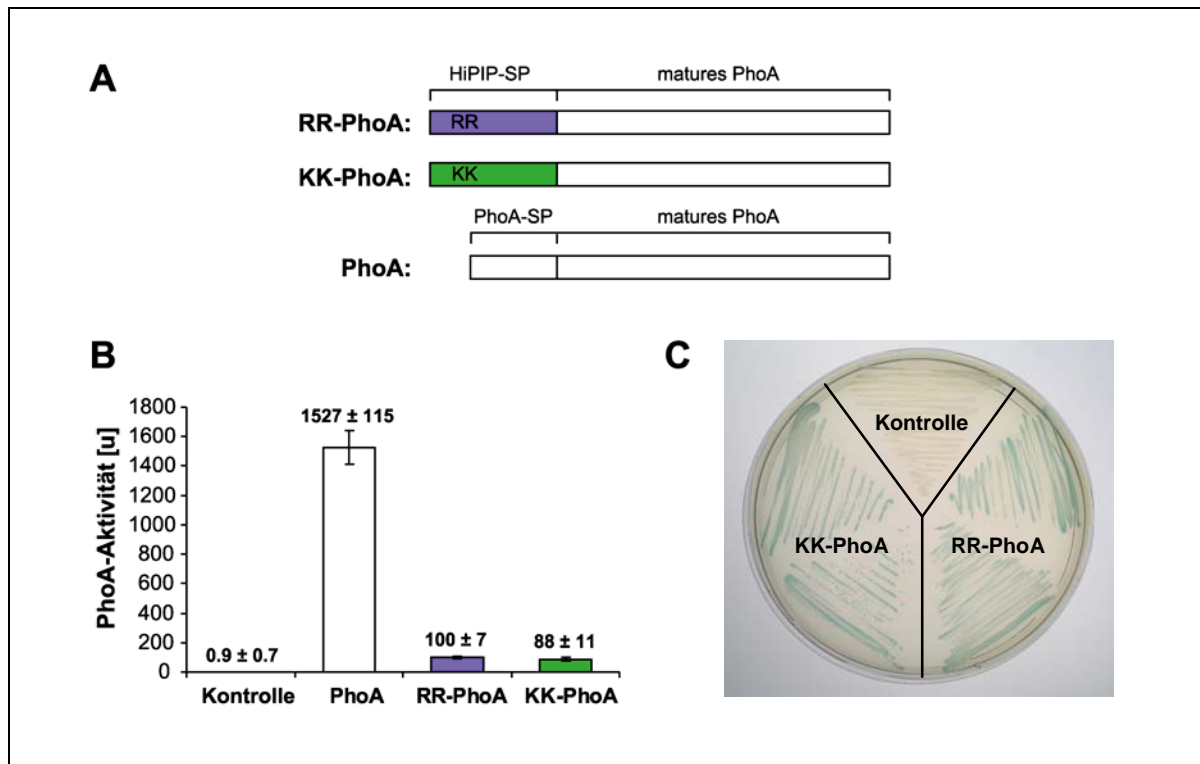


Abb. 3-3: Sec-abhängiger Transport der Hip^{SP}-PhoA-Fusionen. A) Schematische Darstellung der Fusionen Hip^{SP}-PhoA (RR-PhoA), Hip^{SP}-KK-PhoA (KK-PhoA) und *precursor-PhoA* (PhoA). B) PhoA-Aktivitäten von CC118 (Δ *phoA*) mit den Plasmiden pET22b+ (Kontrolle), pEX-*phoA-tac* (PhoA), pEX-*hip*^{SP}-*phoA-tac* (RR-PhoA) und pEX-*hip*^{SP}-KK-*phoA-tac* (KK-PhoA). C) Färbung der Kolonien von CC118 (Δ *phoA*) mit den Plasmiden pET22b+ (Kontrolle), pEX-*hip*^{SP}-*phoA-tac* (RR-PhoA) und pEX-*hip*^{SP}-KK-*phoA-tac* (KK-PhoA) auf XP-Platten.

Bereits auf den XP-Platten (Abb. 3-3C) war zu sehen, dass sowohl RR-PhoA als auch KK-PhoA ins Periplasma transportiert wurden, da die entsprechenden Kolonien eine Blaufärbung zeigten. Die Kolonien der Kontrolle dagegen blieben weiß. Detailliertere Aussagen ließen sich mit der quantitativen Bestimmung der PhoA-Aktivität treffen (Abb. 3-3B). PhoA mit seinem natürlichen Sec-Signalpeptid wurde sehr gut transportiert, was sich in einer hohen PhoA-Aktivität äußerte. Die Aktivität reduzierte sich auf ca. 6% im Falle von RR-PhoA und KK-PhoA. Ein Teil der gebildeten Fusionsproteine wurden somit transportiert. Dieser Transport muss aber Sec-abhängig erfolgt sein, da ein Austausch des RR-Motivs in zwei Lysine den Tat-Transport vollständig blockiert (Brüser *et al.*, 2003). Wäre RR-PhoA ebenfalls Tat-abhängig transportiert worden, müsste die Aktivität von RR-PhoA, die von KK-PhoA deutlich übersteigen. Somit zeigte sich, dass das HiPIP-Signalpeptid mit geringer Effizienz auch vom Sec-System erkannt wird, wie es schon für einige andere Tat-Signalpeptide, wie z.B für das DmsA- oder das SufI-Signalpeptid bekannt war (DeLisa *et al.*, 2003; Tullman-Ercek *et al.*, 2007)

3.2.2 Einführung verschiedener Sec-avoidance-Motive in das HiPIP-Signalpeptid

Für weitere Untersuchungen zur Qualitätskontrolle war es nicht von Vorteil, dass das Modellsupstrat auch Sec-abhängig transportiert wurde. Außerdem war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, genauere Aussagen darüber zu treffen, welche Eigenschaften ein Signalpeptid zu einem Tat-Signalpeptid machen. Somit sollte durch die Einführung von Sec-avoidance-Motiven die Sec-Inkompatibilität der Hip^{SP}-PhoA-Fusion gesenkt werden. Sec-avoidance-Motive werden bestimmte Aminosäuresequenzen im Signalpeptid genannt, die ein Targeting zur Sec-Translokase verhindern sollen. Dazu gehören (1) geladene Aminosäuren in der c-Region (Blaudeck *et al.*, 2003; Bogsch *et al.*, 1997) und (2) eine geringere Hydrophobizität der h-Region (Cristóbal *et al.*, 1999).

Es wurden verschiedene Aminosäureaustausche durchgeführt (Abb. 3-4A). Zunächst wurden die ungeladenen Aminosäuren Glycin und Phenylalanin in der c-Region des HiPIP-Signalpeptides in zwei positiv geladene Arginine bzw. zwei negativ geladene Aspartate ausgetauscht. Um die Hydrophobizität der h-Region zu verringern, wurden ein Methionin und ein Isoleucin gegen zwei weniger hydrophobe Alanine ausgetauscht. Die Aminosäureaustausche erfolgten mittels *QuikChange*TM-Mutagenese (Stratagene), den Primerpaaren *hip-sec-avoid-RR-F/hip-sec-avoid-RR-R*, *hip-sec-avoid-DD-F/hip-sec-avoid-DD-R* und *hip-h-region-F/hip-h-region-R* und den Plasmiden *pEX-hip^{SP}-phoA-tac* und *pEX-hip^{SP}-KK-phoA-tac* als *template*. Erhalten wurden die Plasmide *pEX-hip^{SP}-RR-phoA-tac*, *pEX-hip^{SP}-KK-RR-phoA-tac*, *pEX-hip^{SP}-DD-phoA-tac*, *pEX-hip^{SP}-KK-DD-phoA-tac*, *pEX-hip^{SP}-h-reg.-phoA-tac* und *pEX-hip^{SP}-KK-h-reg.-phoA-tac*.

Zusätzlich wurde auch die Kombination aus den Aminosäureaustauschen GF>RR und MI>AA durchgeführt, wodurch die Plasmide *pEX-hip^{SP}-RR+h-reg.-phoA-tac* und *pEX-hip^{SP}-KK-RR+h-reg.-phoA-tac* entstanden.

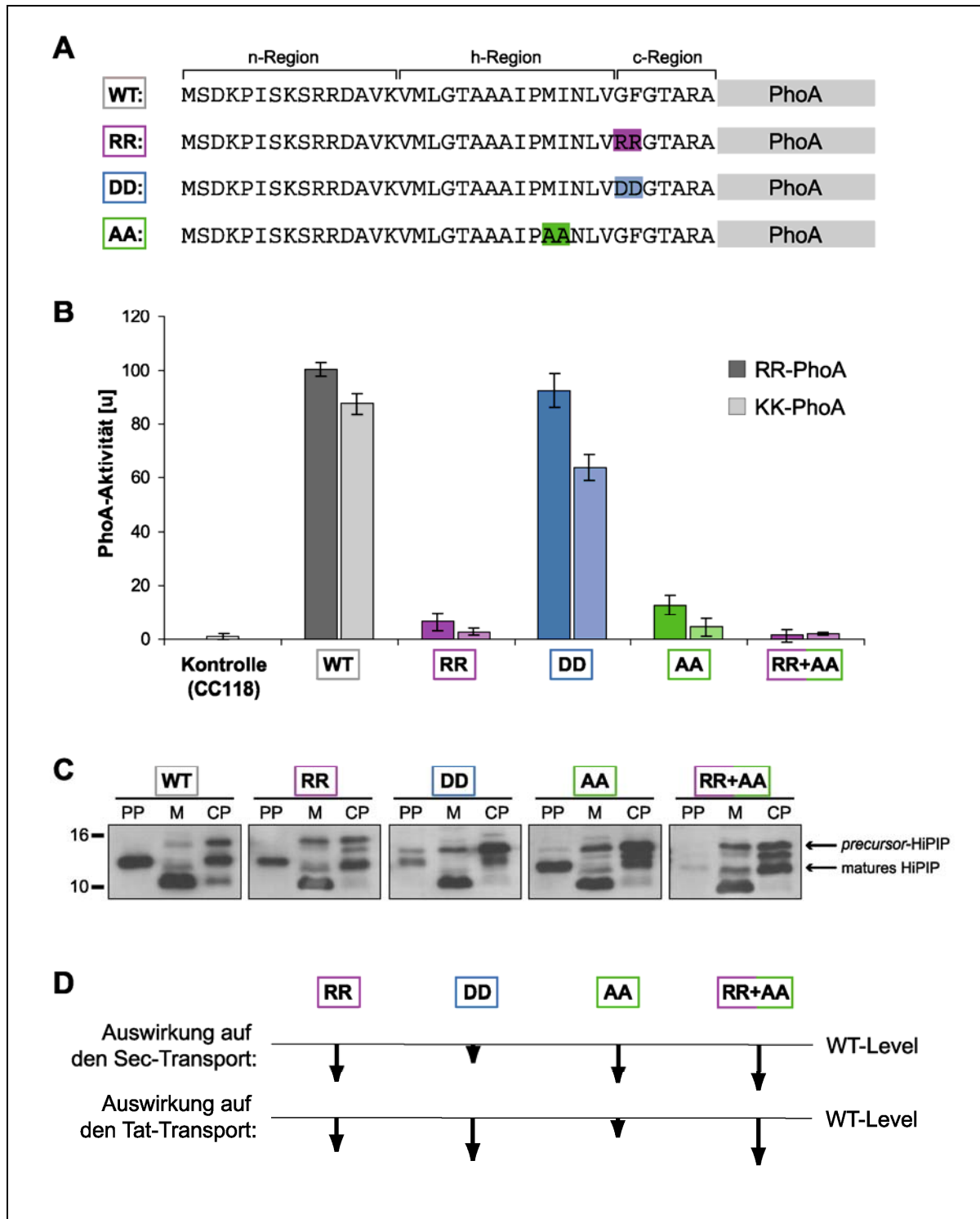


Abb. 3-4: Auswirkungen verschiedener Sec-avoidance-Motive auf den Tat- und den Sec-Transport. A) Aminosäuresequenz des Signalpeptides der Hip^{SP}-PhoA-Fusion (WT). Die eingeführten Sec-avoidance-Motive wurden farblich markiert. B) PhoA-Aktivitäten von CC118 ($\Delta phoA$) mit den Plasmiden pET22b+ (Kontrolle), pEX-hip^{SP}-RR-*phoA-tac*/ pEX-hip^{SP}-KK-RR-*phoA-tac* (RR), pEX-hip^{SP}-DD-*phoA-tac*/ pEX-hip^{SP}-KK-DD-*phoA-tac* (DD), pEX-hip^{SP}-h-reg-*phoA-tac*/ pEX-hip^{SP}-KK-h-reg-*phoA-tac* (AA) und pEX-hip^{SP}-RR+h-reg-*phoA-tac*/ pEX-hip^{SP}-KK-RR+h-reg-*phoA-tac* (RR+AA). C) Auswirkungen der Aminosäureaustausche auf den Tat-abhängigen Transport von HiPIP. Fraktionierungen von Periplasma (PP), Membranen (M) und Cytoplasma (CP) von MC4100 pABS-*tatABC* und pEXH5-*tac* (WT), pEXH5-RR-*tac* (RR), pEXH5-DD-*tac* (DD), pEXH5-AA-*tac* (AA) und pEXH5-RR+h-reg-*tac* (RR+AA). (15% SDS-PAGE, Western Blot, Detektion mit α -HiPIP-Serum und ECL-System) D) Schematische Darstellung der Auswirkungen der Aminosäureaustausche auf den Sec- und den Tat-Transport.

Mit den erhaltenen Plasmiden im $\Delta phoA$ -Stamm CC118 wurde die PhoA-Aktivität bestimmt (Abb. 3-4B). Es zeigte sich, dass die Einführung von negativ geladenen Aspartaten in die c-Region so gut wie keinen Einfluss auf den Sec-Transport hatte, wogegen die positiv geladenen Arginine den Sec-Transport deutlich verringerten. Den gleichen Effekt hatte die Einführung der weniger hydrophoben Alanine in die h-Region. Und die Kombination aus den positiven Ladungen in der c-Region und der weniger hydrophoben h-Region hatte zur Folge, dass kein Sec-abhängiger Transport mehr möglich war.

Auffällig war, dass der Transport von RR-PhoA immer etwas höher als der von KK-PhoA war. Um zu testen, ob diese leicht erhöhte Aktivität nicht doch einem Tat-abhängigen Transport zuzuschreiben war, wurden die PhoA-Aktivitäten im Wildtyp und bei gleichzeitiger Überexpression von *tatABC* verglichen (MC4100 pEX-*hip*^{SP}-*phoA-tac* und MC4100 pABS-*tatABC* pEX-*hip*^{SP}-*phoA-tac*, Ergebnisse nicht gezeigt). Durch die *tatABC*-Überexpression wurde die Aktivität nicht erhöht, so dass ein Tat-abhängiger Transport von RR-PhoA ausgeschlossen werden konnte. Es scheint so zu sein, dass die zwei Lysine im Falle des HiPIP-Signalpeptides die Effizienz des Sec-Transportes etwas erniedrigen.

Es musste jetzt aber überprüft werden, welche Auswirkungen die Aminosäureaustausche auf den Tat-Transport haben. Dazu wurden mit den oben genannten Primern diese Aminosäureaustausche auch bei HiPIP eingeführt. Mit pEXH5-*tac* als *template* wurden die Plasmide pEXH5-DD-*tac*, pEXH5-RR-*tac*, pEXH5-h-reg-*tac* und pEXH5-RR+h-reg-*tac* erhalten. Anhand einer Fraktionierung von Periplasma, Membranen und Cytoplasma von Stämmen, die diese Plasmide sowie Plasmide zur gleichzeitigen Überexpression von *tatABC* enthielten, konnte getestet werden, ob der Transport im Vergleich zum WT-HiPIP verändert war (Abb. 3-4C). Es zeigte sich, dass die Einführung von Ladungen in die c-Region eine deutliche Verringerung des HiPIP-Transportes zur Folge hatte. Besonders überraschend war dies bei dem GF>DD-Austausch, da dieser Austausch keine Auswirkungen auf den Sec-Transport hatte. Die Kombination aus GF>RR und MI>AA führte dazu, dass HiPIP so gut wie gar nicht mehr vom Tat-System transportiert wurde. Somit lässt sich sagen, dass die Einführung von Ladungen in die c-Region im Falle des HiPIP-Signalpeptides nicht den gewünschten spezifischen Sec-avoidance-Effekt mit sich brachte, da auch der Tat-Transport negativ beeinflusst wurde.

Einzig bei dem HiPIP-Derivat mit der weniger hydrophoben h-Region war der Tat-Transport nur unwesentlich verringert. Da dieser Austausch aber den Sec-Transport deutlich verringerte, kann man hier von einem echten Sec-avoidance-Effekt sprechen. Somit wurde diese Hip^{SP}-PhoA-Fusion für die Untersuchungen der Beteiligung vermuteter Kandidaten an der Qualitätskontrolle der Faltung eingesetzt.

3.2.3 Test der Beteiligung verschiedener Proteine an der Qualitätskontrolle der Faltung

Geht man davon aus, dass eine dem Tat-Transport vorgeschaltete Qualitätskontrolle der Faltung entweder das Targeting zum Tat-Translokon oder den Transport direkt verhindert, sollte ein Fehlen einer Komponente der Qualitätskontrolle den Transport eines nicht korrekt gefalteten Substrates eventuell ermöglichen.

Da jetzt mit der Hip^{SP}-PhoA-Fusion ein geeignetes Substrat zur Verfügung stand, konnten mit Hilfe der Bestimmung der PhoA-Aktivitäten einige vermutete Kandidaten auf eine Beteiligung an der Qualitätskontrolle getestet werden. Notwendig waren nur ein Mutanten- und der entsprechende Wildtypstamm.

Das erste Protein, welches getestet werden sollte, war TatD. Das Gen *tatD*, liegt mit *tatABC* in einem Operon und soll für eine cytoplasmatische Nuklease kodieren (Wexler *et al.*, 2000). Eine Beteiligung am Tat-Transport wurde bisher nicht gezeigt. Aber durch die Lage in einer Transkriptionseinheit mit den Tat-Komponenten bestand die Vermutung, dass TatD in irgendeiner Weise eine Relevanz für den Tat-Transport besitzt.

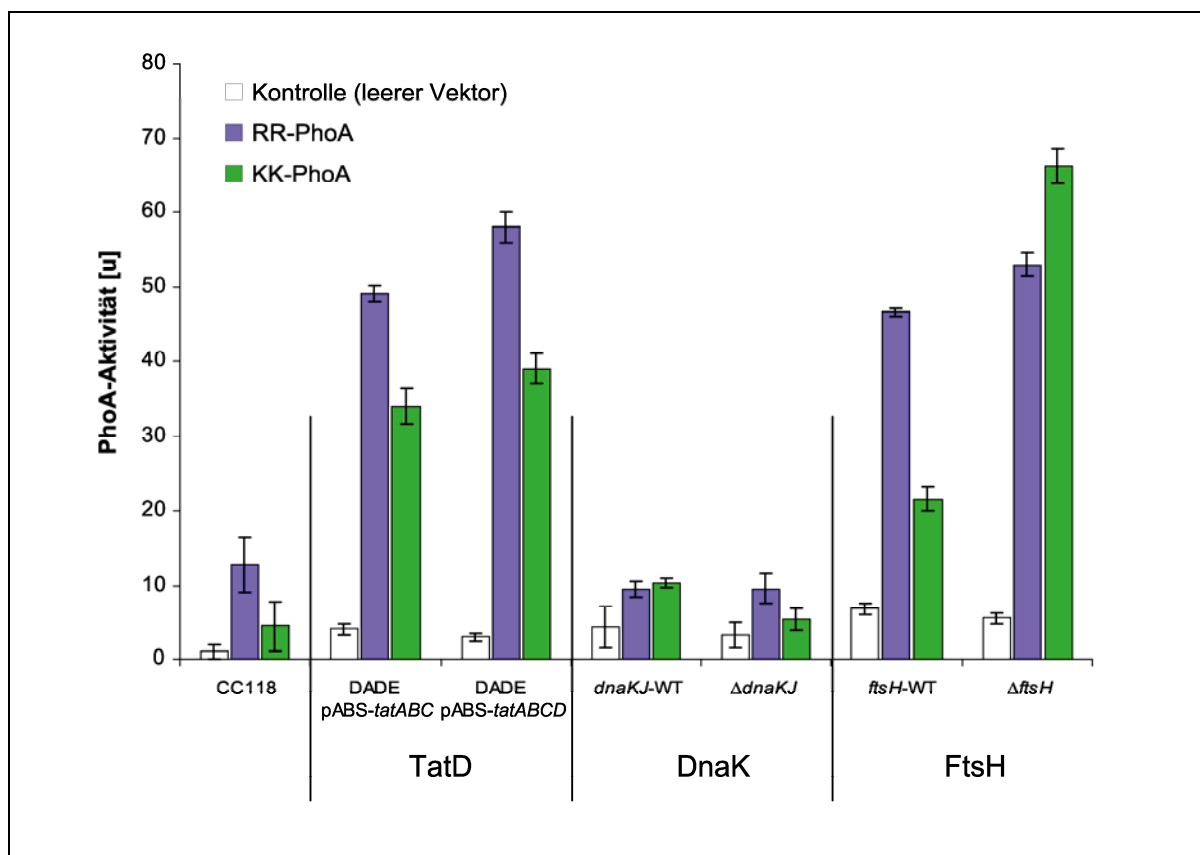


Abb. 3-5: Test auf Beteiligung von TatD, DnaK und FtsH an der Qualitätskontrolle der Faltung von Tat-Substraten. PhoA-Aktivitäten von den jeweils angegebenen Stämmen mit den Plasmiden pET22b+ (Kontrolle), pEX-hip^{SP}-h-reg.-phoA-tac (RR-PhoA) und pEX-hip^{SP}-KK-h-reg.-phoA-tac (KK-PhoA). Die Mittelwerte und die angegebenen Standardabweichungen resultieren aus drei Messungen.

Zudem wurde DnaK getestet. DnaK ist ein cytoplasmatisches Chaperon, von dem bereits bekannt ist, dass es mit dem HiPIP-Signalpeptid interagiert (Brüser *et al.*, 2003; Graubner *et al.*, 2007). Eventuell könnte eine solche Interaktion eine Rolle bei der Qualitätskontrolle der Faltung von Tat-Substraten spielen.

Das dritte Protein, welches getestet werden sollte, war FtsH, eine membrangebundene Protease der AAA-Familie, welche sehr unterschiedliche und vielfältige Aufgaben in der Membran erfüllt (siehe 3.2.4.1). FtsH wurde von Brüser & Sanders (2003) als Qualitätskontroll-Protease des Tat-Systems vorgeschlagen.

Aus dem Vergleich der PhoA-Aktivitäten von Wildtyp- und Mutantenstämmen (Abb. 3-5) lässt sich erkennen, dass das Fehlen sowohl von TatD als auch von DnaK keinen signifikanten Einfluss auf die Menge des transportierten RR-PhoA hatte. Somit ist eine Rolle von TatD und DnaK als vorgeschalteter Interaktionspartner, der ein Targeting zum Tat-Translokon verhindert, sehr unwahrscheinlich. Nicht ganz so eindeutig sind die Ergebnisse im Falle von FtsH. Ein Fehlen von FtsH erhöht zwar nicht die Menge an transportiertem RR-PhoA, aber die an transportiertem KK-PhoA, was nicht einfach zu erklären ist und nicht den Erwartungen entspricht. Da eine Interaktion von FtsH mit dem HiPIP-Signalpeptid bereits bekannt war (Diplomarbeit Trautmann, 2003), befasst sich der nächste Abschnitt (3.2.4) genauer mit der möglichen Beteiligung von FtsH an einer Qualitätskontrolle der Faltung.

3.2.4 Die Rolle von FtsH bei der Qualitätskontrolle der Faltung von Tat-Substraten

3.2.4.1 FtsH – eine Protease mit vielen verschiedenen Aufgaben

FtsH ist eine ATP- und Zn^{2+} -abhängige Metalloprotease der AAA-Familie (*ATPases associated with a variety of cellular activities*). Das *E. coli* *ftsH*-Gen wurde von vier verschiedenen Arbeitsgruppen identifiziert und ist deswegen auch unter den Namen *hflB*, *tolZ* oder *mrsC* bekannt (Schumann, 1999). FtsH ist ein homohexameres Membranprotein mit 70.7 kDa großen Untereinheiten, welche die Cytoplasmamembran jeweils zweimal durchspannen (Abb. 3-6A). Der große cytoplasmatische Teil des Proteins (C-Terminus) enthält pro Untereinheit eine ca. 200 Aminosäuren umfassende Domäne mit einer ATP-Bindestelle, die charakteristisch für alle Proteasen der AAA-Familie ist (Tomoyasu *et al.*, 1993). In der Nähe des C-Terminus befindet sich ein Zn^{2+} -Bindemotiv, welches in der Sequenz dem Aktiven Zentrum von Zink-Metalloproteasen entspricht (Schumann, 1999).

FtsH bildet mit den Membranproteinen HflK und HflC einen Komplex, der vermutlich der Regulation der Proteasefunktion dient (Ito & Akiyama, 2005).

FtsH ist an vielen unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt. Zu den cytoplasmatischen Substraten für die Proteaseaktivität gehören vor allem kurzlebige Proteine, z.B. das Hitzeschockprotein σ^{32} und der CII-Transkriptionsfaktor des λ -Phagen (Schumann, 1999).

Weiterhin scheint FtsH eine Chaperon-Aktivität zu besitzen (Shirai *et al.*, 1996) und beim Einbau von Membranproteinen beteiligt zu sein (Akiyama *et al.*, 1998). Außerdem wurden in *ftsH*-Mutanten Defekte in der Translokation des periplasmatischen Proteins β -Laktamase festgestellt (Schumann, 1999).

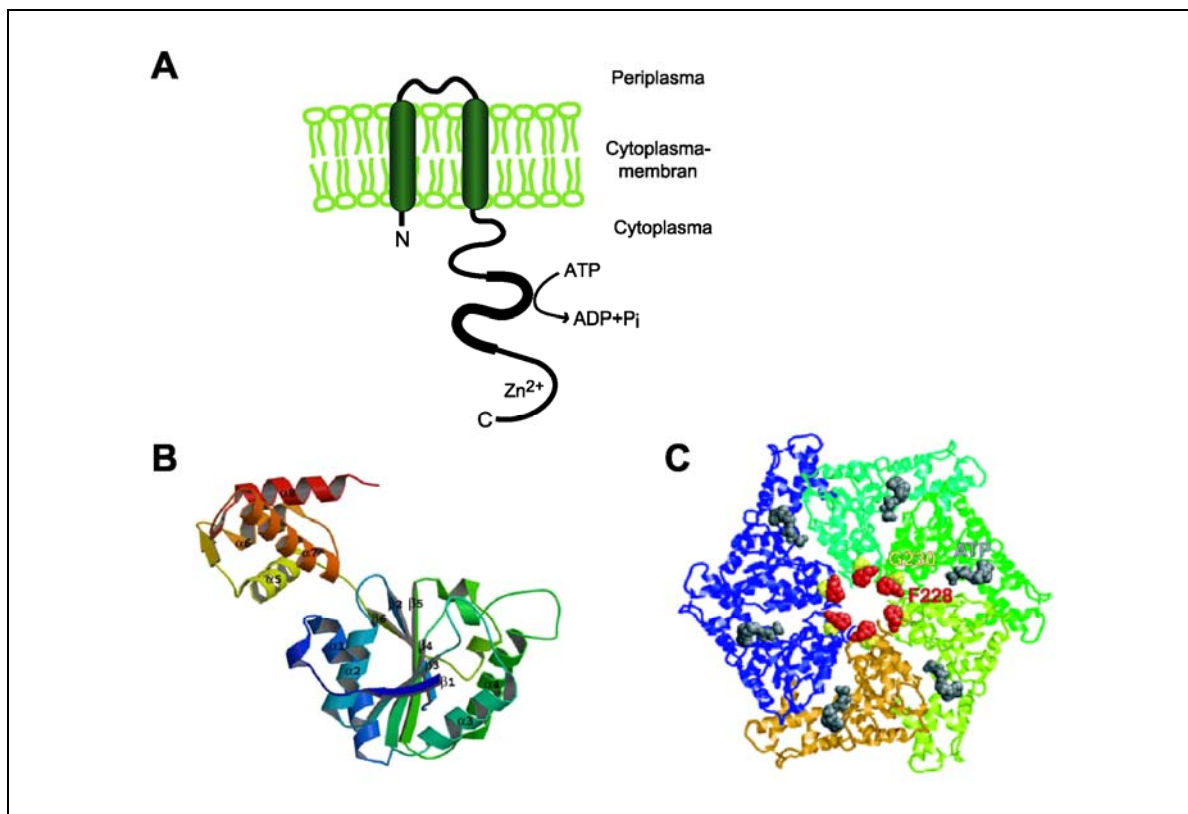


Abb. 3-6: Struktur und Anordnung von FtsH in der Membran. A) Skizze der Anordnung eines Monomers von FtsH in der Membran (Erklärung im Text). B) Strukturmodell eines Monomers von FtsH. Dargestellt sind die membrangebundene (orange/rot) und die große cytoplasmatische Domäne (blau/grün) (<http://mukb.medic.kumamoto-u.ac.jp/AAA/kouzouimg/ftsH.html>). C) Draufsicht auf ein Modell des Hexamers der ATPase-Domäne von FtsH (Yamada-Inagawa *et al.*, 2003). Die konservierten Aminosäuren Phe228 (rot) und Gly230 (gelb) und das gebundene ATP sind gezeigt.

Die für diese Arbeit interessante Funktion von FtsH ist der Abbau von Membranproteinen. Zu diesen Substraten gehören z.B. SecY und die α -Untereinheit der F_1F_0 -ATPase. Diese Proteine werden nur abgebaut, wenn sie nicht in ihren Komplexen assembliert vorliegen, d.h. wenn ein Interaktionspartner fehlt oder eine Mutation vorliegt, die die Assoziierung mit den Untereinheiten stört (Ito & Akiyama, 2005). Aufgrund dieser Eigenschaft wird FtsH eine wichtige Rolle bei der Qualitätskontrolle von Membranproteinen zugeschrieben (Schumann, 1999; Ito & Akiyama, 2005). Brüser & Sanders (2003) vermuteten, dass FtsH auch an einer Qualitätskontrolle der Faltung von Tat-Substraten beteiligt sein könnte. Diese Hypothese wurde dadurch unterstützt, dass FtsH-Homologe in Bacteria (Tomoyasu *et al.*, 1993) und Thylakoiden (Mann *et al.*, 2000) existieren, und dass an Thylakoidmembranen ein FtsH-abhängiger Abbau des Tat-Substrates Rieske-Protein stattfindet, wenn dieses nicht im *b₆f*-Komplex vorliegt (Ostersetzer & Adam, 1997).

3.2.4.2 FtsH prozessiert das HiPIP-Signalpeptid bei blockiertem Transport

Es konnte bereits gezeigt werden, dass FtsH bei blockiertem Transport von HiPIP sowohl *in vivo* als auch *in vitro* das HiPIP-Signalpeptid prozessiert (Diplomarbeit Trautmann, 2003) (Abb. 3-7).

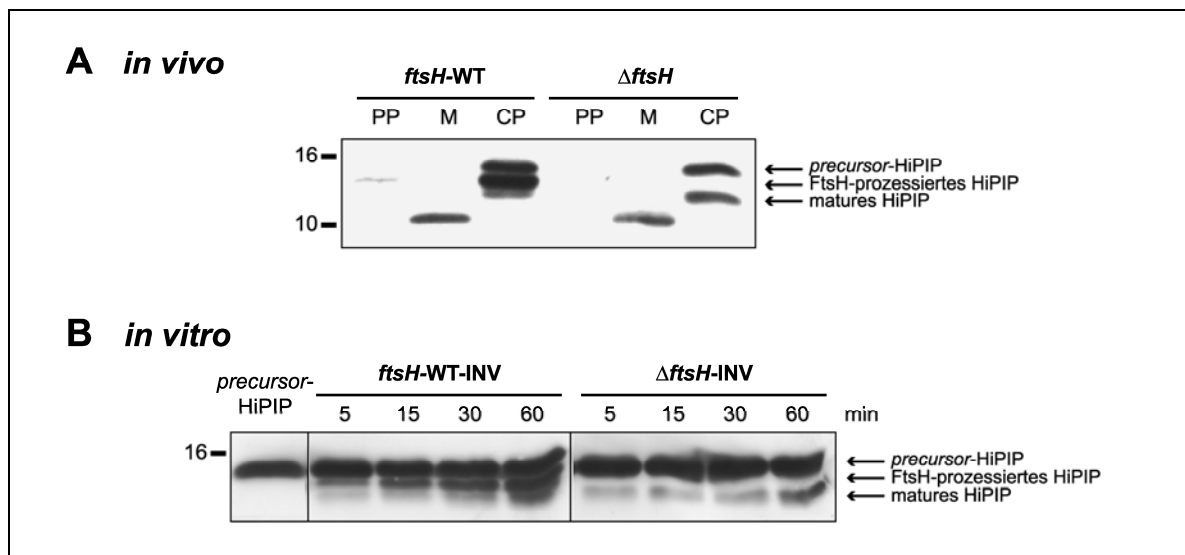


Abb. 3-7: *In vivo*- und *in vitro*-Prozessierung des HiPIP-Signalpeptides durch FtsH. A) Subzelluläre Fraktionen von *ftsH*-WT und Δ *ftsH* mit den Plasmiden pABS-*tatABC* und pEXH5-KK-*tac*. B) Überstände von *in vitro*-Targeting-Assays mit *ftsH*-WT-INV und Δ *ftsH*-INV und gefaltetem precursor-HiPIP mit unterschiedlich langen Inkubationszeiten. (15% SDS-PAGE, Western Blot, Detektion mit α -HiPIP-Serum und ECL-System)

In vivo war der Transport durch einen Austausch des RR-Motivs in KK blockiert und *in vitro* konnte bisher, aufgrund fehlender Komponenten oder falscher Bedingungen, kein Transport von HiPIP gezeigt werden, wohl aber eine Interaktion mit der Membran (Brüser *et al.*, 2003). In beiden Assays entstand FtsH-abhängig eine HiPIP-Abbaubande, die zwischen der maturen und der precursor-Bande detektierbar war. Durch N-terminale Sequenzierung konnte die genaue Schnittstelle identifiziert werden (Abb. 3-8A). FtsH entfernte acht Aminosäuren der n-Region des Signalpeptides von HiPIP, wobei das RR-Motiv anschließend aber noch vorhanden war.

Da FtsH nicht das gesamte Protein abbaute, war es interessant zu wissen, ob diese Prozessierung eventuell ein Targeting zum Tat-Translokon verhindert. Das würde die Vermutung, dass FtsH eine Rolle bei der Qualitätskontrolle von Tat-Substraten spielt, verstärken. Um ein solches *hip* mit verkürzter n-Region exprimieren zu können, wurde mittels QuikChange™-Mutagenese (Stratagene), dem Primerpaar *hip*-n-NdeI-F/*hip*-n-NdeI-R und pEXH5-*tac* als *template* zusätzlich zu einer vorhandenen NdeI-Schnittstelle (beim Codon des Start-Methionins) eine weitere NdeI-Schnittstelle eingefügt. Aus einem NdeI-Verdau und einer sich anschließenden Religation resultierte das Plasmid pEXH5-*shortn-tac*, mit dessen Hilfe ein HiPIP mit verkürzter n-Region, wie von FtsH prozessiert, erhalten werden konnte (Abb. 3-8A).

Durch eine Fraktionierung von Periplasma, Membranen und Cytoplasma wurde überprüft, ob das HiPIP mit der kurzen n-Region noch vom Tat-System erkannt wird (Abb. 3-8B). Der

Transport war im Vergleich zu dem Transport von WT-HiPIP (nicht gezeigt) nur gering vermindert, aber keineswegs unterdrückt. Das bedeutet, dass FtsH durch die Prozessierung ein Targeting zum Tat-Translokon und einen anschließenden Transport nicht verhindert. Es zeigt aber auch, dass die Aminosäuren vor dem RR-Motiv in der n-Region des HiPIP-Signalpeptids für die Erkennung des Substrates durch das Tat-System nicht benötigt werden.

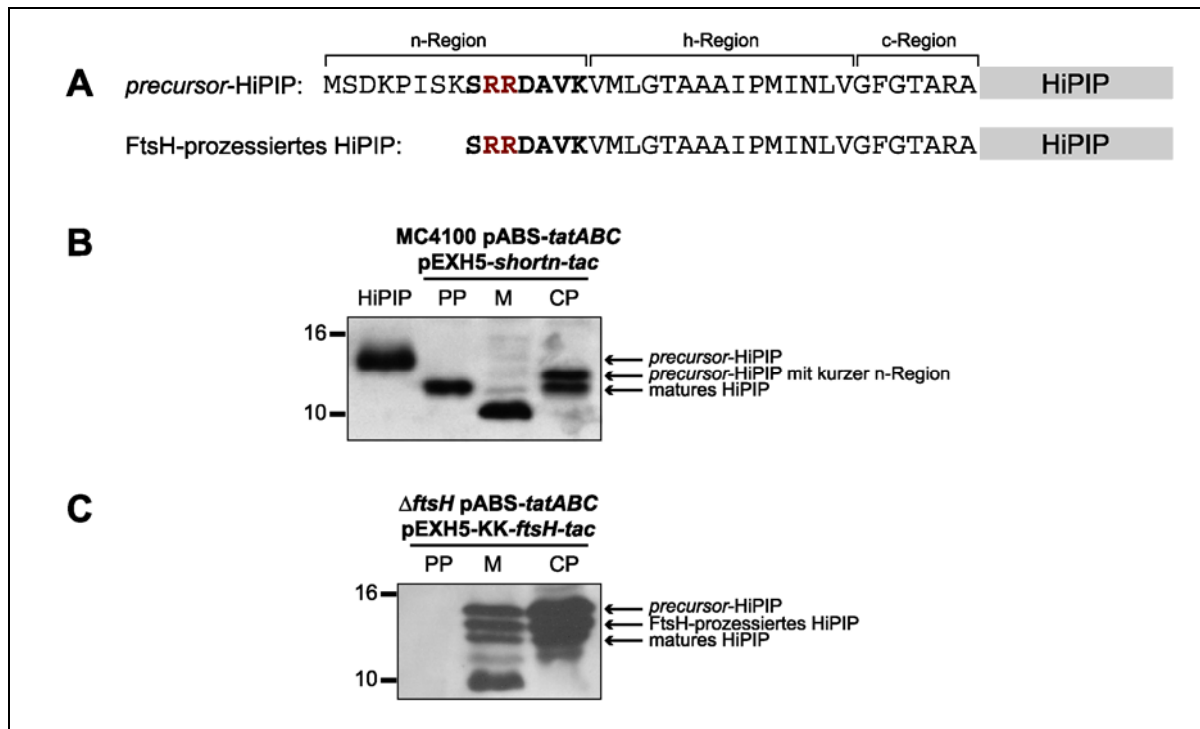


Abb. 3-8: Transport von HiPIP mit verkürzter n-Region und Komplementation von FtsH. A) Aminosäuresequenzen von *precursor*-HiPIP und FtsH-prozessiertem HiPIP. B) Transport von HiPIP mit verkürzter n-Region. Subzelluläre Fraktionen von MC4100 pABS-*tatABC* pEXH5-*shortn-tac* und gereinigtes *precursor*-HiPIP zum Vergleich. C) Komplementation von FtsH. Subzelluläre Fraktionen von Δ *ftsH* pABS-*tatABC* pEXH5-KK-*ftsH-tac*, Induktion mit 1 mM IPTG. (15% SDS-PAGE, Western Blot, Detektion mit α -HiPIP-Serum und ECL-System)

Für die Komplementation von FtsH wurden die Plasmide pEXH5-KK-*ftsH-H6-tac* und pEXH5-KK-*ftsH-H6-tac* benötigt, mit denen sowohl die HiPIP-Derivate, als auch FtsH rekombinat produziert werden können. Dafür wurde *ftsH* mit den Primern *ftsH*-HindIII-F und *ftsH*-XhoI-R aus genomischer *E. coli*-DNA amplifiziert und nach Verdau mit HindIII und XhoI über die gleichen Schnittstellen in die Plasmide pEXH5-*tac* und pEXH5-KK-*tac* eingefügt. FtsH-H6 konnte über das His-tag in der Membranfraktion nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Außerdem war es dem Stamm wieder möglich bei 37°C zu wachsen, wogegen der Δ *ftsH*-Stamm temperatursensitiv ist und nur bei 30°C wächst. Durch die *in trans*-Expression von *ftsH-H6* im Δ *ftsH*-Stamm konnte die Prozessierung des HiPIP-Signalpeptides erreicht werden (Abb. 3-8C). Die Komplementation konnte nur bei zusätzlicher Induktion des *tac*-Promotors mit 1 mM IPTG beobachtet werden, wahrscheinlich weil *ftsH-H6* in diesem Plasmid keinen eigenen Promotor besitzt und nur durch *leakage* über den *hip*-Terminator exprimiert wird.

Die Daten zeigen, dass FtsH für die Prozessierung des HiPIP-Signalpeptides verantwortlich ist, wobei diese Prozessierung aber nicht den Tat-Transport verhindert. Eventuell wurde HiPIP nicht weiter abgebaut, weil FtsH nicht in der Lage ist, fest gefaltete Proteine (wie z.B. GFP) zu entfalten und abzubauen (Ito & Akiyama, 2005). Das dürfte aber bei dem ungefalteten Hip^{SP}-PhoA kein Problem darstellen. Um zu testen, ob Hip^{SP}-PhoA durch FtsH erkannt und abgebaut wird, wurden Membranfraktionen von *ftsH*-WT- und Δ *ftsH*-Stämmen mit und ohne *tatABC*-Überexpression verglichen, die jeweils die Proteine RR-PhoA oder KK-PhoA enthielten (Abb. 3-9).

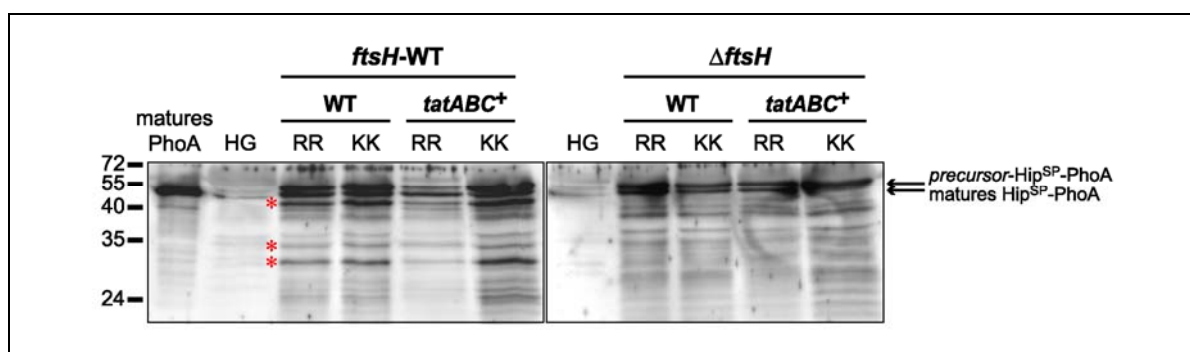


Abb. 3-9: Prozessierung von Hip^{SP}-PhoA durch FtsH. Membranfraktionen von *ftsH*-WT und Δ *ftsH* mit den Plasmiden pET22b+ (HG = Hintergrund), pEX-*hip*^{SP}-*phoA*-*tac* (RR) und pEX-*hip*^{SP}-*KK*-*phoA*-*tac* (KK) jeweils ohne (WT) und mit *tatABC*-Überexpression (*tatABC*⁺) durch das Plasmid pABS-*tatABC*. Als Vergleich für matures PhoA wurden Membranen des Stammes MC4100 pEX-*mat*.*phoA*-*tac* aufgetragen. Die drei erkennbaren FtsH-spezifischen Banden sind durch Sternchen gekennzeichnet. (15% SDS-PAGE, Western Blot, Detektion mit α -PhoA-Serum und ECL-System)

Sowohl RR-PhoA, als auch KK-PhoA sind in der Membranfraktion zu finden. Somit ist die Interaktion mit der Membran nicht abhängig vom RR-Motiv. Der Vergleich der Abbaubanden des *ftsH*-WT-Stammes und des Δ *ftsH*-Stammes zeigt, dass Hip^{SP}-PhoA von FtsH abgebaut wird. In den Membranen des *ftsH*-WT-Stammes finden sich mindestens drei Abbaubanden, die in denen des Δ *ftsH*-Stammes fehlen. Dieser Abbau ist aber nicht RR-spezifisch. Mit KK-PhoA erhält man das identische Bandenmuster, was gegen einen Abbau in Form einer Qualitätskontrolle der Faltung von Tat-Substraten spricht.

Der einzige Unterschied ist die geringere Menge von RR-PhoA in der Membranfraktion bei gleichzeitiger Überexpression von *tatABC*. Das lässt zunächst darauf schließen, dass der FtsH-Abbau eventuell durch eine Interaktion mit dem Tat-System gesteigert wurde. In den nächsten Absätzen (3.2.6) wird sich aber zeigen, dass die verringerte Menge an RR-PhoA nur auf eine verringerte Expression von RR-*phoA* zurückzuführen ist. Gegen einen gesteigerten FtsH-Abbau spricht auch, dass die Menge an RR-PhoA zwar geringer, aber das Verhältnis der Abbaubanden zueinander immer noch das gleiche war. Es erfolgte keine Anreicherung von FtsH-spezifischen Banden.

3.2.5 RR-PhoA übt einen cytostatischen Effekt auf wachsende Kulturen aus

3.2.5.1 Konstitutive Expression

Bei Transformationen und Vereinzlungen auf LB-Platten fiel auf, dass der Stamm MC4100 pABS-tatABC pEX-hip^{SP}-phoA-tac schlechter wuchs, als z.B. MC4100 pEX-hip^{SP}-phoA-tac oder MC4100 pABS-tatABC pEX-hip^{SP}-KK-phoA-tac. Somit schien dieser Effekt auf die gleichzeitige Expression von *tatABC* und *hip^{SP}-phoA* zurückzuführen zu sein. Zur besseren Beurteilung dieses Effektes wurde das Wachstum der verschiedenen Stämme genauer untersucht (Abb. 3-10).

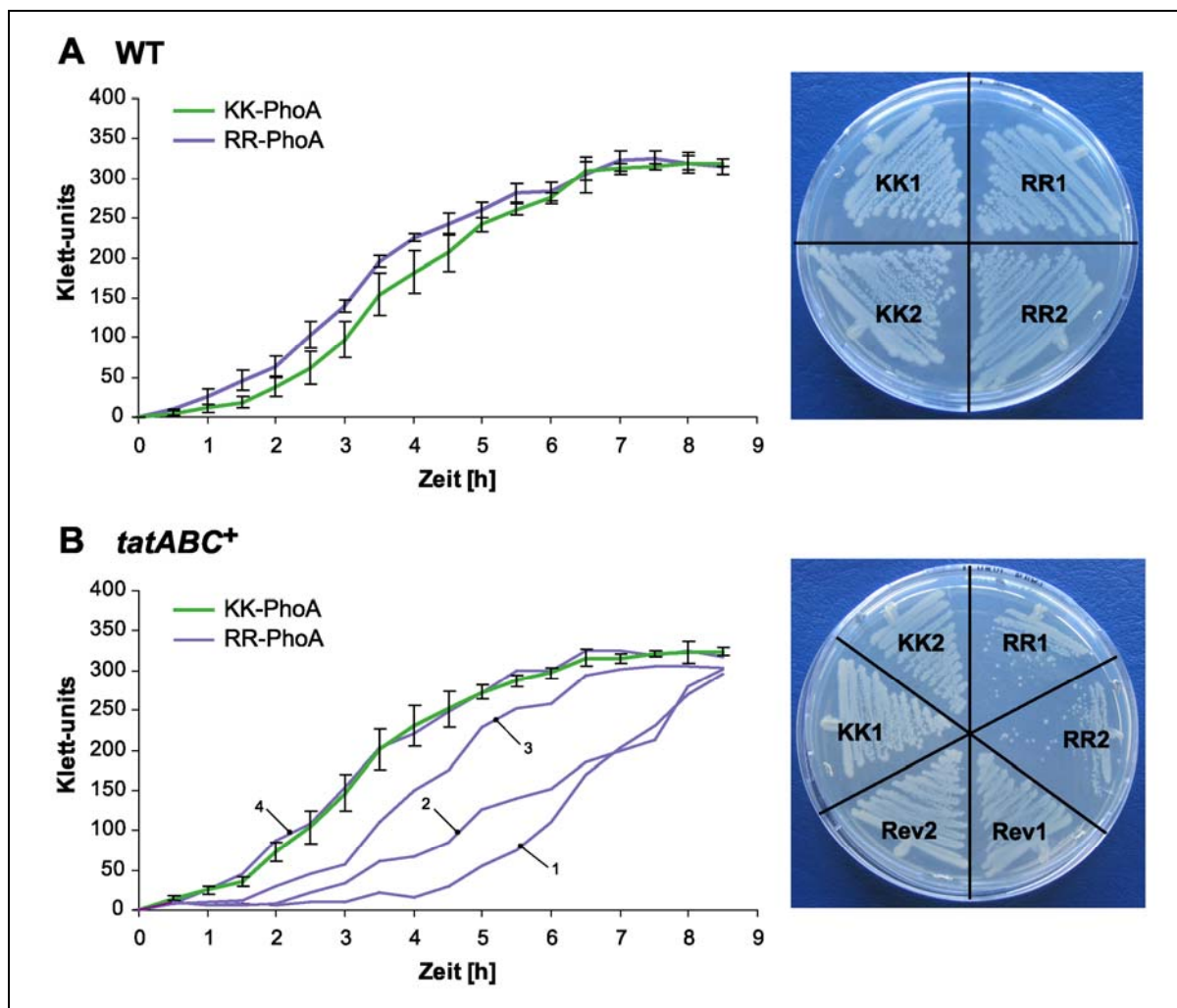


Abb. 3-10: Der toxische Einfluss von RR-PhoA auf die Zellen - Wachstum in Flüssigmedium und auf Agar-Platte.
 A) Wachstum von MC4100 mit den Plasmiden pEX-hip^{SP}-phoA-tac (RR-PhoA) und pEX-hip^{SP}-KK-phoA-tac (KK-PhoA) in LB (links) und auf einer LB-Platte (rechts). Dafür wurden frisch transformierte Kolonien gepickt. B) Wachstum von MC4100 pABS-tatABC mit den Plasmiden pEX-hip^{SP}-phoA-tac (RR-PhoA) und pEX-hip^{SP}-KK-phoA-tac (KK-PhoA) in LB (links) und auf einer LB-Platte (rechts). Es wurden verschiedene frisch transformierte Kolonien gepickt, außer bei Rev1 und Rev2. Diese entsprechen älteren Kolonien von MC4100 pABS-tatABC pEX-hip^{SP}-phoA-tac. Die angegebenen Standardabweichungen basieren auf Messungen von drei unabhängigen Zellkulturen.

Solange die Tat-Komponenten TatABC nur in Wildtyp-Mengen in der Zelle vorhanden waren, war nur ein geringer Unterschied zwischen dem Wachstum der RR-PhoA und der KK-PhoA

enthaltenden Zellen, sowohl im Flüssigmedium, als auf der Agar-Platte, zu erkennen (Abb. 3-10A).

Wurde *tatABC* aber überexprimiert (Abb. 3-10B) sah man bereits auf der Agar-Platte, dass die Zellen mit RR-PhoA viel kleinere Kolonien bildeten und somit schlechter wuchsen. Überraschenderweise war dieser Effekt aber nicht in allen Kolonien gleich stark. Es gab Kolonien mit RR-PhoA, die genauso gut wuchsen, wie die Kolonien mit KK-PhoA. Anscheinend hatten sie eine Möglichkeit entwickelt, den toxischen Effekt zu unterdrücken bzw. zu ihrer normalen Physiologie zu revertieren. Deswegen werden die Isolate solcher gut wachsender Kolonien im Folgenden auch Revertanten genannt.

Noch deutlicher wurden diese Wachstumsunterschiede in Wachstumskurven, für die Zellen vier verschiedener RR-PhoA-Kolonien eingesetzt wurden (Abb. 3-10B RR-PhoA 1-4). Alle Klone zeigten ein unterschiedliches Wachstumsverhalten. Klon 4 wuchs genauso gut, wie die KK-PhoA-Stämme und war somit schon revertiert. Dagegen begann Klon 1 erst nach einer vierstündigen *lag*-Phase zu wachsen. Alle Klone erreichten nach einer gewissen Zeit die gleiche Zelldichte. Wurden diese Zellen jetzt auf einer Agar-Platte ausgestrichen, zeigten sie keine Auffälligkeiten in der Koloniegröße und waren demnach phänotypisch revertiert.

Da der Wachstumseffekt nur auftrat, wenn TatABC und RR-PhoA, aber nicht KK-PhoA, in erhöhter Menge in den Zellen vorlag, deutete dies auf eine Interaktion zwischen Tat-Komponenten und RR-PhoA hin, wobei diese Interaktion aber einen toxischen Einfluss auf die Physiologie der Zelle ausübte.

Falls RR-PhoA direkt mit dem Translokon interagiert, wäre es möglich, dass diese Interaktion einen Einfluss auf den Transport von anderen Tat-Substraten hat. Das Translokon könnte z.B. durch die Interaktion blockiert und der Transport anderer Tat-Substrate verringert werden. Da der Transport von HiPIP sehr gut untersucht war, sollte HiPIP als konkurrierendes Tat-Substrat eingesetzt werden.

Dazu wurde mit Hilfe der Primer *Plac-PstI-forward* und *hip-BamHI-reverse* das *hip*-Fragment mitsamt dem *tac*-Promotor und dem *hip*-Terminator aus dem Plasmid *pEXH5-tac* amplifiziert und nach Verdau mit PstI und BamHI über die gleichen Schnittstellen in das Plasmid *pABS-tatABC* eingefügt. Erhalten wurde das Plasmid *pABS-tatABC-hip-tac*, mit dem es möglich war, *tatABC* und *hip* unabhängig voneinander konstitutiv zu exprimieren. Somit konnte durch zwei Plasmide (*pABS-tatABC-hip-tac* und *pEX-hip^{SP}-phoA-tac*) in einem Stamm die Überexpression von *tatABC* und von zwei Tat-Substraten *hip* und *hip^{SP}-phoA* erreicht werden.

Um den Einfluss von RR-PhoA auf den Transport von HiPIP zu untersuchen, wurden Fraktionierungen von Periplasma, Membranen und Cytoplasma der entsprechenden Stämme durchgeführt (Abb. 3-11).

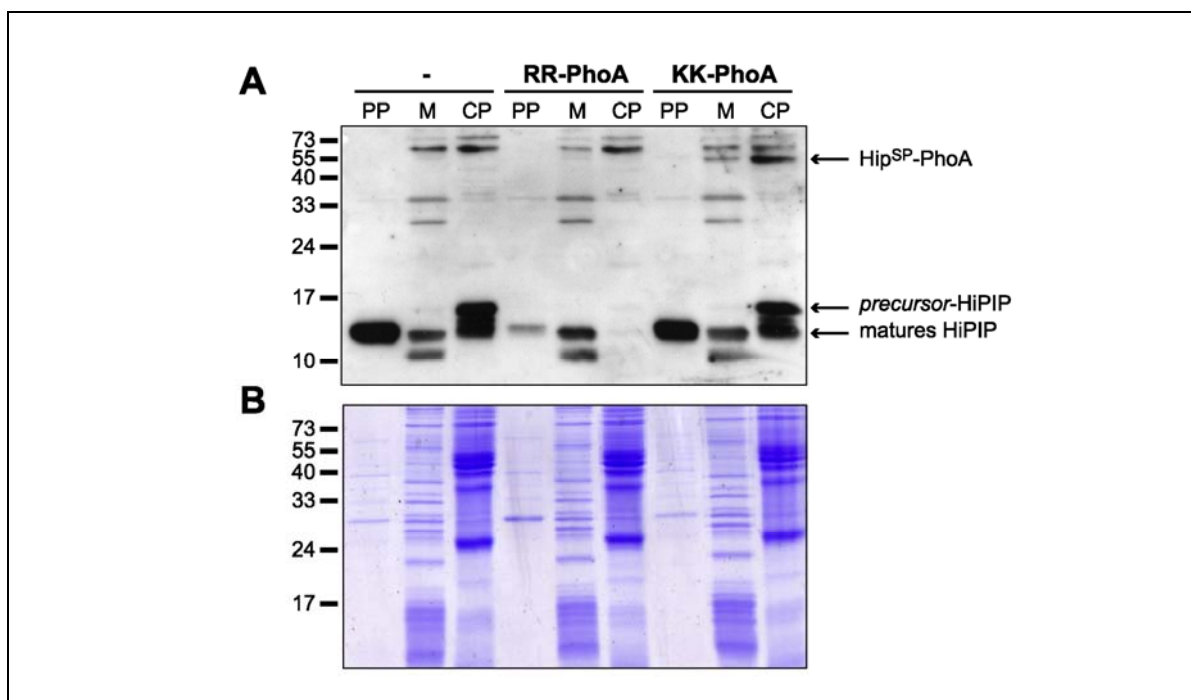


Abb. 3-11: Einfluss von RR-PhoA auf den Transport von HiPIP. Subzelluläre Fraktionen von MC4100 pABS-tatABC-hip-tac und jeweils pET22b+ (-), pEX-hip^{SP}-phoA-tac (RR-PhoA) und pEX-hip^{SP}-KK-phoA-tac (KK-PhoA). (15% SDS-PAGE; A) Western Blot, Detektion mit α-HiPIP-Serum und ECL-System; B) Coomassie-gefärbt)

KK-PhoA hatte, wie erwartet, keinen Einfluss auf den HiPIP-Transport. Es wurde genauso viel HiPIP transportiert, wie in der Kontrolle mit dem leeren Vektor (Abb. 3-11A Spuren 1 und 7). Im Cytoplasma und in der Membranfraktion des KK-PhoA-enthaltenden Stammes war ebenfalls deutlich KK-PhoA (bei ca. 55 kDa) zu erkennen, da der HiPIP-Antikörper auch das HiPIP-Signalpeptid allein erkennt. Anders sah es aber bei dem RR-PhoA-enthaltenden Stamm aus. Hier war kein RR-PhoA detektierbar, und auch die Menge an HiPIP war stark reduziert. Der Transport war aber nicht blockiert, da HiPIP fast nur im Periplasma nachgewiesen wurde. Im entsprechenden Coomassie-gefärbten Gel (Abb. 3-11B) ließen sich aber keine Unterschiede im restlichen Proteinmuster erkennen. Das führte zu der Vermutung, dass die Zelle als Antwort auf den toxischen Effekt von RR-PhoA eine Proteaseaktivität erhöht, die speziell Tat-Substrate aus der Zelle entfernt und damit eine Interaktion von Tat-Komponenten und RR-PhoA verhindert. Ein gezielter Abbau nur von RR-PhoA schien aber nicht möglich zu sein, da auch das untöxische HiPIP sehr stark reduziert war.

Um zu untersuchen ob die Proteaseaktivität in Bezug auf Tat-Substrate verändert wurde, wurden *in vitro*-Proteaseassays mit Zellextrakten der entsprechenden Stämme und *in vitro*-gefaltetem HiPIP durchgeführt (Abb. 3-12).

Es zeigte sich, dass weder die Zellextrakte der KK-PhoA-, noch die der RR-PhoA-enthaltenden Zellen in der Lage waren, HiPIP abzubauen. Lediglich das Verhältnis von *precursor* zu maturem HiPIP wurde verringert, aber es war kein Unterschied in der Proteaseaktivität der beiden getesteten Zellextrakte erkennbar. Somit kann eine gesteigerte Proteaseaktivität nicht der

Grund für die geringere Menge an RR-PhoA und HiPIP in dem RR-PhoA-Stamm (Abb. 3-11) und damit die Antwort auf den toxischen Effekt sein.

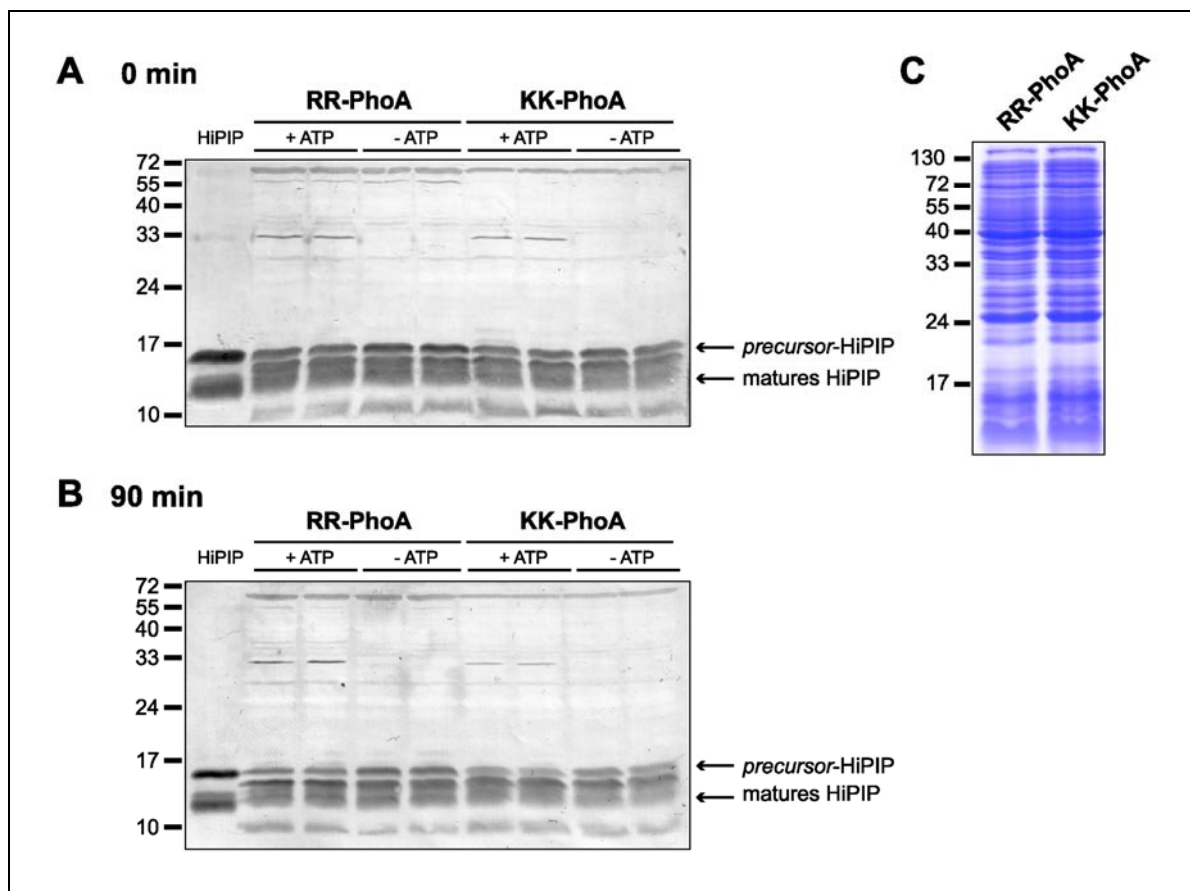


Abb. 3-12: *In vitro*-Protease-Assay mit Zellextrakt und *In vitro*-gefaltetem HiPIP. Je zwei Ansätze mit Zellextrakt von den Stämmen MC4100 pABS-tatABC mit pEX-hip^{SP}-phoA-tac (RR-PhoA) und pEX-hip^{SP}-KK-phoA-tac (KK-PhoA) wurden mit und ohne ATP-Zugabe 0 min (A) und 90 min (B) bei 37 °C inkubiert. In der Spur 1 ist jeweils das eingesetzte *in vitro*-gefaltete HiPIP aufgetragen. (15% SDS-PAGE, Western Blot, Detektion mit α-HiPIP-Serum und Chloronaphтол) C) Vergleich der Zellextrakte. (15% SDS-PAGE, Coomassiegefärbt)

3.2.5.2 Induzierbare Expression

Da bei konstitutiver Expression von RR-phoA die Zellen sehr schnell zu ihrem normalen Wachstum revertierten und damit den toxischen Effekt unterdrückten, war es notwendig das Expressionssystem zu wechseln. Ausgewählt wurde der Arabinose-regulierbare Expressionsvektor pBAD22 (Guzman et al., 1995), der neben der regulierbaren Expression den Vorteil bietet, dass der Promotor durch Zugabe von Glukose ins Medium komplett reprimierbar ist. Mit den Plasmiden pEX-hip^{SP}-phoA-tac und pEX-hip^{SP}-KK-phoA-tac als template und dem Primerpaar hip^{SP}-phoA-NcoI-F/hip^{SP}-phoA-XbaI-R wurde das Fragment hip^{SP}-phoA amplifiziert und nach Verdau mit NcoI und XbaI über die gleichen Schnittstellen in das Plasmid pBAD22 eingefügt, resultierend in pBAD-hip^{SP}-phoA und pBAD-hip^{SP}-KK-phoA. Mit diesen Plasmiden konnte die Expression von RR-phoA durch Zugabe von 0.1% Glucose im Medium reprimiert und dann erst

zum gewünschten Zeitpunkt durch Zugabe von 0.5% Arabinose induziert werden. Immer wenn im Folgenden Arabinose-induzierbare Plasmide eingesetzt wurden, wurde ein Arabinose-resistentes Derivat des WT-Stammes MC4100 (Berthelmann & Brüser, 2004) verwendet. Zuerst wurde erneut eine Wachstumskurve aufgenommen (Abb. 3-13).

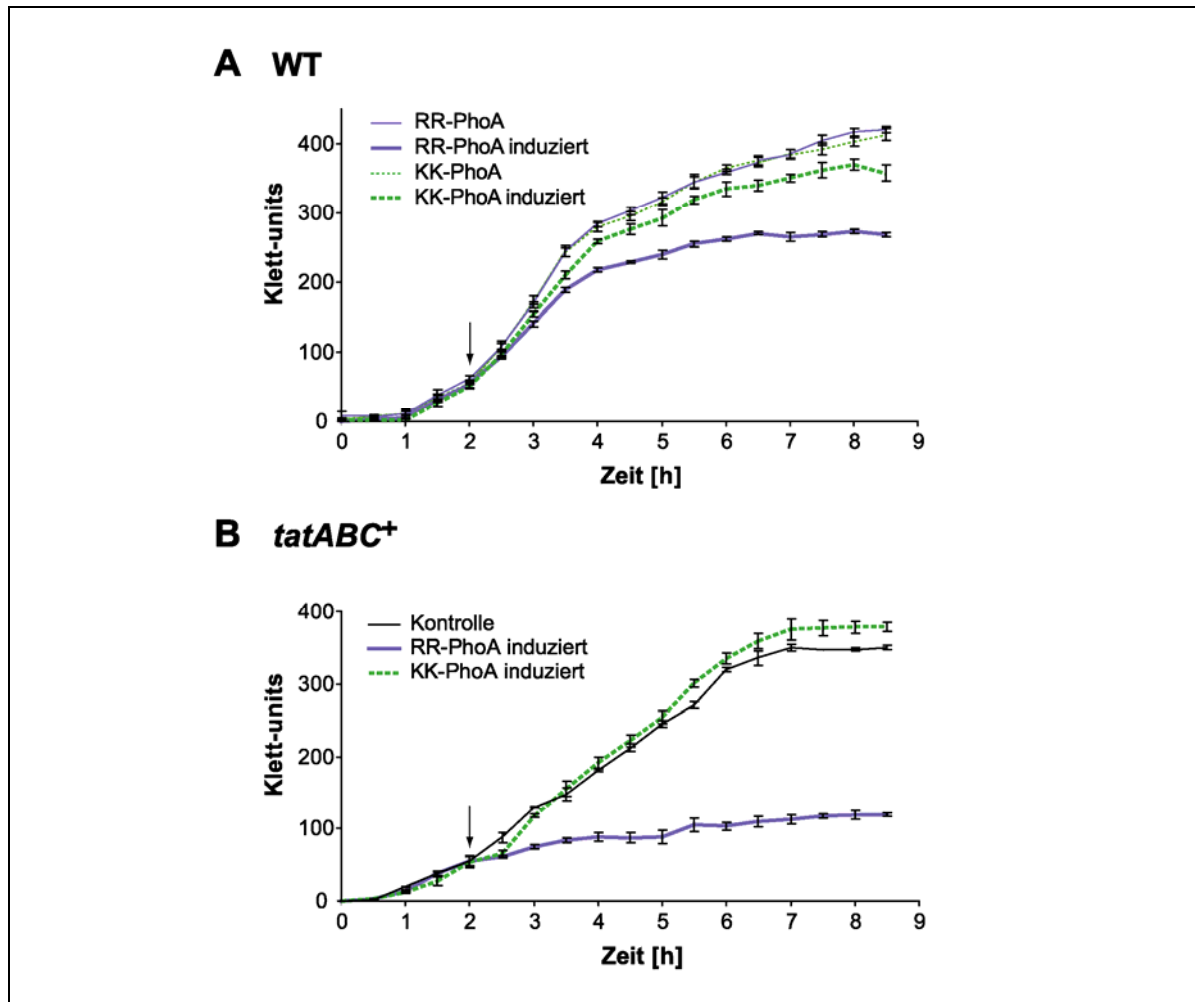


Abb. 3-13: Der toxische Einfluss von RR-PhoA auf das Zellwachstum. A) Wachstumskurven von MC4100 mit pBAD-*hip*^{SP}-*phoA* (RR-PhoA) und pBAD-*hip*^{SP}-*KK-phoA* (KK-PhoA), jeweils uninduziert (dünne Linie) und induziert (dicke Linie). B) Wachstumskurven von MC4100 pABS-*tatABC* mit pBAD22 (Kontrolle), pBAD-*hip*^{SP}-*phoA* (RR-PhoA) und pBAD-*hip*^{SP}-*KK-phoA*. Die Zeitpunkte der Induktion mit 0.5% Arabinose sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die angegebenen Standardabweichungen basieren auf Messungen von drei unabhängigen Zellkulturen.

Betrachtet man zunächst die Wachstumskurve mit WT-TatABC-Hintergrund (Abb. 3-13A), fällt auf, dass nach Induktion der Stamm mit RR-PhoA eindeutig schlechter wuchs als der Stamm mit KK-PhoA. Somit trat der toxische oder cytostatische Effekt nicht nur bei Überexpression von *tatABC* auf.

Wurde nun aber auch noch *tatABC* überexprimiert (Abb. 3-13B), wuchs der RR-*phoA*-exprimierende Stamm nach der Induktion fast gar nicht mehr, wogegen die Expression von KK-*phoA* keinen Einfluss auf das Wachstum hatte. Der KK-*phoA*-exprimierende Stamm wuchs genauso schnell wie der Stamm mit dem leeren Vektor. Da die Inhibition des Wachstums

eindeutig auf das Vorhandensein des RR-Motives zurückzuführen war und auch noch deutlich anstieg, wenn die Menge von TatABC erhöht wurde, ist der toxische Effekt sehr wahrscheinlich eine Folge einer Interaktion zwischen RR-PhoA und den Tat-Komponenten. Eine solche Interaktion kann eigentlich nur auf einem Targeting beruhen. Das ist besonders interessant, wenn man bedenkt, dass PhoA im Cytoplasma nicht vollständig falten kann und ein solches Targeting eigentlich durch eine Qualitätskontrolle der Faltung verhindert werden sollte.

Wichtig ist, dass die Anzahl der lebenden Zellen während des Wachstumsstillstandes nicht abnahm, da die Anzahl der *colony forming units* bezogen auf eine OD₆₀₀ von 1 konstant blieb ($2.5 \cdot 10^8$ cfu/ml).

Bei der konstitutiven Expression von RR-*phoA* war bereits aufgefallen, dass die Zellen eine Möglichkeit finden, den toxischen Effekt abzuwenden, d.h. zu ihrem normalen Wachstum zu revertieren. Mit Hilfe der induzierbaren Expression konnte der Zeitpunkt der Reversion genauer bestimmt werden (Abb. 3-14).

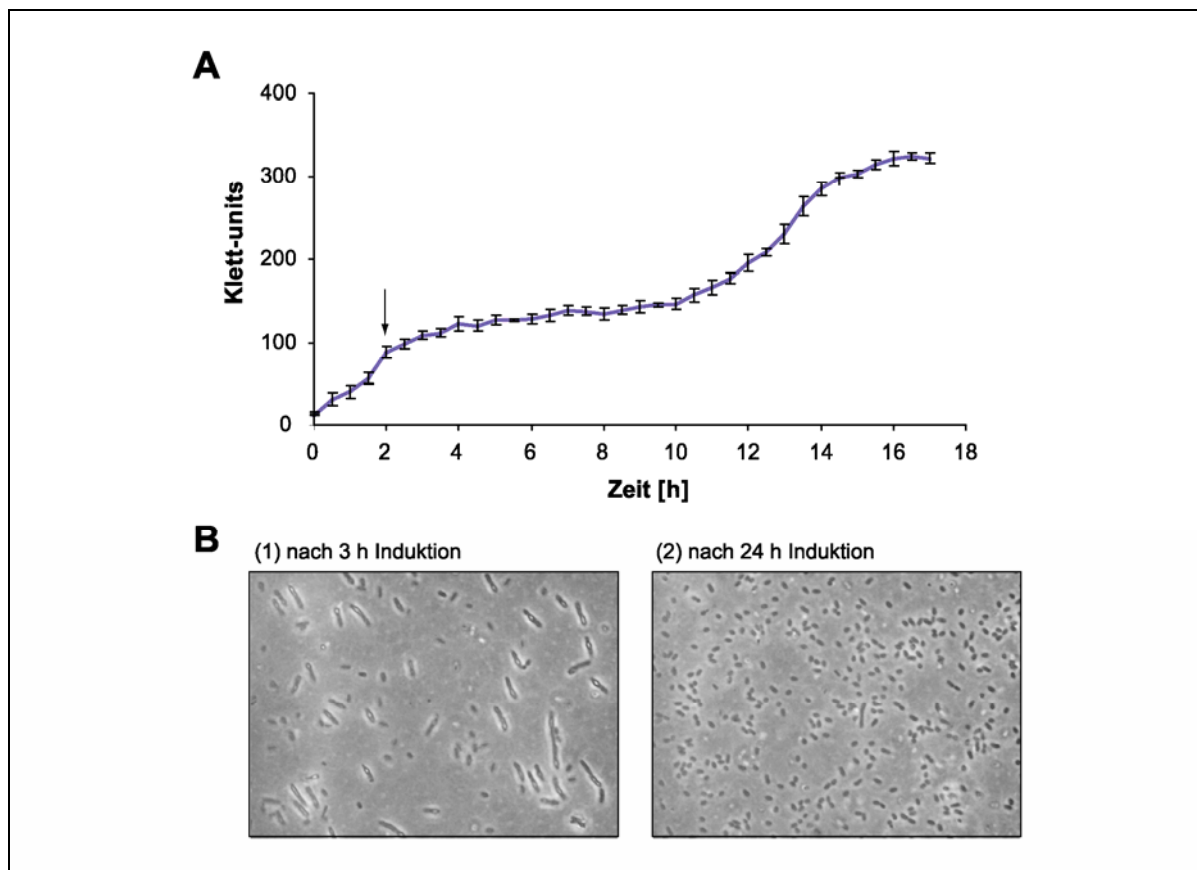


Abb. 3-14: Die Rückkehr der RR-*phoA*-exprimierenden Stämme zum normalen Wachstum. A) Wachstumskurve von MC4100 pABS-*tatABC* pBAD-*hip^{SP}-phoA*. Der Zeitpunkt der Induktion mit 0.5% Arabinose ist durch den Pfeil gekennzeichnet. Die angegebenen Standardabweichungen basieren auf Messungen von drei unabhängigen Zellkulturen. B) Zellmorphologie von MC4100 pABS-*tatABC* pBAD-*hip^{SP}-phoA* 3 Stunden (1) und 24 Stunden (2) nach der Induktion.

Es zeigte sich, dass die Zellen nach der Induktion nach einem achtstündigen Wachstumsstillstand wieder zum normalen Wachstum zurückkehren konnten. Dieser Effekt war auch an der

Zellmorphologie zu erkennen (Abb. 3-14B). 3 h nach Beginn der Induktion bildeten die Zellen lange und zum Teil keulenförmige Stäbchen. Dagegen zeigten sie nach 24 h Induktion wieder den Phänotyp eines gesunden MC4100-Stammes.

3.2.6 Reduzierung der Anzahl der Plasmidkopien als Antwort auf den cytostatischen Effekt

Nun stellte sich die Frage, wie es den Zellen gelang, den toxischen Effekt abzuwenden und zu ihrem normalen Wachstum zurückzufinden. Im Abschnitt 3.2.5.1 wurde bereits vermutet, dass die Proteaseaktivität gesteigert sein könnte. Dagegen sprachen aber die Ergebnisse des oben geschilderten Protease-Assays.

Um Unterschiede im Proteinmuster der Stämme zu detektieren, wurden Fraktionierungen von Periplasma, Membranen und Cytoplasma durchgeführt und die Fraktionen im Coomassie-gefärbtem SDS-Gel miteinander verglichen (Abb. 3-15).

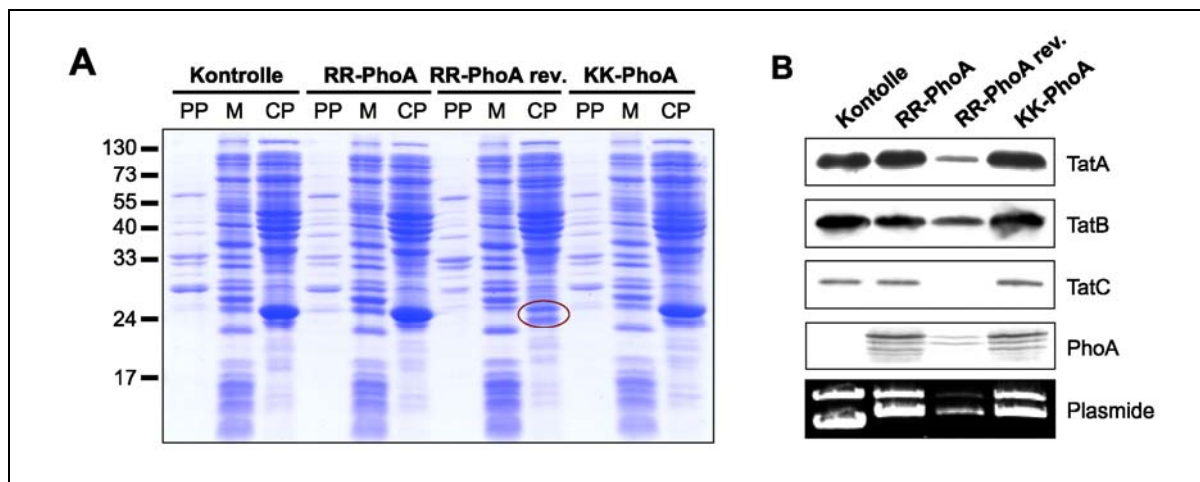


Abb. 3-15: Der toxische RR-PhoA-Effekt wird durch eine Reduzierung der Plasmidkopien abgewendet. A) Subzelluläre Fraktionen von MC4100 pABS-*tatABC* mit pBAD22 (Kontrolle), pBAD-*hip^{SP}-phoA* (RR-PhoA = frisch induziert, RR-PhoA rev. = bereits revertiert) und pBAD-*hip^{SP}-KK-phoA* (KK-PhoA); (15% SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt). Markiert wurde das stark reduzierte Protein bei ca. 24 kDa im Cytoplasma des revertierten RR-PhoA-Stammes. B) Membranfraktionen der Stämme wie unter A). Detektiert wurden nach Western Blot mit dem ECL-System mit spezifischen Antikörpern: TatA (bei 18 kDa), TatB (bei 30 kDa), TatC (bei 28 kDa) und PhoA (obere Bande bei 55 kDa). Weiterhin gezeigt ist ein NcoI-Restriktionsverdau (Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel) von Miniplasmidpräparationen gleicher Menge an eingesetzten Zellen. Die obere Bande entspricht linearisiertem pABS-*tatABC* (7142 bp). Die jeweils untere Bande entspricht einem 4542-bp-Fragment aus pBAD22 (Kontrolle = Vektor ohne Insertion), bzw. einem 5119-bp-Fragment aus den Plasmiden pBAD-*hip^{SP}-phoA* (RR-PhoA) und pBAD-*hip^{SP}-KK-phoA* (KK-PhoA).

Es zeigte sich, dass im Cytoplasma des revertierten RR-PhoA-Stammes ein Protein mit der Größe von ca. 24 kDa stark reduziert vorlag, wogegen es in den anderen Stämmen in sehr hohen Mengen detektierbar war (Abb. 3-15A). Durch den Vergleich der Proteinmuster mit dem WT-Stamm stellte sich heraus, dass es sich bei diesem Protein um die Chloramphenicol-acetyltransferase handeln muss, welche die Chloramphenicol-Resistenz von pABS-*tatABC*

vermittelt. Die Western-Blot-Analyse der Membranfraktionen mit spezifischen Antikörpern (Abb. 3-15B) zeigte, dass die Menge an Tat-Proteinen, als auch die an RR-PhoA in den Revertanten sehr verringert war. Dass diese Verminderung aber keiner Proteolyse zuzuschreiben war, zeigte die Analyse der Plasmidminipräparation (Abb. 3-15/Plasmide). Die Bakterien scheinen als Antwort auf den toxischen Effekt, der nach der Expression von *tatABC* und RR-*phoA* auftritt, die Kopienanzahl beider Expressionsplasmide so zu reduzieren, dass sie gerade noch auf den entsprechenden Antibiotika wachsen können, aber die Expressionsprodukte keinen Schaden mehr anrichten können. Wurden diese Plasmide erneut transformiert, lagen sie wieder in einer normalen Kopienzahl vor (Ergebnisse nicht gezeigt). Somit wurde die verringerte Kopienzahl der „Revertanten“, welche nach diesem Ergebnis eigentlich Suppressor-Mutanten genannt werden sollten, nicht durch Mutationen auf dem Plasmid verursacht.

3.2.7 Das Targeting von RR-PhoA zum Tat-Translokon schwächt den Protonengradienten über der Cytoplasmamembran

Da eine Interaktion von RR-PhoA und den Tat-Komponenten wahrscheinlich an der Membran erfolgte und der toxische Effekt stark anstieg, wenn der TatABC-Level erhöht wurde, lag die Vermutung nahe, dass das Targeting Auswirkungen auf den Protonengradienten (ΔpH) der Cytoplasmamembran haben könnte. Eventuell könnte bei einem Versuch des Translokons RR-PhoA zu transportieren, der Protonengradient geschwächt werden. Vorstellbar wäre auch ein Protonen-*leakage*, welches durch eingefädelt und in die Membran entlassenes RR-PhoA hervorgerufen wird. Die Membranstabilität und das Vermögen einer Membran, einen ΔpH aufzubauen und zu halten, wurde mit Hilfe der Methode des Fluoreszenz Quenching mit invertierten Vesikeln (INV) der entsprechenden Stämme getestet.

Es zeigte sich, dass alle getesteten INV in der Lage waren, nach ATP-Zugabe einen ΔpH über der Membran aufzubauen (Abb. 3-16A). Zum Zeitpunkt der ATP-Zugabe begann die reversible ATP-Synthase Protonen in das Innere der INV zu pumpen. Allerdings war der aufgebaute ΔpH bei den RR-PhoA-INV um ca. die Hälfte geringer als bei den INV, aus dem Stamm mit dem leeren Vektor (Kontrolle) oder aus dem KK-*phoA*-exprimierenden Stamm. Das zeigt, dass die Membranstabilität infolge der TatABC-RR-PhoA-Interaktion geschwächt wurde, und dass dieses Protonen-*leakage* an irgendeiner Stelle der Membran wahrscheinlich der Grund für die Inhibition des Wachstums ist.

Ein Vergleich der Proteine der INV im SDS-Gel (Abb. 3-16C) zeigte, dass die Proteinmuster und auch die Mengen an TatABC in allen Vesikeln gleich waren, und dass gleiche INV-Konzentrationen zur Messung eingesetzt wurden. Da die Zellen für die Präparation der RR-PhoA-INV während des Wachstumstillstandes geerntet wurden, soll an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die Zahl der lebenden Zellen während der Inhibition des Wachstums nicht geringer wurde (vgl. 3.2.5.2).

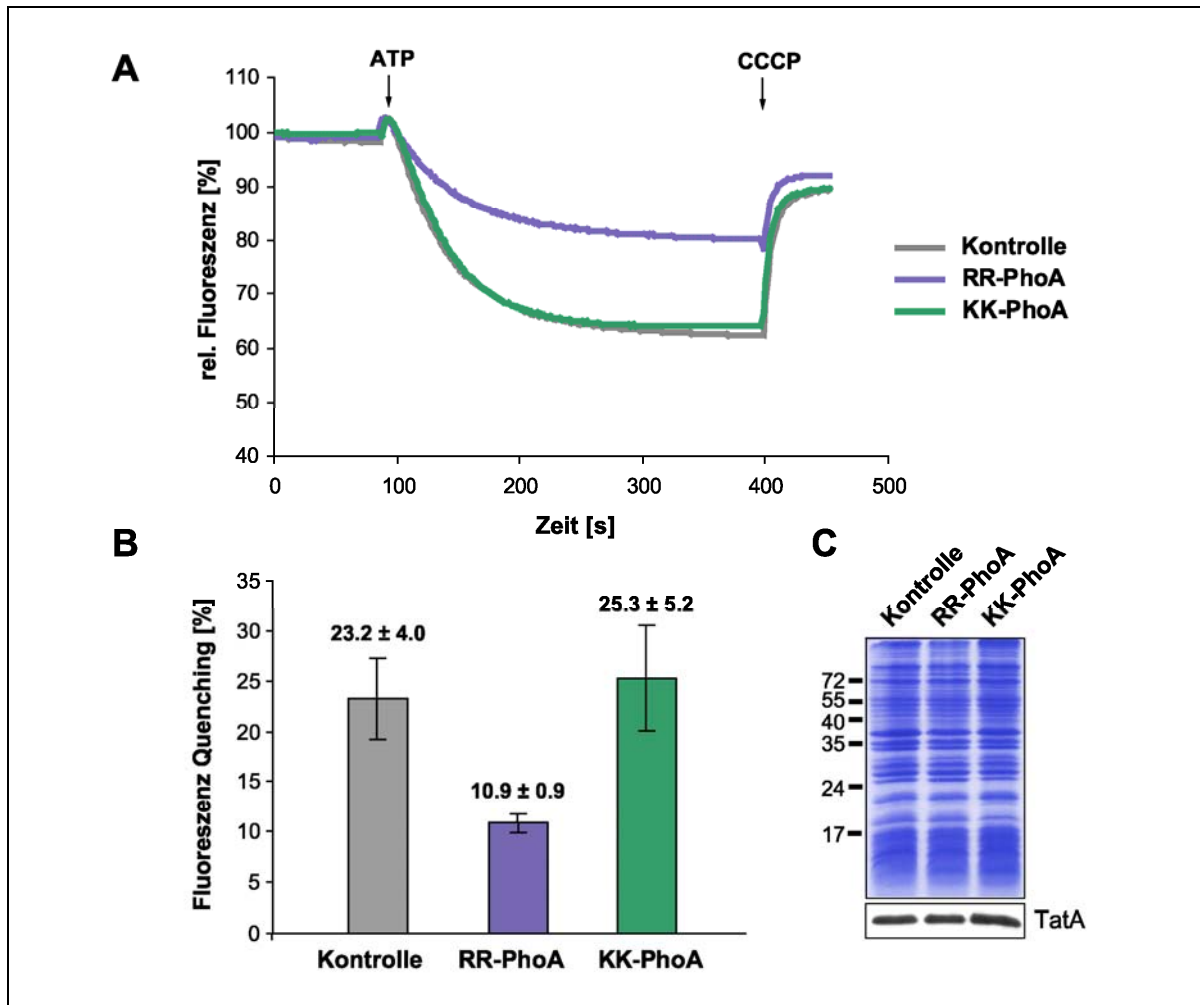


Abb. 3-16: Einfluss von RR-PhoA auf die Membranstabilität. A) Fluoreszenz-Quenching mit invertierten Vesikeln (INV) von MC4100 pABS-tatABC mit pBAD22 (Kontrolle), pBAD-hip^{SP}-phoA (RR-PhoA) und pBAD-hip^{SP}-KK-phoA (KK-PhoA). Gleiche Mengen an Zellen wurden nach 3 h Induktion mit 0.5% Arabinose geerntet und zur INV-Präparation eingesetzt. Die Pfeile kennzeichnen die Zugabe von ATP und dem Entkoppler CCCP. B) Das angegebene Fluoreszenz Quenching entspricht der Differenz der relativen Fluoreszenz vor und nach der CCCP-Zugabe. Die Werte und die angegebenen Standardabweichungen resultieren aus drei unabhängigen Messungen. C) Vergleich der Proteinmuster der eingesetzten INV in einer Coomassiegefärbten SDS-PAGE. Der Western Blot, detektiert mit α -TatA-Serum, zeigt, dass gleiche Mengen an Tat-Komponenten in den INV vorhanden waren.

3.2.8 RR-PhoA blockiert nicht das Translokation

Um herauszufinden, ob RR-PhoA nach einer Interaktion mit TatABC eventuell das Translokation blockierte, wurde der Transport von anderen Tat-Substraten bei gleichzeitiger Expression von RR-phoA betrachtet. Zunächst wurden die Auswirkungen auf den HiPIP-Transport untersucht (Abb. 3-17). Es stellte sich heraus, dass das Vorhandensein von RR-PhoA keine Veränderung des HiPIP-Transportes zur Folge hatte. Es wurde genauso viel HiPIP transportiert, wie bei gleichzeitiger Expression von KK-phoA (Abb. 3-17A).

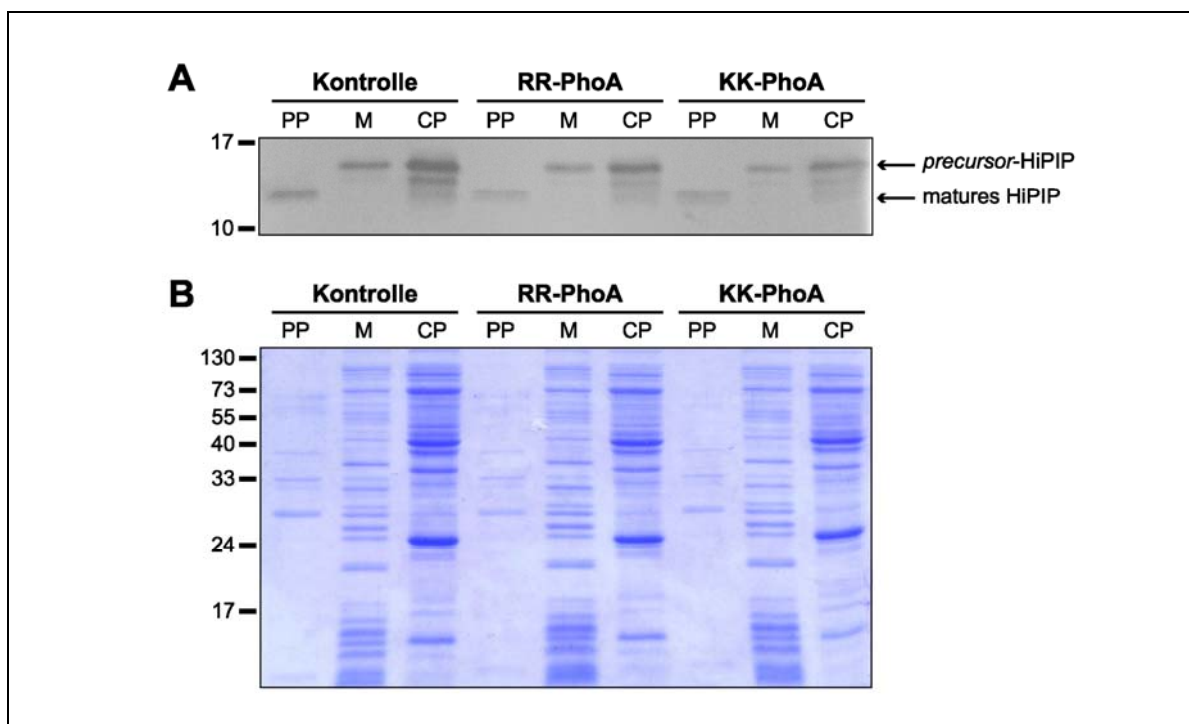


Abb. 3-17: Einfluss von RR-PhoA auf den HiPIP-Transport. Subzelluläre Fraktionen von MC4100 pABS-*tatABC-hip-tac* und jeweils pBAD22 (Kontrolle), pBAD-*hip^{SP}-phoA* (RR-PhoA) und pBAD-*hip^{SP}-KK-phoA* (KK-PhoA). Die Zellernte erfolgte 2 h nach Induktion mit 0.5% Arabinose. (15% SDS-PAGE; A) Western Blot, Detektion mit α -HiPIP-Serum und Färbung mit Chloronaphtol; B) Coomassie-gefärbt)

Es bleibt einzig festzustellen, dass die Gesamtmenge von HiPIP im RR-PhoA- und auch im KK-PhoA-enthaltenden Stamm leicht geringer war, als in der Kontrolle mit dem leeren Vektor. Das könnte dadurch erklärt werden, dass nach Induktion 5 Gene rekombinant exprimiert wurden, wogegen es in der Kontrolle nur 4 waren. Vielleicht stoßen hier die Zellen an ihre Grenzen, so dass die Expression der einzelnen Gene etwas verringert wird.

Ein weiterer Nachteil war, dass das *hip*-Gen konstitutiv exprimiert wurde. Somit war vor der RR-*phoA*-Induktion bereits so viel HiPIP ins Periplasma transportiert worden, dass eine Blockade von einigen Translokons zu diesem Zeitpunkt eventuell nicht mehr bemerkt werden konnte. Außerdem müsste eine Blockade des Tat-Transportes mit WT-TatABC-Hintergrund viel besser detektierbar sein. Hierbei wäre aber der HiPIP-Transport zu gering, um Unterschiede feststellen zu können. Deswegen wurde der Einfluss auf natürliche *E. coli*-Tat-Substrate untersucht. Das waren zum einen die TMAO-Reduktase und zum anderen die Amidasen AmiA und AmiC.

Da bekannt war, dass die Zugabe von Arabinose ins Medium einen negativen Einfluss auf den Tat-Transport von einigen Substraten haben kann (Barrett & Robinson, 2005), sollten RR-*phoA* und KK-*phoA* unter der Kontrolle des Rhamnose-induzierbaren Promotors *P_{rhaBAD}* exprimiert werden. Hierfür wurden die entsprechenden NdeI/HindIII-Fragmente aus pEX-*hip^{SP}-phoA-tac* und pEX-*hip^{SP}-KK-phoA-tac* ausgeschnitten und über die gleichen Schnittstellen in den Vektor pJOE2702 (Voff et al., 1996) eingefügt. Es entstanden die Plasmide pJOE-*hip^{SP}-phoA* und pJOE-*hip^{SP}-KK-phoA*, welche eine Rhamnose-regulierbare Expression von RR-*phoA* und KK-*phoA* erlauben.

Zunächst wurde mit Hilfe dieser Plasmide das anaerobe Wachstum auf TMAO der RR-PhoA- und KK-PhoA-enthaltenden Stämme verglichen (Abb. 3-18A/B). Es zeigte sich, dass keine Unterschiede im Wachstum zwischen den beiden Stämmen zu erkennen waren. Der Grund dafür könnte aber sein, dass die Zellen auf TMAO sehr langsam wachsen, und somit könnte die unter 3.2.6 beobachtete Reduzierung der Anzahl der Plasmidkopien, während der sehr langen lag-Phase, bereits stattgefunden haben. In diesem Fall wäre, aufgrund der geringen Menge an RR-PhoA, eine Blockade von Tat-Translokons nicht mehr detektierbar. Deshalb wurde zusätzlich eine TorA-Aktivitätsfärbung im nativen Gel nach Silvestro *et al.* (1989) durchgeführt (Abb. 3-19C).

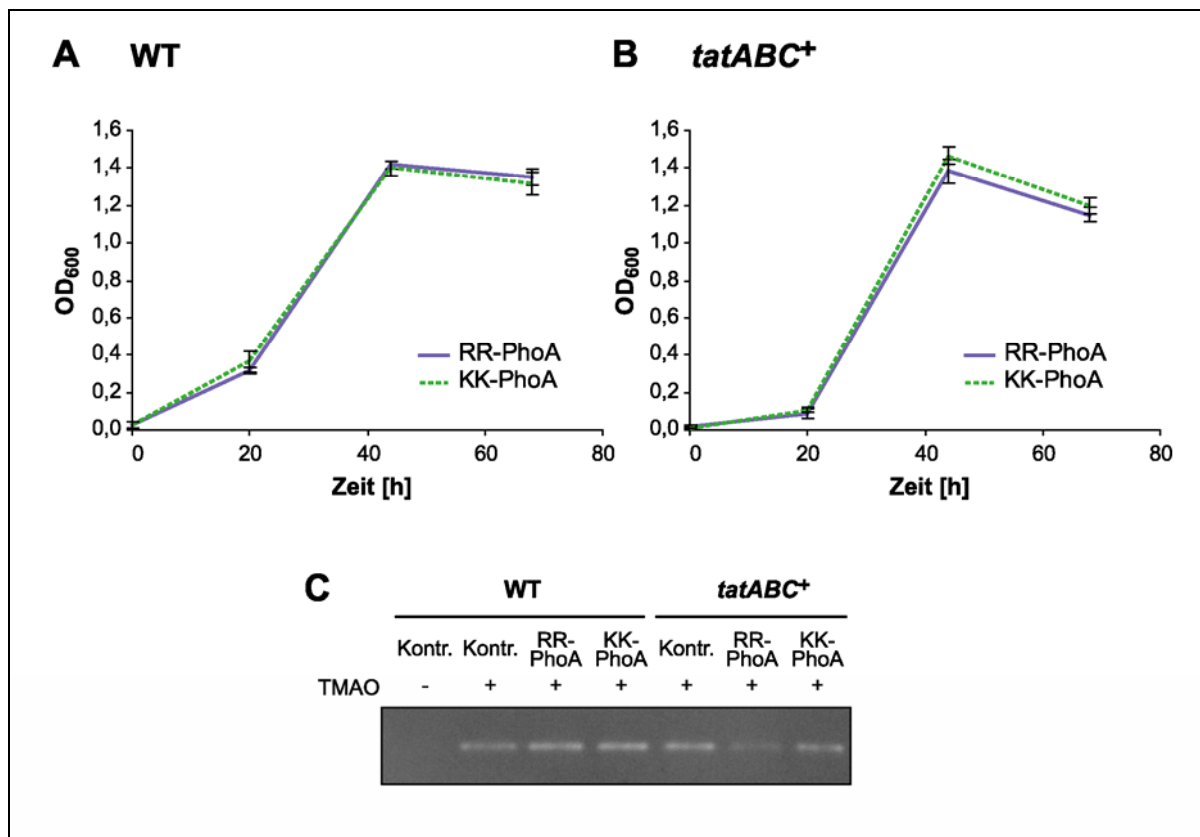


Abb. 3-18: Einfluss von RR-PhoA auf den TorA-Transport. A) Wachstum auf TMAO von MC4100 pJOE-*hip*^{SP}-*phoA* (RR-PhoA) und pJOE-*hip*^{SP}-KK-*phoA* (KK-PhoA); Induktion mit 0.01% Rhamnose. B) Wachstum auf TMAO von MC4100 pABS-*tatABC* pJOE-*hip*^{SP}-*phoA* (RR-PhoA) und pJOE-*hip*^{SP}-KK-*phoA* (KK-PhoA); Induktion mit 0.01% Rhamnose. C) TorA-Aktivitäts-Färbung im nativen Gel (10% native PAGE). Hierfür wurden aerobe Vorkulturen (entsprechend A und B, Kontr. = leerer Vektor (pJOE2702)) mit 0.01% Rhamnose induziert. Nach 2 h wurden die Zellen geerntet und in LB mit 0.5% Glycerol, 0.4% Nitrat, 0.01% Rhamnose und +/-1.1% TMAO zur Induktion von *torA* überführt. Nach einer weiteren Stunde anaerobem Wachstum wurden die Zellen geerntet, das Periplasma fraktioniert, in einer nativen PAGE getrennt und einer TorA-Aktivitätsfärbung unterzogen. Eine Kultur (linke Spur) wurde nicht induziert um die Induktion der Aktivitäts-Bande durch TMAO zu zeigen.

Hierfür wurde 2 h nach der Induktion von RR-*phoA* und KK-*phoA*, nach einem Wechsel zu anaerobem Wachstum, durch die Zugabe von TMAO die Expression von *torA* induziert. Anschließend wurde die Menge an transportiertem TorA im Periplasma nachgewiesen. Falls RR-PhoA die Tat-Translokons blockiert hätte, müsste die Menge an TorA im Periplasma

abnehmen. Dieser Effekt sollte vor allem mit wenigen Translokons, d.h. mit WT-TatABC-Hintergrund, erkennbar sein. Das Gegenteil aber war der Fall (Abb. 3-18C). Mit WT-Hintergrund war die Menge an transportiertem TorA bei Vorhandensein von RR-PhoA nicht reduziert. Erst als auch *tatABC* überexprimiert wurde, nahm die TorA-Aktivität im Periplasma ab. Das deutet darauf hin, dass diese Abnahme ein sekundärer Effekt ist. Da die Interaktion zwischen TatABC und RR-PhoA ein Protonen-*leakage* zur Folge hat (Abb. 3-16), könnte dieses wiederum eine Abnahme des Δ pH-abhängigen Tat-Transportes weiterer Tat-Substrate nach sich ziehen. Ein dauerhaftes Verstopfen oder Blockieren des Tat-Translokons durch RR-PhoA erscheint aber aufgrund der Datenlage sehr unwahrscheinlich.

Ein ähnliches Ergebnis zeigt der Transport der Amidasen AmiA und AmiC, die bei der Zellteilung eine Rolle spielen. Dieser kann durch das Vermögen der Zellen auf SDS wachsen zu können, nachgewiesen werden. Ize *et al.* (2003) zeigten, dass Zellen bei denen der Tat-Transport der Amidasen gestört ist, sensitiver auf SDS reagieren als ein WT-Stamm, wobei die genaue Ursache dieser Beobachtung nicht geklärt ist.

Mit WT-TatABC-Hintergrund zeigte der RR-PhoA-Stamm im Vergleich mit den Kontrollen nur eine minimale Erhöhung der SDS-Sensitivität bei den niedrigen SDS-Konzentrationen. Genau wie bei der TorA-Aktivität stieg die SDS-Sensitivität erst, wenn auch die *tat*-Gene überexprimiert wurden. Somit zeigt auch dieses Ergebnis, dass eine Blockade des Tat-Transportes durch RR-PhoA nicht stattfindet. Erst wenn der cytostatische Effekt auftritt, der wahrscheinlich auf ein Protonen-*leakage* über der Cytoplasmamembran zurückzuführen ist, hat das auch einen negativen Einfluss auf den PMF-abhängigen Transport der natürlichen Tat-Substrate.

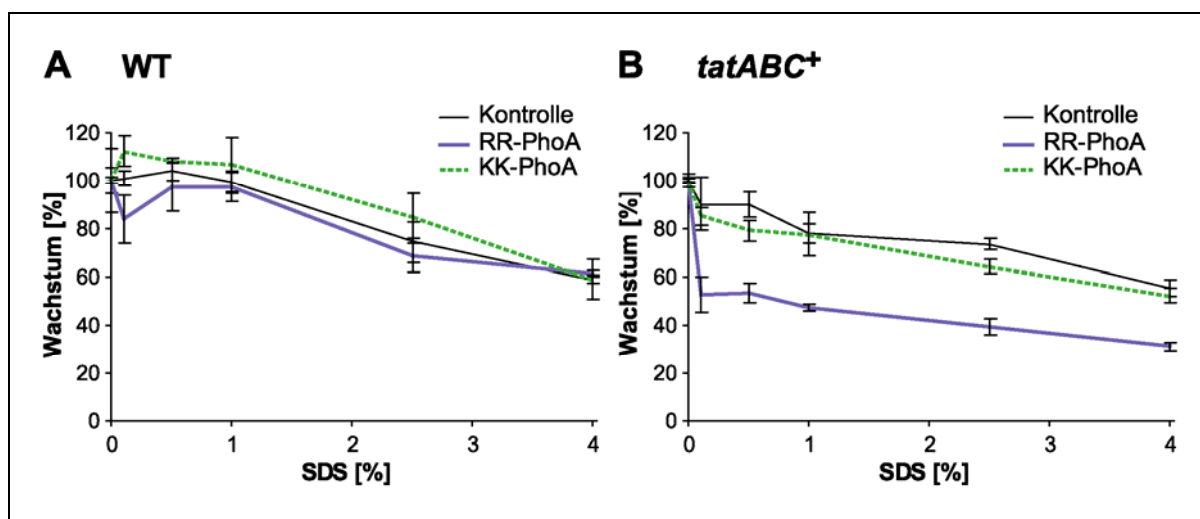


Abb. 3-19: Einfluss von RR-PhoA auf den Transport der Amidasen AmiA und AmiC. A) SDS-Sensitivitätsmessung von MC4100 mit dem leeren Vektor pJOE2702 (Kontrolle), pJOE-*hip*^{SP}-*phoA* (RR-PhoA) oder pJOE-*hip*^{SP}-KK-*phoA* (KK-PhoA); Induktion mit 0.01% Rhamnose. B) SDS-Sensitivitätsmessung wie unter A) mit gleichzeitiger Expression von *tatABC* mit Hilfe des Plasmides pABS-*tatABC*.

Da RR-PhoA nicht das Translokon blockiert, wird wahrscheinlich auch das Protonen-*leakage* nicht direkt am Translokon stattfinden. RR-PhoA könnte nach Interaktion mit dem Tat-

Translokon eingefädelt werden und nach unvollständigem Transport in die Membran entlassen werden. So ein Nicht-Membranprotein in der Membran könnte, wenn es lokal in erhöhten Mengen auftritt, die Membran schwächen und zu einem Protonen-*leakage* führen. Diese Vermutung könnte durch den Nachweis von RR-PhoA oder RR-PhoA-Abbauprodukte in der Membran untermauert werden. Dafür wurden Membranen von RR-PhoA- und KK-PhoA- enthaltenden Zellen präpariert und mit verschiedenen Chemikalien gewaschen oder mit Proteasen behandelt, um RR-spezifisch ein PhoA-Intermediat detektieren zu können (Abb. 3-20).

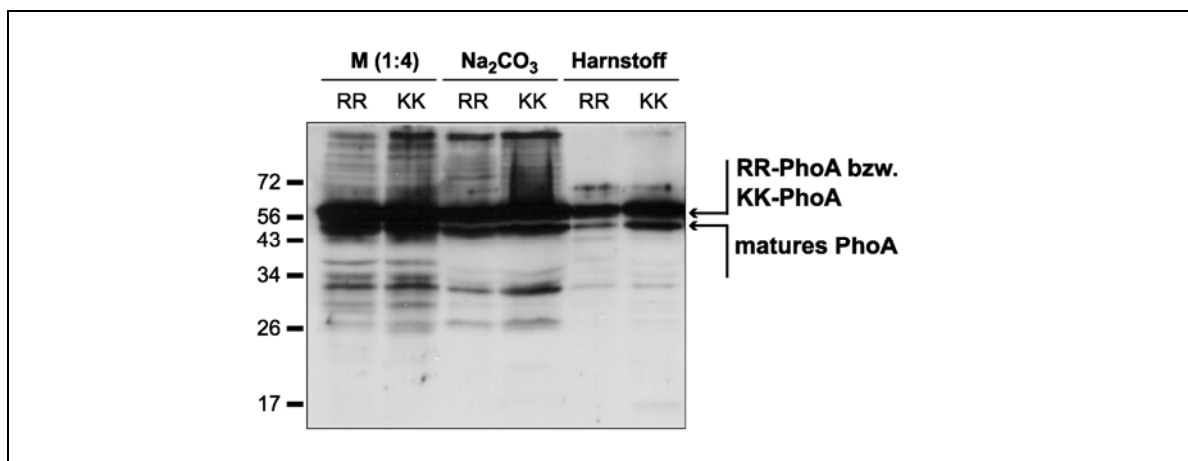


Abb. 3-20: Versuch der Detektion von membrangebundenen RR-PhoA-Abbauprodukten. Hierfür wurden Membranen von MC4100 pABS-*tatABC* und zusätzlich pBAD-*hip^{SP}-phoA* (RR) oder pBAD-*hip^{SP}-KK-phoA* (KK) präpariert, mit 0.18 M Na₂CO₃ oder 2 M Harnstoff 10 min auf Eis inkubiert und anschließend wieder sedimentiert. (15% SDS-PAGE, Western Blot, Detektion mit α -PhoA-Serum und ECL-System) In den Spuren 1-2 sind zum Vergleich die eingesetzten Membranen in einer Verdünnung von 1:4 aufgetragen.

Trotz mehrerer Versuche gelang es nicht eine *twin-arginine*-spezifische Bande zu detektieren. Es konnten verschiedene Abbauprodukte angereichert werden, die aber alle auch bei KK-PhoA entstanden. Die bekannten RR- und Tat-unabhängigen Membraninteraktionen von Tat-Substraten könnten die Ursache für das Vorhandensein von RR-PhoA und KK-PhoA in der Membran sein.

3.2.9 Direkter Nachweis der Interaktion zwischen RR-PhoA und dem Tat-System mittels BN-PAGE

Um einen direkten Nachweis der Interaktion zwischen RR-PhoA und dem Tat-Translokon zu erhalten, wurde die Methode der BN-PAGE verwendet. Beim Thylakoid-Tat-System konnten mit dieser Methode bereits Substrat-Translokon-Interaktionen gezeigt werden (Berghöfer & Klösgen, 1999), wogegen das beim bakteriellen System bisher nicht gelungen war. Es konnten aber bereits einige stabile TatABC-Komplexe nachgewiesen werden (Sargent *et al.*, 2001; Bolhuis *et al.*, 2001; Oates *et al.*, 2003; Oates *et al.*, 2005).

Zunächst wurden verschiedene Detergenzien für die Solubilisierung getestet, wobei mit Digitonin die besten Resultate erhalten wurden.

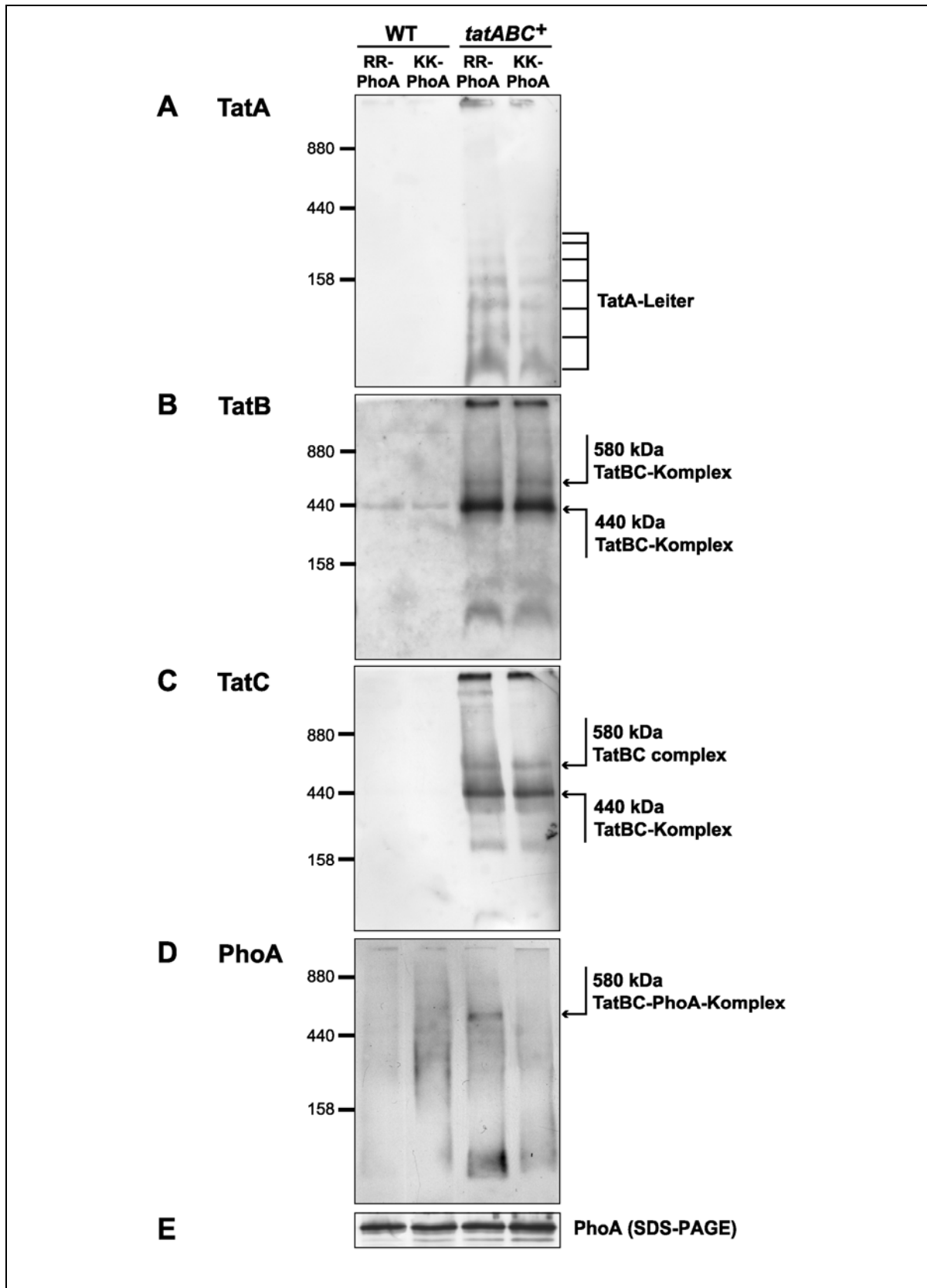


Abb. 3-21: RR-PhoA interagiert mit dem TatBC-Komplex. A-D) BN-PAGE von solubilisierten Membranen von MC4100 mit WT-TatABC-Hintergrund (WT) und *tatABC*-Überexpression mit dem Plasmid pABS-*tatABC* (*tatABC*⁺). Zusätzlich tragen die Stämme die Plasmide pBAD-*hip*^{SP}-*phoA* (RR-PhoA) oder pBAD-*hip*^{SP}-*KK-phoA* (KK-PhoA) (2 h Induktion mit 0.5% Arabinose). Detektion von TatA, TatB, TatC und PhoA nach Western Blot mit spezifischen Antikörpern und dem ECL-System. Als Marker wurden das Ferritin-Dimer (880 kDa), das Ferritin-Monomer (440 kDa) und die Aldolase (158 kDa) verwendet. E) Detektion von PhoA (obere Bande bei 55 kDa) in den solubilisierten Membranen von A-D (15% SDS-PAGE, Western Blot, Detektion mit α -PhoA-Serum und dem ECL-System).

Genau wie bei Oates *et al.* (2005), zeigten die TatA-Komplexe eine leiterähnliche Anordnung (Abb. 3-21A). Bei der Detektion von TatB und TatC waren auch „Leitern“ im unteren Bereich der Gele erkennbar, jedoch waren beide Proteine auch in zwei stabilen Komplexen auf gleicher Höhe nachweisbar, was darauf hindeutete, dass es sich um TatBC-Komplexe handelte (Abb. 3-21B/C). Der Großteil der Proteine fand sich in einem Komplex bei 440 kDa, der im Falle von TatB sogar mit WT-Mengen von TatABC detektierbar war. Es ist sehr wahrscheinlich, dass dieser Komplex dem 370 kDa-Komplex von Oates *et al.* (2005) entspricht. Zusätzlich zu diesem bekannten Komplex wurde aber noch ein neuer, weiterer TatBC-Komplex mit einer Größe von 580 kDa detektiert, der aber in geringeren Mengen vorlag. Interessanterweise konnte kein eindeutiges TatA-Signal auf der Höhe der beiden detektierten TatBC-Komplexe gefunden werden.

Bei der Detektion von PhoA fand sich eine scharfe Bande auf der Höhe des 580 kDa-Komplexes, die aber nur beim Vorhandensein von RR-PhoA und gleichzeitiger *tatABC*-Überexpression sichtbar war. Auch bei mehreren Analysen konnte eine solche Bande nie mit KK-PhoA detektiert werden. Somit war diese Bande abhängig vom RR-Motiv, was darauf hindeutet, dass es sich hierbei um eine echte Substrat-TatBC-Interaktion handelt. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass RR-PhoA nur detektierbar war, wenn TatABC in größeren Mengen als im WT vorlag. Da bei zusätzlicher Expression von *tatABC* mittels des Plasmides *pABS-tatABC* nur die Menge an TatABC zunahm, muss ein Erscheinen eines Komplexes bedeuten, dass RR-PhoA eine Interaktion mit dem 580 kDa-TatBC-Komplex eingegangen ist. Die Menge an RR-PhoA bzw. KK-PhoA war in allen solubilisierten Membranen gleich (Abb. 3-21E). Dass man auch KK-PhoA in der Membranfraktion wiederfindet, lässt sich durch eine RR-unabhängige Membraninteraktion vor dem Targeting erklären, die schon in einigen Arbeiten nachgewiesen wurde (Brüser *et al.*, 2003; Berghöfer & Klösigen, 1999; Cline & Mori, 2001; Hou *et al.*, 2006; siehe auch Abb. 3-20).

Somit konnte mit diesem 580 kDa-Komplex nicht nur ein neuer TatBC-Komplex, sondern auch erstmals ein Substrat-TatBC-Komplex bei Bakterien nachgewiesen werden. Interessanterweise handelt es sich bei dem Substrat um ungefaltetes PhoA mit einem Tat-Signalpeptid, welches nicht durch eine etwaige Qualitätskontrolle der Faltung am Targeting zum Translokon gehindert wurde.

Der 580 kDa-TatBC-enthaltende Komplex war auch ohne das Vorhandensein von RR-PhoA detektierbar. Um sicherzustellen, dass dieser Komplex wirklich unabhängig von PhoA-Konstrukten und dem gewählten *tatABC*-Expressionssystem gebildet wird, wurden WT-Membranen und Membranen von Stämmen mit zwei verschiedenen *tatABC*-Expressionssystemen mit Digitonin solubilisiert und in einer BN-PAGE analysiert (Abb. 3-22A).

In allen Fällen waren beide TatBC-enthaltenden Komplexe detektierbar. Mit dieser BN-PAGE konnte sogar gezeigt werden, dass auch mit WT-TatABC-Mengen beide Komplexe vorhanden sind und somit natürlich und unabhängig von der zusätzlichen Expression von *tatABC* gebildet

werden. Zusätzlich wurden auch weitere Banden unterhalb 440 kDa detektiert, die wahrscheinlich auf Disassemblierungen während der Solubilisierung zurückzuführen sind.

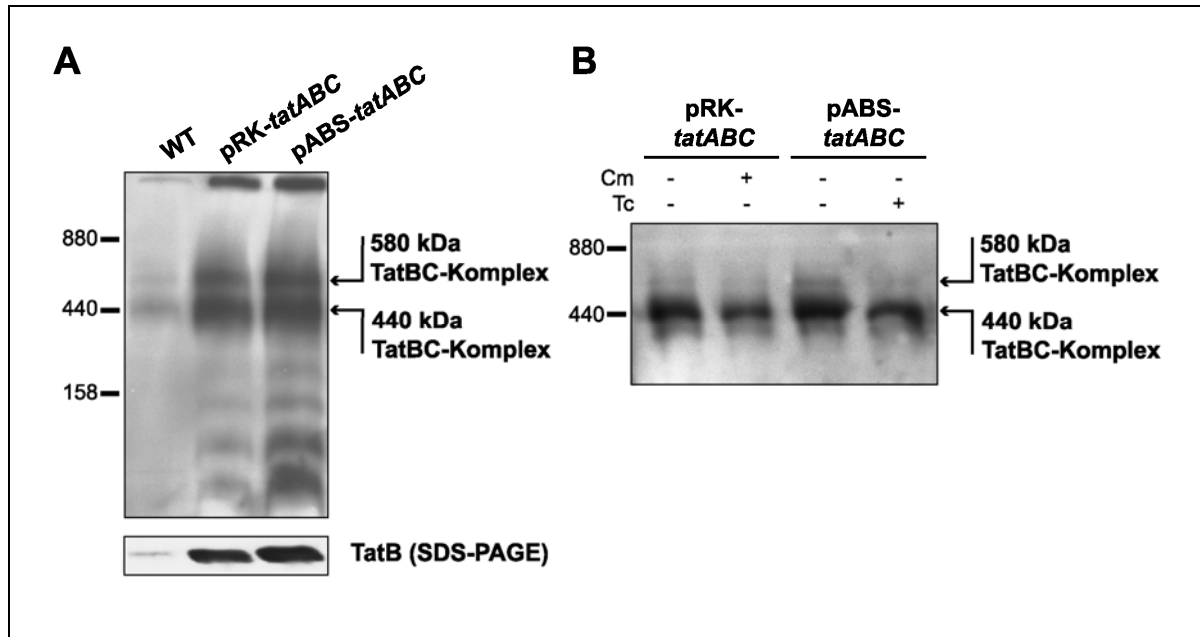


Abb. 3-22: A) Die TatBC-Komplexe bei 440 kDa und 580 kDa sind unabhängig von RR-PhoA und dem *tatABC*-Expressionssystem. BN-PAGE von solubilisierten Membranen von MC4100 mit WT-TatABC-Hintergrund (WT) und *tatABC*-Überexpression mit den Plasmiden pRK-*tatABC* und pABS-*tatABC*. Detektion von TatC nach Western Blot mit α -TatC-Serum und dem ECL-System. Als Marker wurden das Ferritin-Dimer (880 kDa), das Ferritin-Monomer (440 kDa) und die Aldolase (158 kDa) verwendet. Unterer Gelausschnitt: Vergleich der Menge von TatB (30 kDa) in den solubilisierten Membranen (15% SDS-PAGE, Western Blot, Detektion mit α -TatB-Serum und dem ECL-System). B) Auswirkungen einer Inhibition der Translation auf das Verhältnis der TatBC-Komplexe. BN-PAGE von solubilisierten Membranen von MC4100 mit WT-TatABC-Hintergrund (WT) und *tatABC*-Überexpression mit den Plasmiden pRK-*tatABC* und pABS-*tatABC*. 30 min vor der Zellernte wurden den Stämmen die Translationsinhibitoren Chloramphenicol (Cm) oder Tetracyclin (Tc) mit einer Endkonzentration von 170 μ g/ml bzw. 50 μ g/ml (Lopez et al., 1998) zugegeben. (Detektion von TatB nach Western Blot mit α -TatB-Serum und dem ECL-System)

Die Fragen, die sich nun stellten, waren: Könnte der 440 kDa-Komplex ein reiner TatBC-Komplex ohne gebundenes Substrat sein? Und könnte der 580 kDa-Komplex eventuell ein TatBC-Substrat-Komplex sein, der durch Substratbindung an den 440 kDa-Komplex entsteht?

Da die Mengen an natürlichen Tat-Substraten in den Komplexen zu gering sind, um sie in einer BN-PAGE nachweisen zu können, ist es nicht einfach diese Fragen zu klären. Eine Möglichkeit bestand darin, durch eine Zugabe von Translationsinhibitoren 30 min vor der Zellernte (nach Lopez et al., 1998), die Menge von *precursor*-Tat-Substraten im Cytoplasma zu verringern und die Auswirkungen auf das Verhältnis der beiden Komplexe zueinander zu betrachten. Sollte der 580 kDa-Komplex nach Substratbindung aus dem 440 kDa-TatBC-Komplex entstehen, müsste eine Abnahme der Tat-Substrate zur Folge haben, dass nur die Menge des 580 kDa-Komplexes abnimmt. Voraussetzung dafür ist die wahrscheinliche Annahme, dass eine Inhibition der Translation schneller Auswirkungen auf die Menge von noch nicht transportiertem Tat-Substrat hat, als auf die Menge von TatABC in der Membran.

Es konnte aber keine alleinige Abnahme des 580-kDa Komplexes beobachtet werden (Abb. 3-22B). Auch die Menge des 440 kDa-Komplexes war reduziert. Entweder war die Verringerung der Komplexe auf die Abnahme von TatABC zurückzuführen, oder es handelt sich bei beiden Komplexen um substratbindende Komplexe. Nach diesem Ergebnis scheint es aber eher unwahrscheinlich, dass der 580 kDa-TatBC-Komplex durch Substratbindung aus dem 440 kDa-Komplex hervorgeht.

Um die Laufhöhen der Komplexe besser vergleichen zu können, wurde ein Blot einer BN-PAGE mit den gleichen Spuren erst vor der Zugabe der verschiedenen Antikörper geteilt (Abb. 3-23). Sowohl mit dem TatB-Antikörper, als auch mit dem TatC-Antikörper ließen sich die beiden Komplexe genau auf derselben Höhe detektieren. Auch die Banden unterhalb 440 kDa zeigten ein vergleichbares Muster. Entweder disassemblierten die großen Komplexe während der Solubilisierung in kleinere TatBC-Komplexe, oder es handelt sich um kleinere, natürlich in der Membran vorkommende TatBC-Komplexe, die z.B. bei Substratbindung zu einem großen Komplex assemblieren können. Solche „Leitern“ von TatB und TatC, genau wie von TatA, wurden bereits von Oates *et al.* (2005) beschrieben. Interessanterweise bildete aber sowohl der 440 kDa- als auch der 580 kDa-TatBC-enthaltende Komplex keine scharfe Bande. Es sieht so aus, als würde die Bande nach oben „schmieren“. Betrachtet man die mit dem PhoA-Antikörper detektierte Bande, die eine stärkere Abgrenzung zeigt, befindet sich diese auf der Höhe des „Schmiers“ des 580 kDa-Komplexes, ein wenig oberhalb der Hauptintensität dieser Bande. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass beide Komplexe Substrate binden, und dass die Unschärfe der beiden Komplexe durch die unterschiedliche Größe der verschiedenen Tat-Substrate zustande kommt.

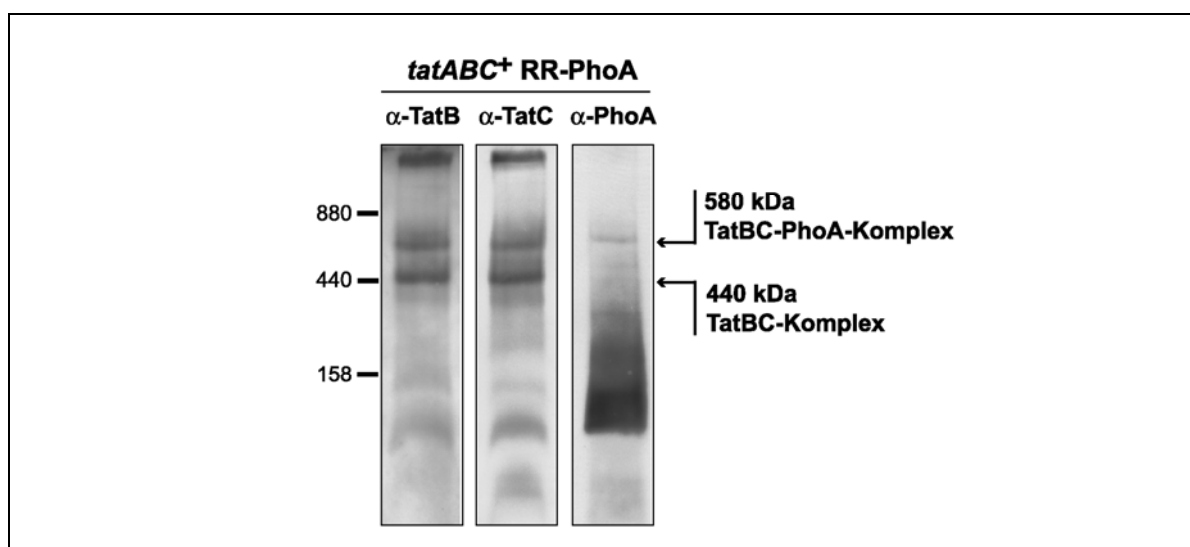


Abb. 3-23: Die Bindung von RR-PhoA bedingt eine leichte Verschiebung des 580 kDa-Komplexes. A) BN-PAGE von solubilierten Membranen von MC4100 mit pABS-*tatABC* und pBAD-*hip^{SP}-phoA*. Detektion von TatB, TatC und PhoA nach Western Blot mit spezifischen Antikörpern. Im Unterschied zu den vorhergehenden Abbildungen handelt es sich hier um ein Gel, das erst nach dem Western Blot vor der Antikörperzugabe geteilt wurde.

Um eindeutig nachzuweisen, dass RR-PhoA, TatB und TatC in einem Komplex vorliegen, sollte der Komplex mittels *Pull-down* oder über eine Streptactin®-Säule (mittels eines C-terminalen Strep-tags an TatC) gereinigt werden. Jegliche Versuche führten aber nicht zum Erfolg. Der 580 kDa-TatBC-RR-PhoA-Komplex ist wahrscheinlich so sensibel, dass er zwar die Solubilisierung übersteht, aber während einer weiteren Behandlung schnell zerfällt.

Da aber eindeutig gezeigt wurde (Abb. 3-21), dass die durch den PhoA-Antikörper detektierbare Bande bei 580 kDa (1) abhängig vom RR-Motiv ist und (2) erst erscheint, wenn die Menge an TatABC erhöht ist, kann man davon ausgehen, dass es sich um einen echten TatBC-RR-PhoA-Komplex handelt.

3.3 Tat-Transport von ungefalteten FG-repeats aus Nsp1p

Mit Hilfe von RR-PhoA konnte gezeigt werden, dass ein Targeting zum Tat-Translokon von ungefalteten Substraten möglich ist und nicht durch eine Qualitätskontrolle der Faltung verhindert wird. Aber warum erfolgt nach dem Targeting kein Transport? Auf der Suche nach einem Modell-Substrat für eine solche Fragestellung stießen wir auf Nsp1p, ein Protein aus Hefe, welches am Aufbau und an der Funktion des Kernporenkomplexes beteiligt ist. Nsp1p besitzt eine Domäne, die in ihrer nativen Form ungefaltet vorliegt. Die für uns besonders interessante Eigenschaft dieser Domäne war, dass sie aus 18 sich wiederholenden, annähernd identischen Sequenzen, sogenannten FG-repeats, besteht. Somit lassen sich, relativ einfach, durch Fusion an ein Tat-Signalpeptid ungefaltete Modell-Substrate mit unterschiedlichen Längen herstellen.

3.3.1 Das Nucleoporin Nsp1p als Teil des Kernporenkomplexes

In der Kernhülle von Hefen und Vertebraten befinden sich zahlreiche Kernporen, die für den Stoffaustausch zwischen dem Kern- und Cytoplasma sorgen. Sie erlauben eine passive Diffusion von Ionen und kleinen Molekülen und steuern einen Rezeptor-kontrollierten Transport von Proteinen, RNA's und Ribonucleoprotein-Partikeln (RNP's) (Köser *et al.*, 2005).

An der Kernpore verbindet sich die äußere und innere Kernmembran, und die Pore wird von einem Kernporenkomplex (*nuclear pore complex* = NPC) eingefasst, der eine achtfache Symmetrie aufweist (Abb. 3-24). Der NPC wird von ca. 30 verschiedenen Proteinen, sogenannten Nucleoporinen (Nups), gebildet. Zum Inneren des Zellkernes bilden die Proteine einen Korb und zum Cytoplasma Tentakel-ähnliche Ausläufer, die Filamente genannt werden. Dazwischen befinden sich mehrere Ringe, die zusammen einen zentralen Transportkanal formen (Abb. 3-24C). Viele der Nucleoporine enthalten charakteristische Domänen mit sich wiederholenden sehr ähnlichen Sequenzen, die zentral die Reste F und G besitzen. Diese FG-repeats spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen den Nucleoporinen und den Rezeptormolekülen der zu transportierenden Proteinkomplexe, RNA's oder RNP's (Rexach & Blobel, 1995). Nsp1p, ein 86 kDa-großes Protein enthält 18 solcher FG-repeats (Rout & Wente, 1994). Es ist in drei verschiedenen Subkomplexen vorhanden: auf der Cytoplasma- und der Kernseite der zentralen Pore (Transporter) und am distalen Ring der Korbstruktur (Fahrenkrog *et al.*, 1998). Die FG-repeats der Nups sind im nativen Zustand ungefaltet und unstrukturiert (Bayliss *et al.*, 2000; Allen, N.P. *et al.*, 2002; Denning *et al.*, 2002; Denning *et al.*, 2003), so dass z.B. die C-terminale Domäne von Nup153 bis zu 200 nm lang sein kann und den Weg vom distalen Ring der Korbstruktur bis zur cytoplasmatischen Seite des NPC's überbrücken kann. Diese strukturelle

Flexibilität spielt eine entscheidende Rolle bei den Aufgaben der Nups und damit auch dem Transport durch die Kernpore (Köser *et al.*, 2005).

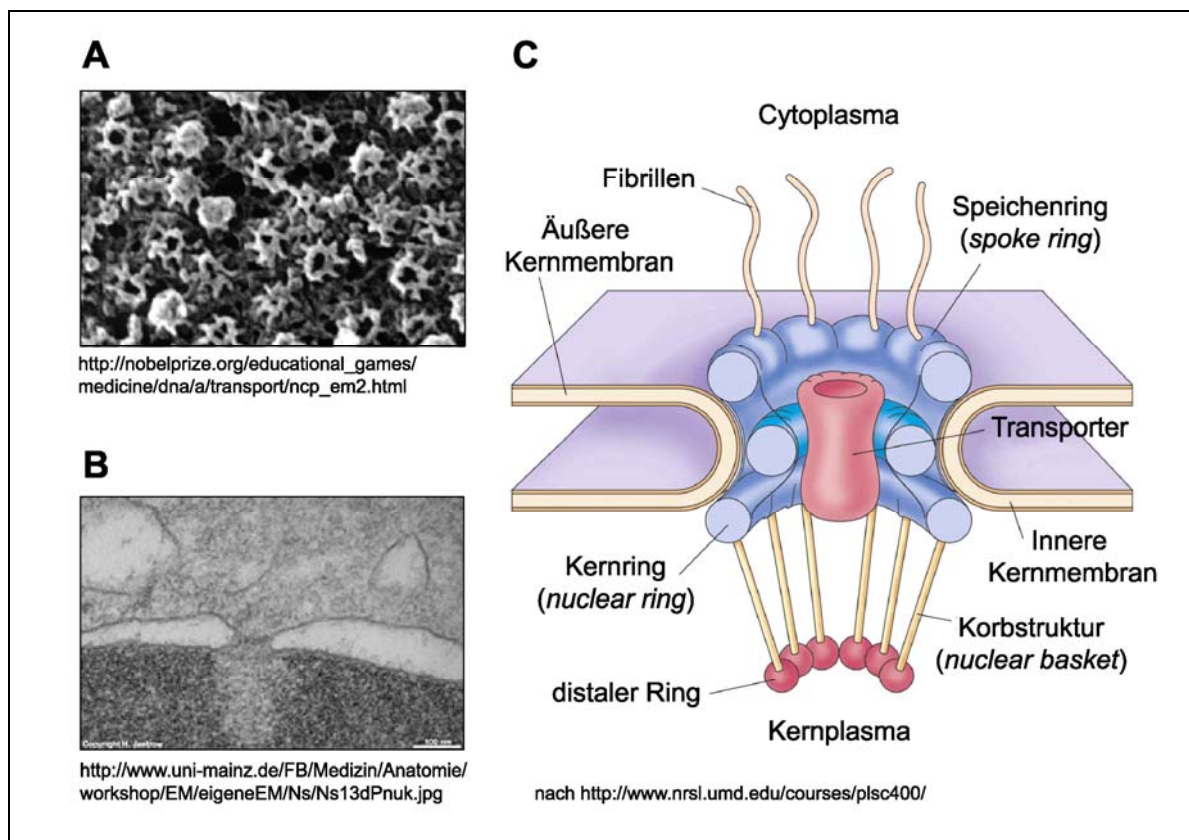


Abb. 3-24: Die Kernpore und der Kernporenkomplex (NPC). A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von NPC's von der Kernplasmaseite aus. Die Korbstruktur mit den acht Fibrillen ist deutlich zu erkennen. Die großen globulären Strukturen, die zu sehen sind, entsprechen RNP-Partikeln (mRNA + Protein), die vom Kern ins Cytoplasma transportiert werden (Kiseleva *et al.*, 1996). B) Elektronenmikroskopische Queransicht einer Kernpore. Man sieht, wie an diesen Stellen die innere mit der äußeren Kernmembran verbunden ist. C) Schematische Darstellung des Aufbaus eines NPC.

3.3.2 Die FG-repeats-Domäne wird bis zu einer Größe von ca. 23 kDa Tat-abhängig transportiert

Zunächst sollte wieder das HiPIP-Signalpeptid an die FG-repeats fusioniert werden, da es auch im Falle von PhoA ein Targeting zum Translokon vermitteln konnte. Voraussetzung das HiPIP-Signalpeptid ist in der Lage ein Targeting der FG-repeats zum Tat-Translokon zu vermitteln, sollte untersucht werden, ob ein kurzes Protein mit wenigen FG-repeats eventuell sogar Tat-abhängig transportiert werden kann. Es wurden Fusionen aus dem HiPIP-Signalpeptid und verschiedenen langen FG-repeats (1, 2, 3, 5, 7, 10 und 17 repeats) hergestellt.

Als Expressionsplasmid wurde der Rhamnose-regulierbare Expressionsvektor pBW22 ausgewählt (Wilms *et al.*, 2001). Um das *hip*-Signalpeptid mit der benötigten BamHI-Schnittstelle am Ende in den Vektor zu übertragen, wurde das *hip*-Fragment mittels NdeI und Scal aus dem Plasmid pEXH5-BamHISP ausgeschnitten und über die gleichen Schnittstellen in das Plasmid pBW22 eingefügt. Anschließend wurde mittels QuikChange™-Mutagenese

(Stratagene) und dem Primerpaar *hip*-KK-F/*hip*-KK-R das *twin-arginine*-Motiv im Signalpeptid von HiPIP in zwei Lysine ausgetauscht. Erhalten wurden die beiden Plasmide pBW-*hip*-H6-BamHI und pBW-*hip*-KK-H6-BamHI. In diese Plasmide konnten nun über die Schnittstellen BamHI und XhoI die verschieden langen *nsp1p*-Fragmente eingefügt werden, die durch PCR mit den Primern *nsp1p*-BamHI-F und entsprechend *nsp1p*-XhoI-R1, *nsp1p*-XhoI-R2, *nsp1p*-XhoI-R3, *nsp1p*-XhoI-R5, *nsp1p*-XhoI-R7, *nsp1p*-XhoI-R10 oder *nsp1p*-XhoI-R17 und dem Plasmid pNsp1-FF18 als *template* erhalten wurden. Das Ergebnis waren die Plasmide pBW-*hip*^{SP}-*nsp*R1-H6, pBW-*hip*^{SP}-*nsp*R2-H6, pBW-*hip*^{SP}-*nsp*R3-H6, pBW-*hip*^{SP}-*nsp*R5-H6, pBW-*hip*^{SP}-*nsp*R7-H6, pBW-*hip*^{SP}-*nsp*R10-H6, pBW-*hip*^{SP}-*nsp*R17-H6, pBW-*hip*^{SP}-KK-*nsp*R1-H6, pBW-*hip*^{SP}-KK-*nsp*R2-H6, pBW-*hip*^{SP}-KK-*nsp*R3-H6, pBW-*hip*^{SP}-KK-*nsp*R5-H6, pBW-*hip*^{SP}-KK-*nsp*R7-H6, pBW-*hip*^{SP}-KK-*nsp*R10-H6 und pBW-*hip*^{SP}-KK-*nsp*R17-H6, mit denen jetzt die unterschiedlich langen Fusionsproteine aus HiPIP-Signalpeptid (sowohl mit RR- oder mit KK-Motiv) und 1, 2, 3, 5, 7, 10 oder 17 FG-*repeats* und C-terminalem His-tag erhalten werden konnten. Beispielhaft sind die Aminosäuresequenzen der Proteine Hip^{SP}-NspR3-H6 und Hip^{SP}-NspR17-H6 in der Abb. 3-25 dargestellt. Die Fusionsproteine werden im Folgenden, der Einfachheit halber, RR-FG1, RR-FG2, RR-FG3, RR-FG5, RR-FG7, RR-FG10 und RR-FG17, bzw. KK-FG1, KK-FG2, KK-FG3, KK-FG5, KK-FG7, KK-FG10 und KK-FG17, mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP, genannt. Bei ersten Expressionsversuchen zeigte sich, dass die Proteine RR-FG1 und RR-FG2, bzw. KK-FG1 und KK-FG2 aber zu klein, zu instabil und damit sehr schlecht detektierbar waren, so dass diese Fusionsproteine nicht weiter zum Einsatz kamen.



Abb. 3-25: Aminosäuresequenz der Fusionsproteine RR-FG3 und RR-FG17. Die Proteine setzen sich zusammen aus dem HiPIP-Signalpeptid, 3 bzw. 17 FG-*repeats* aus Nsp1p und einem C-terminalen His-tag. Markiert sind neben dem Signalpeptid und dem His-tag auch die FG-*repeats*, die jeweils aus 9 Aminosäuren bestehen (bis auf wenige Ausnahmen: KPAFSFGAK) und voneinander durch stark geladene *spacer*-Regionen getrennt sind (Rout & Went, 1994).

Mittels subzellulärer Fraktionierung konnte nun getestet werden, ob ein Tat-abhängiger Transport dieser natürlich ungefalteten und unstrukturierten Proteine möglich war. Um zwischen Tat- und Sec-Transport unterscheiden zu können, wurden die Fraktionen aus einer Tat-Mutante, einem WT-Stamm und einem Stamm mit zusätzlicher *tatABC*-Expression miteinander verglichen (Abb. 3-26). Es zeigte sich, dass kein Sec-abhängiger Transport der FG-repeats stattfand, da in der Tat-Mutante kein matures Protein im Periplasma detektierbar war. Zum Teil war im WT-Stamm eine geringe Menge transportiertes Protein detektierbar, aber vor allem nahm der Transport mit einer erhöhten Menge an TatABC deutlich zu. Das beweist, dass der Transport Tat-abhängig war. Die Tat-Abhängigkeit des Transportes konnte auch über die *twi-arginine*-Abhängigkeit gezeigt werden. Ein RR>KK-Austausch im Signalpeptid führte zur Blockade des Transportes der FG-repeats (beispielhaft gezeigt an FG5 in Abb. 3-26B).

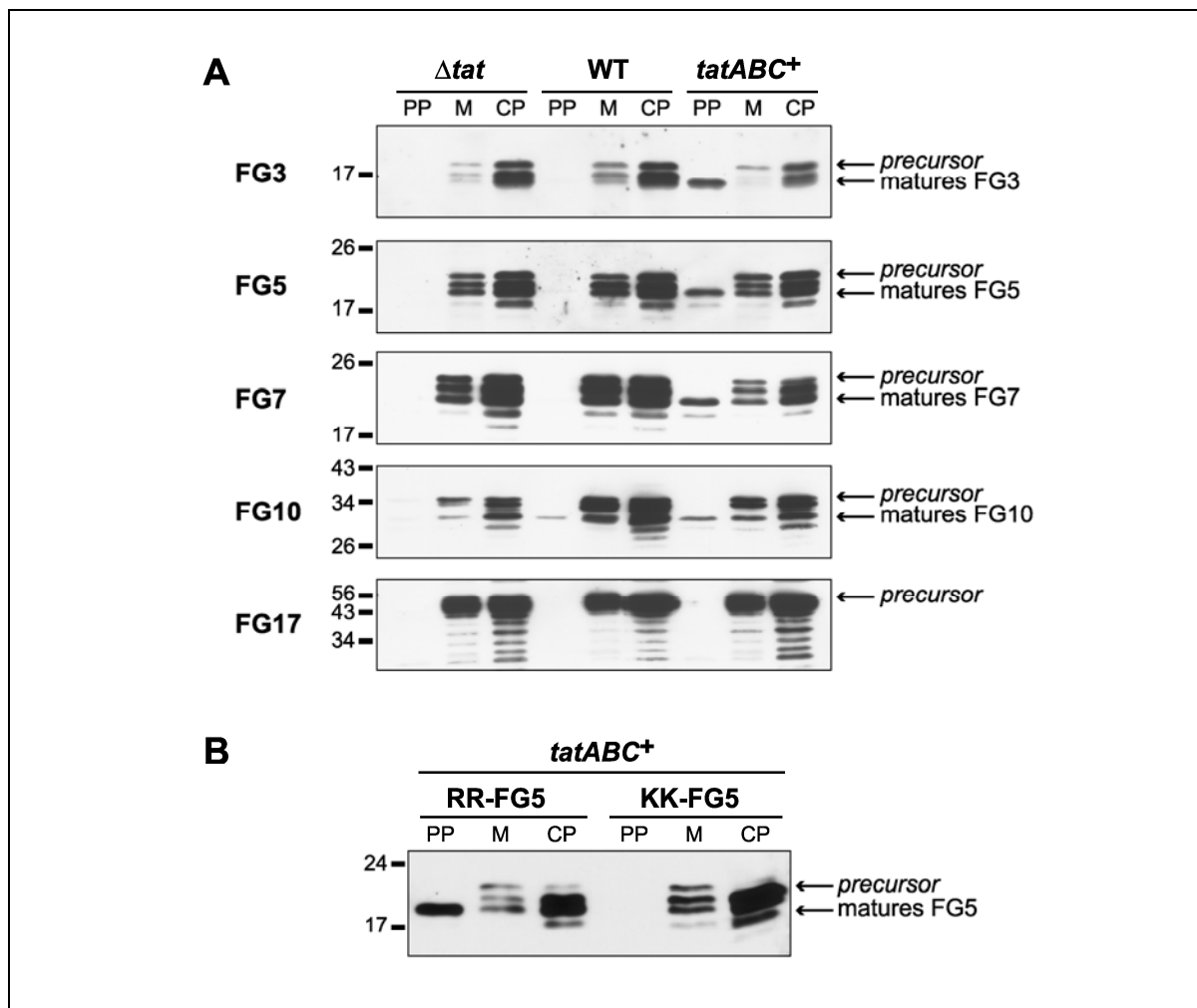


Abb. 3-26: Tat-abhängiger Transport von verschiedenen langen FG-repeats-Domänen. A) Subzelluläre Fraktionen von DADE (Δtat), MC4100 (WT) und MC4100 pABS-*tatABC* (*tatABC*⁺) mit jeweils den Plasmiden pBW-*hip*^{SP}-*nspR3*-H6 (FG3), pBW-*hip*^{SP}-*nspR5*-H6 (FG5), pBW-*hip*^{SP}-*nspR7*-H6 (FG7), pBW-*hip*^{SP}-*nspR10*-H6 (FG10) und pBW-*hip*^{SP}-*nspR17*-H6 (FG17). Man sieht, dass der Tat-abhängige Transport mit der Länge der Fusionsproteine abnimmt. 10 FG-repeats können gerade noch transportiert werden, mit 17 FG-repeats ist das Protein für den Tat-abhängigen Transport zu lang. B) Subzelluläre Fraktionen von MC4100 pABS-*tatABC* (*tatABC*⁺) mit jeweils den Plasmiden pBW-*hip*^{SP}-*nspR5*-H6 (RR-FG5) und pBW-*hip*^{SP}-*nspR5*-KK-H6 (KK-FG5) im Vergleich. Durch das Fehlen des RR-Motivs ist der Transport von FG5 blockiert. (15% SDS-PAGE mit sich anschließendem Western Blot und Detektion mittels α -His-tag-Serum und dem ECL-System)

Aber nicht alle Proteine wurden in gleicher Menge transportiert. Der Transport der kleinen Proteine (RR-FG3 und RR-FG5) war sehr effizient, wogegen RR-FG10 nur noch schlecht und RR-FG17 gar nicht mehr transportiert wurde. Die Grenze der Tat-Kompatibilität lag in der Nähe der Länge von RR-FG10, dessen matures Protein eine Masse von 23 kDa aufweist.

Somit zeigt dieses Ergebnis, dass das Tat-System in der Lage ist, unstrukturierte und ungefaltete Proteine bis zu einer Länge von ca. 23 kDa zu transportieren. Dass längere Proteine nicht mehr transportiert werden, muss mechanistische Gründe haben, da die langen *FG-repeats*-Domänen (RR-FG10 und RR-FG17) auch nur aus den gleichen oder ähnlichen *FG-repeats* bestehen, wie die kurzen.

Nun stellte sich die Frage, ob die Expression bzw. das Targeting der *FG-repeats*-Domänen zum Tat-System, ähnlich dem Targeting von RR-PhoA, einen toxischen Effekt auf die Zelle ausübt. Dazu wurden erneut Wachstumskurven aufgenommen. Beispielhaft gezeigt sind die Wachstumskurven der RR-FG17- und KK-FG17-enthaltenden Stämme (Abb. 3-27).

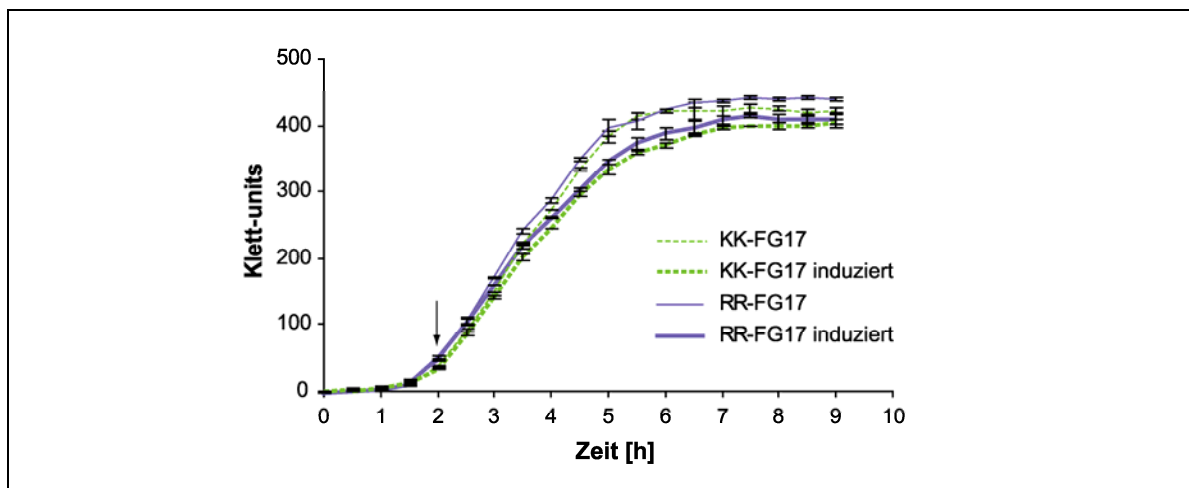


Abb. 3-27: RR-FG17 übt keinen cytotostatischen Effekt auf das Wachstum der Zelle aus. Wachstumskurven von MC4100 pABS-*tatABC* (*tatABC*⁺) mit den Plasmiden pBW-*hip*^{SP}-*nspR17*-H6 (RR-FG17) und pBW-*hip*^{SP}-*nspR17*-KK-H6 (KK-FG17), jeweils uninduziert und induziert. Der Zeitpunkt der Induktion mit 0.1% Rhamnose ist durch den Pfeil gekennzeichnet. Nach Rhamnose-Zugabe wachsen die Zellen etwas schlechter, aber es ist kein Unterschied im Wachstum zwischen dem RR-FG17- und dem KK-FG17-enthaltenden Stamm zu detektieren.

Es ließ sich bei keinem der Konstrukte ein RR-abhängiger Einfluss auf das Wachstum nachweisen. Selbst RR-FG17 übt keinen cytotostatischen Effekt auf die Zelle aus, obwohl man davon ausgehen kann, dass ein Targeting zum Tat-System erfolgte, sich aber kein abgeschlossener Transport anschließt, ähnlich wie bei RR-PhoA. Im Gegensatz zu RR-FG17 hatte aber das Targeting von RR-PhoA eine erhebliche Inhibition des Wachstums zur Folge (Abb. 3-13).

3.3.3 5 FG-repeats werden auch mit *E. coli*-Tat-Signalpeptiden transportiert

Da HiPIP ein Protein aus *Allochromatium vinosum* und damit kein natürliches *E. coli*-Tat-Substrat ist, sollte getestet werden, ob die FG-repeats auch mit *E. coli*-eigenen Tat-Signalpeptiden Tat-abhängig transportiert werden. Ausgewählt wurden die Signalpeptide von AmiA, CueO, DmsA und TorA, die sich zwar in ihrer Länge unterscheiden, aber alle die typischen Merkmale von Tat-Signalpeptiden aufweisen (Abb. 3-28A).

Die Fragmente der Signalpeptide wurden mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und BamHI aus den Plasmiden pEX-amiA/hip-tac, pEX-cueO/hip-tac, pEX-dmsA/hip-tac und pEX-torA/hip-tac ausgeschnitten und über die gleichen Schnittstellen in das Plasmid pBW-hip^{SP}-nspR5-H6 eingefügt. Das Resultat waren die Plasmide pBW-amiA^{SP}-nspR5-H6, pBW-cueO^{SP}-nspR5-H6, pBW-dmsA^{SP}-nspR5-H6 und pBW-torA^{SP}-nspR5-H6, mit denen die Expressionsprodukte AmiA^{SP}-FG5, CueO^{SP}-FG5, DmsA^{SP}-FG5 und TorA^{SP}-FG5 erhalten werden konnten (Abb. 3-28A).

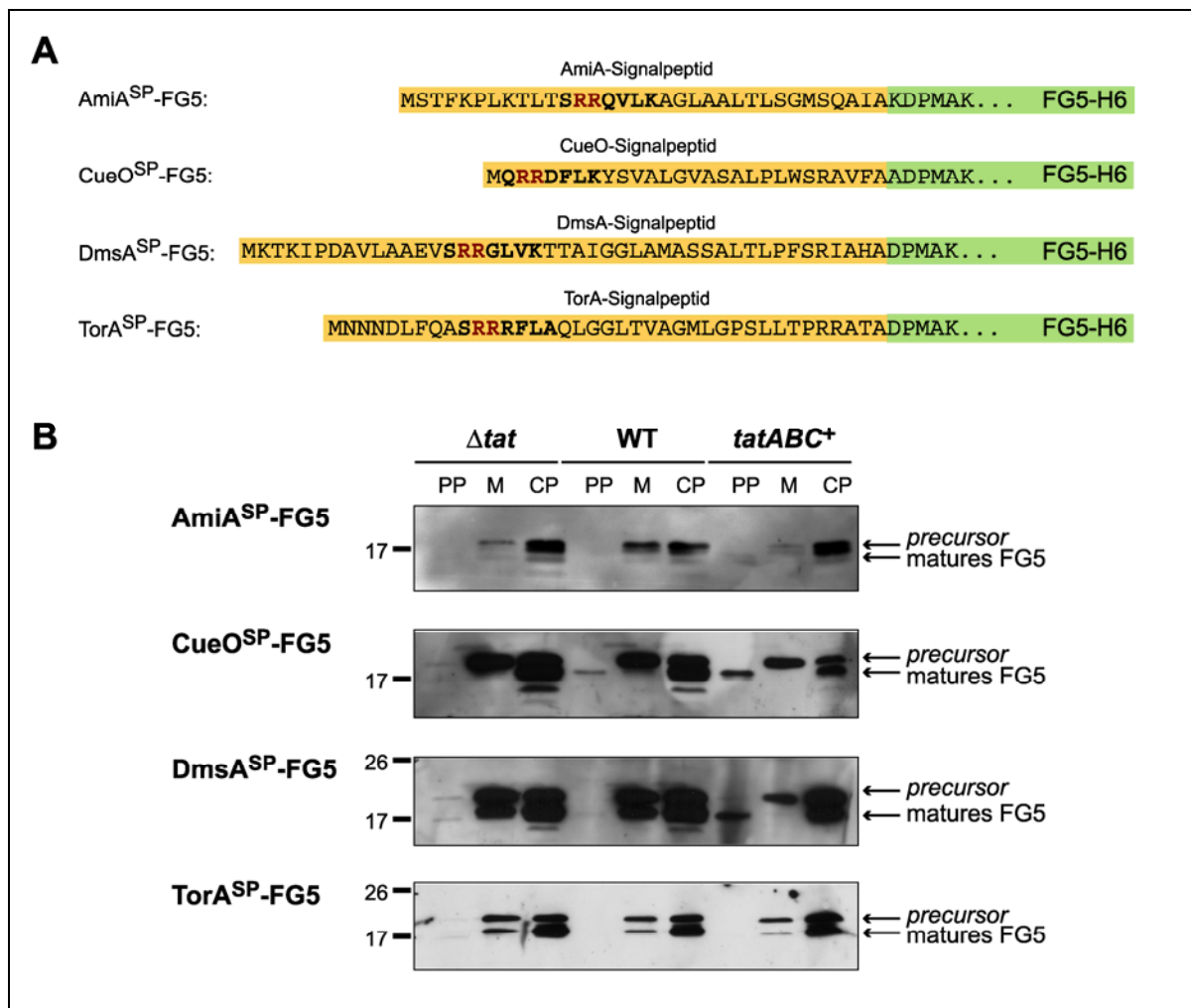


Abb. 3-28: CueO^{SP}-FG5 und DmsA^{SP}-FG5 werden Tat-abhängig transportiert. A) Aminosäuresequenz der Fusionsproteine von 5 FG-repeats mit den verschiedenen *E. coli*-Signalpeptiden. B) Subzelluläre Fraktionen von DADE (Δ tat), MC4100 (WT) und MC4100 pABS-tatABC (tatABC⁺) mit jeweils den Plasmiden pBW-amiA^{SP}-nspR5-H6 (AmiA^{SP}-FG5), pBW-cueO^{SP}-nspR5-H6 (CueO^{SP}-FG5), pBW-dmsA^{SP}-nspR5-H6 (DmsA^{SP}-FG5) und pBW-torA^{SP}-nspR5-H6 (TorA^{SP}-FG5). (15% SDS-PAGE mit sich anschließendem Western Blot und Detektion mittels α -His-tag-Serum und dem ECL-System)

Die Fraktionierung der entsprechenden Stämme (Abb. 3-28B) ergab, dass zwei der vier getesteten Konstrukte Tat-abhängig transportiert wurden. Das CueO- und das DmsA-Signalpeptid konnten die fünf FG-repeats zum Tat-abhängigen Transport führen. Das zeigt, dass diese Fähigkeit nicht nur auf das Signalpeptid des heterologen Proteins HiPIP beschränkt ist. Im Falle von AmiA ist das Ergebnis der Fraktionierung nicht eindeutig, weil das Fusionsprotein sehr instabil und nur schlecht detektierbar war, so dass kein Transport festzustellen war. Mit dem TorA-Signalpeptid konnte FG5 aber eindeutig nicht Tat-abhängig transportiert werden. Ursachen hierfür könnten sein, dass hier Chaperone (z.B. TorD) am Targeting beteiligt sind, die den Transport von ungefalteten FG-repeats unterbinden.

3.3.4 Exponierte hydrophobe Aminosäuren im maturen Protein verhindern den Tat-abhängigen Transport der FG-repeats-Domänen

3.3.4.1 Übertragung einer hydrophoben Aminosäuresequenz von PhoA in die FG-repeats

Was könnte der Grund dafür sein, dass RR-PhoA einen cytostatischen Effekt auf die Zelle ausübt und RR-FG17 nicht? Da beide Konstrukte das identische Signalpeptid enthalten und auch von der Größe vergleichbar sind, muss der Unterschied in der Aminosäuresequenz des maturen Proteins liegen. Da die FG-repeats-Domäne außer den einzelnen Phenylalaninen in den FG-Motiven keine hydrophoben Reste enthält, kam die Vermutung auf, dass hydrophobe Bereiche in PhoA der entscheidende Unterschied sein könnten. Sie könnten dafür verantwortlich sein, dass PhoA nach initiiertem Tat-Transport, ähnlich wie bei Membranproteinen, die Tat-abhängig in die Membran eingebaut werden, in die Membran entlassen werden. Da PhoA aber keinen stabilen Membrandurchgang bilden kann, könnte eine Anhäufung von membrandurchspannendem PhoA ein Protonen-leakage verursachen und somit den toxischen Effekt auslösen.

Deswegen wurden zunächst die Hydropathie-Plots beider Proteine verglichen (Abb. 3-29A). Dabei fällt auf, dass im Protein RR-FG17 nach dem HiPIP-Signalpeptid keine Aminosäuresequenz vorhanden ist, die signifikant hydrophob ist. Dagegen findet man in RR-PhoA doch zumindest zwei hydrophobe Bereiche. Die größte Hydrophobizität besitzt die Aminosäuresequenz NIILLI (nach ca. 100 Aminosäuren) aus dem hydrophoben core des Proteins (<http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pdbId=1B8J>). Genau diese Sequenz sollte nun an ähnlicher Position, relativ zum N-Terminus, in den 3. FG-repeat der FG-Domänen übertragen werden, um zu sehen, ob dieser hydrophobe Bereich Auswirkungen auf den Transport der Konstrukte und das Wachstum der entsprechenden Kulturen hat.

Die Aminosäureaustausche wurden in zwei Stufen mittels *QuikChange*TM-Mutagenese (Stratagene) mit den Primerpaaren Nsp1p-Aust-1F/Nsp1p-Aust-1R und Nsp1p-Aust-2F/Nsp1p-Aust-2R durchgeführt. Als *templates* dienten die Plasmide pBW-hip^{SP}-nspR3-H6, pBW-hip^{SP}-

nspR5-H6, pBW-hip^{SP}-nspR7-H6, pBW-hip^{SP}-nspR10-H6, pBW-hip^{SP}-nspR17-H6, pBW-hip^{SP}-KK-nspR3-H6, pBW-hip^{SP}-KK-nspR5-H6, pBW-hip^{SP}-KK-nspR7-H6, pBW-hip^{SP}-KK-nspR10-H6 und pBW-hip^{SP}-KK-nspR17-H6. Die erhaltenen Plasmide wurden pBW-hip^{SP}-nspR3Φ-H6, pBW-hip^{SP}-nspR5Φ-H6, pBW-hip^{SP}-nspR7Φ-H6, pBW-hip^{SP}-nspR10Φ-H6, pBW-hip^{SP}-nspR17Φ-H6, pBW-hip^{SP}-KK-nspR3Φ-H6, pBW-hip^{SP}-KK-nspR5Φ-H6, pBW-hip^{SP}-KK-nspR7Φ-H6, pBW-hip^{SP}-KK-nspR10Φ-H6 und pBW-hip^{SP}-KK-nspR17Φ-H6 genannt.

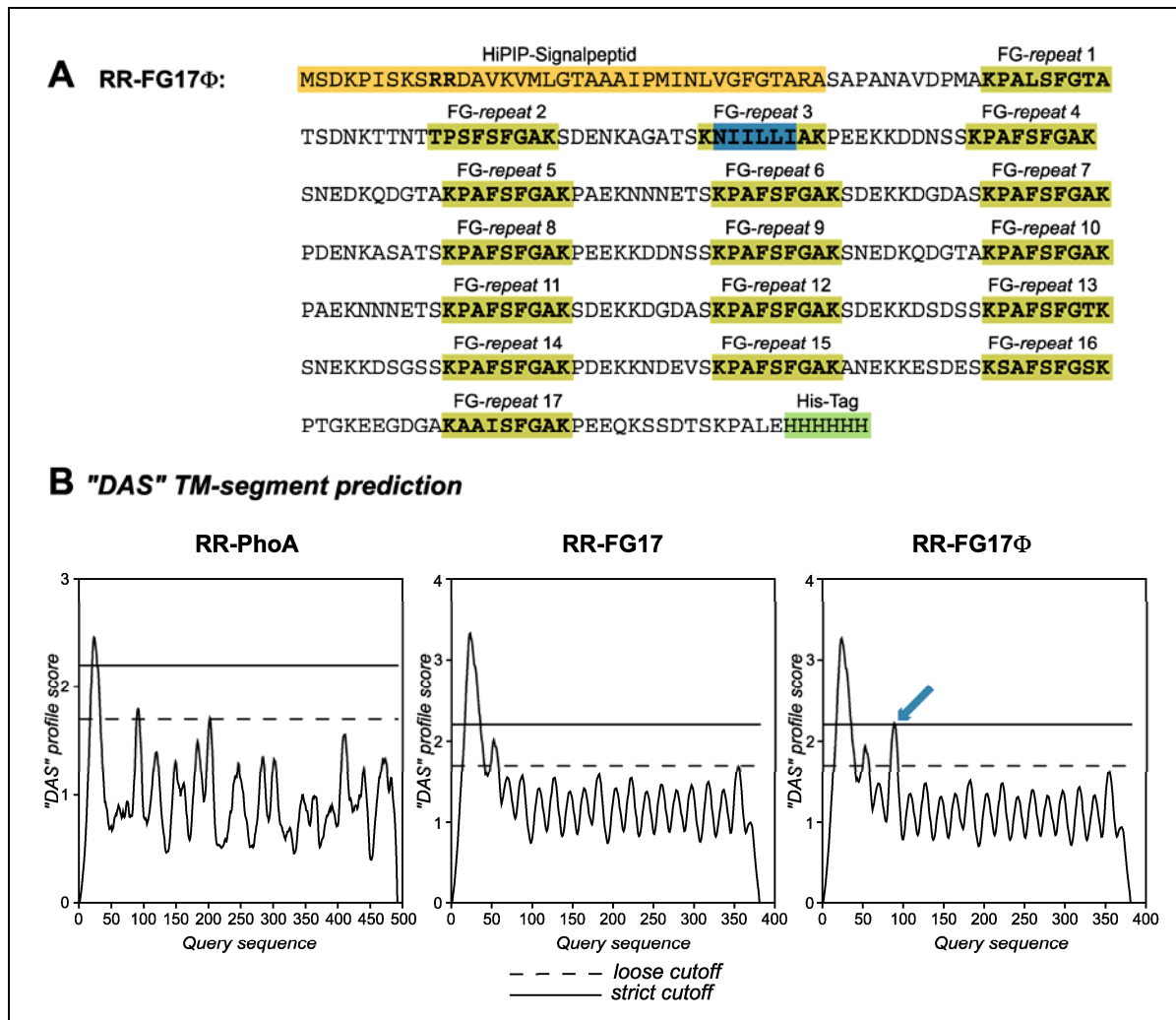


Abb. 3-29: Einführung einer hydrophoben Aminosäuresequenz (PAFSFG>NIILLI) in den 3. FG-repeat von RR-FG17.
 A) Aminosäuresequenz von RR-FG17Φ. Blau markiert sind die eingeführten hydrophoben Aminosäuren.
 B) Vergleich der Hydropathie-Plots von RR-PhoA, RR-FG17 und RR-FG17Φ. Der blaue Pfeil markiert den hydrophoben Bereich, entstanden durch die Aminosäureaustausche PAFSFG>NIILLI ("DAS"- Transmembrane Prediction server, Bioinformatic Center, Stockholm University - <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/maindas.html>).

3.3.4.2 FG5 und FG5 Φ liegen unstrukturiert in der Zelle vor

Dass Nsp1p in seiner nativen Form unstrukturiert und ungefaltet vorliegt, wurde bereits mittels Circular dichroismus von Denning *et al.* (2002) und Bayliss *et al.* (2000) gezeigt. Da aber sichergestellt werden musste, dass die hydrophoben Aminosäuren im 3. FG-repeat keine Struktur erzeugen, sollten die CD-Spektren der maturen Proteine FG5 und FG5 Φ miteinander verglichen werden. Es wurden die maturen Proteine verwendet, da ein *precursor* nicht ohne Verunreinigungen durch matures Protein aus dem Cytoplasma gereinigt werden kann, weil immer ein signifikanter Teil durch Proteasen unspezifisch prozessiert wird. Dass das HiPIP-Signalpeptid unstrukturiert vorliegt, wurde schon durch Kipping *et al.* (2003) gezeigt.

Um die maturen Proteine mit Hilfe eines His-tags reinigen zu können, wurden die Plasmide pBAD-*nspR5*-H6 und pBAD-*nspR5* Φ -H6 benötigt. Zunächst wurde mittels der Primer *nsp1p*-NcoI-F und *nsp1p*-XhoI-R5 das FG5-Fragment aus p*Nsp1*-FF18 amplifiziert, mit NcoI und XhoI verdaut und über die gleichen Schnittstellen in pBAD-*pspA*-H6 eingefügt. Mit dem entstandenen Plasmid als *template* wurden die Aminosäureaustausche in zwei Stufen mittels QuikChangeTM-Mutagenese (Stratagene) mit den Primerpaaren Nsp1p-Aust-1F/Nsp1p-Aust-1R und Nsp1p-Aust-2F/Nsp1p-Aust-2R durchgeführt.

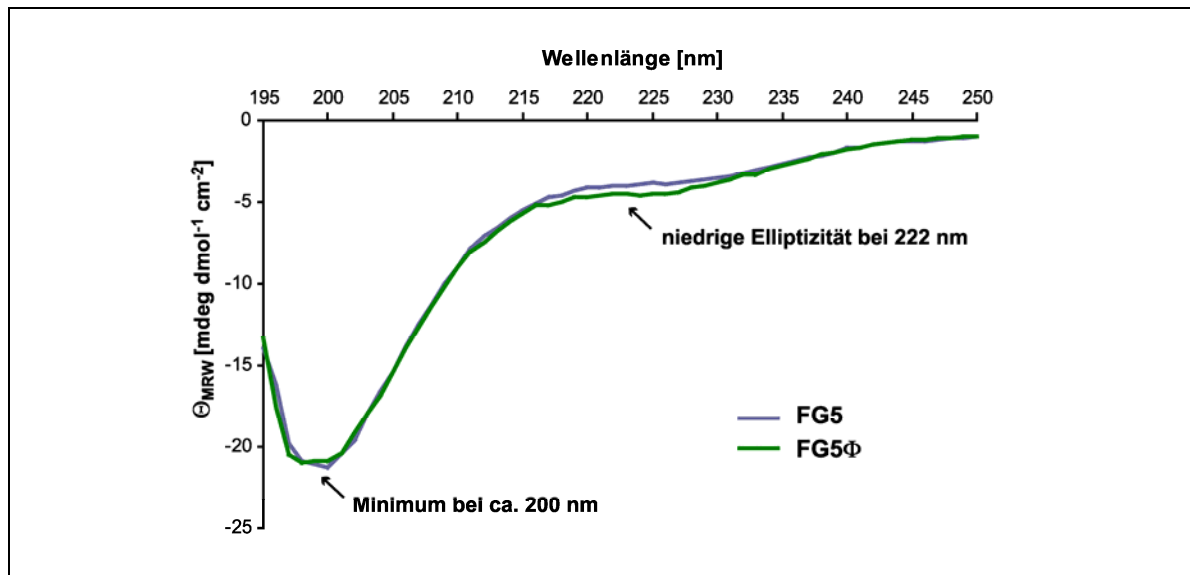


Abb. 3-30: CD-Spektren von FG5 und FG5 Φ . Die Proteine wurden über ihr C-terminales His-tag aus dem Cytoplasma von MC4100 pBAD-*nspR5*-H6 und pBAD-*nspR5* Φ -H6, nach 2 Stunden Induktion mit 0.5% Arabinose gereinigt. Die Aufnahme des Spektrums erfolgte mit einer Proteinkonzentration von 0.5 mg/ml in 20 mM K-Phosphat pH 7.0. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry, da eine genauere Bestimmung durch die Absorption bei 280 nm durch das Fehlen von Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten in Nsp1p nicht möglich war.

Die Aufnahme der CD-Spektren ergab, dass die sechs hydrophoben Aminosäuren keine Veränderung der Sekundärstruktur der 5 FG-repeats induzieren (Abb. 3-30). Sowohl das Spektrum von FG5, als auch das von FG5 Φ zeigen die typischen Merkmale eines

unstrukturierten und ungefalteten Proteins (Johnson *et al.*, 1990; Kelly & Price, 2000). In beiden Spektren findet man ein Minimum knapp unterhalb von 200 nm und eine niedrige Elliptizität bei 222 nm, genau die Charakteristika, die schon zuvor in CD- Spektren von FG-Nucleoporinen gefunden wurden (Bayliss *et al.*, 2000; Denning *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse wurden mittels NMR in Kooperation mit Dr. Christian Lücke (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) bestätigt.

3.3.4.3 Die exponierte hydrophobe Aminosäuresequenz blockiert den Transport und inhibiert das Zellwachstum

Mit Hilfe der RR-FGn Φ -Konstrukte wurde nun getestet, ob die hydrophobe Aminosäuresequenz einen Einfluss auf den Transport der FG-repeats-Domänen oder auf das Zellwachstum hat.

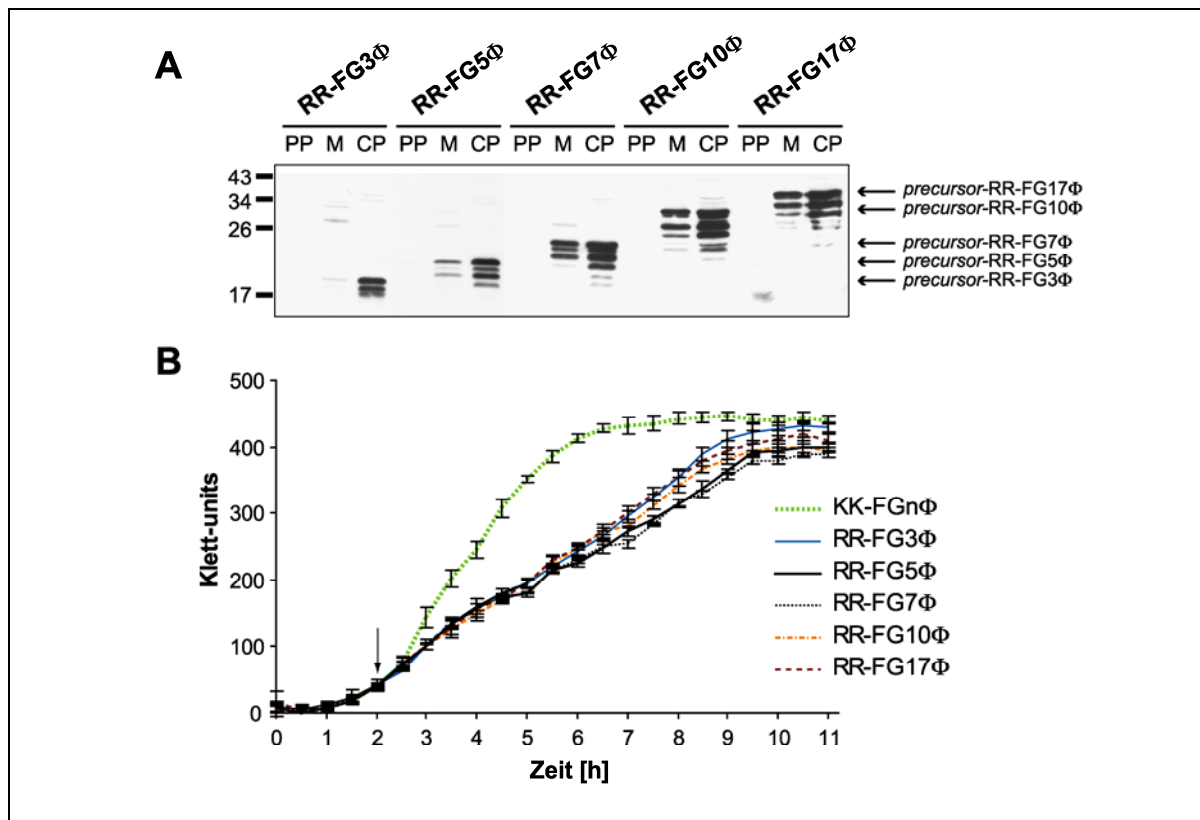


Abb. 3-31: **A)** Der hydrophobe Bereich im 3. FG-repeat verhindert den Tat-abhängigen Transport der FG-repeats-Domänen. Subzelluläre Fraktionen von MC4100 pABS-tatABC mit den Plasmiden pBW-hip^{SP}-nspR3 Φ -H6 (RR-FG3 Φ), pBW-hip^{SP}-nspR5 Φ -H6 (RR-FG5 Φ), pBW-hip^{SP}-nspR7 Φ -H6 (RR-FG7 Φ), pBW-hip^{SP}-nspR10 Φ -H6 (RR-FG10 Φ) und pBW-hip^{SP}-nspR17 Φ -H6 (RR-FG17 Φ). (15% SDS-PAGE mit sich anschließendem Western Blot und Detektion mittels α -His-tag-Serum und dem ECL-System) **B)** Die Expression der Gene von RR-FGn Φ hat ein verringertes Wachstum zur Folge. Wachstumskurve der Stämme wie unter A) und mit den Plasmiden mit RR>KK-Austausch im Signalpeptid von HiPIP (KK-FGn Φ entspricht dem Mittelwert der Messungen der Kulturen mit KK-FG3 Φ , KK-FG5 Φ , KK-FG7 Φ , KK-FG10 Φ und KKR17 Φ). Die Standardabweichungen resultieren aus den Messungen von drei unabhängigen Kulturen. Der Zeitpunkt der Induktion mit 0.5% Rhamnose ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

Alle RR-FGn Φ -Konstrukte konnten nicht mehr Tat-abhängig transportiert werden (Abb. 3-31A). Außerdem änderte sich auch das Wachstum der getesteten Stämme. Die Induktion der Gene von RR-FG3 Φ , RR-FG5 Φ , RR-FG7 Φ , RR-FG10 Φ und RR-FG17 Φ hatte ein deutlich verringertes Wachstum der Stämme zur Folge (Abb. 3-31B). Dabei schien die Länge des Proteins aber keine Rolle zu spielen, entscheidend für die Inhibition waren nur die sechs hydrophoben Aminosäuren. Fehlte das RR-Motiv, d.h. war das RR-Motiv in ein KK-Motiv ausgetauscht, war keine Inhibition des Wachstums zu detektieren. Das zeigte, dass dieser Wachstumseffekt eine Folge einer Interaktion zwischen den RR-FGn Φ -Konstrukten und dem Tat-System sein musste.

Unterstützt wurde diese Vermutung zusätzlich dadurch, dass z.B. RR-FG5 Tat-abhängig transportiert wurde und somit das Signalpeptid vom Tat-System erkannt wurde. Da bei der Einführung der hydrophoben Aminosäuresequenz das Signalpeptid nicht verändert wurde, kann man davon ausgehen, dass auch RR-FG5 Φ ein Targeting zum Tat-System erfährt.

Es wurde auch mit den FG-repeats-Konstrukten versucht, eine direkte Interaktion mit dem Tat-System mittels BN-PAGE nachzuweisen, was aber nicht gelang. Weder RR-FG5 noch RR-FG5 Φ konnten in dem 440 kDa- oder dem 580 kDa-TatBC-enthaltenden Komplex detektiert werden. Eventuell ist die Interaktion mit dem Tat-Translokon nur von kürzerer Dauer oder nicht so stabil wie mit RR-PhoA.

3.3.4.4 RR-FG5 Φ und RR-FG17 Φ führen nicht zu so einem starken Protonen-leakage an der Cytoplasmamembran wie RR-PhoA

Da das Targeting der FG-repeats-Domänen mit dem hydrophoben Bereich zum Tat-System eine Inhibition des Wachstums zur Folge hatte, sollte untersucht werden, ob ebenso wie bei RR-PhoA eine Verringerung der Membranstabilität der Grund dafür ist. Deswegen wurde auch hier (am Beispiel von RR-FG5 Φ und RR-FG17 Φ) mittels Fluoreszenz-Quenching an invertierten Vesikeln, der Aufbau des Protonengradienten an der Membran verfolgt.

Die Messungen ergaben, dass der Einfluss von RR-FG5 Φ und RR-FG17 Φ auf die Membranstabilität nur sehr gering war (Abb. 3-32). Der Vergleich des Quenchings der RR-FG5 Φ -INV und RR-FG17 Φ -INV mit den KK-FG5 Φ -INV bzw. KK-FG17 Φ -INV zeigte nur eine Änderung innerhalb der Standardabweichung. Dagegen hatte die Expression von RR-*phoA* eine Verringerung des Quenchings um ca. 50% zur Folge (Abb. 3-16). Allenfalls beim Aufbau des Δ pH nach der ATP-Zugabe war eine leichte Verzögerung erkennbar. Da aber bereits der Einfluss von RR-FGn Φ auf das Wachstum geringer war als der von RR-PhoA, wurden auch nicht so deutliche Auswirkungen auf das Quenching erwartet.

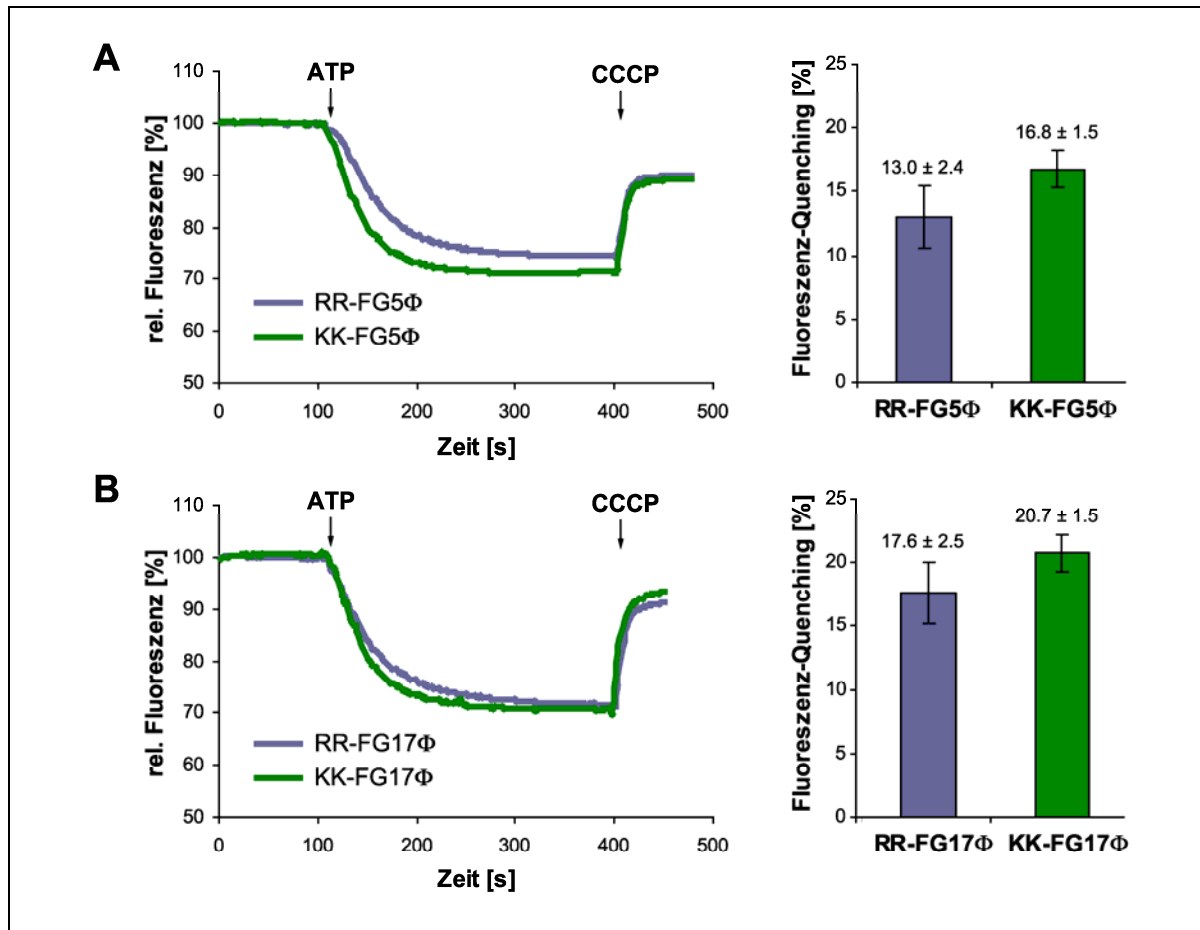


Abb. 3-32: Einfluss von RR-FG5Φ und RR-FG17Φ auf die Membranstabilität. Fluoreszenz-Quenching mit invertierten Vesikeln (INV) von MC4100 pABS-*tatABC* mit A) pBW-*hip*^{SP}-*nspR5Φ*-H6 (RR-FG5Φ) und pBW-*hip*^{SP}-*nspR5Φ*-KK-H6 (KK-FG5Φ) und B) pBW-*hip*^{SP}-*nspR17Φ*-H6 (RR-FG17Φ) und pBW-*hip*^{SP}-*nspR17Φ*-KK-H6 (KK-FG17Φ). Gleiche Mengen an Zellen wurden 2 h nach Induktion mit 0.5% Rhamnose geerntet und zur INV-Präparation eingesetzt. Die Pfeile kennzeichnen die Zugabe von ATP und des Entkopplers CCCP zum Reaktionsansatz. Das angegebene Fluoreszenz Quenching in den Diagrammen auf der rechten Seite entspricht der Differenz der relativen Fluoreszenz vor und nach der CCCP-Zugabe. Die Werte und die angegebenen Standardabweichungen resultieren aus drei unabhängigen Messungen.

3.3.4.5 Die Lage der hydrophoben Aminosäuresequenz NILLI scheint keinen Einfluss zu haben

Bis hierhin wurden nur die Auswirkungen des hydrophoben Bereiches im 3. FG-repeat der FG-Domänen untersucht. Interessant war es nun zu wissen, ob die Lage dieser exponierten hydrophoben Aminosäuren einen Einfluss auf den Transport der entsprechenden Konstrukte hat. Deswegen wurde, am Beispiel von FG5, die von PhoA übernommene Aminosäuresequenz auch in den 5. FG-repeat eingefügt.

Die Aminosäureaustausche wurden wieder in zwei Stufen mittels *QuikChange*TM-Mutagenese (Stratagene) mit den Primerpaaren Nsp1p-Hy-hinten-F1/Nsp1p-Hy-hinten-R1 und Nsp1p-Hy-hinten-F2/Nsp1p-Hy-hinten-R2 durchgeführt. Als *template* dienten pBW-*hip*^{SP}-*nspR5*-H6 und pBW-*hip*^{SP}-KK-*nspR5*-H6. Erhalten wurden die Plasmide pBW-*hip*^{SP}-*nspR5Φ*-H6 und pBW-*hip*^{SP}-KK-*nspR5Φ*-H6. Die daraus resultierenden Proteine wurden RR-FG5Φ_c und KK-FG5Φ_c genannt,

da sich der hydrophobe Bereich bei diesen Konstrukten in der Nähe des C-Terminus befindet (Abb. 3-33A).

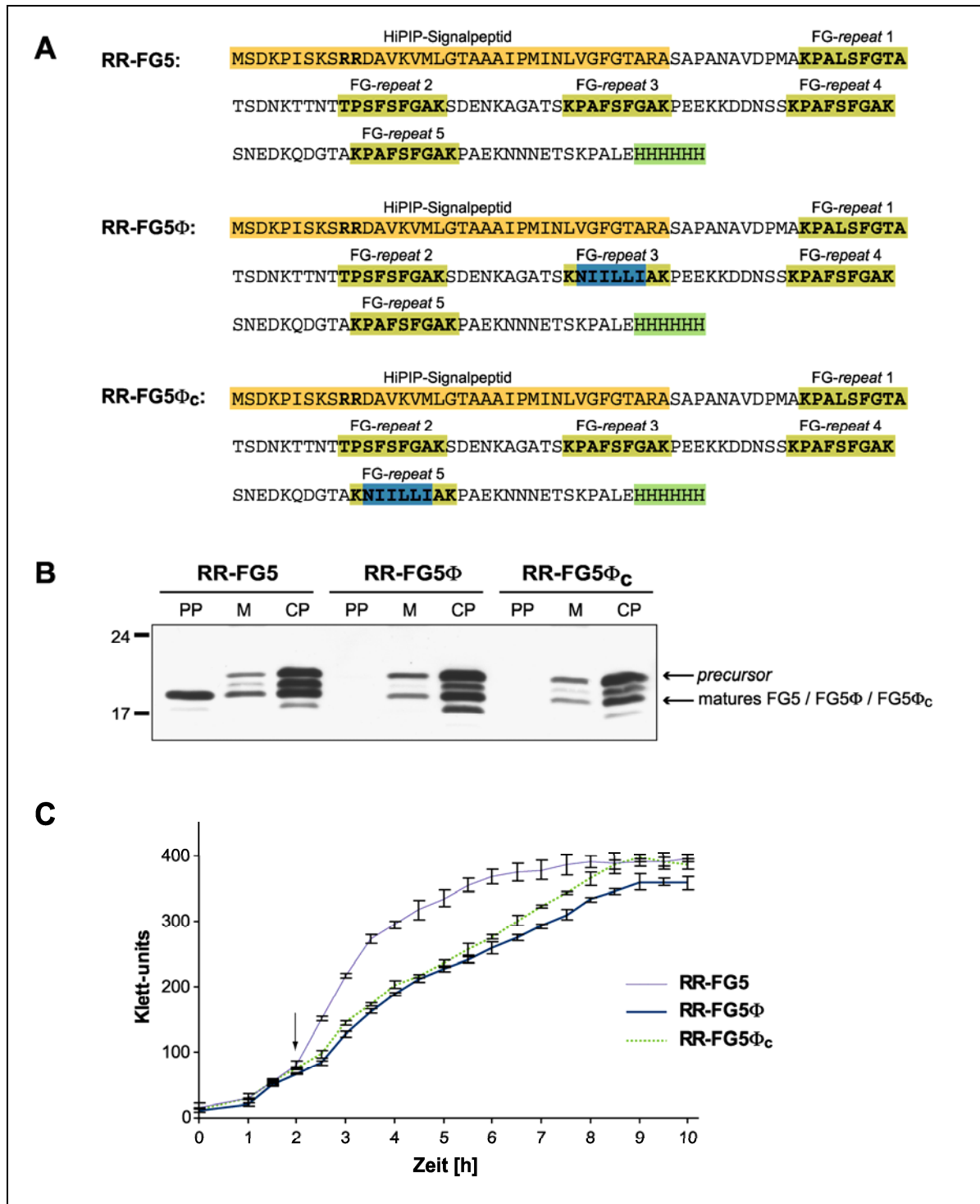


Abb. 3-33: Direkter Vergleich des Tat-abhängigen Transportes und des Einflusses auf das Wachstum von RR-FG5, RR-FG5 Φ und RR-FG5 Φ_c . A) Aminosäuresequenzen von RR-FG5, RR-FG5 Φ und RR-FG5 Φ_c . Blau markiert sind die hydrophoben Bereiche im 3. bzw. 5. FG-repeat. B) Subzelluläre Fraktionen von MC4100 pABS-tatABC mit den Plasmiden pBW-hip^{SP}-nspR5-H6 (RR-FG5), pBW-hip^{SP}-nspR5 Φ -H6 (RR-FG5 Φ) und pBW-hip^{SP}-nspR5 Φ_c -H6 (RR-FG5 Φ_c). (15% SDS-PAGE mit sich anschließendem Western Blot und Detektion mittels α -His-tag-Serum und dem ECL-System) C) Wachstumskurven der Stämme wie unter B). Die Standardabweichungen sind angegeben und beziehen sich auf die Messung von drei unabhängigen Kulturen. Der Zeitpunkt der Induktion mit 0.5% Rhamnose ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

Es zeigte sich, dass eine Verschiebung des hydrophoben Bereiches vom 3. in den 5. *FG-repeat* keine Änderung im Transport oder im Wachstumsverhalten zur Folge hatte (Abb. 3-33B/C). Das Tat-System war auch bei dieser veränderten Position des hydrophoben Bereiches nicht in der Lage, die Domäne mit den 5 *FG-repeats* zu transportieren. Die Inhibition des Wachstums war mit beiden Konstrukten (RR-FG5 Φ und RR-FG5 Φ_c) ebenfalls vergleichbar. Somit war das Vorhandensein des exponierten hydrophoben Bereiches entscheidend für die Verhinderung des Tat-abhängigen Transportes, nicht jedoch die genaue Lage.

3.3.4.6 Lokalisation der *FG-repeats*-Domänen in der Zelle

Da der Nachweis der direkten Interaktion der *FG-repeat*-Konstrukte mit TatABC durch BN-PAGE nicht möglich war und auch der Nachweis von spezifischen RR-PhoA-Abbauprodukten in der Cytoplasmamembran nicht gelang, sollte mit Hilfe von C-terminalen GFP-Fusionen die Verteilung von RR-FG5, KK-FG5, RR-FG5 Φ und KK-FG5 Φ in der Zelle mittels Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht werden. Es wurde schon mehrfach gezeigt, dass das *green fluorescent protein* (GFP) fusioniert an ein TorA- oder DmsA-Signalpeptid Tat-abhängig transportiert werden kann (Santini *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001; Ize *et al.*, 2002; Berthelmann & Brüser, 2004). Damit sollte eine C-terminale GFP-Fusion an RR-FG5, KK-FG5, RR-FG5 Φ und KK-FG5 Φ keine Veränderungen bei der Erkennung durch das Tat-System nach sich ziehen.

Zur Konstruktion der GFP-Fusionen wurde das *gfp*-Fragment mittels der Primer *gfp*-SacII-F-st und *gfp*-XhoI-R-st aus dem Plasmid pTB-DG amplifiziert, mit SacII und XhoI verdaut und über die gleichen Schnittstellen in pBW-*hip*^{SP}-nspR5-H6, pBW-*hip*^{SP}-KK-nspR5-H6, pBW-*hip*^{SP}-nspR5 Φ -H6 und pBW-*hip*^{SP}-KK-nspR5 Φ -H6 eingefügt. Erhalten wurden die Plasmide pBW-*hip*^{SP}-nspR5-*gfp*, pBW-*hip*^{SP}-KK-nspR5-*gfp*, pBW-*hip*^{SP}-nspR5 Φ -*gfp* und pBW-*hip*^{SP}-KK-nspR5 Φ -*gfp*. Die entsprechenden Expressionsprodukte waren RR-FG5-GFP, KK-FG5-GFP, RR-FG5 Φ -GFP und KK-FG5 Φ -GFP. Zunächst wurde überprüft, ob die C-terminale GFP-Fusion einen Einfluss auf den Transport der *FG-repeats*-Domäne hat (Abb. 3-34A). Es zeigte sich, dass keine der GFP-Fusionen transportiert wurde. Im Falle von KK-FG5-GFP und RR-FG5 Φ -GFP war das auch nicht anders zu erwarten. Sehr interessant ist aber, dass auch RR-FG5-GFP nicht transportiert wurde, obwohl die Domäne aus 5 *FG-repeats* ohne GFP-Fusion sehr gut Tat-abhängig transportiert wurde (Abb. 3-26).

Bernhardt & de Boer (2003) konnten den Transport einer Fusion von GFP an Vollängen-AmiA beobachten. Das zeigt, dass GFP nicht direkt an das Signalpeptid fusioniert sein muss, um vom Tat-Translokator transportiert zu werden. Im Falle von RR-FG5-GFP aber, scheint das unstrukturierte, ungefaltete FG5 zwischen Signalpeptid und dem gefalteten GFP den Transport zu verhindern. Diese Beobachtung könnte ein Puzzlestein in der Aufklärung des Mechanismus des Tat-Transportes sein.

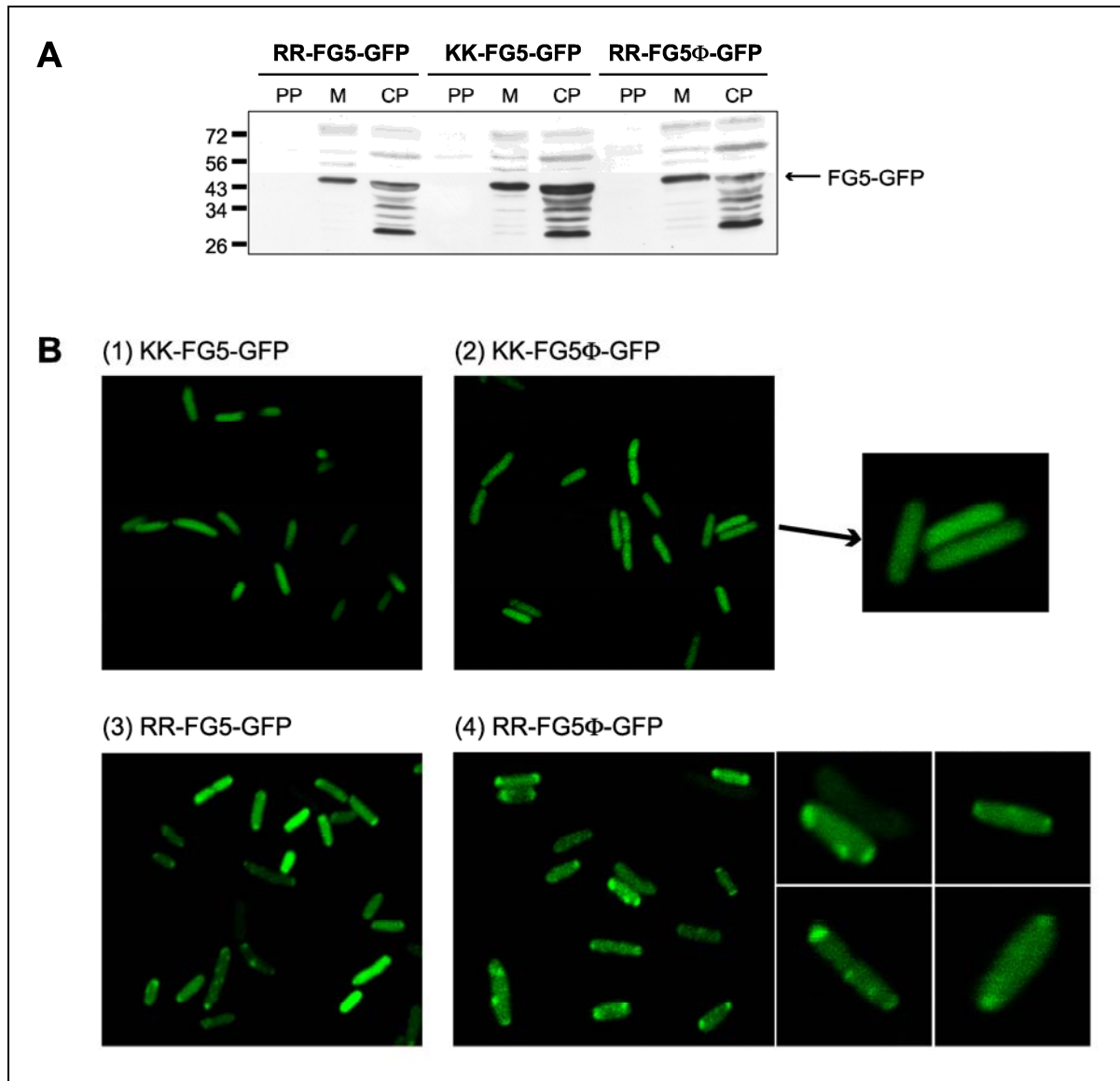


Abb. 3-34: Verteilung von RR-FG5-GFP, KK-FG5-GFP, RR-FG5Φ-GFP und KK-FG5Φ-GFP in der Cytoplasmamembran. A) Transport von RR-FG5-GFP, KK-FG5-GFP und RR-FG5Φ-GFP. Subzelluläre Fraktionen von MC4100 pABS-tatABC mit den Plasmiden pBW-hip^{SP}-nspR5-gfp (RR-FG5-GFP), pBW-hip^{SP}-nspR5-KK-gfp (KK-FG5-GFP) und pBW-hip^{SP}-nspR5Φ-gfp (RR-FG5Φ-GFP). (15% SDS-PAGE mit sich anschließendem Western Blot und Detektion mittels α-GFP-Serum und dem ECL-System). B) Aufnahmen mit dem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop von MC4100 pABS-tatABC mit den Plasmiden pBW-hip^{SP}-nspR5-KK-gfp (KK-FG5-GFP), pBW-hip^{SP}-nspR5Φ-KK-gfp (KK-FG5Φ-GFP), pBW-hip^{SP}-nspR5-gfp (RR-FG5-GFP) und pBW-hip^{SP}-nspR5Φ-gfp (RR-FG5Φ-GFP) nach 2 h Induktion mit 0.01% Rhamnose.

Die Lokalisation der GFP-Konstrukte wurde mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes untersucht (Abb. 3-34B). Sowohl mit KK-FG5-GFP als auch mit KK-FG5Φ-GFP fluoreszierte die gesamte Zelle, so dass man davon ausgehen kann, dass das gesamte Fusionsprotein wie erwartet im Cytoplasma vorlag. Anders sah es aus, wenn das RR-Motiv im HiPIP-Signalpeptid vorhanden war. Hier waren deutlich fluoreszierende Punkte an der Cytoplasmamembran zu erkennen, die vermehrt an den Polen auftraten. Da die Möglichkeit zur Tat-Interaktion der einzige Unterschied dieser Konstrukte ist, kann man davon ausgehen, dass diese Punkte Interaktionen von RR-FG5-GFP und RR-FG5Φ-GFP mit dem Tat-System markieren.

Da RR-FG5-GFP ebenfalls nicht transportiert wurde, war auch kein großer Unterschied in der Lokalisation von RR-FG5-GFP und RR-FG5 Φ -GFP zu erkennen.

Diese Daten decken sich mit den mikroskopischen Aufnahmen von Berthelmann & Brüser (2004). Die Autoren zeigten, dass TatB-GFP und TatC-GFP in *E. coli* vor allem an den Polen zu finden sind und vermuteten dass sich hier die aktiven Tat-Translokons befinden und der Transport abläuft.

Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass die fluoreszierenden Punkte keine Aggregationen aufgrund der Bildung von *Inclusion bodies* darstellen, da sie bei entsprechenden Zentrifugationsgeschwindigkeiten nicht sedimentiert werden konnten (Berthelmann *et al.*, 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von TatB und damit eines aktiven Translokons auch das Fehlen der fluoreszierenden RR-FG5-GFP-Spots zur Folge hatte. Auch eine Behandlung mit dem Entkoppler CCCP bewirkte das Verschwinden der Spots (Berthelmann *et al.*, 2008). Somit wurde nachgewiesen, dass die fluoreszierenden RR-FG5-GFP-Spots die Position der aktiven Substrat-bindenden Translokons anzeigen, da die Bildung von den Tat-Komponenten, dem RR-Motiv und Energie abhängig ist. Da diese Interaktion aber reversibel ist, handelt es sich bei den beobachteten Spots nicht um stabile Aggregationen von in die Membran entlassenem RR-FG5-GFP oder RR-FG5 Φ -GFP. Falls ein Transportintermediat in die Membran entlassen wird, verlässt es die Membran sehr schnell wieder. Somit bleibt unklar, an welcher Stelle im Tat-Transport-Mechanismus die GFP-Fusion den Transport von RR-FG5-GFP blockiert.

4 DISKUSSION

4.1 Das Signalpeptid von Tat-Substraten

Die wichtigste Voraussetzung für ein Targeting eines Substrates zum Tat-System ist das Tat-Signalpeptid. Mit einem geeigneten Signalpeptid können auch Proteine, die eigentlich keine Tat-Substrate sind, vom Tat-System erkannt und transportiert werden. Das wurde z.B. für GFP (Santini *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001; Ize *et al.*, 2002; Berthelmann & Brüser, 2004) und das Maltosebindeprotein MalE (Blaudeck *et al.*, 2003) gezeigt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten einige Merkmale von Tat-Signalpeptiden am Beispiel des HiPIP-Signalpeptides genauer untersucht werden.

4.1.1 Unterschiede zwischen Tat- und Sec-Signalpeptiden

Tat- und Sec-Signalpeptide sind sich in ihrem Aufbau sehr ähnlich und es wurde bereits gezeigt, dass 16 der 27 nachgewiesenen *E. coli* Tat-Signalpeptide auch vom Sec-System erkannt werden (Tullman-Ercek *et al.*, 2007). Diese Eigenschaft wurde auch für das HiPIP-Signalpeptid bestätigt. Die Fusion aus HiPIP-Signalpeptid und maturem PhoA wurde, wenn auch mit geringer Effizienz (ca. 6% im Vergleich zum PhoA-precursor), vom Sec-System erkannt und transportiert (Abb. 3-3). Das bedeutet, dass das Tat-Consensus-Motiv mit den beiden Argininen alleine nicht ausreicht um ein Targeting zum Sec-Translokon zu verhindern. Andererseits ist das RR-Motiv aber für ein Targeting zum Tat-Translokon zwingend notwendig. Werden die beiden Arginine in Lysine ausgetauscht, findet in der Regel keine Interaktion mit den Tat-Komponenten statt (Halbig *et al.*, 1999a; Cristóbal *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 1999; Alami *et al.*, 2002; Brüser *et al.*, 2003; Kreutzenbeck *et al.*, 2007 und Abb. 3-21).

Wenn das RR-Motiv, bzw. die Consensus-Sequenz für ein spezifisches Targeting nicht ausreichend ist, was sind dann die Merkmale, die ein Tat-Signalpeptid von einem Sec-Signalpeptid differenzieren? Warum werden einige Tat-Signalpeptide, wie die von DmsA oder HiPIP, auch vom Sec-System erkannt, wogegen die Signalpeptide von TorA oder HyaA ihr matures Protein ausschließlich zum Tat-System führen (DeLisa *et al.*, 2003; Tullman-Ercek *et al.*, 2007)?

Die erste Arbeit in dieser Richtung wurde von Bogsch *et al.* (1997) durchgeführt. Die Autoren wiesen nach, dass ein Lysin in der c-Region des 23K-Proteins (23 kDa-große Untereinheit des Photosystems II) dafür verantwortlich ist, dass das Signalpeptid nicht vom Sec-System erkannt wird. Blaudeck *et al.* (2003) zeigten ebenfalls, dass positive Ladungen, in diesem Falle zwei Arginine, in der c-Region des TorA-Signalpeptides für ein ausschließliches Targeting zum Tat-Translokon verantwortlich sind. Solche positiv geladenen Aminosäuren in der c-Region werden auch Sec-avoidance-Motive genannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde am HiPIP-Signalpeptid

getestet, ob durch die Einführung von Ladungen in die c-Region die Sec-Kompatibilität gesenkt werden konnte (Abb. 3-4). Dabei zeigte sich, dass die Einführung von negativen Ladungen (DD) keinen Einfluss auf das Sec-Targeting hatte, wogegen zwei positive Ladungen (RR) das Targeting zum Sec-Translokon drastisch minimierte. Bei der Kontrolle des Tat-Transportes fiel aber auf, dass dieser auch reduziert war. Somit wurde der Sec-Transport durch die positiven Ladungen zwar verhindert, aber durch den ebenfalls minimierten Tat-Transport blieb das gewünschte Ergebnis aus.

Tullman-Ercek *et al.* (2007) zeigten am Beispiel des Tat-Substrates MdoD (beteiligt an der Glucan Biosynthese), dass eine positive Ladung im N-Terminus der maturen Domäne ebenfalls als *Sec-avoidance*-Motiv dienen kann. Auch andere Eigenschaften des Bereiches um das AXA-Motiv (Erkennungssequenz für die Signalpeptidase) scheinen wichtig für den Tat-Transport zu sein. Eine Erhöhung der Hydrophobizität kann zur Folge haben, dass die terminale Prozessierung verlangsamt stattfindet (Frielingsdorf & Klösigen, 2007). Die Autoren vermuten, dass konformelle Änderungen dazu führen können, dass die Signalpeptidase die Schnittstelle nicht erkennen kann.

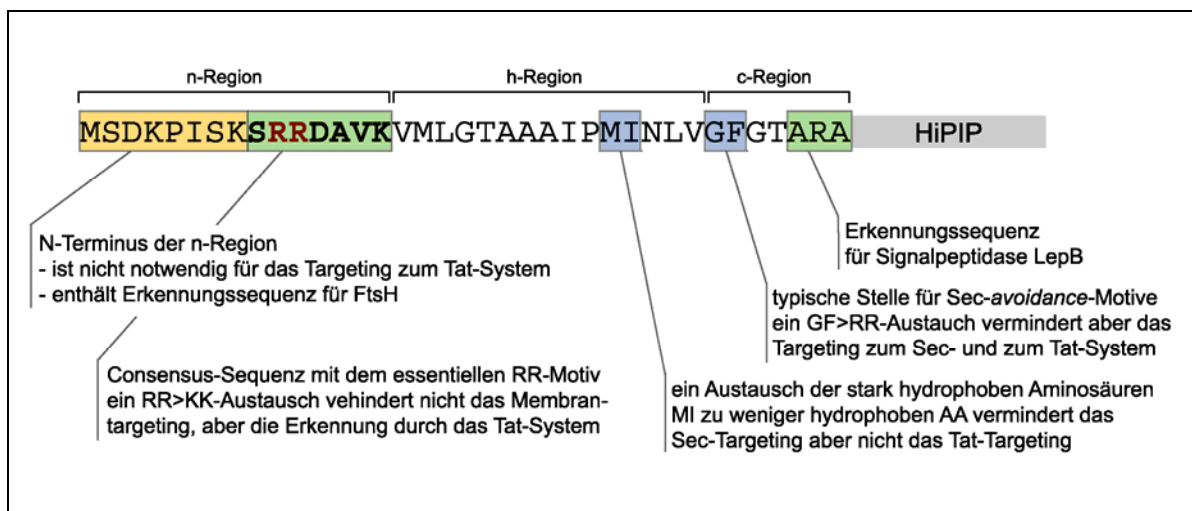


Abb. 4-1: Merkmale des HIPIP-Signalpeptides. (Beschreibung im Text)

Ein weiterer oft beschriebener Unterschied zwischen Sec- und Tat-Signalpeptiden ist die Hydrophobizität der h-Region. Cristóbal *et al.* (1999) zeigten anhand einer statistischen Auswertung, dass die h-Regionen von Tat-Signalpeptiden in der Regel weniger hydrophobe Aminosäuren enthalten, als die von Sec-Signalpeptiden. Den Autoren gelang es weiterhin, durch eine Erhöhung der Hydrophobizität der h-Region, das Tat-spezifische TorA-Signalpeptid in ein Sec-Signalpeptid umzuwandeln. Im Rahmen dieser Arbeit gelang dies auch im umgekehrten Fall für das HIPIP-Signalpeptid (Abb. 3-4). Durch eine Verringerung der Hydrophobizität konnte das Targeting von RR-PhoA zum Sec-Translokon drastisch verringert werden. Der gleiche Aminosäureaustausch im HIPIP-*precursor* hatte aber keine Veränderung des Tat-abhängigen Transportes zur Folge.

Es scheint so zu sein, dass die Hydrophobizität der Signalpeptide einen großen Einfluss auf die Wahl des Targetings hat und dass schon kleinste Variationen das Ziel des Proteins verändern können. Neben der Unterscheidung zwischen Sec- und Tat-Targeting ist die Hydrophobizität von Sec-Signalpeptiden ebenfalls entscheidend dafür, ob das Targeting zum Sec-Translokon SecB- oder SRP-abhängig erfolgt (de Gier *et al.*, 1997). Eventuell erfahren alle anderen Signalpeptide, die nicht die korrekte Hydrophobizität für die Erkennung durch SecB oder SRP haben, ein Membrantargeting, welches dann ein Targeting zum Tat-Translokon zur Folge haben kann.

Kebir & Kendall (2002) untersuchten *in vitro* das Vermögen einiger Tat-Signalpeptide die ATPase-Aktivität von SecA anzuregen. Dabei zeigte sich, dass mit dem TorA-Signalpeptid zumindest ein Teil der Aktivität des PhoA-Signalpeptides erreicht werden konnte, wogegen die Antwort auf das SufI-Signalpeptid nur sehr gering war. Diese Daten stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von DeLisa *et al.* (2003) und Tullman-Ercek *et al.* (2007), die gerade SufI in die Klasse von Signalpeptiden einstufen, die auch vom Sec-Translokon erkannt werden. Dagegen ist das TorA-Signalpeptid eigentlich Sec-inkompatibel. Das zeigt, dass es sich bei der Unterscheidung zwischen Tat- und Sec-Targeting um ein sehr sensibles System handelt, über das noch viel Unklarheit herrscht. Eventuell spielt dabei die mature Domäne des Proteins eine größere Rolle, als bisher angenommen. Eine neuere Einteilung der Tat-Substrate in drei Gruppen berücksichtigt zum ersten Mal auch die Charakteristik der murenen Domäne (Brüser, 2007). Zur ersten Gruppe gehören demnach die Tat-Substrate, für deren Funktionalität im Periplasma der Transport nach dem Cofaktoreinbau im gefalteten Zustand notwendig ist. Die zweite Gruppe umfasst die Tat-Substrate, die zu schnell falten, um Sec-kompatibel zu sein. Und zu der dritten Gruppe lassen sich die Tat-Substrate zusammenfassen, die ebenfalls Sec-abhängig transportiert werden können, deren Faltung aber nicht komplett unterdrückt werden kann. Somit kann es möglich sein, dass ein Tat-Signalpeptid prinzipiell auch vom Sec-System erkannt werden kann, der Faltungszustand der murenen Domäne eventuell aber auch am korrekten Targeting beteiligt ist.

4.1.2 Die n-Region von Tat-Signalpeptiden

Ein weiterer Unterschied zwischen Tat- und Sec-Signalpeptiden ist die Länge der n-Region. Tat-Signalpeptide besitzen meistens eine längere n-Region als Sec-Signalpeptide. Dabei variiert die Anzahl der Aminosäuren vor der Consensus-Sequenz sehr stark. Einige Signalpeptide enthalten vor der Consensus-Sequenz nur einige wenige Aminosäuren (z.B. SufI), wogegen sich in anderen Signalpeptiden bis zu über 20 Aminosäuren oberhalb der Consensus-Sequenz finden lassen (z.B. YagT).

Palmer *et al.* (2005) postulierten, dass der N-Terminus vor allem für die Bindung von Chaperonen verantwortlich ist, die notwendig für die korrekte Faltung und den Einbau von Cofaktoren sind. Die Autoren sind der Meinung, dass vor allem die Signalpeptide der Cofaktor-

haltigen Tat-Substrate extrem lange n-Regionen besitzen. Vergleicht man aber die bekannten Tat-Signalpeptide, kann man das nicht verallgemeinern. So besitzen z.B. die Cofaktor-haltigen Tat-Substrate FdnG, NapA, HybA oder FdoG sehr kurze n-Regionen, wogegen das Signalpeptid von AmiA vor der Consensus-Sequenz noch 11 weitere Aminosäuren enthält.

Bei der Untersuchung der FtsH-Prozessierung des HiPIP-Signalpeptides stellte sich heraus, dass die Aminosäuren vor der Consensus-Sequenz, die bei blockiertem Transport FtsH-abhängig entfernt werden, nicht für ein Targeting oder den Tat-Transport von HiPIP direkt benötigt werden (Abb. 3-8). Auch Henry *et al.* (1997) und Ma & Cline (2000) beobachteten, dass eine Deletion der n-Region vor der Consensus-Sequenz von OE23 bzw. OE17 keine Auswirkung auf den *in-vitro*-Transport in Thylakoide hat. Somit müssen diese Aminosäuren eine andere Bedeutung haben. Auf die möglichen Aufgaben von FtsH im Zusammenhang mit dem Tat-Transport wird im nächsten Kapitel noch genauer eingegangen. Es wäre aber vorstellbar, dass sich im N-Terminus vieler Tat-Substrate Erkennungssequenzen für FtsH oder auch für andere Proteasen befinden, die dafür sorgen, dass Substrate, die nicht transportiert werden können, aus der Membran entfernt werden.

4.1.3 Das Tat-unabhängige Membrantargeting von Tat-Substraten

Dass das Tat-Signalpeptid vor dem Targeting zum Tat-System mit der Membran interagiert, wurde schon einige Male gezeigt (Brüser *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2006; Shanmugham *et al.*, 2006). Diese Interaktion findet unabhängig von jeglichen Tat-Komponenten statt. Shanmugham *et al.* (2006) vermuten, dass die erste Interaktion durch elektrostatische Anziehung zwischen den positiv geladenen Aminosäuren des Consensus-Motives und der an der Oberfläche negativ geladenen Membran zustande kommt. Das erklärt, warum dieses Membrantargeting nicht verhindert wird, wenn das RR-Motiv gegen zwei Lysine ausgetauscht wird (Brüser *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2006). Auch in dieser Arbeit wurde festgestellt, dass RR-PhoA und KK-PhoA in gleichen Mengen in der Membranfraktion vorlagen, obwohl KK-PhoA nicht in einem TatBC-Komplex nachgewiesen wurde (Abb. 3-21). Nach der ersten elektrostatischen Interaktion schließt sich wahrscheinlich eine Interaktion der h-Region mit den Phospholipiden an, da Shanmugham *et al.* (2006) diese nicht durch Waschen mit NaCl unterbinden konnten. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in dieser Arbeit gemacht (Abb. 3-20). Durch Waschen der Membranen mit NaBr, Harnstoff oder Na₂CO₃ war es nicht möglich, selektiv RR-PhoA anzureichern. Das lässt vermuten, dass auch die Interaktion der h-Region mit den Phospholipiden RR-unabhängig stattfindet.

Anhand des HiPIP-Signalpeptides wurde von Kipping *et al.* (2003) gezeigt, dass das Tat-Signalpeptid in wässriger Lösung unstrukturiert vorliegt. Die h-region nimmt erst in der hydrophoben Umgebung der Phospholipide eine Sekundärstruktur (α -Helix) ein (San Miguel *et al.*, 2003), durch die eventuell eine Unterscheidung von RR und KK ermöglicht wird. Somit

könnte jetzt selektiv das RR-Motiv von TatC erkannt werden und das eigentliche Targeting zum Tat-System stattfinden.

Auf eine Besonderheit des Membrantargetings soll an dieser Stelle noch eingegangen werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass der N-Terminus des Signalpeptides während der gesamten Zeit von der ersten Interaktion bis zum Ende des Transportes auf der cytoplasmatischen Seite der Membran verbleibt. Am thylakoidalen Tat-System konnte dies schon mit diversen Substraten gezeigt werden (Fincher *et al.*, 1998; Musser & Theg; 2000; Hou *et al.*, 2006; Gérard & Cline, 2006). Auch beim HiPIP-Signalpeptid gibt es einige Hinweise darauf, dass der N-Terminus im Cytoplasma verbleibt. Würde die h-Region des *precursor*-HiPIPs einen kompletten Membrandurchgang bilden, müssten fünf positiv und zwei negativ geladene Aminosäuren die Membran überqueren. Es ist kaum vorstellbar, dass der Transport von drei positiven Nettoladungen gegen den elektrochemischen Gradienten spontan erfolgt. Weiterhin wurde unter 3.2.4.2 gezeigt, dass FtsH, nach einem erfolgten Membrantargeting, unter bestimmten Bedingungen eine Prozessierung der n-Region des *precursor*-HiPIP vornimmt. Da aber die FtsH-Domäne mit der proteolytischen Aktivität im Cytoplasma liegt, muss sich auch der N-Terminus von *precursor*-HiPIP im Cytoplasma befinden.

4.2 Die Rolle von FtsH beim Tat-abhängigen Transport

Unter 3.2.4.2 wurde gezeigt, dass *precursor*-HiPIP, wenn es nicht transportiert werden kann, eine Prozessierung in Abhängigkeit von FtsH erfährt. Der Transport war dabei auf verschiedene Weise blockiert: (I) *in vitro* durch eventuelles Fehlen von wichtigen Komponenten oder ungenügender PMF, oder (II) *in vivo* durch das Fehlen des RR-Motivs, wodurch der *precursor* nicht vom Tat-System als Substrat erkannt wird.

Die Prozessierung durch FtsH erfolgt ATP-unabhängig (Diplomarbeit Silke Trautmann, 2003). Obwohl FtsH eine ATP-abhängige Metalloprotease ist, ist die Proteaseaktivität selbst anscheinend nicht ATP-abhängig. Das cIII-Protein des λ -Phagen wird beispielsweise ebenfalls ATP-unabhängig abgebaut. ATP wird vermutlich nur zur Entfaltung des Substrates, d.h. für die Chaperon-Aktivität von FtsH, benötigt (Schumann, 1999).

Bei der Prozessierung werden die ersten 8 Aminosäuren der n-Region von *precursor*-HiPIP entfernt. In Abb. 3-9 ist zu sehen, dass auch mit dem Substrat Hip^{SP}-PhoA FtsH-spezifische Abbauprodukte nachweisbar sind. Bei Transportuntersuchungen mit anderen Tat-Substraten (z.B. CueO, AmiA, YcdB) lassen sich im Cytoplasma ebenfalls Abbauprodukte nachweisen, die in ihrer Größe zwischen dem *precursor* und dem maturen Protein liegen (Wenke Schüler, Alexander Sturm & Thomas Brüser, persönliche Mitteilung) und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch FtsH-abhängig entstehen. Das zeigt, dass die beschriebene Prozessierung nicht nur darauf zurückzuführen ist, dass HiPIP kein *E. coli*-Protein ist.

FtsH ist eine Endopeptidase, und die Abbauprodukte sind Oligopeptide kleiner als ~3 kDa, meistens zwischen 10 und 20 Aminosäuren lang (Asahara *et al.*, 2000; Shotland *et al.*, 2000). Es wurden bisher keine spezifischen *cleavage sites* gefunden, aber FtsH bevorzugt hydrophobe und basische Aminosäuren auf beiden Seiten der Schnittstellen (Akiyama, 1999). *In vitro*-Analysen ergaben, dass der prozessive Abbau durch FtsH sehr schnell verläuft und die Initiation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist (Bruckner *et al.*, 2003; Shotland *et al.*, 2000). Die Initiation erfolgt an einer cytoplasmatischen Domäne des Substrates, die ca. 10 bis 20 Aminosäuren lang und unstrukturiert sein muss (Kihara *et al.*, 1999). Die zum Abbau bestimmten Membranproteine werden dann zur weiteren Proteolyse aus der Membran gezogen, wobei die AAA-Domäne unter ATP-Verbrauch wahrscheinlich die „Dislokase“-Funktion übernimmt (Kihara *et al.*, 1999; Ito & Akiyama, 2005). Alle diese Eigenschaften passen genau auf die beobachtete Prozessierung von HiPIP bei blockiertem Transport. Überraschend ist aber, dass es bei der Entfernung der ersten 8 Aminosäuren des N-Terminus bleibt und die Prozessierung nicht weiter verläuft. Der Grund dafür könnte sein, dass FtsH nicht in der Lage ist fest gefaltete Proteine zu entfalten. Beispielsweise kann GFP nicht von FtsH abgebaut werden, obwohl das für andere Proteasen kein Problem ist, da die Entfaltungsaktivität von FtsH für dieses fest gefaltete Protein nicht ausreicht (Herman *et al.*, 2003; Ito & Akiyama, 2005).

FtsH spielt eine generelle Rolle bei der Qualitätskontrolle von Membranproteinkomplexen und erkennt und entfernt unkomplexierte Proteine aus der Membran (Schumann, 1999; Ito & Akiyama, 2005). Es wäre vorstellbar, dass genau diese Funktion auch in Aktion tritt, wenn überschüssige oder falsch gefaltete Tat-Substrate in der Membran vorliegen. Aber kann man hierbei von einer Qualitätskontrolle der Faltung von Tat-Substraten reden? Theoretisch wäre FtsH in der Lage eine solche Funktion zu übernehmen. Durch die vorhandene Protease- und Chaperon-Aktivität könnten durch falsche Faltung exponierte hydrophobe Regionen erkannt und aus der Membran entfernt werden. Für eine Beteiligung von FtsH an einer echten Qualitätskontrolle der Faltung sollte zumindest eine der folgenden Kriterien erfüllt werden:

- (I) Wenn eine Kontrolle der Faltung durch FtsH einem Targeting zwingend vorgeschaltet wäre, müsste der Tat-Transport in einem Δ *ftsH*-Stamm eingeschränkt sein. Das konnte nicht beobachtet werden. Beim Fehlen von FtsH, fehlte nur die Prozessierung. Auf den Tat-abhängigen Transport von HiPIP hatte das aber keinen Einfluss (Abb. 3-7).
- (II) Eine echte Qualitätskontrolle der Faltung sollte mit dem Tat-System zusammenarbeiten. Eine Veränderung der Menge der Tat-Komponenten in der Membran hatte aber keine Veränderung der prozessierten Menge an HiPIP zur Folge (Ergebnisse nicht gezeigt), so dass man davon ausgehen kann, dass die Prozessierung Tat-unabhängig erfolgte.
- (III) Falls eine Qualitätskontrolle der Faltung eingreift, wenn das Tat-System mit falsch-gefalteten oder nicht transportierbaren Substraten interagiert, sollte die Prozessierung RR-spezifisch erfolgen. Die in dieser Arbeit beobachtete FtsH-abhängige Prozessierung von HiPIP und Hip^{SP}-PhoA erfolgte aber immer unabhängig vom RR-Motiv. Auch die

Substrate, die ein KK-Motiv enthielten wurden von FtsH erkannt und abgebaut (Abb. 3-7 und Abb. 3-9). Für die geringere Menge von RR-PhoA in der *ftsH*-WT-Membran gibt es eine andere Erklärung. Wie unter 3.2.6 gezeigt, hat der toxische Effekt, ausgelöst durch die gleichzeitige Überexpression von *tatABC* und *RR-phoA*, eine Reduzierung der Plasmidkopien zur Folge. Dadurch sinkt die Menge an nachweisbarem RR-PhoA in der Membran (Abb. 3-9). Dass dieser Effekt in dem Δ *ftsH*-Stamm nicht so stark ausgeprägt war, lässt sich dadurch erklären, dass der Δ *ftsH*-Stamm von Natur aus schon sehr langsam und nur bei 30°C wächst, und hier wahrscheinlich auch das Targeting und der Transport langsamer ablaufen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass FtsH eine wichtige Aufgabe bei der Entfernung von unkomplexierten und sich akkumulierenden Proteinen aus der Membran hat. Diese Eigenschaft könnte dafür sorgen, dass Tat-Substrate, die ein Membrantargeting erfahren aber nicht transportiert werden können, durch FtsH erkannt und abgebaut werden. Eventuell besitzen einige Tat-Substrate genau für diese Erkennung durch FtsH die längere n-Region, die zumindest im Falle von HiPIP nicht für den Transport notwendig ist. Eine solche Prozessierung ist aber nicht einer Qualitätskontrolle der Faltung gleichzusetzen.

4.3 Das Targeting von ungefalteten Substraten – Existiert eine generelle Qualitätskontrolle der Faltung von Tat-Substraten?

Während der letzten Jahre entstand die Hypothese, dass eine Qualitätskontrolle der Faltung am bakteriellen Tat-System existiert. Durch einige Studien wurde gezeigt, dass ungefaltete Substrate nicht Tat-abhängig transportiert werden (Santini *et al.*, 1998; Halbig *et al.*, 1999b; Sanders *et al.*, 2001; DeLisa *et al.*, 2003). Vor allem die Tatsache, dass dieselben rekombinanten Substrate vom Tat-System akzeptiert werden, wenn eine Faltung im Cytoplasma ermöglicht wird (Sanders *et al.*, 2001; DeLisa *et al.*, 2003), führte zu der Vermutung, dass ein Mechanismus existiert, der die korrekte Faltung der Tat-Substrate vor der Bindung an TatBC überprüft. Sanders *et al.* (2001) zeigten, dass Cytochrome nur Tat-abhängig transportiert wurden, wenn eine rekombinante mitochondriale Häm-Ligase die Cofaktorassemblierung im Cytoplasma ermöglichte. Auch das Sec-Substrat PhoA konnte nur in einem Mutantenstamm, in dem die Thioredoxin-Reduktase und die Glutathion-Oxidoreduktase fehlten, wodurch eine cytoplasmatische Disulfid-Bildung und Faltung erreicht werden konnte, Tat-abhängig transportiert werden (DeLisa *et al.*, 2003). Eine postulierte generelle Qualitätskontrolle der Faltung könnte der Interaktion mit den Tat-Komponenten vorgeschaltet sein (Brüser & Sanders, 2003) oder eine intrinsische Eigenschaft von TatA, TatB oder TatC sein (DeLisa *et al.*, 2003; Palmer *et al.*, 2005). Fisher & DeLisa (2004) diskutieren, dass die cytoplasmatische Domäne von TatB exponierte hydrophobe Bereiche von nicht korrekt gefalteten Proteinen erkennen und weitere Translokationsschritte verhindern könnte. Die

Autoren untermauern diese These damit, dass TatB die einzige Tat-Komponente ist, bei der mittels *cross-linking* gezeigt wurde, dass sie mit dem murenen Bereich der Tat-Substrate interagiert (Alami *et al.*, 2003).

Eine zweite Erklärung für die Unterscheidung des Tat-Systems zwischen gefalteten und ungefalteten Substraten könnte sein, dass das Tat-Translokon rein mechanistisch nicht in der Lage ist, lange und nicht globuläre Proteine zu transportieren.

Diese zweite Hypothese wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt. An mehreren Beispielen wurde gezeigt, dass ein Targeting von ungefalteten Tat-Substraten zum Tat-Translokon möglich ist. Eine direkte Interaktion von RR-PhoA und den Tat-Komponenten TatB und TatC wurde mittels BN-PAGE nachgewiesen (Abb. 3-21). Dem Tat-abhängigen Transport der FG-repeats-Domänen muss ebenfalls ein Targeting vorausgegangen sein (Abb. 3-26).

Mittlerweile ist es ebenfalls gelungen, den Tat-abhängigen Transport der fehlgefalteten HiPIP-Derivate (vgl. 3.1) eindeutig nachzuweisen (Richter *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass alle RR-HiPIP-Derivate bei denen die Cofaktor-bindenden Cysteine schrittweise gegen Aspartate ausgetauscht wurden, transportiert wurden. Dagegen wurden die entsprechenden KK-Konstrukte nicht transportiert, so dass eine Tat-Abhängigkeit nachgewiesen wurde. Durch das Fehlen aller Cysteine ist davon auszugehen, dass kein Cofaktoreinbau und damit keine korrekte Faltung des Proteins mehr möglich war. Somit zeigen auch diese Daten, dass das Tat-System prinzipiell in der Lage ist, ungefaltete oder fehlgefaltete Substrate zu transportieren.

Demzufolge ergaben sich keine Hinweise auf die Existenz einer generellen Qualitätskontrolle der Faltung, weder vor der Interaktion mit den Tat-Komponenten, noch am Tat-Translokon selber. Eine Qualitätskontrolle als intrinsische Funktion von TatB oder TatC, wie von DeLisa *et al.* (2003) und Fisher & DeLisa (2004) vermutet, ist unwahrscheinlich, da eine direkte Interaktion von RR-PhoA mit dem TatBC-Komplex nachgewiesen wurde. Eine weitere Möglichkeit einer generellen Qualitätskontrolle wäre die Verhinderung der Assemblierung von TatA an einen Komplex aus TatBC und dem ungefalteten Substrat. Aber auch diese konnte widerlegt werden, da sowohl die fehlgefalteten HiPIP-Derivate (Richter *et al.*, 2007), als auch die ungefalteten FG-repeats-Domänen (Abb. 3-26) transportiert wurden. Auch dem Protonen-leakage, bzw. dem toxischen Effekt, den das Targeting von RR-PhoA zur Folge hatte (Abb. 3-13 und Abb. 3-16), muss eine Assemblierung von TatA und eine Initiierung der Translokation vorausgegangen sein. Somit kann die Existenz einer generellen Qualitätskontrolle der Faltung am Tat-Translokon mit den vorliegenden Ergebnissen weitgehend ausgeschlossen werden.

Allerdings wurde kürzlich gezeigt, dass bei den Eisen-Schwefel-Proteinen NrfC und NapG, durch den Austausch einiger Cofaktor-bindenden Aminosäuren, der Tat-Transport vollständig blockiert wird (Matos *et al.*, 2008). In diesen besonderen Fällen wurde im WT-Stamm ein Abbau der NrfC- und NapG-Derivate detektiert, wogegen diese im Δ tatABC-Stamm stabil vorlagen. Eine solche Beobachtung konnte mit allen in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konstrukten nicht gemacht werden. Matos *et al.* (2008) stellten weiterhin fest, dass vor allem TatA eine Rolle bei

der Prozessierung der Derivate spielt, und erklären dies durch eine Qualitätskontrolle zu einem späten Zeitpunkt der Translokation, nach der Bildung des aktiven Translokons. Allerdings hatte das Fehlen weder von TatB noch von TatC eine erhöhte Stabilität der Derivate zur Folge, und es ist sehr unwahrscheinlich, dass das aktive Translokon nur mit TatA und TatB oder TatC alleine gebildet wird. In dieser Studie wurde auch keine Bindung der Substrate am Translokon gezeigt. Eventuell könnte in diesem speziellen Fall TatA alleine, vielleicht zusammen mit einer Protease (z.B. FtsH), an der Erkennung der falschgefalteten NrfC- und NapG-Derivate beteiligt sein. Um Aussagen darüber treffen zu können, fehlt bei Matos *et al.* (2008) aber die wichtige Kontrolle in einem Δ tatBC-Stamm, so dass zu diesem Zeitpunkt keine weitere Interpretation dieser Ergebnisse möglich ist.

In anderen Arbeiten wurde ebenfalls gezeigt, dass für ein Targeting zum Tat-Translokon nicht zwangsweise ein korrekt gefaltetes Tat-Substrat notwendig ist. Chanal *et al.* (2003) konnten mittels TorA502, einem verkürzten TorA, dem 9 essentielle Liganden für den Molybdo-Cofaktor-Einbau fehlen, den Tat-Transport von Vollängen-TorA inhibieren. Das rekombinant produzierte TorA502 muss das Tat-Translokon so gesättigt haben, dass ein Transport von TorA, exprimiert vom chromosomalen *torA*-Gen, nicht mehr detektierbar war. TorA502 wurde aber nicht transportiert. Alami *et al.* (2003) konnten mittels *in vitro-cross-linking* nachweisen, dass das Sufl-Signalpeptid sogar ohne mature Domäne mit dem Tat-Translokon interagiert.

Am Tat-System von Thylakoiden wurde bereits gezeigt, dass fehlgefaltete Tat-Substrate transportiert werden können. Hynds *et al.* (1998) untersuchten den *in vitro*-Transport von einer Fusion aus dem thylakoidalen Protein 23K und der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR). Eine am C-Terminus um 77 Aminosäuren verkürzte Version dieser Fusion, der es nicht möglich ist, vollständig zu falten, wurde dennoch in das Thylakoidlumen transportiert. Auch der Einbau eines Aminosäureanalogons in das Vollängen-Konstrukt während der *in vitro*-Translation, wodurch die Tertiärstruktur destabilisiert wurde, hatte keine Blockade des Transportes zur Folge. Somit wurde im pflanzlichen Tat-System nie von einer Qualitätskontrolle der Faltung ausgegangen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass auch das Tat-System von *E. coli* ungefaltete Proteine transportieren kann, und es somit diesbezüglich keinen generellen Unterschied zwischen den beiden Tat-Systemen gibt.

Ein weiterer Mechanismus, der immer im Zusammenhang mit einer Qualitätskontrolle der Faltung genannt wird, ist das sogenannte *proofreading* (Berks *et al.*, 2005). Dabei handelt es sich um ein System aus Tat-Substrat und einem spezifischen cytoplasmatischen Chaperon, welches die Faltung und den Einbau von Cofaktoren unterstützt und die Signalpeptide bis zur vollständigen Faltung maskiert. Diese spezifischen Chaperone werden auch REMPs (*redox enzyme maturation proteins*) genannt (Turner *et al.*, 2004). Für die Tat-abhängig transportierten Redoxproteine bzw. -komplexe DmsAB, TorA und HybOC wurden die spezifischen Chaperone DmsD, TorD und HybE identifiziert, die die Signalpeptide ihrer Partner-Tat-Substrate erkennen

und schützen, bis der Cofaktor eingebaut und die Faltung abgeschlossen ist (Oresnik *et al.*, 2001; Ray *et al.*, 2003; Jack *et al.*, 2004; Dubini & Sargent, 2004; Berks *et al.*, 2005).

Am Beispiel der periplasmatischen Nitrat-Reduktase NapA und deren spezifischem Chaperon NapD wurde gezeigt, dass NapD eine Anti-Transport-Aktivität besitzt. Der Tat-abhängige Transport einer Fusion aus dem NapA-Signalpeptid und der Chloramphenicolacetyltransferase (Cat) konnte durch NapD gestoppt werden. NapD scheint am Signalpeptid zu binden und den Transport zu verhindern, bis die komplette Faltung und Assemblierung von NapA abgeschlossen ist. Das gefaltete Reporterprotein Cat konnte aber keine NapD-Entlassung vom NapA-Signalpeptid erwirken (Maillard *et al.*, 2007).

Solche spezifischen Chaperone können unter natürlichen Bedingungen helfen, das Targeting von fehlgefalteten Tat-Substraten zu verhindern und damit auch die Zelle vor eventuell daraus resultierenden toxischen Effekten zu schützen. Da Chaperone die Substrate aber gerade bei der Faltung unterstützen, kann das *proofreading* nicht einer generellen Qualitätskontrolle von Tat-Substraten gleichgesetzt werden, die erst nach einer Faltung das Tat-Targeting von fehlgefalteten Substraten verhindern soll.

In diesem Zusammenhang wird auch nach generellen Chaperonen gesucht, die an vielen verschiedenen Tat-Substraten binden und nicht nur auf ein spezifisches Substrat festgelegt sind. Solche generellen Chaperone könnten die Substrate im Cytoplasma vor Abbau schützen und in einem transportfähigen Zustand halten – Aufgaben, die z.B. SecB und DnaK beim Sec-Transport übernehmen. Eventuell könnten solche generellen Chaperone auch ein Targeting zum Tat-System vermitteln.

Graubner *et al.* (2006) konnten DnaK und SlyD als generelle Chaperone identifizieren, die mit einer Auswahl von Tat-Signalpeptiden interagierten, für die keine spezifischen Chaperone bekannt sind. Ein Fehlen von DnaK und SlyD hatte bei den meisten untersuchten Tat-Substraten keinen Einfluss auf den Transport, und die postulierte Aufgabe der Stabilisierung des Signalpeptides im Cytoplasma wurde von anderen Chaperonen, z.B. GroEL übernommen. Interessanterweise konnten die Autoren DnaK eine Rolle beim Tat-abhängigen Transport von CueO nachweisen. In einem $\Delta dnaK$ -Stamm war der Transport von CueO blockiert.

Auch Pérez-Rodríguez *et al.* (2007) zeigten eine Interaktion von DnaK mit einigen Tat-Substraten, wodurch deren Stabilität im Cytoplasma erhöht wurde. Aus den Ergebnissen wurde aber auch ersichtlich, dass DnaK nicht in der Lage ist, Faltungszustände zu unterscheiden. Somit scheint eine *proofreading*-Funktion ähnlich derer der spezifischen Chaperone unwahrscheinlich. Unbekannt ist aber weiterhin, ob solche generellen Chaperone eine Rolle beim Tat-Targeting spielen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Existenz einer generellen Qualitätskontrolle der Faltung weitestgehend ausgeschlossen werden kann. Unter natürlichen Bedingungen werden die Signalpeptide der Cofaktor-enthaltenden Tat-Substrate bei der Faltung von spezifischen Chaperonen maskiert, so dass diese nicht vor der abgeschlossenen Faltung und Assemblierung

transportiert werden. Für Tat-Substrate ohne Cofaktoren und solche, die nur [4Fe-4S]-Cofaktoren enthalten, wurden bisher keine spezifischen Chaperone identifiziert (Berks *et al.*, 2005). Diese werden zum Teil so schnell falten, eventuell unterstützt durch generelle Chaperone, dass ein Transport im ungefalteten Zustand ausgeschlossen werden kann. Dabei scheint es wahrscheinlich, dass vor einer Interaktion mit den Tat-Komponenten die Signalpeptide durch generelle Chaperone wie DnaK und SlyD geschützt werden. Somit kann die Zelle unter natürlichen Bedingungen die Gefahr zumeist umgehen, ungefaltete Substrate Tat-abhängig zu transportieren.

4.4 Der Tat-Transport von ungefalteten Substraten – Welche Eigenschaften der Substrate verhindern den Tat-Transport?

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass prinzipiell auch ungefaltete Substrate Tat-abhängig transportiert werden können. Eine gewisse Selektivität am Tat-Translokon findet aber trotzdem statt, die wahrscheinlich auf den Mechanismus des Tat-Transportes zurückzuführen ist. Alle getesteten Modell-Tat-Substrate wurden vom Tat-System erkannt, und auch der Transport wurde zumindest initiiert (vgl. 4.3). Zwei Eigenschaften der Tat-Substrate limitieren dann aber den Transport:

- (I) Zu lange ungefaltete Substrate können nicht vollständig transportiert werden.
- (II) Hydrophobe Bereiche verhindern den Tat-Transport ins Periplasma.

Kurze ungefaltete Substrate (fehlgefaltete HiPIP-Derivate, RR-FG3, RR-FG5, CueO^{SP}-FG5 und DmsA^{SP}-FG5) werden ohne Probleme Tat-abhängig transportiert (vgl. 4.3).

Die Untersuchungen mit den unterschiedlich großen FG-*repeats*-Domänen (Abb. 3-26) zeigten, dass die Länge des muren ungefalteten Proteins einen entscheidenden Einfluss auf die Transportfähigkeit hat. Der Transport der kurzen FG-*repeats*-Domänen (RR-FG3 und RR-FG5) war sehr effizient, wogegen RR-FG10 nur noch schlecht und RR-FG17 gar nicht mehr transportiert wurde. Die Grenze der Tat-Kompatibilität lag hier im Bereich der Länge von RR-FG10, dessen mures Protein eine Masse von 23 kDa aufweist. Auffallend war aber, dass der Transport mit zunehmender Länge des muren Proteins schrittweise abnahm und nicht ab einer gewissen Länge abrupt aufhörte. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist, dass alle FG-*repeats*-Domänen transportiert wurden, der Tat-Mechanismus aber nur eine bestimmte Länge in Richtung Periplasma befördern konnte (vgl. 4.5). Da die langen FG-*repeats*-Domänen (RR-FG10 und RR-FG17) aus den gleichen oder ähnlichen FG-*repeats* bestehen wie die kurzen, gibt es keinen Grund anzunehmen, dass hier kein Transportversuch erfolgte. Mittlerweile wurde postuliert, dass das Tat-Translokon die Substrate nach erfolgreichem Transport, vor der Prozesierung durch die Signalpeptidase, lateral in die Membran entlässt (Frielingsdorf & Klösigen, 2007; Sargent *et al.*, 2006). Somit könnten auch die langen Proteine, bei denen der Transport

nicht vollständig war, eingefädelt in die Membran entlassen werden (Abb. 3-26). Durch die vielen geladenen Aminosäurereste an der Oberfläche wäre dieser Membrandurchgang aber sehr instabil. Nach der Entfernung des Signalpeptides könnte das eingefädelte Protein die Membran sehr schnell, je nach Länge ins Periplasma oder ins Cytoplasma, verlassen (Abb. 4-2). Zehn FG-repeats können dabei gerade noch so weit transportiert werden, dass ein Teil des maturen Proteins das Periplasma erreicht (Abb. 3-26).

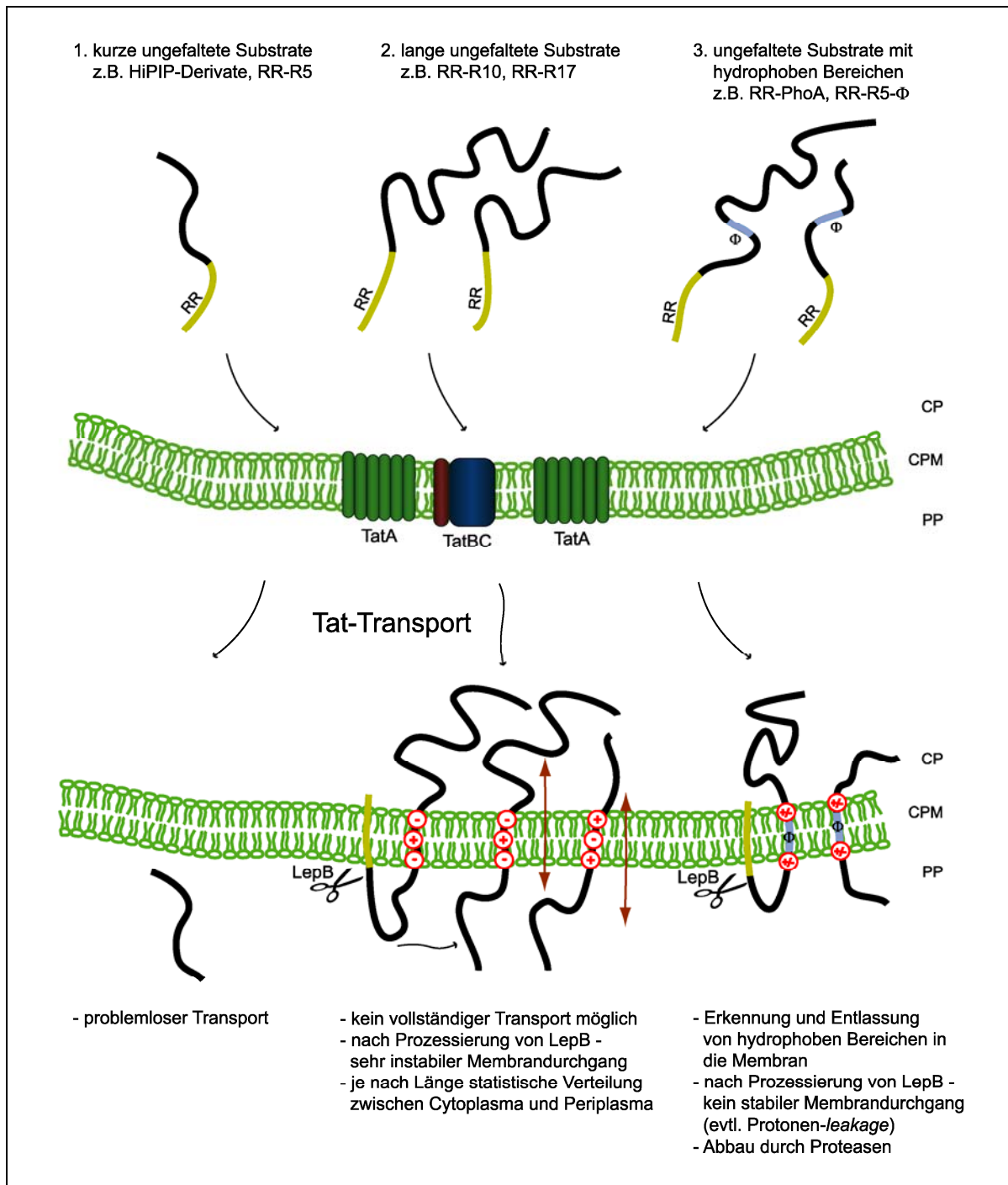


Abb. 4-2: Schematische Darstellung des Transportes der verschiedenen Tat-Modellsubstrate.

Ähnliche Beobachtungen machten Cline & McCaffery (2007). Die Autoren untersuchten den Transport von unterschiedlich langen Fusionsproteinen (mOE17 oder ProteinA fusioniert über verschieden lange unstrukturierte *linker* an pOE17) und kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass die Translokationseffizienz mit der Länge des zu transportierenden Proteins abnimmt. Auch in dieser Studie konnte keine Interaktion des unvollständig transportierten Substrates mit dem Translokon nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass auch diese Transportintermediate in die Membran entlassen wurden.

Nachdem eine hydrophobe Aminosäuresequenz in die *FG-repeats* eingefügt wurde, konnten diese nicht mehr transportiert werden (Abb. 3-31). Das zeigt, dass nur Substrate mit einer hydrophilen Oberfläche mit dem Tat-System kompatibel sind und das Periplasma erreichen. Bei den meisten natürlichen Tat-Substraten ist das auch der Fall. Nach der Faltung im Cytoplasma befinden sich alle hydrophoben Bereiche im Inneren des globulären Proteins. Einige vereinzelte hydrophobe Aminosäuren kann das Tat-System anscheinend tolerieren, da auch in den transportierten *FG-repeats* einzelne Phenylalanine zu finden sind. Erst eine hydrophobe Sequenz blockierte den Transport ins Periplasma. Dabei war es aber nicht entscheidend, ob sich die Aminosäuresequenz NILLI im 3. oder im 5. *FG-repeat* befand (Abb. 3-33). Neuere Ergebnisse zeigen, dass drei aufeinanderfolgende hydrophobe Aminosäuren für eine Inhibition des Transportes nicht ausreichend sind (Richter *et al.*, 2007). Es stellt sich jedoch die Frage, wie eine einzelne hydrophobe Sequenz den vollständigen Transport ins Periplasma verhindert. Hatzixanthis *et al.* (2003) zeigten, dass das Tat-System auch an der Biogenese von integralen Membranproteinen beteiligt ist. Vier *E. coli* Proteine mit C-terminalen Transmembranhelices wurden identifiziert, deren Integration in die Cytoplasmamembran Tat-abhängig und YidC-unabhängig erfolgte. Dazu zählen die kleinen Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenasen N/O (FdnH und FdoH) und die kleinen Untereinheiten der Hydrogenasen 1/2 (HyaA und HybO). Die Autoren vermuten, dass das Tat-System den hydrophoben Membrandurchgang erkennt und das Protein in die Membran entlässt, was mit den Ergebnissen dieser Arbeit konform wäre.

Somit könnten die Erkennung von hydrophoben Bereichen, ein unvollständiger Transport und die Entlassung eines membrandurchspannenden Substrates natürliche Vorgänge beim Tat-Transport sein. Das Problem für die Zelle ist nur, dass es sich bei den hydrophoben Bereichen von RR-FGn Φ und RR-PhoA nicht um stabile Membrandurchgänge handelt. In beiden Fällen ist die hydrophobe Sequenz umschlossen von geladenen Aminosäuren (Abb. 4-2). Solche Nicht-Membranproteine in der Membran könnten, vor allem wenn sie lokal in erhöhten Mengen auftreten, die Membran erheblich schwächen und zu dem beobachteten Protonen-*leakage* (Abb. 3-16 und Abb. 3-32) und dem daraus resultierenden cytotostatischen Effekt auf das Wachstum (Abb. 3-13 und Abb. 3-31) führen. Wie stark dieser Effekt ausgeprägt ist, hängt wahrscheinlich vor allem davon ab, wie schnell diese Proteine aus der Membran entfernt werden können. Diese Aufgabe könnten Proteasen wie FtsH übernehmen, die darauf spezialisiert sind, unkomplexierte oder fehlgefaltete Membranproteine zu erkennen und

abzubauen. Entscheidend für das Ausmaß des Protonen-*leakage* wird weiterhin sein, wieviel membrandurchspannendes PhoA oder FGn Φ in die Membran entlassen wird. Das erklärt auch, warum der cytostatische Effekt mit Zunahme der Menge an Tat-Translokons stieg (Abb. 3-13). Ein Hinweis darauf, dass das beobachtete Protonen-*leakage* nicht am Translokon direkt auftrat, ist, dass RR-PhoA nicht das Translokon blockierte (Abb. 3-18 und Abb. 3-19). Der Transport von TorA und den Amidasen mit WT-TatABC-Mengen funktionierte ohne Einschränkungen, so dass das unvollständig transportierte RR-PhoA höchstwahrscheinlich entlassen wurde. Erst bei erhöhter Menge an TatABC war die Membran so geschwächt, dass auch ein sekundärer negativer Effekt auf den Transport der natürlichen Tat-Substrate erkennbar war (Abb. 3-18C und Abb. 3-19B).

Die Existenz von unterschiedlichen Populationen von Tat-Translokons in *E. coli* kann aber auch nicht vollständig ausgeschlossen werden. In diesem Fall könnten RR-PhoA und RR-FGn Φ nur eine bestimmte Population von Translokons blockieren und somit keinen Einfluss auf den Transport von TorA, AmiA oder AmiC haben.

Vergleicht man aber den Transport von RR-FG17 und RR-FG17 Φ zeigt sich, dass nur die hydrophobe Aminosäuresequenz NIILLI den ausschlaggebenden Unterschied ausmacht, der zu dem cytostatischen Effekt führte. Beide Proteine konnten nicht ins Periplasma transportiert werden, wobei RR-FG17 aber die Membran, bzw. das Translokon ohne weitere Folgen schnell wieder verlassen konnte. Dagegen führte der hydrophobe Bereich in RR-FG17 Φ zu einer Wachstumsinhibition, die wahrscheinlich aus einem Protonen-*leakage* resultierte. Folglich war nicht alleine der blockierte Transport der Grund für das Protonen-*leakage*, welches vermutlich auch nicht am Translokon, sondern aufgrund eines membrandurchspannenden FG17 Φ erfolgte.

4.5 Der Mechanismus des Tat-Transportes – Ein-Schritt-Mechanismus oder Prozessiver Mechanismus?

Dass die erste Bindung zwischen Tat-Substrat und Tat-System zwischen dem Signalpeptid und dem TatBC-Komplex erfolgt, ist bekannt (Alami *et al.*, 2003; Gérard & Cline, 2006; Holzapfel *et al.*, 2007). Aber wie sieht es im Verlauf des Transportes aus? Gibt es weitere Bindungsstellen zwischen Substrat und den Tat-Komponenten, ähnlich wie beim Sec-Transport, so dass der Transport ein prozessiver Mechanismus ist? Oder erfolgt der Tat-Transport in nur einem Schritt? Die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen mit bereits bekannten Studien lassen auf einen Ein-Schritt-Mechanismus schließen:

- (I) Die FG-*repeats*-Domänen wurden nur bis zu einer Länge von ca. 24 kDa vollständig transportiert (Abb. 3-26). Dies ist ein Hinweis darauf, dass nach der Signalpeptidbindung und der Assemblierung des Tat-Translokons der Transport in nur einem Schritt abläuft. Gäbe es mehrere Bindungsstellen innerhalb des murenen Proteins, dann wäre eine

- Interaktion auch in den *repeats* 10 - 17 möglich gewesen, da sich die Aminosäuresequenzen der *FG-repeats* sehr ähnlich sind. In diesem Fall hätten auch die längeren *FG-repeats*-Domänen ins Periplasma transportiert werden können.
- (II) Die Domäne aus fünf *FG-repeats* konnte problemlos Tat-abhängig transportiert werden (Abb. 3-26). Wurde aber C-terminal ein GFP angehängt, war der Transport komplett blockiert (Abb. 3-34). Dabei ist bekannt, dass GFP fusioniert an ein Tat-Signalpeptid Tat-abhängig transportiert werden kann (Santini *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001; Ize *et al.*, 2002; Berthelmann & Brüser, 2004). Selbst der Transport einer Fusion aus Vollängen-AmiA und GFP wurde bereits gezeigt (Bernhardt & de Boer, 2003). Im Falle von RR-FG5-GFP scheinen aber die fünf ungefalteten *FG-repeats* zwischen Signalpeptid und dem gefalteten GFP den Transport zu verhindern. Das lässt ebenfalls vermuten, dass keine weiteren Bindungen zwischen dem Substrat und dem Tat-System während des Transportes stattfinden und RR-FG5-GFP zu lang ist, um in einem Schritt transportiert zu werden.
- (III) Ähnliche Beobachtungen machten Musser & Theg (2000). Hier verhinderte ein C-terminal (über einen 25 Aminosäuren-langen *linker*) gebundenes Avidin den Transport von pOE17, wobei ein Tat-Targeting des *precursor*-Avidin-Komplexes aber erfolgte.
- (IV) Asai *et al.* (1999) führten Transport-Studien mit einem pOE23-Avidin-Komplex durch. Ein Targeting zum Tat-Translokation wurde ebenfalls gezeigt, und es konnte sogar ein membrandurchspannendes Transport-Intermediat nachgewiesen werden, welches auf einen unvollständigen Transport hindeutet.
- (V) Gérard & Cline (2006) zeigten, dass ein Tat-Substrat, welches über das Signalpeptid kovalent mittels *cross-linking* an TatC gebunden ist, noch transportiert wird. Somit bleibt die erste Interaktion zwischen TatC und dem *precursor* vermutlich während des gesamten Transportprozesses bestehen. Das bedeutet, dass ein prozessiver Transport mit weiteren stabilen Interaktionen zwischen Tat-System und Substrat sehr unwahrscheinlich ist.

Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass das Signalpeptid von Tat-Substraten die einzige bekannte konservierte Bindungsstelle enthält, lassen den Schluss zu, dass nur das Signalpeptid gebunden wird und das Substrat in nur einem Schritt über die Cytoplasmamembran gebracht wird. Dabei erreichen aber nur globuläre oder kurze Substrate das Periplasma. Alle anderen Substrate werden wahrscheinlich, unvollständig transportiert, in die Membran entlassen (vgl. 4.4).

Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Studie von Cline & McCaffery (2007), wobei die Autoren diese konträr interpretierten. Die Untersuchungen zeigten, dass die Translokationseffizienz mit der Länge des zu transportierenden Proteins abnahm. Dabei konnten unterschiedliche Proteine mit einer geschätzten Länge von 20 nm und 30 - 40 nm gerade noch ins Thylakoidlumen transportiert werden. Die Autoren sind aber der Meinung, dass durch einen Ein-Schritt-

Mechanismus die 5 - 7 nm dicke Thylakoidmembran nicht überquert werden kann und postulieren dementsprechend einen dynamischen Transport. Unklar bleibt aber, warum diese dynamische Kraft nicht in der Lage ist, auch noch längere Proteine über die Membran zu transportieren. Vorstellbar wäre aber, dass TatC als Motor eines $\Delta\psi$ -induzierten *pulling*-Mechanismuses den initiiierenden Zug übernimmt. Erleichtert durch die geladenen Aminosäuren des zu transportierenden Proteins und ein *precursor*-Konzentrationsgefälle über der Membran, wäre es denkbar, dass 10 - 15 nm eines Proteins in einem Schritt über die Membran gezogen werden könnten. Würde dann dieses eingefädelt Protein in die Membran entlassen, könnte es spontan die *trans*-Seite der Membran erreichen.

4.6 Die Tat-Komplexe

Mittels BN-PAGE konnten im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Tat-Komplexe identifiziert werden. Dabei handelte es sich um Komplexe mit der Größe von ca. 440 kDa und 580 kDa (Abb. 3-21). Beide Komplexe enthielten TatB und TatC und waren auch mit WT-Mengen an Tat-System (Abb. 3-22) detektierbar, so dass gezeigt wurde, dass sie natürlich vorkommenden Tat-Komplexen entsprechen. In keinem der beiden Komplexe konnte TatA nachgewiesen werden.

Der 440 kDa-TatBC-Komplex könnte dem von Oates *et al.* (2005) beschriebenen 370 kDa-Komplex entsprechen. Auch McDevitt *et al.* (2006) konnten einen Komplex dieser Größe mit WT-Mengen an Tat-System isolieren (zwischen 400 und 550 kDa). In diesem Komplex wurde ebenfalls kein TatA nachgewiesen, so dass man davon ausgehen kann, dass die Spuren von TatA, die bisher in TatBC-Komplexen nachgewiesen wurden (Bolhuis *et al.*, 2001; de Leeuw *et al.*, 2002), eine Folge der Überexpression darstellten.

Am Thylakoid-Tat-System wurde gezeigt, dass TatA nur bei vorhandenem Protonengradient und gebundenem Tat-Substrat mit dem TatBC-Komplex interagiert (Mori & Cline, 2002). Da bei der Solubilisierung der Membran der Protonengradient und das Membranpotential zerstört wird, war zu erwarten, dass eine Interaktion von TatA mit dem TatBC-Substrat-Komplex aufgehoben wird. Somit wird es wahrscheinlich auch in Zukunft nicht möglich sein, allein mittels Solubilisierung der Membranen ein vollständiges, aktives Translokation zu isolieren.

Zusätzlich zu dem bereits bekannten 440 kDa-TatBC-Komplex wurde noch ein neuer weiterer TatBC-Komplex mit einer Größe von 580 kDa detektiert. Das Interessante an diesem Komplex ist, dass er RR-PhoA bindet (Abb. 3-21). Somit handelt es sich hierbei um den ersten *in vivo* nachgewiesenen *E. coli* TatBC-Substrat-Komplex. Eine Interaktion mit dem Tat-System wurde bisher nur anhand von *in vitro*-translatierten Substraten, bzw. Signalpeptiden gezeigt (de Leeuw *et al.*, 2002; Alami *et al.*, 2003). Mittlerweile konnten auch McDevitt *et al.* (2006) einen substratbindenden Komplex nachweisen. Als Substrat verwendeten die Autoren SufI, welches in

ihrem zwischen 400 - 550 kDa großem TatBC-Komplex enthalten war. Allerdings erfolgte hier die Substratbindung RR-unabhängig.

Da RR-PhoA nur als Teil des 580 kDa-Komplexes detektiert werden konnte, stellen sich die Fragen, ob der 580 kDa-Komplex aus dem 440-kDa-Komplex nach Substratbindung hervorgeht, oder ob es sich bei den Komplexen um unabhängige TatBC-Komplexe handelt, die beide Substrate binden können.

Um diesen Fragen nachzugehen, wurden die Komplexe ebenfalls nach einer Inhibition der ribosomalen Translation analysiert (Abb. 3-22B). Sollte der 580 kDa-Komplex nach Substratbindung aus dem 440 kDa-TatBC-Komplex entstehen, müsste eine Abnahme der Tat-Substrate zur Folge haben, dass nur die Menge des 580 kDa-Komplexes abnimmt. Da aber weiterhin beide Komplexe im gleichen Verhältnis detektierbar waren, ist es unwahrscheinlich, dass der 580 kDa-TatBC-Komplex nach Substratbindung aus dem 440 kDa-Komplex hervorgeht. Interessanterweise war aber die Menge beider Komplexe reduziert. Somit besteht die Möglichkeit, dass es sich bei beiden Komplexen um unabhängige substratbindende Komplexe handelt. Es wäre denkbar, dass in *E. coli* zwei verschiedene Populationen von Translokons für unterschiedliche Substrate existieren. Eine andere Erklärung für diese Beobachtung wäre aber auch, dass der 440 kDa-Komplex ein Zerfallsprodukt des 580 kDa-Komplexes darstellt. Während der Solubilisierungen und der sich anschließenden BN-PAGE zeigte es sich, dass der 580 kDa-Komplex sehr sensibel und daher manchmal auch gar nicht detektierbar war. Möglicherweise handelt es sich bei den beiden Komplexen um ein und denselben Komplex, der *in vivo* eventuell sogar noch größer ist.

Bei der Analyse der Komplexe (Abb. 3-23) fiel auf, dass beide TatBC-enthaltenden Komplexe keine scharfe Bande bildeten. Diese Unschärfe könnte durch die unterschiedliche Größe von gebundenen Tat-Substraten begründet werden. Da die mit dem PhoA-Antikörper detektierte Bande im oberen Bereich der Bande des 580 kDa-TatBC-Komplexes lag, wäre es denkbar, dass dieser *shift* durch die Bindung von RR-PhoA zustande kommt.

Interessant war auch, dass sich unterhalb des 440 kDa-Komplexes weitere kleinere Komplexe sowohl mit dem TatB, als auch mit dem TatC-Antikörper detektieren ließen. Solche „Leitern“, die bereits beschrieben wurden (Oates *et al.*, 2005), deuten auf Disassemblierung während der Solubilisierung hin. Es wäre auch möglich, dass es sich um natürlich in der Membran vorkommende kleinere Komplexe handelt, die nach einer Substratbindung zu einem großen Komplex assemblieren. Gegen diese Theorie spricht aber, dass Behrendt *et al.* (2007) zeigen konnten, dass TatC alleine einen Komplex von ca. 250 kDa bildet. Dieser Komplex stellt wahrscheinlich das Grundgerüst für die 440 kDa und 580 kDa großen TatBC-Komplexe dar, da er bei Vorhandensein von TatB nicht mehr detektierbar ist.

4.7 Zusammenfassendes Modell des Tat-Transportes

Der derzeitige Wissensstand und die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu dem folgenden favorisierten Modell über den Ablauf und den Mechanismus des Tat-Transportes (Abb. 4-3).

Nach der Translation müssen die Tat-Substrate ihre native Form einnehmen und eventuelle Cofaktoren einbauen, wobei sie von Chaperonen unterstützt werden. Dabei werden die Signalpeptide bis zur abgeschlossenen Faltung wahrscheinlich durch spezifische oder unspezifische Chaperone maskiert und vor dem Abbau geschützt. Dieser Vorgang wird auch *proofreading* genannt (vgl. 4.3). Die korrekte Faltung der Tat-Substrate ist deswegen so wichtig, da wahrscheinlich keine Qualitätskontrolle der Faltung nach der Bindung am TatBC-Komplex stattfindet. Das Tat-Translokon kann ungefaltete oder fehlgefaltete Tat-Substrate nicht von den korrekt gefalteten unterscheiden. Vor allem bei kleinen Tat-Substraten, wie HiPIP, die zudem auch noch hydrophil im ungefalteten Zustand sind, kann nur ein korrekter Cofaktoreinbau und eine effiziente Faltung im Cytoplasma den Transport im gefalteten Zustand garantieren (vgl. 4.3).

Nach der Faltung erfolgt zunächst eine Interaktion des Signalpeptides mit der Cytoplasmamembran, die nicht RR-spezifisch ist und an der keine Tat-Komponenten beteiligt sind (Berghöfer & Klösigen, 1999; Cline & Mori, 2001; Brüser *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2006; Shanmugham *et al.*, 2006). Durch die Interaktion mit den Phospholipiden nimmt die h-Region des Signalpeptides anscheinend eine Sekundärstruktur (α -Helix) ein (San Miguel *et al.*, 2003), die eventuell erst die RR-spezifische Erkennung des Signalpeptides ermöglicht. Diese erfolgt durch einen TatBC-Komplex, der wahrscheinlich dem in dieser Arbeit nachgewiesenen 580 kDa-Komplex entspricht (vgl. 4.6). Die erste Interaktion findet dabei zwischen dem N-Terminus von TatC und dem Signalpeptid (in der Nähe des konservierten RR-Motivs) statt (Alami *et al.*, 2003; Gérard & Cline, 2007; Holzapfel *et al.*, 2007; Kreutzenbeck *et al.*, 2007) und bleibt während der gesamten Translokation bestehen (Gérard & Cline, 2006). An den gebildeten Substrat-TatBC-Komplex erfolgt in Thylakoiden PMF-abhängig die Assemblierung von TatA-Oligomeren (Cline & Mori, 2001; Mori & Cline, 2002; Dabney-Smith *et al.*, 2006), so dass das aktive Translokon gebildet wird. An *E. coli*-INV wurde gezeigt, dass die $\Delta\psi$ -abhängige Energetisierung des Translokons auch ohne Vorhandensein des *precursors* möglich ist (Bageshwar & Musser 2007). Somit ist es vorstellbar, dass die Assemblierung des *E. coli* Tat-Translokons, bzw. von TatA-Oligomeren, auch ohne einen TatBC-Substrat-Komplex erfolgen kann, und dieser erst zu einem späteren Zeitpunkt bindet.

Musser & Theg (2000), Berks *et al.* (2000a) und Wu *et al.* (2000) favorisieren für das Translokon ein Modell einer wassergefüllten Pore, die durch die cytoplasmatischen Domänen von TatA verschlossen wird. Gegen eine wassergefüllte Pore, die kontrolliert geöffnet werden kann (*gated pore*-Mechanismus: Musser & Theg, 2000; Berks *et al.*, 2000a), sprechen die

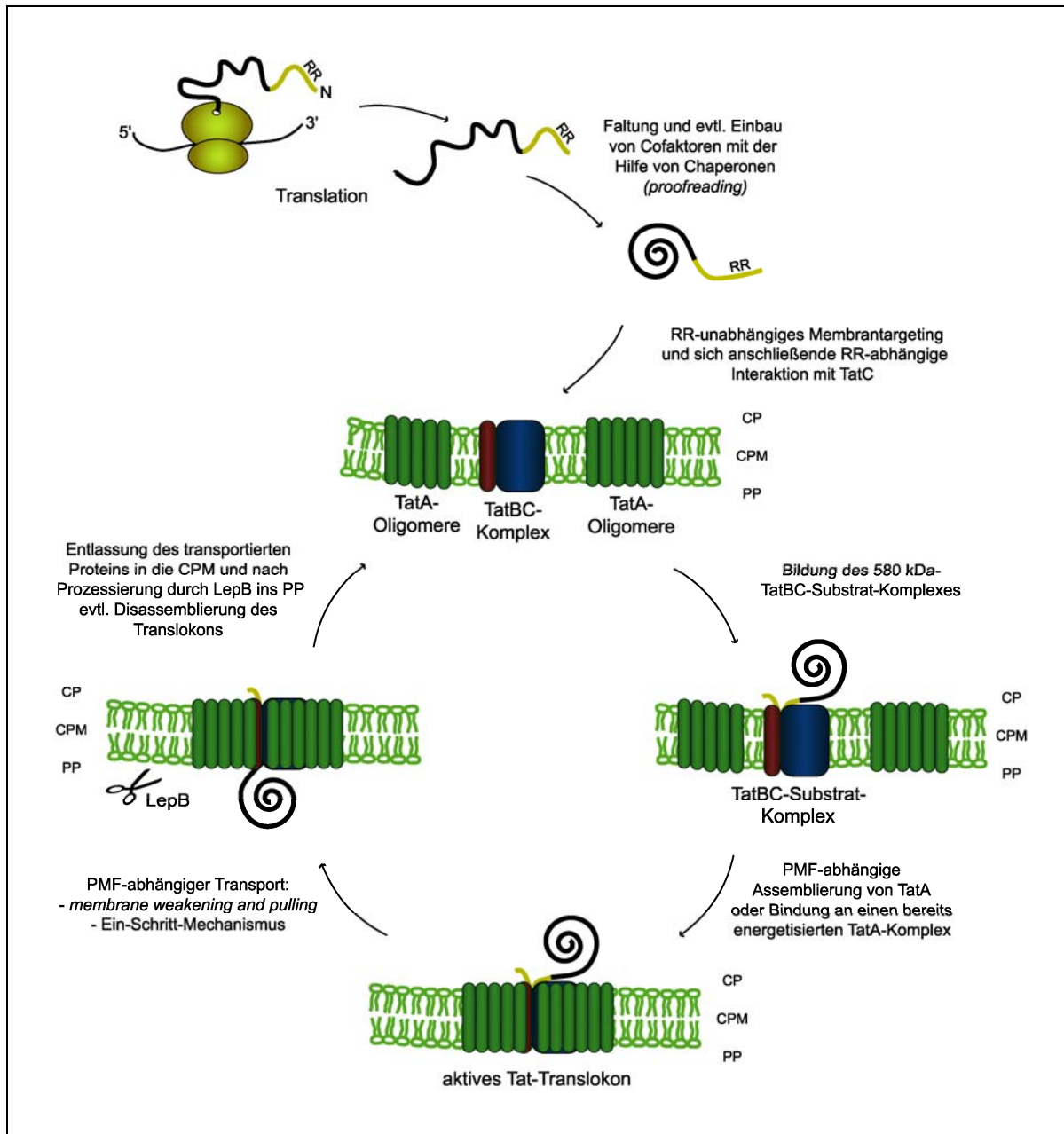


Abb. 4-3: Zusammenfassendes Modell des Tat-Transportes. (Beschreibung im Text)

Ergebnisse dieser Arbeit. Es ist unwahrscheinlich, dass ein 20 kDa großes ungefaltetes Protein mit Hilfe eines solchen Systems transportiert werden kann. Auch das Modell des *gating-pushing*-Mechanismus (Wu *et al.*, 2000) setzt voraus, dass das zu transportierende Protein globulär ist, damit die amphipathischen Domänen von TatA/B/E die Pore verschließen und das Substrat von außen durch die Pore schieben können. Die Tatsache, dass das Tat-Translokation auch nicht-globuläre Substrate transportieren kann (vgl. 4.3), lässt sich am besten mit dem Modell des *membrane weakening and pulling*-Mechanismus (Brüser & Sanders, 2003) beschreiben. Dabei soll durch die Assemblierung von mehreren TatA-Kopien an den TatBC-Substrat-Komplex die Membranstruktur punktuell so geschwächt werden, dass ein Transport möglich, aber der Ionen-flow minimiert ist. Die Frage nach der mechanistischen Kraft, die das

Protein über die Membran transportiert, ist noch völlig offen. Brüser & Sanders (2003) postulieren, dass TatC als Motor des *pulling*-Mechanismuses, unter Nutzung der protonenmotorischen Kraft, das Tat-Substrat durch die Membran ziehen kann. Vereinbar mit dem *membrane weakening*-Modell wäre auch ein $\Delta\psi$ -induzierter Transport des Substrates aufgrund der geladenen Aminosäuren des Proteins, welcher durch ein *precursor*-Konzentrationsgefälle von der cytoplasmischen zur periplasmatischen Membranseite erleichtert wird (Bageshwar & Musser, 2007).

Eine wichtige mechanistische Schlussfolgerung aus den Daten dieser Arbeit ist, dass nach der ersten Interaktion zwischen TatC und dem Signalpeptid wahrscheinlich keine weiteren Interaktionen zwischen den Tat-Komponenten und dem Substrat erfolgen, so dass der Transport vermutlich in einem Ein-Schritt-Mechanismus abläuft (vgl. 4.5). Globuläre Proteine können so das Periplasma erreichen. Bei hydrophilen ungefalteten Proteinen sinkt die Transporteffizienz mit der Länge des ungefalteten Substrates.

Während des Transportes werden exponierte hydrophobe Bereiche des Substrates, vermutlich durch Interaktion mit den Membranlipiden oder hydrophoben Domänen von Membranproteinen, erkannt und in die Membran entlassen, wodurch die Tat-abhängige Integration von membranverankerten Proteinen möglich wird (vgl. 4.4).

Es gibt Hinweise darauf, dass nach erfolgtem Transport das Substrat zunächst lateral in die Membran entlassen wird, bevor die Signalpeptidase LepB an ihrer Erkennungstelle (AXA-Motiv) schneidet (Frielingsdorf & Klösigen, 2007). Jetzt erreicht das mature Protein das Periplasma. Bisher wurde angenommen, dass zu diesem Zeitpunkt das Translokon disassembliert. Bageshwar & Musser (2007) schließen aber durch neuere Ergebnisse nicht aus, dass an einem Tat-Translokon mehrere TatBC-Substrat-Komplexe binden können und eine Assemblierung nicht für nur ein Substrat erfolgt.

4.8 Ausblick

Die größten Unklarheiten beim Tat-Transport herrschen noch über den Mechanismus der eigentlichen Translokation. Die Tatsache, dass die Faltung keine notwendige Bedingung für den Tat-Transport ist, sondern die Länge des Substrates und die Hydrophobizität der Oberfläche über die Transportfähigkeit entscheiden, bildet eine wichtige Grundlage für das Verständnis des Mechanismuses.

Im Rahmen dieser Arbeit gab es mehrere Anhaltspunkte dafür, dass die Tat-Translokase den Transport über die Cytoplasmamembran in einem Schritt bewältigt, und dass das zu transportierende Protein somit nur eine bestimmte Strecke zurücklegen kann (vgl.4.5). Diese Theorie sollte weiter überprüft werden. Anstelle der RR-FG5-GFP-Fusionen sollte auch der Transport von Fusionen mit einer geringeren Anzahl an FG-*repeats* untersucht werden. Es wäre möglich, dass z.B. RR-FG3-GFP Tat-abhängig transportiert werden kann, da der ungefaltete

linker zwischen dem HiPIP-Signalpeptid und GFP in diesem Fall kurz genug sein könnte. Ein solches Ergebnis würde die Theorie eines Ein-Schritt-Mechanismuses unterstützen.

Weitere interessante Fragestellungen, die nicht beantwortet werden konnten, betreffen die beiden detektierten TatBC-Komplexe. Können beide detektierten TatBC-Komplexe Substrate binden? Gibt es unterschiedliche Translokons für verschiedene Substrate? Ist es möglich, dass der 580 kDa große TatBC-Komplex aus dem 440 kDa-TatBC-Komplex nach Substratbindung hervorgeht? Oder handelt es sich bei den beiden Komplexen um ein und denselben Komplex, der *in vivo* vielleicht noch größer ist? Um diese Fragen zu beantworten, sollte versucht werden weitere Tat-Substrate in den Komplexen nachzuweisen. Mittels *cross-linking* vor der Solubilisierung könnte ein Zerfall der Komplexe während der Aufarbeitung eventuell vermindert werden. Eventuell wäre es mit einer Kombination aus *cross-linking* und Solubilisierung auch möglich das komplette Translokon mit gebundenem TatA nachzuweisen.

Das Tat-System könnte in näherer Zukunft eine Anwendung in der Biotechnologie finden. Die Möglichkeiten und Grundlagen eines solchen Einsatzes wurden kürzlich in einem *Review* zusammengefasst (Brüser, 2007). Die Selektivität des Tat-Systems für hydrophile Oberflächen könnte sehr nützlich für biotechnologische Anwendungen sein, wie z.B. für die Untersuchung der Löslichkeit von Proteinen (Fisher *et al.*, 2006). Noch interessanter für die Biotechnologie wäre aber der selektive Transport von gefalteten Substraten. Falls Tat-abhängig nur korrekt gefaltete Substrate ins Periplasma oder bei Gram-positiven Bakterien in das umgebende Medium sekretiert werden, könnte man, durch eine Reinigung aus einem solchen Extrakt, theoretisch einen sehr hohen Anteil an nativem Protein oder aktivem Enzym erhalten. Dafür müssen die Substrate aber einige Voraussetzungen erfüllen, z.B. müssen sie im ungefalteten Zustand oder bei fehlendem Cofaktoreinbau hydrophobe Bereiche exponieren, so dass kein vollständiger Tat-Transport ins Periplasma möglich ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern die Basis für weitere Untersuchungen zu den notwendigen Eigenschaften eines Proteins für eine solche biotechnologische Anwendung.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das *Twin-Arginine-Translokation*-(Tat)-System ist ein Proteintransportsystem, welches gefaltete Proteine über biologische Membranen transportiert - in *E. coli* über die Cytoplasmamembran ins Periplasma. In den letzten Jahren wurde aufgrund einiger Studien davon ausgegangen, dass eine korrekte Faltung der Tat-Substrate eine notwendige Voraussetzung für die Erkennung und den Transport ist. Daraus resultierend entstand die Hypothese der Existenz einer Qualitätskontrolle der Faltung, die z.B. eine intrinsische Eigenschaft der Tat-Translokase sein könnte.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass keine generelle Qualitätskontrolle der Faltung existieren kann, da verschiedene nicht korrekt gefaltete oder unstrukturierte Modellsubstrate vom Tat-System erkannt und zum Teil auch vollständig transportiert wurden. Das Sec-Substrat PhoA erfuhr mit einem Tat-Signalpeptid (RR-PhoA) ein Targeting zum Tat-System, welches vom RR-Motiv abhängig war. Das Substrat konnte nicht vollständig transportiert werden, woraus ein Protonen-*leakage* an der Membran resultierte und einen wachstumsinhibierenden Effekt zur Folge hatte. Transportuntersuchungen mit natürlichen Tat-Substraten deuten darauf hin, dass das Protonen-*leakage* aber keine Folge eines blockierten Translokons war, so dass dieser Effekt nur durch in die Membran entlassenes PhoA begründet werden kann. RR-PhoA wurde in einem 580 kDa TatBC-enthaltenden Komplex nachgewiesen, welcher der erste Substrat-bindende TatBC-Komplex ist, der in einem bakteriellen Tat-System detektiert werden konnte. Ein weiterer TatBC-Komplex mit einer Größe von 440 kDa enthielt kein RR-PhoA. Beide Komplexe konnten mit WT-Mengen an Tat-System nachgewiesen werden, so dass davon auszugehen ist, dass es sich um natürlich vorkommende Tat-Komplexe handelt.

Mit Hilfe der natürlich ungefalteten FG-*repeats* des Nucleoporins Nsp1p aus Hefe konnte zum ersten Mal der Tat-Transport von völlig unstrukturierten Proteinen gezeigt werden. Interessanterweise sank die Transporteffizienz mit der Länge des ungefalteten Proteins, was darauf hindeutet, dass nur eine Interaktion zwischen Tat-System und Substrat stattfindet und der Transport in einem Ein-Schritt-Mechanismus abläuft. Die Einführung von sechs Aminosäuren aus einem hydrophoben Bereich eines globulären Proteins verhinderte den Transport der FG-*repeats*. Die physiologischen Daten lassen vermuten, dass der hydrophobe Bereich während des Transportes erkannt und in die Membran entlassen wird.

Weiterhin konnten einige Merkmale von Tat-Signalpeptiden am Beispiel des HiPIP-Signalpeptides genauer untersucht werden. Das HiPIP-Signalpeptid wird auch vom Sec-System erkannt. Das Sec-Targeting konnte durch die Einführung von weniger hydrophoben Aminosäuren in die h-Region vermindert werden. Ein Sec-*avoidance*-Motiv in der c-Region dagegen, verminderte auch das Tat-Targeting. Die n-Region vor dem Consensus-Motiv ist für einen Tat-abhängigen Transport nicht notwendig. Sie enthält aber eine Erkennungssequenz für die Membranprotease FtsH, die das HiPIP-Signalpeptid bei blockiertem Transport prozessiert.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, H., Scotti, P.A., de Cock, H., Luirink, J. & Tommassen, J. (2002)** The presence of a helix breaker in the hydrophobic core of signal sequences of secretory proteins prevents recognition by the signal-recognition particle in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 269: 5564-5571
- Akiyama, Y., Ehrmann, M., Kihara, A. & Ito, K. (1998)** Polypeptide binding of *Escherichia coli* FtsH (HflB). *Mol Microbiol* 28: 803-812
- Akiyama Y. (1999)** Self-processing of FtsH and its implication for the cleavage specificity of this protease. *Biochemistry* 38: 11693-11399
- Alami, M., Trescher, D., Wu, L.F. & Müller, M. (2002)** Separate analysis of twin-arginine translocation (Tat)-specific membrane binding and translocation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 277: 20499-20503
- Alami, M., Luke, 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*. *Mol Cell* 12: 937-946
- Alder, N.N. & Theg, S.M. (2003)** Energetics of protein transport across biological membranes. A study of the thylakoid DeltapH-dependent/cpTat pathway. *Cell* 112: 231-242
- Allen N.P., Patel, S.S., Huang, L., Chalkley, R.J., Burlingame, A., Lutzmann, M., Hurt, E.C. & Rexach, M. (2002)** Deciphering networks of protein interactions at the nuclear pore complex. *Mol Cell Proteomics* 1: 930-946
- Allen, S.C., Barrett, C.M., Ray, N. & Robinson, C. (2002)** Essential cytoplasmic domains in the *Escherichia coli* TatC protein. *J Biol Chem* 277: 10362-10366
- Arkowitz, R.A. & Wickner, W. (1994)** SecD and SecE are required for the proton electro-chemical gradient stimulation of preprotein translocation. *EMBO J* 13: 954-963
- Asahara, Y., Atsuta, K., Motohashi, K., Taguchi, H., Yohda, M. & Yoshida, M. (2000)** FtsH recognizes proteins with unfolded structure and hydrolyzes the carboxyl side of hydrophobic residues. *J Biochem* 127: 931-937
- Asai, T., Shinoda, Y., Nohara, T., Yoshihisa, T. & Endo, T. (1999)** Sec-dependent pathway and pH-dependent pathway do not share a common translocation pore in thylakoid protein transport. *J Biol Chem* 274: 20075-20078
- Bageshwar, U.K. & Musser, S.M. (2007)** Two electrical potential dependent steps are required for transport by the *Escherichia coli* Tat machinery. *J Cell Biol* 179: 87-99

- Banci, L., Bertini, I., Dikiy, A., Kastrau, D.H., Luchinat, C. & Sompornpisut, P. (1995) The three-dimensional solution structure of the reduced high-potential iron-sulfur protein from *Chromatium vinosum* through NMR. *Biochemistry* 34: 206-219
- Barrett, C.M., Mathers, J.E. & Robinson, C. (2003) Identification of key regions within the *Escherichia coli* TatAB subunits. *FEBS Lett* 537: 42-46
- Barrett, C. M. & Robinson, C. (2005) Evidence for interactions between domains of TatA and TatB from mutagenesis of the TatABC subunits of the twin-arginine translocase. *FEBS J* 272: 2261-2275
- Bayliss, R., Littlewood, T. & Stewart, M. (2000) Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell* 102: 99-108
- Beck, K., Eisner, G., Trescher, D., Dalbey, R.E., Brunner, J. & Müller, M. (2001) YidC, an assembly site for polytopic *Escherichia coli* membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. *EMBO Rep* 2: 709-714
- Beck, K., Wu, L.F., Brunner, J. & Müller, M. (2000) Discrimination between SRP- and SecA/ SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor. *EMBO J* 19: 134-143
- Behrendt, J., Standar, K., Lindenstrauß, U. & Brüser, T. (2004) Topological studies on the twin-arginine translocase component TatC. *FEMS Microbiol Lett* 234: 303-308
- Behrendt, J., Lindenstrauß, U. & Brüser T. (2007) The TatBC complex formation suppresses a modular TatB-multimerization in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 581: 4085-4090
- Berghöfer, J. & Klösigen, R.B. (1999) Two distinct translocation intermediates can be distinguished during protein transport by the TAT (Deltaph) pathway across the thylakoid membrane. *FEBS Lett* 460: 328-332
- Berks, B.C. (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* 22: 393-404
- Berks, B.C., Sargent, F. & Palmer, T. (2000a) The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* 35: 260-274
- Berks, B.C., Sargent, F., De Leeuw, E., Hinsley, A.P., Stanley, N.R., Jack, R.L., Buchanan, G. & Palmer, T. (2000b) A novel protein transport system involved in the biogenesis of bacterial electron transfer chains. *Biochim Biophys Acta* 1459: 325-330
- Berks, B.C., Palmer, T. & Sargent, F. (2005) Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr Opin Microbiol* 8: 174-181
- Bernhardt, T.G. & de Boer, P.A. (2003) The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol Microbiol* 48: 1171-1182

- Berthelmann, F. & Brüser, T. (2004)** Localization of the Tat translocon components in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 569: 82-88
- Berthelmann, F., Mehner, D., Richter, S., Lünsdorf, H., Hause, G. & Brüser, T. (2008)** Recombinant expression of *tatABC* and *tatAC* results in the formation of interacting cytoplasmic TatA tubes in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 283: 25281-25289
- Blaudeck, N., Kreutzenbeck, P., Freudl, R. & Sprenger, G.A. (2003)** Genetic analysis of pathway specificity during posttranslational protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Bacteriol* 185: 2811-2819
- 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. *J Biol Chem* 280: 3426-3432
- Bogsch, E., Brink, S. & Robinson, C. (1997)** Pathway specificity for a Δ pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein. *EMBO J* 16: 3851-3859
- 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. *J Biol Chem* 273: 18003-18006
- Bolhuis, A., Mathers, J.E., Thomas, J.D., Barrett, C.M.L. & Robinson, C. (2001)** TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276: 20213-20219
- Braun, N.A., Davis, A.W. & Theg, S.M. (2007)** The chloroplast Tat pathway utilizes the transmembrane electric potential as an energy source. *Biophys J* 93: 1993-1998
- Brickman, E. & Beckwith, J. (1975)** Analysis of the regulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesis using deletions and phi80 transducing phages. *J Mol Biol* 96: 307-316
- Brock, I.W., Mills, J.D., Robinson, D. & Robinson, C. (1995)** The delta pH-driven, ATP-independent protein translocation mechanism in the chloroplast thylakoid membrane. Kinetics and energetics. *J Biol Chem* 270: 1657-1662
- Bruckner, R.C., Gunyuzlu, P.L. & Stein, R.L. (2003)** Coupled kinetics of ATP and peptide hydrolysis by *Escherichia coli* FtsH protease. *Biochemistry* 42: 10843-10852
- Brüser, T., Trüper, H.G. & Dahl, C. (1997)** Cloning and sequencing of the gene encoding the high potential iron-sulphur protein (HiPIP) from the purple sulphur bacterium *Chromatium vinosum*. *Biochim Biophys Acta* 1352: 18-22

- Brüser, T., Deutzmann, R. & Dahl, C. (1998) Evidence against the double-arginine motif as the only determinant for protein translocation by a novel Sec-independent pathway in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 164: 329-336
- Brüser, T. & Sanders, C. (2003) An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiol Res* 158: 7-17
- Brüser, T., Yano, T., Brune, D.C. & Daldal, F. (2003) Membrane targeting of a folded and cofactor-containing protein. *Eur J Biochem* 270: 1211-1221
- Brüser, T. (2007) The twin-arginine translocation system and its capability for protein secretion in biotechnological protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 35-45
- Cabelli, R.J., Dolan, K.M., Qian, L.P. & Oliver, D.B. (1991) Characterization of membrane-associated and soluble states of SecA protein from wild-type and SecA51(TS) mutant strains of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 266: 24420-24427
- Carter, C.W., Kraut, J., Freer, S.T., Nguyen-Huu-Xuong, Alden, R.A. & Bartsch, R.G. (1974) Two-Angstrom crystal structure of oxidized Chromatium high potential iron protein. *J Biol Chem* 249: 4212-4225
- Casadaban, M.J. & Cohen, S.N. (1979) Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-*lac* bacteriophage: *in vivo* probe for transcriptional control sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4530-4533
- Chanal, A., Santini, C.L. & Wu, L.F. (2003) Specific inhibition of the translocation of a subset of *Escherichia coli* TAT substrates by the TorA signal peptide. *J Mol Biol* 327: 563-570
- Clarkson, W.D., Kent, H.M. & Stewart, M. (1996) Separate binding sites on nuclear transport factor 2 (NTF2) for GDP-Ran and the phenylalanine-rich repeat regions of nucleoporins p62 and Nsp1p. *J Mol Biol* 263: 517-524
- 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. *J Biol Chem* 267: 2688-2696
- Cline, K. & Mori, H. (2001) Thylakoid Delta pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J Cell Biol* 154: 719-729
- Cline, K. & McCaffery, M. (2007) Evidence for a dynamic and transient pathway through the TAT protein transport machinery. *EMBO J* 26: 3039-3049
- Cristóbal, S., de Gier, J.W., Nielsen, H. & von Heijne, G. (1999) Competition between Sec- and Tat-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *EMBO J* 18: 2982-2990
- Dabney-Smith, C., Mori, H. & Cline, K. (2006) Oligomers of Tha4 organize at the thylakoid Tat translocase during protein transport. *J Biol Chem* 281: 5476-5483

- Dalbey, R.E. & Chen, M. (2004) Sec-translocase mediated membrane protein biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1694: 37-53
- de Gier, J.W., Valent, Q.A., von Heijne, G. & Lührink, J. (1997) The *E. coli* SRP: preferences of a targeting factor. *FEBS Lett* 408: 1-4
- 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. *J Mol Biol* 322: 1135-1146
- DeLisa, M.P., Tullman, D. & Georgiou, G. (2003) Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6115-6120
- Denning, D.P., Patel, S.S., Uversky, V., Fink, A.L. & Rexach, M. (2003) Disorder in the nuclear pore complex: the FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2450-2455
- Denning, D.P., Uversky, V., Patel, S.S., Fink, A.L. & Rexach, M. (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* nucleoporin Nup2p is a natively unfolded protein. *J Biol Chem* 277: 33447-33455
- Derman, A.I., Prinz, W.A., Belin, D. & Beckwith, J. (1993) Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* 262: 1744-1747
- Dilks, K., Rose, R.W., Hartmann, E. & Pohlschröder, M. (2003) Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey. *J Bacteriol* 185: 1478-1483
- Dubini, A. & Sargent, F. (2004) Assembly of Tat-dependent [NiFe] hydrogenases: identification of precursor-binding accessory proteins. *FEBS Lett* 549: 141-146
- Duong, F. & Wickner, W. (1997a) Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFYajC subunits of of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO J* 16: 2756-2768
- Duong, F. & Wickner, W. (1997b) The SecDFYajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J* 16: 4871-4879
- Fahrenkrog, B., Hurt, E.C., Aebi, U. & Panté, N. (1998) Molecular architecture of the yeast nuclear pore complex: localization of Nsp1p subcomplexes. *J Cell Biol* 143: 577-588
- Fekkes, P., van der Does, C. & Driessen, A.J.M. (1997) The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J* 16: 6105-6113
- Finazzi, G., Chasen, C., Wollman, F.A. & de Vitry, C. (2003) Thylakoid targeting of Tat passenger proteins shows no delta pH dependence *in vivo*. *EMBO J* 22: 807-815

- Fincher, V., McCaffery, M. & Cline, K. (1998) Evidence for a loop mechanism of protein transport by the thylakoid Delta pH pathway. *FEBS Lett* 423: 66-70
- Fisher, A.C. & DeLisa, M.P. (2004) A little help from my friends: quality control of presecretory proteins in Bacteria. *J Bacteriol* 186: 7467-7473
- Fisher, A.C., Kim, W., & DeLisa, M.P. (2006) Genetic selection for protein solubility enabled by the folding quality control feature of the twin-arginine translocation pathway. *Protein Sci* 15: 449-458
- Frielingsdorf, S. & Klösigen, R.B. (2007) Prerequisites for terminal processing of thylakoidal Tat substrates. *J Biol Chem* 282: 24455-24462
- Gérard, F. & Cline, K. (2006) Efficient twin arginine translocation (Tat) pathway transport of a precursor protein covalently anchored to its initial cpTatC binding site. *J Biol Chem* 281: 6130-6125
- Gérard, F. & Cline, K. (2007) The thylakoid proton gradient promotes an advanced stage of signal peptide binding deep within the Tat pathway receptor complex. *J Biol Chem* 282: 5263-52672
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10482-10486
- Graubner, W., Schlierhorn, A. & Brüser, T. (2007) DnaK plays a pivotal role in Tat targeting of CueO and functions beside SlyD as a general Tat signal binding chaperone. *J Biol Chem* 282: 7116-7124
- 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. *J Biol Chem* 282: 23937-23945
- Gross, R., Simon, J. & Kröger, A. (1999) The role of the twin-arginine motif in the signal peptide encoded by the *hydA* gene of the hydrogenase from *Wolinella succinogenes*. *Arch Microbiol* 172: 227-232
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J. & Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* 177: 4121-4130
- Halbig, D., Wiegert, T., Blaudeck, N., Freudl, R. & Sprenger, G.A. (1999a) The efficient export of NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase to the periplasm of *Zymomonas mobilis* depends both on an intact twin-arginine motif in the signal peptide and on the generation of a structural export signal induced by cofactor binding. *Eur J Biochem* 263: 543-551
- Halbig, D., Hou, B., Freudl, R., Sprenger, G. A. & Klösigen, R.B. (1999b) Bacterial proteins carrying twin-R signal peptides are specifically targeted by the delta pH-dependent transport machinery of the thylakoid membrane system. *FEBS Lett* 447: 95-98
- Hartl, F.U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J.P. & Wickner, W. (1990) The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell* 63: 269-279

- Hatzixanthis, K., Palmer, T. & Sargent, F. (2003) A subset of bacterial inner membrane proteins integrated by the twin-arginine translocase. *Mol Microbiol* 49: 1377-1390
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F. & Nataro, J.P. (1998) The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* 6: 370-378
- Hendrick, J.P. & Wickner, W. (1991) SecA protein needs both acidic phospholipids and SecY/E protein for functional high-affinity binding to the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Biol Chem* 266: 24596-24600
- 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. *J Cell Biol* 136: 823-832
- Herman, C., Prakash, S., Lu, C.Z., Matouschek, A. & Gross, C.A. (2003) Lack of a robust unfoldase activity confers a unique level of substrate specificity to the universal AAA protease FtsH. *Mol Cell* 11: 659-669
- Herskovitz, A.A., Bochkareva, E.S. & Bibi, E. (2000) New prospects in studying the bacterial signal recognition particle pathway. *Mol Microbiol* 38: 927-939
- Hicks, M.G., de Leeuw, E., 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 Lett* 539: 61-67
- Holland, I.B. (2004) Translocation of bacterial proteins - an overview. *Biochim Biophys Acta* 1694: 5-16
- Holzappel, E., Eisner, G., Alami, M., Barrett, C.M., Buchanan, G., Luke, 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: 2892-2898
- Hou, B., Frielingsdorf, S., Klösgen, R.B. (2006) Unassisted membrane insertion as the initial step in DeltapH/Tat-dependent protein transport. *J Mol Biol* 355: 957-967
- Hunt, J.F., Weinkauff, S., Henry, L., Fak, J.J., McNicholas, P., Oliver, D.B. & Deisenhofer, J. (2002) Nucleotide control of interdomain interactions in the conformational reaction cycle of SecA. *Science* 297: 2018-2026
- Hynds, P.J., Robinson, D. & Robinson, C. (1998) The sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malformed proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* 273: 34868-34874
- Ito, K. & Akiyama, Y. (2005) Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu Rev Microbiol* 59: 211-231

- Ize, B., Gérard, F. & Wu, L.F. (2002) *In vivo* assessment of the Tat signal peptide specificity in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* 178: 548–553
- Ize, B., Stanley, N.R., Buchanan, G. & Palmer, T. (2003) Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity. *Mol Microbiol* 48: 1183-1193
- Jack, R.L., Sargent, F., Berks, B.C., Sawers, G. & Palmer, T. (2001) Constitutive expression of *Escherichia coli* tat genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth. *J Bacteriol* 183: 1801-1804
- Jack, R.L., Buchanan, G., Dubini, A., Hatzixanthis, K., Palmer, T. & Sargent, F. (2004) Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins. *EMBO J* 23: 3962-3972
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R. & Coutte, L. (2004) Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim Biophys Acta* 1694: 235-257
- Johnson, W.C. Jr. (1990) Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins* 7: 205-214
- Kebir, M.O. & Kendall, D.A. (2002) SecA specificity for different signal peptides. *Biochemistry* 41: 5573-5580
- Kelly, S.M., & Price N. (2000) The use of Circular Dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci* 1: 349-384
- Kihara, A., Akiyama, Y. & Ito, K. (1999) Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis. *EMBO J* 18: 2970-2981
- Kipping, M., Lillie, H., Lindenstrauß, U., Andreesen, J.R., Griesinger, C., Carlomagno, T. & Brüser, T. (2003) Structural studies on a twin-arginine signal sequence. *FEBS Lett* 550: 18-22
- Kiseleva, E., Goldberg, M.W., Daneholt, B. & Allen, T.D. (1996) RNP export is mediated by structural reorganization of the nuclear pore basket. *J Mol Biol* 260: 304-311
- Köser, J., Maco, B., Aepli, U. & Fahrenkrog, B. (2005) The nuclear pore complex becomes alive: new insights into its dynamics and involvement in different cellular processes. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*
- 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. *J Biol Chem* 282: 7903-7911
- Kumagai, H., Fujiwara, T., Matsubara, H. & Saeki, K. (1997) Membrane localization, topology, and mutual stabilization of the *rnfABC* gene products in *Rhodobacter capsulatus* and implications for a new family of energy-coupling NADH oxidoreductases. *Biochemistry* 36: 5509-5521

- Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lee, E. & Manoil, C. (1994) Mutations eliminating the protein export function of a membrane-spanning sequence. *J Biol Chem* 269: 28822-28828
- Lee, H.C. & Bernstein, H.D. (2001) The targeting pathway of *Escherichia coli* presecretory and integral membrane proteins is specified by the hydrophobicity of the targeting signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3471-3476
- 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. *J Bacteriol* 184: 5871-5879
- Lee, P.A., Orriss, G.L., Buchanan, G., Greene, N.P., Bond, P.J., Punginelli, C., Jack, R.L., Sansom, M.S., Berks, B.C. & Palmer, T. (2006) Cysteine-scanning mutagenesis and disulfide mapping studies of the conserved domain of the twin-arginine translocase TatB component. *J Biol Chem* 281: 34072-34085
- Lopez, P.J., Marchand, I., Yarchuk, O. & Dreyfus, M. (1998) Translation inhibitors stabilize *Escherichia coli* mRNAs independently of ribosome protection. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6067-6072
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Bio Chem* 193: 265-275
- Ma, X. & Cline, K. (2000) Precursors bind to specific sites on thylakoid membranes prior to transport on the delta pH protein translocation system. *J Biol Chem* 275: 10016-10022
- Maillard, J., Spronk, C.A., Buchanan, G., Lyall, V., Richardson, D.J., Palmer, T., Vulster, G.W. & Sargent, F. (2007) Structural diversity in twin-arginine signal peptide-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15641-15646
- Mann, N.H., Novac, N., Mullineaux, C.W., Newman, J., Bailey, S. & Robinson, C. (2000) Involvement of an FtsH homologue in the assembly of functional photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett* 479: 72-77
- Matos, C.F., Robinson, C. & Di Cola, A. (2008) The Tat system proofreads FeS protein substrates and directly initiates the disposal of rejected molecules. *EMBO J* 27: 2055-20063
- 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. *FEBS J* 273: 5656-5668
- Mori, H. & Cline, K. (1998) A signal peptide that directs non-Sec transport in bacteria also directs efficient and exclusive transport on the thylakoid Δ pH pathway. *J Biol Chem* 273: 11405-11408

- Mori, H. & Cline, K. (2002)** A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid Δ pH/Tat translocase. *J Cell Biol* 157: 205-210
- Mould, R.M. & Robinson, C. (1991)** A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* 266: 12189-12193
- Mühlenhoff, U. & Lill, R. (2000)** Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1459: 370-382
- Müller, C.A., Broz, P. & Cornelis, G.R. (2008)** The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol Microbiol* 68: 1085-1095
- Müller, M. & Blobel, G. (1984)** *In vitro* translocation of bacterial proteins across the plasma membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 7421-7425
- Müller, M., Koch, H.-G., Beck, K. & Schäfer, U. (2001)** Protein traffic in Bacteria: Multiple routes from the ribosome to and across the membrane. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66: 107-155
- Musser, S.M. & Theg, S.M. (2000)** Characterization of the early steps of OE17 precursor transport by the thylakoid Δ pH/Tat machinery. *Eur J Biochem* 267: 2588-2598
- Natarajan, K. & Cowan, J.A. (1997)** Identification of key intermediates of relevance to iron-sulfur cluster biosynthesis. Mechanism of cluster assembly and implications for protein folding. *J Am Chem Soc* 119: 4082-4083
- Nouwen, N., van der Laan, M. & Driessen, A.J. (2001)** SecDFyajC is not required for the maintenance of the proton motive force. *FEBS Lett* 508: 1003-1006
- Oates, J., Mathers, J., Mangels, D., Kuhlbrandt, W., Robinson, C. & Model, K. (2003)** Consensus structural features of purified bacterial TatABC complexes. *J Mol Biol* 330: 277-286
- Oates, J., Barrett, C.M., 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. *J Mol Biol* 346: 295-305
- Oresnik, I.J., Ladner, C.L. & Turner, R.J. (2001)** Identification of a twin-arginine leader-binding protein. *Mol Microbiol* 40: 323-331
- Ostersetzer, O. & Adam, Z. (1997)** Light-stimulated degradation of an unassembled Rieske FeS protein by a thylakoid-bound protease: the possible role of the FtsH protease. *Plant Cell* 9: 957-965
- Palmer, T., Sargent, F. & Berks, B.C. (2005)** Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol* 13: 175-180

- Pérez-Rodríguez, R., Fisher, A.C., Perlmutter, J.D., Hicks, M.G., Chanal, A., Santini, C.L., Wu, L.F., Palmer, T. & DeLisa, M.P. (2007)** An essential role for the DnaK molecular chaperone in stabilizing over-expressed substrate proteins of the bacterial twin-arginine translocation pathway. *J Mol Biol* 367: 715-730
- 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: 13690-13697
- Post, A. (2003)** Die Faltung als Determinante beim Tat-abhängigem Transport von HiPIP. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Pugsley, A.P. (1993)** The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 57: 50-108
- Pugsley, A.P., Francetic, O., Possot, O.M., Sauvonnet, N. & Hardie, K.R. (1997)** Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative Bacteria – a review. *Gene* 192: 13-19
- Punginelli, C., Maldonado, B., Grahl, S., Jack, R., Alami, M., Schroder, J., Berks, B.C. & Palmer, T. (2007)** Cysteine scanning mutagenesis and topological mapping of the *Escherichia coli* twin-arginine translocase TatC Component. *J Bacteriol* 189: 5482-5494
- Ray, N., Oates, J., Turner, R.J. & Robinson, C. (2003)** DmsD is required for the biogenesis of DMSO reductase in *Escherichia coli* but not for the interaction of the DmsA signal peptide with the Tat apparatus. *FEBS Lett* 534: 156-160
- Rexach, M. & Blobel, G. (1995)** Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* 83: 683-692
- Richter, S. & Brüser, T. (2005)** Targeting of unfolded PhoA to the TAT translocon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 280: 42723-42730
- Richter, S., Lindenstrauß, U., Lücke, C., Bayliss, R. & Brüser, T. (2007)** Functional Tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins. *J Biol Chem* 282: 33257-33264
- Rout, M.P. & Wente, S.R. (1994)** Pores for thought: nuclear pore complex proteins. *Trends Cell Biol* 4: 357-365
- Saier, M.H. Jr. (2006)** Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J Membr Biol* 214: 75-90
- Sambasivarao, D., Scraba, D.G., Trieber, C. & Weiner, J.H. (1990)** Organization of dimethyl sulfoxide reductase in the plasma membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172: 5938-5948

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (2. Edition) *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (3. Edition) *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, New York
- 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. *Eur J Biochem* 270: 3345-3352
- Sanders, C., Wethkamp, N. & Lill, H. (2001)** Transport of cytochrome c derivatives by the bacterial Tat protein translocation system. *Mol Microbiol* 41: 241-246
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- 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*. *EMBO J* 17: 101-112
- Santini, C.L., Bernadac, A., Zhang, M., Chanal, A., Ize, B., Blanco, C. & Wu, L.F. (2001)** Translocation of jellyfish green fluorescent protein via the Tat system of *Escherichia coli* and change of its periplasmic localization in response to osmotic upshock. *J Biol Chem* 276: 8159-8164
- Sargent, F., Bogsch, E., Stanley, N.R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B.C. & Palmer, T. (1998)** Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J* 17: 3640-3650
- 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. *J Biol Chem* 274: 36073-36082
- Sargent, F., Gohlke, U., de Leeuw, E., Stanley, N.R., Palmer, T., Saibil, H.R. & Berks, B.C. (2001)** Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure. *Eur J Biochem* 268: 3361-3367
- Sargent, F., Berks, B.C. & Palmer, T. (2006)** Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins. *FEMS Microbiol Lett* 254: 198-207
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1991)** Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199: 223-231
- Schumann, W. (1999)** FtsH – a single-chain charonin? *FEMS Microbiol Rev* 23: 1-11
- 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* 278: 1467-1470

- Shanmugham, A., Wong Fong Sang, H.W., Bollen, Y.J. & Lill, H. (2006)** Membrane binding of twin arginine preproteins as an early step in translocation. *Biochemistry* 45: 2243-2249
- Shirai, Y., Akiyama, Y. & Ito, K. (1996)** Supression of *ftsH* mutant phenotypes by overproduction of molecular chaperones. *J Bacteriol* 178: 1141-1145
- Shotland, Y., Shifrin, A., Ziv, T., Teff, D., Koby, S., Kobiler, O. & Oppenheim, A.B. (2000)** Proteolysis of bacteriophage lambda CII by *Escherichia coli* FtsH (HflB). *J Bacteriol* 182: 3111-3116
- Silvestro, A., Pommier, J., Pascal, M.C. & Giordano, G. (1989)** The inducible trimethylamine N-oxide reductase of *Escherichia coli* K12: its localization and inducers. *Biochim Biophys Acta* 999: 208-216
- Sone, M., Kishigami, S., Yoshihisa, T. & Ito, K. (1997)** Roles of disulfide bonds in bacterial alkaline phosphatase. *J Biol Chem* 272: 6174-6178
- Sozhamannan, S. & Chatteraj, D.K. (1993)** Heat shock proteins DnaJ, DnaK, and GrpE stimulate P1 plasmid replication by promoting initiator binding to the origin. *J Bacteriol* 175: 3546-3555
- Stanley, N.R., Sargent, F., Buchanan, G., Shi, J., Stewart, V., Palmer, T. & Berks, B.C. (2002)** Behaviour of topological marker proteins targeted to the Tat protein transport pathway. *Mol Microbiol* 43: 1005-1021
- Tatsuta, T., Tomoyasu, T., Bukau, B., Kitagawa, M., Mori, H., Karata, K. & Ogura, T. (1998)** Heat shock regulation in the *ftsH* null mutant of *Escherichia coli*: dissection of stability and activity control mechanisms of sigma32 *in vivo*. *Mol Microbiol* 30: 583-593
- Thanassi, D.G. & Hultgren, S.J. (2000)** Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* 12: 420-430
- Thomas, J.D., Daniel, R.A., Errington, J. & Robinson, C. (2001)** Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 39: 47-53
- Tomoyasu, T., Yuki, T., Morimura, S., Mori, H., Yamanaka, K., Niki, H., Hiraga, S. & Ogura, T. (1993)** The *Escherichia coli* FtsH protein is a prokaryotic member of a protein family of putative ATPases involved in membrane functions, cell cycle control and gene expression. *J Bacteriol* 175: 1344-1351
- Trautmann, S. (2003).** Untersuchungen zur Interaktion von Tat-Substraten mit der Cytoplasmamembran von *E. coli*. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Tullman-Ercek, D., DeLisa, M.P., Kawarasaki, Y., Iranpour, P., Ribnicky, B., Palmer, T. & Georgiou, G. (2007)** Export pathway selectivity of *Escherichia coli* twin arginine translocation signal peptides. *J Biol Chem* 282: 8309-8316

- Turner, R.J., Papish, A.L. & Sargent, F. (2004) Sequence analysis of bacterial redox enzyme maturation proteins (REMPs). *Can J Microbiol* 50: 225-238
- Verméglio, A., Li, J., Schoepp-Cothenet, B., Pratt, N. & Kaff, D.B. (2002) The role of high-potential iron protein and cytochrome c_8 as alternative electron donors to the reaction center of *Chromatium vinosum*. *Biochemistry* 41: 8868-8875
- Voff, J.-N., Eichenseer, C., Viell, P., Piendl, W. & Altenbuchner, J. (1996) Nucleotide sequence and role in DNA amplification of the direct repeats composing the amplifiable element AUD1 of *Streptomyces lividans* 66. *Mol Microbiol* 21: 1037-1047
- von Heijne, G. (1990) The signal peptide. *J Membr Biol* 115: 195-201
- von Heijne, G. (1998) Life and death of a signal peptide. *Nature* 396: 111-113
- 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: 93-101
- Wexler, M., Bogsch, E., Klösigen, R.B., Palmer, T., Robinson, C. & Berks, B.C. (1998) Targeting signals for a bacterial Sec-independent export system direct plant thylakoid import by the Δ pH pathway. *FEBS Lett* 431: 339-342
- Wexler, M., Sargent, F., Jack, R.L., Stanley, N.R., Bogsch, E.G., Robinson, C., Berks, B.C. & Palmer, T. (2000) TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. *J Biol Chem* 275: 16717-16722
- Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Syldatk, C., Mattes, R., Siemann, M. & Altenbuchner, J. (2001) High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rhaBAD promoter. *Biotechnol Bioeng* 73: 95-103
- Wu, L.-F., Ize, B., Chanal, A., Quentin, Y. & Fichant, G. (2000) Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2: 179-189
- Yahr, T.L. & Wickner, W.T. (2001) Functional reconstitution of bacterial Tat translocation *in vitro*. *EMBO J* 20: 1-8
- Yamada-Inagawa, T., Okuno, T., Karata, K., Yamanaka, K., & Ogura, T. (2003) Conserved pore residues in the AAA protease FtsH are important for proteolysis and its coupling to ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 278: 50182-50187

7 ANHANG

PUBLIKATIONSLISTE

- Richter, S. & Brüser, T. (2005)** Targeting of unfolded PhoA to the TAT translocon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 280: 42723-42730
- Richter, S., Lindenstrauß, U., Lücke, C., Bayliss, R. & Brüser, T. (2007)** Functional Tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins. *J Biol Chem* 282: 33257-33264
- Berthelmann, F., Mehner, D., Richter, S., Lünsdorf, H., Hause, G. & Brüser, T. (2008)** Recombinant expression of *tatABC* and *tatAC* results in the formation of interacting cytoplasmic TatA tubes in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 283: 25281-25289

DANKSAGUNG

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank:

Prof. Dr. J.R. Andreesen dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit am Institut für Mikrobiologie durchführen zu können, vor allem aber für seine vielfältige Unterstützung und sein stetiges Interesse.

Dr. Thomas Brüser für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die engagierte Betreuung und Unterstützung, ständige Diskussionsbereitschaft, viele Tipps, Ideen und das in mich gesetzte Vertrauen.

Den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Tat-Arbeitsgruppe, besonders Jana Behrendt, Felix Berthelmann, Ute Lindenstrauß, Denise Mehner, Wenke Graubner, Kerstin Standar, Alexander Sturm und Antje Vogel für das gute Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei Problemen.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfe in sämtlichen Fällen.

Carolin, Jana und Stef für die erholsamen Mittagspausen und ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ein ganz dickes Danke geht an meine Familie, dafür dass es euch gibt und ihr mir die Zeit gelassen habt, diese Arbeit zu schreiben.

Diese Arbeit wurde finanziell durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und das Land Sachsen-Anhalt gefördert.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Aus anderen Veröffentlichungen entnommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), Oktober 2008

Silke Richter

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Silke Richter, geb. Trautmann
Geburtsdatum: 09.04.1975
Geburtsort: Suhl
Familienstand: verheiratet

SCHULBILDUNG

Sep. 1981- Aug. 1990 Polytechnische Oberschule in Benshausen
Sep. 1990 – Juli 1993 Heinrich-Ehrhardt-Gymnasium in Zella-Mehlis

HOCHSCHULAUSSCHULUNG

Okt. 1994 – Sept. 1998 Studium an der FH Merseburg in der Fachrichtung Chemieingenieurwesen
Thema der Diplomarbeit: „Ökotoxizitätstests im Vergleich“
Abschluss: Dipl.-Ing. (FH) Technische Chemie

Okt. 1998 – Okt. 2003 Studium an der MLU Halle-Wittenberg in der Fachrichtung Biochemie
Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Interaktion von Tat-Substraten mit der Cytoplasmamembran von *E. coli*“
Abschluss: Dipl.-Biochemiker

Nov. 2003 – April 2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin/ Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Brüser am Institut für Mikrobiologie des Fachbereiches Biologie der MLU Halle-Wittenberg