

**Tat-abhängiger Transport von Proteinen
über biologische Membranen**

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium habilitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von

Dr. rer. nat. Thomas Brüser

geb. am 15.06.1969 in Olpe

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. Jan R. Andreesen**
- 2. Prof. Dr. Karlheinz Altendorf (Osnabrück)**
- 3. Prof. Dr. Roland Freudl (Jülich)**

Halle (Saale), den 14.11.2006

urn:nbn:de:gbv:3-000011038

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011038>]

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<i>Vorwort</i>	2
1 <i>Proteintransport über biologische Membranen</i>	4
1.1 Membransysteme und Proteintransport	4
1.2 Tat und Sec: die generellen Transportwege über die Cytoplasmamembran	7
1.2.1 Grundlagen des Sec-abhängigen Transportes	8
1.2.2 Grundlagen des Tat-abhängigen Transportes	10
2 <i>Das Tat-System</i>	16
2.1 Identifizierung von Tat-Signalpeptiden	17
2.2 Chaperonbindung an Tat-Signalpeptide	18
2.3 Tat-Signalpeptide als erste Voraussetzung für den Tat-abhängigen Transport	22
2.4 Hydrophilizität, nicht Faltung, als zweite Voraussetzung für den Tat-Transport	26
2.5 Membraninteraktion zur Vorbereitung auf die Translokon-Interaktion	31
2.6 Analyse der Komponenten des Tat-Translokons	34
2.7 Subzelluläre Organisation des Tat-Translokons	38
2.8 YcdB - Das erste Tat-Substrat mit Häm-Cofaktor	38
2.9 Heterologe Tat-Translokons	40
2.10 Modelle des Tat-Transportes	43
2.11 Zusammenfassung und Perspektiven	49
3 <i>Literatur</i>	52
4 <i>Anhang</i>	64
4.1 Ausgewählte Publikationen (2002 – 2006)	64
4.2 Verzeichnis aller wissenschaftlichen Veröffentlichungen des Verfassers	65
4.2.1 Originalartikel in Fachzeitschriften	65
4.2.2 Fachbuchbeiträge	66
4.3 Lehrtätigkeit	67
4.4 Lebenslauf	69
4.5 Danksagung	71

Vorwort

Aus heutiger Perspektive erscheint mein Weg zum Tat-abhängigen Proteintransport beinahe unausweichlich, da ich trotz einiger Wechsel von Laboren und Themen immer wieder mit dem Transport gefalteter Proteine konfrontiert wurde. Ich wollte Protein-Biochemiker werden und machte mein Diplom im Hauptfach Biochemie an der Universität zu Köln (Prof. H. W. Klein). Die Diplomarbeit führte mich an das *Nitrogen Fixation Laboratory* in Brighton / England zu dem am Stickstoffzyklus arbeitenden Biochemiker Prof. Robert R. Eady. Mich faszinierten Stoffwechselwege, in denen Metalloproteine eine herausragende Rolle spielen. Redoxproteine bilden die umfangreichste Enzymklasse, und Prokaryoten haben den Eukaryoten dabei einige Reaktionswege mit ungewöhnlichen Cofaktoren und Katalysemeechanismen voraus. Der Stickstoff-Zyklus ist dafür beispielhaft und verdeutlicht zudem auch die grundlegende Bedeutung bakterieller Reaktionswege für das Leben auf dieser Erde. Ich arbeitete an der Denitrifikation von *Alcaligenes xylosoxidans*, genauer an Kupfer-Nitritreduktasen, Hämoproteinen (Cyt *c'*) und Azurinen. Die Reinigung dieser Metalloproteine (noch ohne *tags*) verknüpft mit biophysikalischen und enzymologischen Analysen fesselte mein Interesse an der mikrobiellen Biochemie. Schon damals, 1993, hörte ich ganz nebenbei Diskussionen mit Dr. Richard Pau, dem Leiter des Nachbarlabors, über die ungeklärte Frage, wie denn Molybdopterin-Cofaktoren bei periplasmatischen Molybdoproteinen über die Membran kommen können. Das Tat-System war noch unbekannt, es gab aber schon Hinweise auf einen Cofaktor-Einbau vor dem Transport. Für mich stand nur fest, dass ich auch nach der Diplomarbeit weiter an Enzymen von bakteriellen Stoffwechselwegen arbeiten wollte - am liebsten an Redoxproteinen. Nach meinen Diplomprüfungen 1994 ging ich zunächst an die Universität Karlsruhe, wo ich im Labor von Prof. Walter G. Zumft Arbeiten an der Denitrifikation fortsetzte und mich mit der N₂O-Reduktase beschäftigte. Die Frage nach einem ungewöhnlichen Transportsystem stand auch hier im Raum. Schließlich kam ich 1995 in die Arbeitsgruppe von Prof. Hans G. Trüper und Dr. Christiane Dahl ans Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Bonn, wo ich 1999 mit einer Dissertation über Enzyme des oxidativen Schwefelstoffwechsels promoviert wurde. Auch in Bonn kam ich wieder mit dem Tat-System in Berührung: Neben meiner Arbeit an der Entdeckung und Charakterisierung der APS:Phosphat Adenylyltransferase (APAT) reinigte ich das *high potential iron-sulfur protein* (HiPIP) aus *Allochromatium vinosum* und klonierte und sequenzierte erstmals das Gen dieses Proteins, wobei mir sofort das *twin-arginine*-Motiv im Signalpeptid auffiel. Ich verglich Signalpeptide vieler transportierter Redoxproteine und stellte fest, dass immer zwei Arginine an ähnlicher Position und in einer recht konservierten Umgebung vorkamen und wollte die Bedeutung dieses ersten Signalpeptid-Motives entschlüsseln. Wenige Monate später erschien noch 1996 der bahnbrechende Review von Dr. Ben Berks in *Molecular Microbiology* und die Idee

war Allgemeingut. Ich veröffentlichte noch im Jahr der Entdeckung der Tat-System-Komponenten eine Studie, in der ich zeigte, dass das *twin-arginine*-Motiv (damals noch *double-arginine*-Motiv) alleine nicht für einen Sec-unabhängigen Transportmodus ausreicht und schloss meine Promotion ab. Bei dem nun anstehenden Postdoc-Aufenthalt in den USA bei Prof. Fevzi Daldal sollte ich wahrscheinlich nichts mehr mit Proteintransport zu tun haben. Aber auch in Philadelphia kam ich neben Arbeiten an der Biogenese der *cbb₃*-Cytochromoxidase von *Rhodobacter capsulatus* schon bald wieder zum Tat-System. Der Grund war ein rein praktischer: im Nachbarlabor gab es ⁵⁵Fe und Prof. Daldal gab mir als Leopoldina-Forschungsstipendiaten die Freiheit, am Tat-Transport zu arbeiten. Ich konnte nun HiPIP *precursor* präparieren und *in vitro* falten, wobei ich ⁵⁵Fe in den [4Fe-4S]^{2+/3+}-Cofaktor einbaute. So analysierte ich das *targeting* von HiPIP *in vitro* und *in vivo* mit neuen Methoden. Die Tat-Perspektiven waren spannender denn je und die ideale Verquickung von mikrobieller Physiologie und Biochemie, mit vielen wichtigen Redoxproteinen, neu zu entdeckenden Cofaktoren, vielen Protein-Protein-Interaktionen, Protein-Lipid-Interaktionen, einem großen Transportkomplex, und insbesondere mit der Möglichkeit, ein neues generelles *Prinzip* der Biochemie zu entschlüsseln.

Nach zwei Postdoc-Jahren in den USA war ich übergelukkig, im Januar 2002 in Deutschland am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg als Assistent in der Abteilung von Prof. Jan R. Andreesen die Möglichkeit zur eigenständigen Forschung am Transport gefalteter Proteine in Bakterien zu erhalten. Hier konnte ich eine effiziente Arbeitsgruppe aufbauen, welche sich inzwischen international auf dem sehr kompetitiven Feld der Tat-Forschung etabliert hat.

Die Ergebnisse der ersten Jahre dieser Forschungsarbeit in Halle sind in dieser Habilitation zusammengefasst. Alle Arbeiten behandeln Aspekte des Tat-abhängigen Proteintransportes. Da die aktuellen Projekte immer die spannendsten sind, habe ich neben den acht Veröffentlichungen seit 2002 (→ Abschnitt 4.1) auch einige bisher unveröffentlichte experimentelle Arbeiten integriert. Das erste Kapitel der vorliegenden Arbeit führt in die Thematik ganz grundlegend ein, wobei hier von den eigenen Tat-Forschungsarbeiten nur die älteren und zum Hintergrundwissen gehörenden erwähnt werden. Im zweiten Kapitel werden die einzelnen Teilprojekte zum Tat-abhängigen Transport detailliert besprochen, wobei die Arbeiten aus Halle ganz im Zentrum stehen und gemeinsam mit der aktuellen Tat-Literatur diskutiert werden.

1 Proteintransport über biologische Membranen

1.1 Membransysteme und Proteintransport

Alle Organismen grenzen sich durch biologische Membranen von ihrer Umgebung ab. Viele Proteine müssen in oder über diese Membranen transportiert werden, um außerhalb des Cytoplasmas oft sehr wichtige Funktionen zu erfüllen. So stellt der Proteintransport eine Voraussetzung für Stoff- und Informationsaustausch, Energietransduktion, Fortbewegung, oder Kompartimentierungen dar. Ein gezielter Transport der Proteine in oder über Membranen findet zumeist nicht spontan statt, sondern benötigt Transportsysteme, die ihrerseits wiederum aus Proteinen aufgebaut sind (Wickner und Schekman, 2005). Eukaryoten müssen wegen der Vielfalt subzellulärer Membransysteme und Kompartimente den Proteintransport stärker differenzieren und koordinieren. Einige der eukaryotischen Transportsysteme stammen offensichtlich von prokaryotischen Systemen ab. Dazu zählt auch der im Zentrum dieser Arbeit stehende ΔpH - oder Tat-Weg, der in der Thylakoidmembran pflanzlicher Plastiden genauso vorkommt wie in der Cytoplasmamembran vieler Bakterien. Da pflanzliche Plastiden von endosymbiontischen Cyanobakterien abstammen, entspricht die Thylakoidmembran phylogenetisch gesehen der bakteriellen Cytoplasmamembran, so dass der Tat-Weg nicht *wirklich* den Sprung in originär-eukaryotische Membransysteme geschafft hat. Neben dem plastidären Tat-System, welches in dieser Arbeit immer wieder in die Betrachtungen einbezogen wird, sollen andere eukaryotische Transportsysteme hier nicht weiter erläutert werden: es sei dazu auf ausgewählte aktuelle Übersichtsartikel verwiesen [Endoplasmatisches Retikulum (Alder und Johnson, 2004; Osborne *et al.*, 2005), Zellkern (Pemberton und Paschal, 2005), Mitochondrien (Wiedemann *et al.*, 2004), Plastiden (Gutensohn *et al.*, 2006; Nassoury und Morse, 2005), Peroxisomen (Heiland und Erdmann, 2005)].

Prokaryoten sind in der Regel weniger vielfältig kompartimentiert als Eukaryoten. Das Cytoplasma wird bei allen Prokaryoten durch eine Cytoplasmamembran umgeben. Zusätzlich gibt es bei Gram-negativen Bakterien noch eine äußere Membran, wodurch ein weiteres Kompartiment geschaffen wird, das Periplasma. Die Cytoplasmamembran muss ionendicht gehalten werden, da ein stabiles elektrochemisches Membranpotential ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) Vorgänge wie ATP-Synthese, aktiven Transport, oder Flagellenrotation energetisiert. Die äußere Membran unterscheidet sich im Aufbau stark von der inneren Membran und ist im Gegensatz zu dieser durchlässig für Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von etwa 600 Da (Koebnik *et al.*, 2000). Für Proteine stellt daher auch die äußere Membran eine Barriere dar. Die Zielorte des Transportes extracytoplasmatischer Proteine bei typischen Gram-negativen und Gram-positiven Prokaryoten sind in **Abbildung 1** schematisch zusammengefasst.

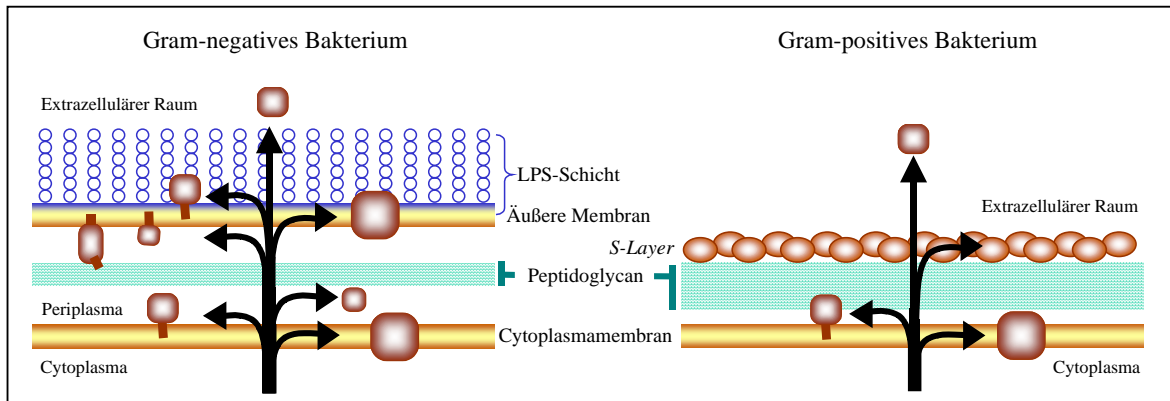


Abbildung 1: Extracytoplasmatische Proteine müssen vom Cytoplasma ausgehend bei Gram-positiven bzw. Gram-negativen Bakterien an verschiedene Zielorte gebracht werden. LPS: Lipopolysaccharid

Die Cytoplasmamembran ist bei Bakterien und manchen Phyla der Archaeen in der Regel von einer Zellwand aus Peptidoglycan umgeben (Murein, Pseudomurein), welche die unterliegende Membran bei hohem Turgor stabilisiert und für Solute (auch Proteine) durchlässig ist. Bei Gram-negativen Arten liegt auf dem Peptidoglycan noch eine äußere Membran auf. Die Verankerung der äußeren Membran an das Peptidoglycangerüst erfolgt sowohl nicht-kovalent über Proteine wie Pal, OmpA und MotB (Parsons *et al.*, 2006), als auch teilweise kovalent über das Lipoprotein Lpp (Braun und Wolff, 1970; Zhang und Wu, 1992). Durch Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Schicht der äußeren Membran sind Gram-negative Arten von einer Polysaccharid-Schicht umgeben. Bei vielen Gram-positiven und manchen Gram-negativen Arten bedeckt ein regelmäßiges Netzwerk aus Strukturproteinen, der sogenannte *surface-* oder *S-layer*, die äußeren Strukturen der Zellen (i.d.R. die Zellwand bzw. die LPS-Schicht; (Garduno *et al.*, 1995; Sara und Sleytr, 2000)). Bei Laborstämmen (wie z. B. *Escherichia coli* K12) sind *S-layer* meist abwesend.

Neben den erwähnten Membranen kommen bei Prokaryoten auch intracytoplasmatische Membransysteme vor. So bilden viele phototrophe Bakterien Vesikel oder Einstülpungen aus der Cytoplasmamembran, wodurch die photosynthetisch aktive Membran vergrößert wird. Auch intrazelluläre Membransysteme bei Nitrifizierern und Methanotrophen dienen der Leistungssteigerung membrangebundener Redoxprozesse (van Niftrik *et al.*, 2004). Bei Arten der Rhizobiaceae und Rhodospirillaceae wurde nachgewiesen, dass sie Volutin in Membranvesikeln speichern (Seufferheld *et al.*, 2003; Seufferheld *et al.*, 2004), und die hydrophoben Polyhydroxybutyrat-Speichergranula sind von einer proteinreichen Phospholipidschicht (Monolayer) umgeben (Pieper-Fürst *et al.*, 1994). Bei einigen Schwefeloxidierern (Gattungen: *Thioploca*, *Thiomargarita*, evtl. *Beggiatoa*) werden sogar Vakuolen gebildet, in denen der Elektronenakzeptor Nitrat in hoher Konzentration gespeichert wird (Mussmann *et al.*, 2003). Neben der Membranvergrößerungsfunktion und der Speicherfunktion gibt es auch Schutzfunktionen intracytoplasmatischer

Membransysteme: bei anaeroben Ammoniumoxidierern der Planctomyceten kommen Membranen vor, welche mit außergewöhnlichen Lipiden eine Diffusionsbarriere für toxische Stoffwechselintermediate bilden (van Niftrik *et al.*, 2004). Zu den genannten intracytoplasmatischen Membransystemen sind wenig direkt auf den Proteintransport bezogene Studien publiziert worden. Studien des bakteriellen Proteintransportes konzentrieren sich bisher auf genetisch und biochemisch besser zugängliche Modellorganismen wie *Escherichia coli* oder *Bacillus subtilis*.

Sollen Proteine aus der Zelle heraus transportiert werden, so nennt man dies „**Sekretion**“¹. Eine Sekretion kann bei Gram-negativen Bakterien entweder *direkt* vom Cytoplasma ausgehend über beide Membran erfolgen, oder *indirekt* in zwei unabhängigen Schritten über die jeweilige Membran. Man unterscheidet inzwischen fünf Kategorien (Typen) der Sekretion, die hier nur kurz gemeinsam mit weiterführenden Übersichtsartikeln erwähnt sein sollen. Sekretion des **Typ I** basiert auf ABC-Transportern, welche an Kanäle in der äußeren Membran koppeln und ungefaltete Proteine ATP-abhängig direkt in die Umgebung schleusen (Delepelaire, 2004). Die **Typ II**-Sekretion befördert periplasmatische Proteine mit einem Pilus-artigen „Kolben“ durch eine spezielle Pore in der äußeren Membran (Filloux, 2004). Die Assemblierung des Kolbens erfolgt von der Cytoplasmamembran ausgehend. Die **Typ III**-Sekretion pathogener Bakterien verläuft über beide Membranen und kann häufig ATP-abhängig Proteine in eukaryotische Wirtszellen befördern (Büttner und Bonas, 2002; Mota *et al.*, 2005). Der **Typ IV** der Sekretion ist eigentlich ein Konjugationssystem zum DNA-Austausch, welches bei einigen Organismen auch für den Transport von Effektor-Proteinen in eukaryotische Zellen genutzt wird (Cascales und Christie, 2003). Unter **Typ V**-Sekretion werden verschiedene Struktur-verwandte Systeme zusammengefasst, die Autotransporter (Typ Va), die „Zwei-Partner-Systeme“ (Typ V b), sowie das AT2-System homooligomerer Autotransporter (Typ Vc) (Henderson *et al.*, 2004). Alle TypV-Systeme bilden eine Pore in der äußeren Membran, durch welche entweder daran fusionierte hydrophile Domänen oder spezifische „Passagier“-Proteine transportiert werden. Ein weiteres, noch nicht in Listen eingeordnetes Sekretionssystem ist das **chaperone-usher-System**, bei dem Pili-Untereinheiten erst durch Chaperon-Bindung im Periplasma falten, dann zu einer spezifischen Pore der äußeren Membran gebracht werden (dem *usher*), und dort durch die Pore hindurch polymerisieren (Sauer *et al.*, 2004).

Man darf von der Vielfalt der Gram-negativen Sekretionswege nicht fälschlich auf eine hohe Zahl ausgeschiedener Proteine schließen: Die Sekretionswege kommen in der Regel nicht allesamt gemeinsam im gleichen Bakterium vor und scheiden nur einen sehr kleinen Teil der transportierten Proteine aus (Yen *et al.*, 2002a). Der weitaus größte Teil der transportierten

¹ Durch den leicht missverständlichen Begriff "Sekretion" sollte ursprünglich der Begriff "Exkretion" vermieden werden, um Proteintransport vom Transport niedermolekularer Substanzen abzugrenzen (Pugsley, 1993).

Proteine verbleibt an Membranen oder löslich im Periplasma. Für den Transport über die Cytoplasmamembran werden **generelle Transportsysteme** genutzt. Weitere Transportwege können sich daran anschließen, wie etwa für die Biogenese von Lipoproteinen in der inneren und äußeren Membran, für den Einbau integraler Membranproteine in die äußere Membran, oder für die Sekretion über die äußere Membran bei den zweischrittigen Sekretionswegen (Gentle *et al.*, 2005; Tokuda und Matsuyama, 2004).

Zwei generelle Proteintransportsysteme sind bislang aus der Cytoplasmamembran der Prokaryoten bekannt: **das Sec und das Tat System**. Das Tat-System steht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Bevor im zweiten Kapitel auf Details zum Tat-System eingegangen wird, sollen in den folgenden Abschnitten einige Grundlagen zu beiden Systemen gelegt werden.

1.2 Tat und Sec: die generellen Transportwege über die Cytoplasmamembran

Das Tat-System (von *twin-arginine translocation*) ist eine molekulare Maschinerie, welche gefaltete Proteine über biologische Membranen transportieren kann (Berks *et al.*, 2005; Müller und Klösgen, 2005). Diese Fähigkeit unterscheidet das Tat-System vom Sec-System (von *secretion*), welches auf Proteine mit höchstens sehr geringer Strukturierung beschränkt ist (Pugsley, 1993). Durch ihre in der Regel unterschiedlichen Anforderungen an die zu transportierenden Proteine – gefaltet bzw. ungefaltet – können beide Translokationssysteme die Schwächen des jeweiligen anderen Systems kompensieren und erlauben so den Transport eines sehr breiten Spektrums von Proteinen über die Membran. Beide Systeme, Tat und Sec, sind *generelle* Proteintransportsysteme: sie sind nicht auf den Transport einzelner Proteine spezialisiert, sondern können viele verschiedene Proteine transportieren, wenn nur wenige Grundvoraussetzungen erfüllt sind. So müssen zu transportierende Proteine (Substrate) beider Translokons N-terminale Signalpeptide besitzen, welche oberflächlich betrachtet sogar recht ähnlich strukturiert sind (**Abbildung 2**). Sie gliedern sich in eine polare N-terminale „**n-Region**“ mit positivem Ladungsüberschuss und in eine hydrophobe „**h-Region**“. Wenn Signalpeptide durch Signalpeptidasen nach dem Transport abgespalten werden, was nicht immer der Fall ist, so weisen sie im C-terminalen Bereich eine kurze hydrophile Region („**c-Region**“) mit einer Signalpeptidase-Erkennungsstelle (zwei kleinen unpolaren Resten in Position -1 und -3 relativ zur Schnittstelle; meist „AxA¹⁴“, (von Heijne, 1983, 1984)) auf. Tat-Substrate besitzen am Ende der n-Region zusätzlich ein konserviertes und für den Transport wichtiges Sequenzmotiv, das namengebende **twin-arginine**-Motiv (ursprünglich „S/T-R-R-x-F-L-K“), mit in der Regel zwei benachbarten Argininen (Berks, 1996; Brink *et al.*, 1998; Buchanan *et al.*, 2001; Hinsley *et al.*, 2001). Eine allgemeine Signatur des *twin-arginine*-Motives ist gemeinsam mit anderen Eigenschaften von Tat- und Sec-Signalpeptiden in Abbildung 2 gezeigt.

Sec- und Tat-Systeme kommen sowohl bei den Bacteria, als auch bei den Archaea und den Eukaryota vor. Während jedoch ein Sec-Translokon bei keinem Organismus fehlt und auch

in originär-eukaryotischen Membransystemen (dem ER) vorkommt, so ist das Tat-System bei einigen Gruppen der Bacteria² und der Archaea³ nicht vorhanden und wurde bei den Eukaryota bisher nur in der Thylakoidmembran pflanzlicher Plastiden nachgewiesen (Dilks *et al.*, 2003; Hutcheon und Bolhuis, 2003). Genetische Hinweise auf eine Existenz des Tat-Systems in Mitochondrien von Pflanzen und Protisten konnten bisher nicht funktionell bestätigt werden (Bogsch *et al.*, 1998).

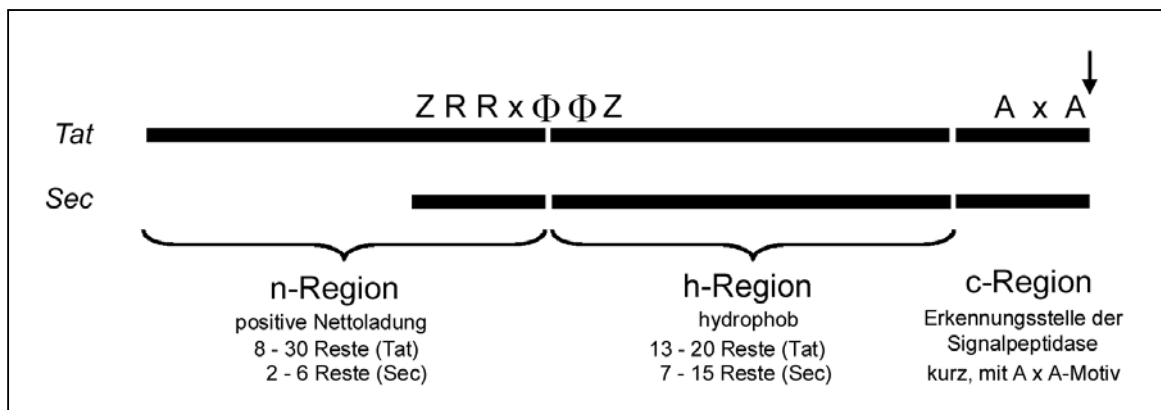


Abbildung 2: Schema des Aufbaus der N-terminalen Signalpeptide von typischen Tat- und Sec-Substraten. Angaben zu den Längen der einzelnen Regionen (n-, h-, c-Region) sind von bekannten Signalpeptiden aus *E. coli* abgeleitet. Das *twi-arginine*-Motiv und die Signalpeptidase-Erkennungsstelle sind angezeigt. Φ: hydrophober Rest; Z: hydrophiler Rest; x: keine klare Einschränkung.

1.2.1 Grundlagen des Sec-abhängigen Transportes

Der Transport ungefalteter Proteine am Sec-Translokon ist seit der ersten Identifizierung von Komponenten des Sec-Systems ein Forschungsschwerpunkt vieler Arbeitsgruppen. Entsprechend umfangreich ist das Wissen zum Sec-System. Die Erläuterung aller Details zum Sec-System würde an dieser Stelle zu weit führen, so dass vorab auf umfangreiche zusammenfassende Übersichtsartikel hingewiesen sei (Dalbey und Chen, 2004; Müller *et al.*, 2001). Einige grundlegende Kenntnisse zum Sec-System werden in späteren Abschnitten dieser Arbeit jedoch vorausgesetzt, so dass die wichtigsten Aspekte hier kurz dargestellt sein sollen.

² Bei den Firmicutes fehlen Tat-Systeme bei den Clostridia (bisher mit Ausnahme der Arten *Moorella thermoacetica* und *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*), Lactobacillales (bisher mit Ausnahme von *Streptococcus thermophilus*) und Mollicutes. Ansonsten fehlen Tat-Systeme bei einigen obligaten Symbionten der Proteobacteria, sowie bisher generell bei den Spirochaeta, Chlamydia, Fusobacteria und Thermotogales (BLAST-Analysen der GenBank-hinterlegten Genome, Januar 2006).

³ Bei den Euryarchaeota fehlen Tat-Systeme bei den Methanobacteriales, Methanococcales, Methanopyrales, und Thermococcales. Auch der einzige bekannte Vertreter der Nanoarchaeota, *Nanoarchaeum equitans*, besitzt kein Tat-System (BLAST-Analysen der GenBank-hinterlegten Genome, Januar 2006).

Das Translokons eines Sec-Systems, dem von *Methanococcus jannaschii*, konnte in seiner Struktur aufgeklärt werden (Van den Berg *et al.*, 2004). Es besteht aus drei Untereinheiten, die denen von *E. coli* (SecYEG) entsprechen. Gegenwärtig wird angenommen, dass zwei SecYEG Heterotrimeren zu einem funktionellen Translokons assemblieren, wobei wahrscheinlich die SecY-Untereinheiten je einen „Kanal“ bilden, durch den ungefaltete Proteine aktiv „hindurchgefädelt“ (*threaded*) werden (Breyton *et al.*, 2002; Mitra *et al.*, 2005). Eine bewegliche Domäne (*plug*) soll die Pore im nicht-aktiven Zustand verschließen, wohingegen ein Ring hydrophober Aminosäuren in der Mitte des Kanals den unkontrollierten Ionen-Einstrom während des Transportes verhindern soll (Van den Berg *et al.*, 2004). Es wurde postuliert, dass ein Zusammenspiel beider benachbarter SecYEG Translokons für die Translokation wichtig ist (Driessen, 2005; Mitra *et al.*, 2005).

Die Anpassung an ungefaltete Proteine ermöglicht dem Sec-System zwei verschiedene Transportmodi: einen cotranslationalen Transport, der bereits während der ribosomalen Proteinsynthese initiiert wird, sowie einen posttranslationalen Transport, der erst nach Beendigung der Translation beginnt (Müller *et al.*, 2001). Der cotranslationale Transport setzt in der Regel eine durch das Signal-Rezeptor-Partikel (SRP) und den membranassoziierten SRP-Rezeptor vermittelte direkte Interaktion des SecYEG Translokons mit dem Ribosom voraus und wird häufig bei polytopen Membranproteinen genutzt (Luirink und Sinning, 2004; Luirink *et al.*, 2005). Bei der Membraninsertion hilft YidC⁴, eine auch eigenständig zur Membraninsertion befähigte Insertase (Dalbey und Chen, 2004; Luirink *et al.*, 2005; van der Laan *et al.*, 2005). Auch lösliche periplasmatische Proteine können prinzipiell cotranslational transportiert werden (Schierle *et al.*, 2003). Die Energetisierung des SRP-abhängigen Transportes erfolgt entweder ausschließlich durch die ribosomale Syntheseleistung oder mit Hilfe der ATPase SecA (Dalbey und Chen, 2004). SecA wird dabei für den Transport größerer polarer Domänen benötigt (Neumann-Haefelin *et al.*, 2000). Nur ein Teil der SecA-Population liegt am SecYEG-Translokons assoziiert vor und es gibt seit kurzem Hinweise darauf, dass lösliches SecA - analog zum SRP - naszierende Polypeptide binden und samt Ribosom zum Translokons bringen kann, was einen SRP-unabhängigen cotranslationalen Transport hydrophiler Proteine über die Membran ermöglichen könnte (Karamyshev und Johnson, 2005).

Der posttranslationale Transport durch das Sec-Translokons setzt voraus, dass sich die transportierten Proteine vor dem Transport nicht stabil falten. Dies kann durch die Bindung von Chaperonen wie etwa DnaK oder - bei *E. coli* - insbesondere durch SecB erreicht werden (Driessen, 2001; Kim und Kendall, 1998; Wild *et al.*, 1992; Zhou und Xu, 2005). SecB hat neben seiner allgemeinen Chaperonfunktion (Ullers *et al.*, 2004) die besondere

⁴ YidC-homologe Insertasen kommen auch bei den von Bakterien abstammenden pflanzlichen Plastiden und bei Mitochondrien vor, nicht aber bei allen Archaea (Pohlschröder *et al.*, 2005).

Fähigkeit der Übergabe des Substrates an SecA, dem bereits erwähnten „Motor“ der Translokation hydrophiler Domänen am SecYEG Translokon (Randall *et al.*, 2004; Randall *et al.*, 2005). Am Translokon energetisiert SecA die posttranslationale Translokation des Proteins (Hunt *et al.*, 2002). Manche Proteine benötigen neben der SecA-bedingten ATP-Hydrolyse ebenfalls einen anliegenden Protonengradienten für eine effiziente Translokation (Driessen und Wickner, 1991).

Die Entscheidung, ob Proteine cotranslational oder posttranslational transportiert werden sollen, wird am Ribosom durch spezifische Interaktionen der naszierenden N-Termini mit dem SRP oder alternativen Faktoren, wie dem „trigger factor“ (TF) herbeigeführt (Müller *et al.*, 2001). Bei den Archaea, bei denen der cotranslationale Transport sicher stattfindet, herrscht wegen des Fehlens von SecA Unklarheit über einen möglichen posttranslationalen Transport durch das Sec-Translokon (Bolhuis, 2004). Eine Energetisierung ähnlich zum posttranslationalen Sec Transport am ER der Eukaryota (welche ebenfalls kein SecA besitzen) kommt für Archaea nicht in Frage: Eukaryoten kompensieren SecA-Abwesenheit durch ein ATP-abhängiges DnaK-verwandtes Chaperon auf der lumenalen Seite des ER, BIP, welches einen „Sperrad“- oder „Ratschen“-Mechanismus (engl.: *ratchet*) erlaubt (Osborne *et al.*, 2005). Falls am archaealen Sec-Translokon daher nur cotranslationaler Transport möglich sein sollte, so muss zumindest das Problem der Translokation großer hydrophiler Domänen auf noch unbekannte Art gelöst sein.

1.2.2 Grundlagen des Tat-abhängigen Transportes

Während man zum Sec-abhängigen Transport ungefalteter Proteine Kristallstrukturen des Sec-Translokons und recht ausgereifte mechanistische Modelle vorweisen kann, so befindet sich die Forschung am Tat-abhängigen Transport gefalteter Proteine noch in einer frühen Phase. Dieser Abschnitt soll in grundlegende Aspekte des Tat-Systems durch die Erzählung der recht spannenden Geschichte seiner Entdeckung einführen.

Wie können gefaltete Proteine transportiert werden? Diese Frage stellte sich bis in die 90er Jahre hinein kaum jemand. Zu jener Zeit kannte man nur *ein* generelles Proteintransportsystem, das Sec-System, und man wusste mit Bestimmtheit, dass weitgehend gefaltete Proteine eben nicht mit dem Sec-System transportiert werden konnten (Pugsley, 1993). Ein Transport gefalteter Proteine galt daher als unmöglich. Hinweise auf ein alternatives Transportsystem für gefaltete Proteine gab es aber schon lange vor dessen Entdeckung. So wurde 1991 festgestellt, dass Molybdat essentiell für den Transport der periplasmatischen DMSO-Reduktase von *Rhodobacter sphaeroides* ist (Yoshida *et al.*, 1991). Die Autoren wollten ihre Ergebnisse aber nicht als Evidenz für Cofaktor-Einbau und Faltung vor dem Transport interpretieren: "*We believe now that the cofactor is incorporated (...) at the periplasmic side, because it is hard to suppose that a polypeptide can be*

transported after a conformational change occurs during incorporation of the cofactor." Offensichtlich durfte nicht sein, was man sich nicht vorstellen konnte. Größere Fortschritte wurden bei der Hydrogenase-Forschung gemacht. Periplasmatische Hydrogenasen werden als Heterodimere vom Tat-System transportiert, wobei nur ein Signalpeptid genutzt wird, welches sich an der kleinen Untereinheit befindet (Rodrigue *et al.*, 1999). Bei der Entdeckung des ersten Signalpeptides einer heterodimeren Hydrogenase durch die Gruppen von Jean LeGall und Harry D. Peck Jr. wurde 1986 festgestellt, dass nur die kleine Untereinheit ein N-terminales Signalpeptid besitzt (Prickril *et al.*, 1986). Damals wurde erstmals die Frage aufgeworfen, wie die große Untereinheit ohne Signalpeptid transportiert werden kann. Man betrachtete ein internes Signalpeptid als die wahrscheinlichste Lösung des Problems, hielt aber auch einen Cotransport für möglich und schrieb: "*Alternatively, the hydrogenase may be posttranslationally translocated across the membrane with the small subunit acting as a carrier for the large subunit.*" Die Gruppe um Cees Veeger entdeckte schließlich 1988, dass die *iron-only*-Hydrogenase von *Desulfovibrio vulgaris* beide Untereinheiten für den Transport benötigt (van Dongen *et al.*, 1988). Die Autoren folgerten, dass ein Transportmechanismus von der Hydrogenase genutzt werden muss, welcher sich vom allgemeinen Mechanismus unterscheidet. Man bemerkte in dieser Arbeit bereits die ungewöhnliche Länge des Hydrogenase-Signalpeptides und die besondere Ausdehnung der polaren n-Region. Das später mit *twin-arginine motif* bezeichnete Motiv am Ende der n-Region wurde von der mit Veeger kooperierenden Gruppe um Gerrit Voordouw gefunden und untersucht, zunächst allerdings für Hydrogenase-spezifisch gehalten (Niviere *et al.*, 1992). In den folgenden Jahren wurden Signalpeptide vom Hydrogenase-Typ auch bei anderen Metalloproteinen gefunden, ohne jedoch das bereits 1988 geforderte alternative Transportsystem mit dem *twin-arginine*-Motiv in Verbindung zu bringen (Hoeren *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1995). Ben Berks stellte schließlich in einer Hypothese klar den Zusammenhang zwischen eben diesem Motiv und dem Transport gefalteter Proteine her und postulierte ein neues Transportsystem (Berks, 1996). Er stellte in jenem Artikel auch schon Ähnlichkeiten zum Δ pH-abhängigen Proteintransport bei plastidären Thylakoiden fest. Zuerst glaubte man hier ebenfalls, dass ausschließlich ein Sec-System ATP-abhängig an der thylakoidalen Membran operiert. Die ATP-Abhängigkeit des Transportes einiger transportierter Proteine des Thylakoid-Lumens wurde erstmals 1989 gezeigt (Theg *et al.*, 1989). Anfang der 90er Jahre konnte darüberhinaus ein ATP-unabhängiger posttranslatonaler Transport einiger lumenaler Proteine nachgewiesen werden (Cline *et al.*, 1992; Klösigen *et al.*, 1992). Der neuartige Transport wurde nur von einem anliegenden Protonengradienten angetrieben und daher Δ pH-Weg genannt (Robinson *et al.*, 1993). In Konkurrenzexperimenten konnte gezeigt werden, dass es mindestens drei verschiedene Wege des posttranslationalen *targetings* zu den Thylakoiden geben musste: einen für

Membranproteine (der später identifizierte SRP-Weg) und zwei für lumenale Proteine (Cline *et al.*, 1993). Kurze Zeit später wurde erkannt, dass Unterschiede in den Signalpeptiden verantwortlich für das differentielle posttranslationale *targeting* an der Thylakoidmembran sein mussten (Henry *et al.*, 1994). Während der Weg für Membranproteine als Variante des SRP-Wegs aufgeklärt wurde (Li *et al.*, 1995), und der ATP-beanspruchende Weg ein SecA-abhängiger Weg war (Yuan und Cline, 1994; Yuan *et al.*, 1994), blieb der Δ pH-Weg etwas länger ungeklärt. Man erkannte 1995, dass zwei benachbarte Arginine im Signalpeptid ein *twin-arginine*-Motiv bildeten, welches entscheidend für das *targeting* über den Δ pH-Weg war (Chaddock *et al.*, 1995). Später fand man heraus, dass der Δ pH-abhängige Transport für diejenigen Proteine geeignet war, welche nicht mittels Sec-System transportiert werden konnten (Bogsch *et al.*, 1997; Henry *et al.*, 1997). Schließlich wurde bei der Charakterisierung einer stark Chlorophyll-fluoreszierenden Mutante von *Zea mays* die erste Komponente des Δ pH-Transportapparates gefunden, Hcf106 (*high chlorophyll fluorescence*) (Settles *et al.*, 1997). Die Autoren erkannten auch, dass wahrscheinliche Orthologe von Hcf106 in Bakterien existierten. Da das Postulat des neuen bakteriellen Translokationsweges für gefaltete *twin-arginine*-Proteine veröffentlicht war (Berks, 1996), konnte nun die Jagd nach dem ersten Nachweis des neuen Translokationssystems in Bakterien beginnen. *Escherichia coli* war der genetisch einfach zu manipulierende Organismus, auf den sich in den ersten Jahren alle Arbeiten konzentrierten.

Als erster fand Joel Weiner mit seiner Gruppe das System mit Hilfe einer eleganten Selektion von *E. coli* Mutanten und anschließender Komplementation der Gene (Weiner *et al.*, 1998). Die zweite Gruppe baute auf den Ergebnissen der Thylakoid-Forschung auf und schaltete gezielt die zu *hcf106* homologen Gene in *E. coli* aus (Sargent *et al.*, 1998). Beide Arbeiten identifizierten das gleiche Operon. Als Name der Gene setzte sich aufgrund eines in der Erstarbeit übersehenen Stop-Codons die Bezeichnung *tatABCD* (von *twin-arginine translocation*) gegenüber *mttA₁A₂BC* (von *membrane targeting and translocation*) durch. Neben dem *tatABCD*-Operon wurde auch ein monocistronisches *tatA*-homologes Gen gefunden, *tatE*, welches *tatA* funktionell ersetzen konnte (Sargent *et al.*, 1998). Neben *tatA/E* waren auch die Gene *tatB* und *tatC* essentiell für den neuen Transportweg (Bogsch *et al.*, 1998; Sargent *et al.*, 1999), nicht jedoch *tatD*, dessen Deletion ohne Folge für den Transport war und für dessen Genprodukt eine Nucleaseaktivität nachgewiesen wurde (Wexler *et al.*, 2000).

Im Jahr der Entdeckung der Komponenten des Tat-Systems in Bakterien, 1998, wurde auch erstmals klar gezeigt, dass ein bakterielles Tat-Substrat, die TMAO-Reduktase aus *E. coli*, Sec-unabhängig transportiert wird und seinen Molybdopterin-Molybdän-Cofaktor (MPT-Mo) vor dem Transport einbauen muss (Santini *et al.*, 1998). Auch ich arbeitete in jenem Jahr schon am Tat-System, wenn auch nur in meiner Freizeit (ich promovierte gerade in Bonn

über den oxidativen Schwefelstoffwechsel in *Allochromatium vinosum*). Kurz zuvor hatte ich das Gen des *high potential iron-sulfur protein* (HiPIP) aus *Allochromatium vinosum* kloniert und sequenziert, und das *twin-arginine*-Motiv im Signalpeptid entdeckt (Brüser *et al.*, 1997). Dies untersuchte ich weiter und konnte 1998 erstmals zeigen, dass ein künstlich insertiertes *twin-arginine*-Motiv in einem Sec-Signal nicht für einen Tat-abhängigen Transport ausreicht (Brüser *et al.*, 1998).

Die Studien an bakteriellen und plastidären Tat-Systemen haben synergistisch zu einem rasanten Erkenntniszuwachs geführt. Bis heute ist das pflanzliche System das effektivere *in vitro* System. Bakterielle Systeme sind demhingegen genetisch besser zugänglich und besonders geeignet für physiologische Untersuchungen. Das pflanzliche System gleicht dem Tat-System von *E. coli* und ist in der Lage, bakterielle Tat-Substrate zu transportieren (Halbig *et al.*, 1999a; Wexler *et al.*, 1998). Es ist interessant, dass das TatABC-System von *E. coli* dem der pflanzlichen Plastiden sogar ähnlicher ist als den Tat Systemen der meisten nicht-Proteobakterien oder dem der Archaea. Typische „Drei-Komponenten-Tat-Systeme“ aus TatA, TatB und TatC findet man bei den Bakterien nur in Proteobakterien. Bei den Chloroflexi ist TatB kaum von TatA Komponenten zu differenzieren. Bacilli, Cyanobacteria, Chlorobi, die Bacteroides-Gruppe, Planctomycetales, die *Deinococcus / Thermus* Gruppe und die wenigen Tat-positiven Vertreter der Clostridia und Lactobacillales besitzen offensichtlich kein TatB und bilden somit „Zwei-Komponenten-Tat-Systeme“. Eine TatB genannte Komponente in *Streptomyces lividans* kann durch TatA zumindest teilweise ersetzt werden und ist daher kein typisches TatB (De Keersmaecker *et al.*, 2005a). Dieser Organismus kann funktionelle TatAC und TatBC-Translokons bilden, so dass die Frage nach dem Wert einer Unterscheidung zwischen TatA und TatB aufkommt.

TatA und TatB ähneln sich auf Sequenzebene im funktionell wichtigen N-terminalen Bereich und haben beide eine N-terminale Membranverankerung und eine sehr polare cytoplasmatische C-terminale Domäne, die mit einer postulierten amphipathischen α -Helix beginnt und über einen kurzen flexiblen Bereich (*hinge*) mit dem Membrandurchgang verbunden ist (Jongbloed *et al.*, 2006). TatB Proteine sind aufgrund einer nicht konservierten Extension der C-terminalen Domäne länger als TatA-Proteine. TatC besitzt sechs Membrandurchgänge mit beiden Termini im Cytoplasma (Behrendt *et al.*, 2004; Ki *et al.*, 2004). Die TatAC-Systeme zeigen, dass *eine* TatA/B-Komponente prinzipiell ausreichend ist (Pop *et al.*, 2002). Mit dem *E. coli* System wurde nachgewiesen, dass TatA die Funktionen von TatB im geringen Umfang erfüllen kann, was durch einzelne Austausche in TatA noch verbessert wird (Blaudeck *et al.*, 2005). Das *tatB*-Gen ist aus einer *tatA*-Genduplikation hervorgegangen (Yen *et al.*, 2002b). TatB hat sich bei Proteobakterien und in pflanzlichen Systemen auf Funktionen in direktem Kontakt mit TatC spezialisiert, wohingegen die TatA-Komponente nur transient an den anderen Komponenten bindet. Solch eine Differenzierung

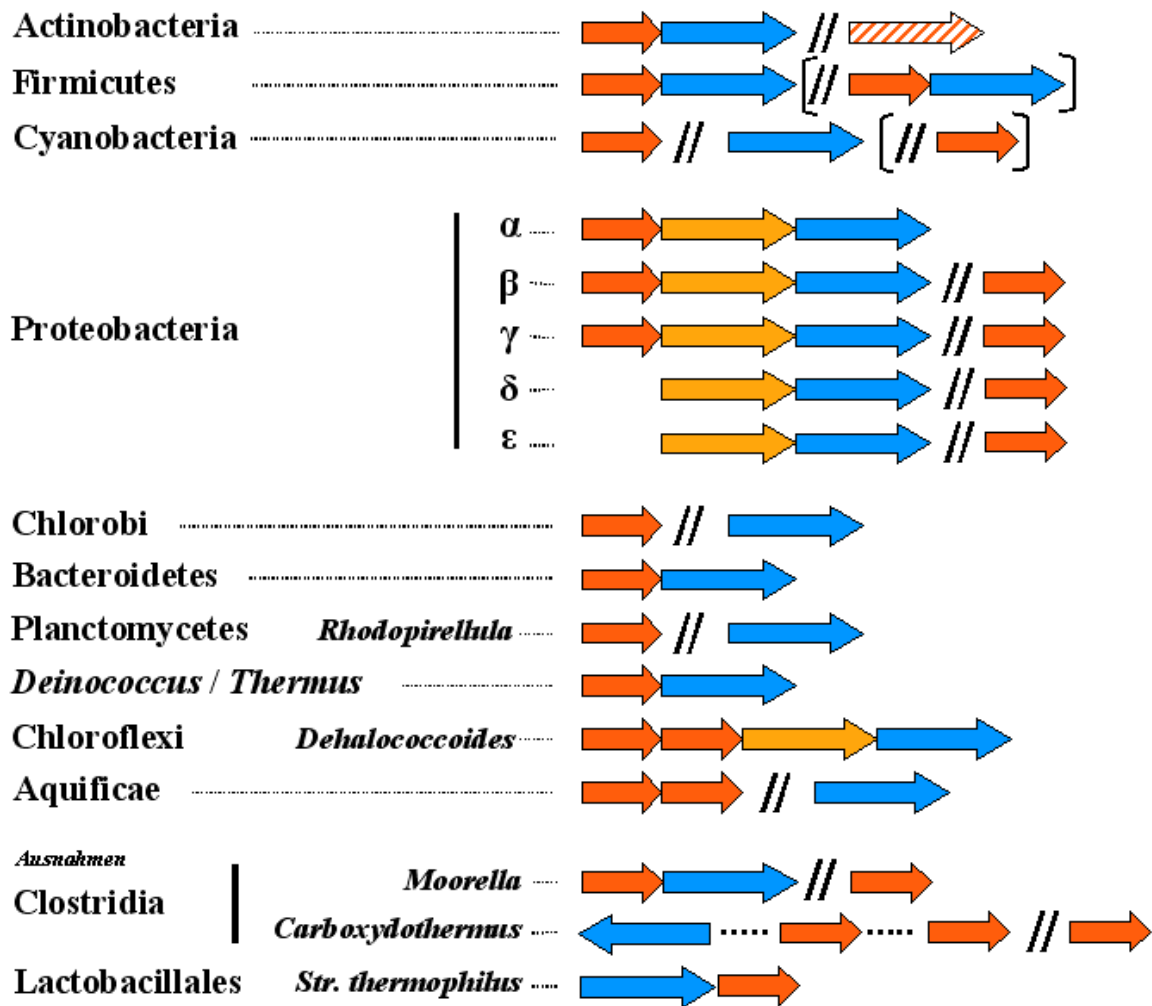


Abbildung 3: Schema typischer Anordnungen der Gene *tatA*, *tatB* und *tatC* in sequenzierten Genomen verschiedener Bakteriengruppen. Entfernt liegende Gene sind mit zwei Querstrichen getrennt. Sehr nahe liegende Gene, welche aber nicht direkt nebeneinander liegen, sind durch gepunktete Linien verbunden dargestellt. rot: *tatA*, orange: *tatB*, blau: *tatC*, rot schraffiert: durch *tatA* komplementierbares *tatB* bei *Streptomyces lividans* (Actinobacteria). In Klammern sind häufig vorkommende zusätzliche Gene angezeigt. Einzelne Gattungen sind angegeben, wenn nur darin sequenzierte Genome vorliegen, oder wenn sie Ausnahmen in einer bisher ansonsten Tat-freien Klasse (Clostridia) oder Ordnung (Lactobacillales) sind. Bei den Lactobacillales wurde bislang nur in einer Art ein Tat-System gefunden (*Streptococcus thermophilus*).

zwischen *TatA* und *TatB* hat bei „Zwei-Komponenten-Tat-Systemen“ noch nicht stattgefunden. Eine Kuriosität vieler Arten mit „Zwei-Komponenten-Tat-Systemen“ ist, dass mehrere Systeme nebeneinander funktionieren: Bei *Bacillus subtilis* existieren zwei *TatAC*-Systeme, von denen zumindest eines speziell an den Transport eines einzigen *Tat*-Substrates angepasst ist (Jongbloed *et al.*, 2004). Diese parallelen *Tat*-Systeme weisen auf besondere Substrat-Anpassungen hin, welche bei den Arten mit „Drei-Komponenten-Tat-Systemen“ weniger ausgeprägt sind. Nicht selten sind *tat*-Gene in direkter Nachbarschaft zu den Genen von *Tat*-Substraten lokalisiert, was auf eine funktionelle Kopplung hinweist. In **Abbildung 3** sind die verschiedenen Genanordnungen gezeigt, welche bei den entsprechenden Phyla vorherrschen.

Die Vorgänge am Tat-Translokon sind bei „Drei-Komponenten-Tat-Systemen“ am besten untersucht und können in einem Zyklus zusammengefasst werden (Mori und Cline, 2002). Tat-Substrate interagieren mit einem TatBC-Komplex, wobei die TatC-Komponente das *twin-arginine*-Motiv erkennt. An den TatBC/Tat-Substrat-Komplex assembliert TatA, wobei ein trans-membraner pH-Gradient zumindest bei *in vitro*-Experimenten von Bedeutung ist. Das so aufgebaute Tat-Translokon bewerkstelligt auf noch unbekannte Weise eine von der *proton motif force* getriebene Translokation. Das Signalpeptid wird anschließend bei den meisten Tat-Substraten abgespalten, wodurch die transportierten Proteine im Periplasma freigesetzt werden. Nach dem Transport disassembliert TatA wieder vom TatBC-Komplex und ein neuer Transportzyklus kann beginnen (**Abbildung 4**).

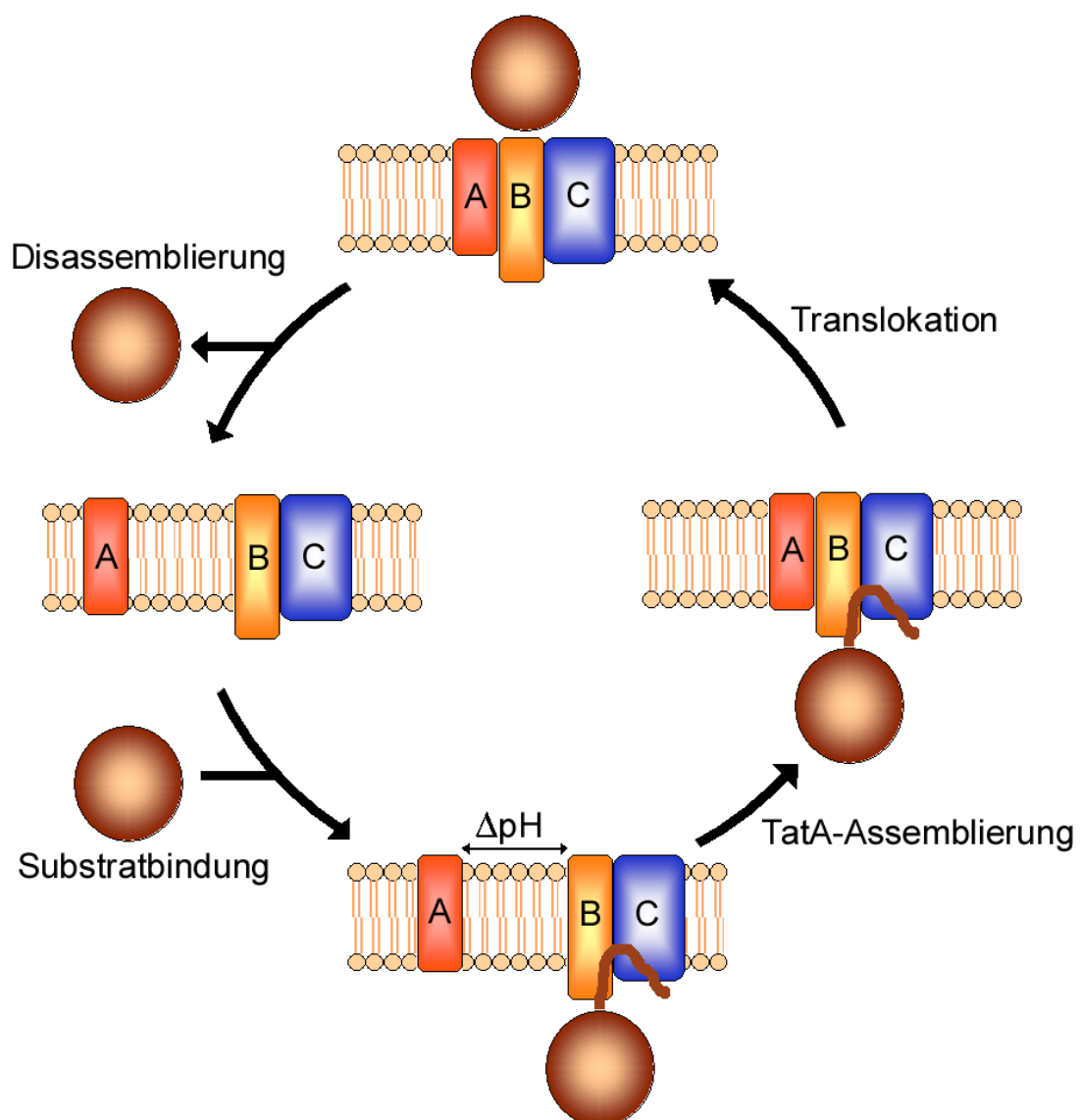


Abbildung 4: Zyklus der Translokationassemblierung und -disassemblierung beim Tat-abhängigen Transport (Mori und Cline, 2002). Tat-Substrate (braun) binden einen Komplex aus TatB (orange) und TatC (blau). TatA (rot) benötigt *in vitro* einen an der Membran anliegenden Protonengradienten, um an den TatBC/Tat-Substrat-Komplex zu binden. Nach dem Transport dissoziiert TatA vom TatBC-Komplex. Signalpeptide werden nach dem Transport in der Regel proteolytisch entfernt.

2 Das Tat-System

Der Tat-abhängige Proteintransport umfasst nicht nur das Geschehen am Translokon, sondern schließt auch vorbereitende unerlässliche Schritte mit ein (Brüser und Sanders, 2003). Man kann den Tat-Transport wie folgt unterteilen:

- vollständige Translation und Faltung, evtl. verbunden mit Cofaktor-Assemblierung.
- Erkennung und Schutz des Signalpeptides im Cytoplasma.
- Membraninteraktion und spezifische Bindung an einen TatBC-Komplex.
- Assemblierung von TatA an den ternären TatBC/Substrat-Komplex.
- Translokation über die Cytoplasmamembran.
- Abspaltung des Signalpeptides und Freisetzung des murenen Proteins.

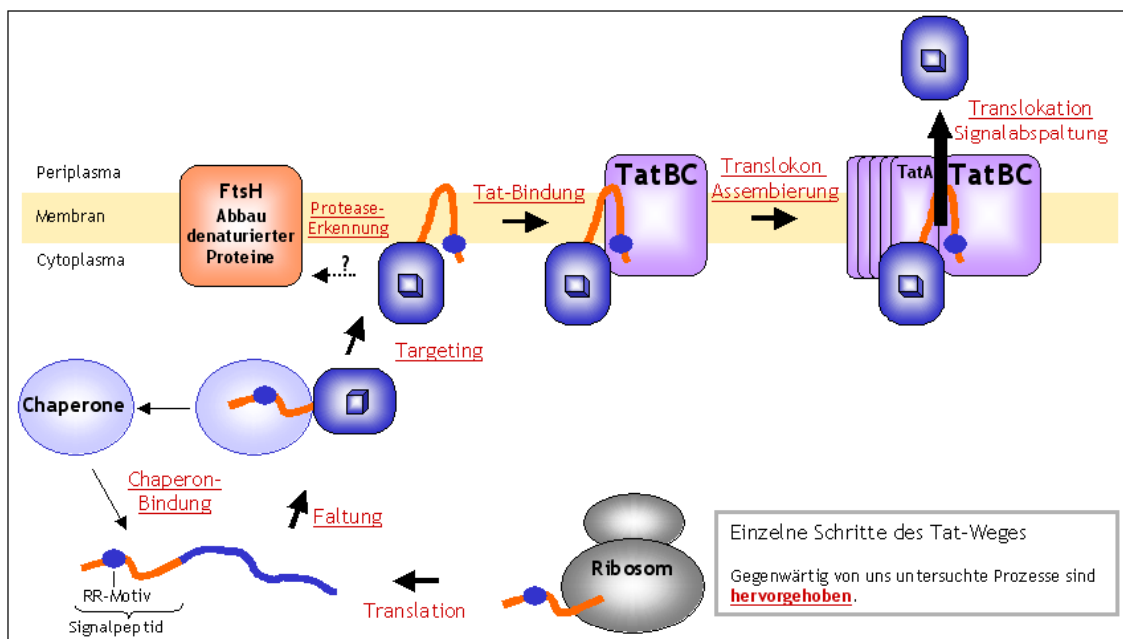


Abbildung 5: Abfolge der Prozesse, welche zur Tat-abhängigen Translokation von Proteinen über die Cytoplasmamembran von *Escherichia coli* führen.

Das obige Schema (**Abbildung 5**) stellt die verschiedenen Substratinteraktionen in den Vordergrund. Es ist mit dem zuvor dargestellten Modell der Translokonassemblierung und -disassemblierung kompatibel. Uns interessiert bei Tat-Signalpeptiden, wie sie erkannt werden können, welche Chaperone sie binden und welche Eigenschaften sie besitzen müssen. Wir wollen zudem wissen, welche Proteine prinzipiell durch das Tat-System transportiert werden können und welche nicht, wie Tat-Substrate mit Membranen interagieren, wie das Translokon gebildet wird und wie der Transport ermöglicht wird. In den folgenden Abschnitten werden diese Arbeitsschwerpunkte mit besonderem Bezug auf die im Anhang ausgewählten eigenen Veröffentlichungen dargestellt.

2.1 Identifizierung von Tat-Signalpeptiden

Tat- und Sec-abhängig transportierte Proteine besitzen recht ähnlich aufgebaute N-terminale Signalpeptide (→ Abschnitt 1.2). Wenn Tat-Signale beschrieben werden, so wird generell auf drei Charakteristika verwiesen: (1) Tat-Signale sind im Durchschnitt länger als Sec-Signalpeptide (23 Reste bei Sec, 37 Reste bei Tat (Palmer *et al.*, 2005)), (2) Tat-Signale besitzen ein konserviertes *twin-arginine*-Motiv, und (3) Tat-Signale sind weniger hydrophob als Sec-Signale. Diese drei Eigenarten sind allesamt recht vage: auch Sec-Signale können sehr lang sein (Llamas und Bitter, 2006; Peterson *et al.*, 2006; Voulhoux *et al.*, 2006), *twin-arginine*-Motive allein reichen nicht als Tat-Determinante aus (Brüser *et al.*, 1998; Jongbloed *et al.*, 2002), und Tat-Signalpeptide können durchaus recht hydrophob sein (z.B. bei Rieske-Untereinheiten der *bc₁*-Komplexe).

Im Jahr 2002 konnten wir die Kriterien für das erste Tat-Signalpeptid-Erkennungsprogramm definieren, TATFIND, welches mit hoher Zuverlässigkeit Tat-Substrate erkennt und dazu genutzt wurde, erstmals die Funktion eines archaealen Tat-Systems nachzuweisen (Rose *et al.*, 2002). Das Programm wird insbesondere bei Genomanalysen erfolgreich verwendet (Dilks *et al.*, 2003; Posey *et al.*, 2006; Schaerlaekens *et al.*, 2004; Thieme *et al.*, 2005). Bei *E. coli* wurden von TATFIND vorhergesagte Tat-Abhängigkeiten bereits mehrfach anschließend experimentell bestätigt, beispielsweise für AmiA, FhuD oder YcdB (Ize *et al.*, 2003; Ize *et al.*, 2004; Sturm *et al.*, 2006). Das Programm bewertet folgende Eigenschaften der Signalpeptide: (1) Die Variabilität der Entfernung des *twin-arginine*-Motives vom N-Terminus, (2) die minimale Länge der h-Region, (3) die maximale Entfernung der h-Region vom *twin-arginine*-Motiv, (4) die Hydrophobizität der h-Region, und (5) das Muster der konservierten Aminosäuren im Bereich der beiden Arginine. Durch diese Kriterien integriert TATFIND wichtige Eigenschaften von Tat-Signalpeptiden, welche in ihrer Summe offensichtlich zur Abgrenzung gegenüber Sec-Signalpeptiden beitragen.

Eine erste wichtige Differenzierung der Signalpeptide findet über die Hydrophobizität der h-Region statt. Die h-Region von Signalpeptiden des SRP-Weges sind im Mittel sehr hydrophob, die des SecAB-abhängigen-Weges weniger hydrophob, und die des Tat-Weges sind am wenigsten hydrophob (Cristóbal *et al.*, 1999; Lee und Bernstein, 2001). Ein Tat-Signalpeptid kann sogar durch Hydrophobisierung der h-Region zu einem Sec-Signalpeptid umgewandelt werden (Cristóbal *et al.*, 1999). Eine Quantifizierung der Hydrophobizität lässt sich mittels verschiedener etablierter Skalierungen durchführen. TATFIND benutzt eine normalisierte Hydrophobizitätsskalierung (Cid *et al.*, 1992) und summiert die Werte der ersten 13 Reste, welche dem letzten geladenen Rest vor der h-Region folgen. Die Zahl 13 beruht auf der Beobachtung, dass die kürzeste h-Region eines Tat-Signalpeptides eine

Länge von 13 Resten hat. Die Hydrophobizität darf für eine positive Bewertung von TATFIND maximal einen Wert von 8.0 erreichen. Dieser recht hohe Wert wird annähernd bei den Signalpeptiden von Rieske-Proteinen erreicht und sicherlich kaum überschritten. Die Signalpeptide der Rieske-Proteine werden nämlich nicht abgespalten und bilden mit ihrer h-Region eine stabile Trans-Membran-Helix, die der Membranintegration und Assemblierung in die *bc₁*-Komplexe dient (Molik *et al.*, 2001). Die h-Regionen von Sec-Substraten können manchmal durchaus weniger hydrophob sein als jene einer Rieske-Untereinheit. Das Hydrophobizitätskriterium lässt eine Bandbreite verschiedener h-Regionen zu, die mit h-Regionen von Sec-Signalpeptiden überlappt. Auch das *twin-arginine*-Motiv ist kein Ausscheidungskriterium für den Sec-Weg. Bereits 1998 zeigten Experimente mit Tat-Substrat-Signalpeptidfusionen, dass die Einführung eines *twin-arginine*-Motives in ein Sec-Signalpeptid den Sec-abhängigen Transport nicht blockiert (Brüser *et al.*, 1998). Ähnliches wurde von plastidären Tat-Substraten berichtet (Bogsch *et al.*, 1997). Es ist offensichtlich die Summe einer Reihe von Eigenschaften, die ein Signalpeptid zu einem Tat-Signal macht. TATFIND hat sicherlich wichtige Kriterien erfasst. Ein neueres Tat-Signal-Identifizierungsprogramm, TatP, hat ähnliche Qualitäten (Bendtsen *et al.*, 2005).

2.2 Chaperonbindung an Tat-Signalpeptide

Bei der ribosomalen Proteinsynthese erfolgt bereits am naszierenden Protein die Entscheidung über sein „Schicksal“. Der am Ribosom erscheinende N-Terminus interagiert mit verschiedenen Chaperonen und je nach Stabilität der Interaktionen erfolgt entweder ein cotranslationales *targeting* zum SecYEG Translokon, oder die Fertigstellung des Polypeptides, wobei eine Faltung entweder unterdrückt oder erlaubt wird. Zwei Chaperone interagieren in der Nähe des ribosomalen Proteins L23 mit dem naszierenden Protein: der *trigger*-Faktor (TF) und das Signalerkennungs-Partikel (SRP) (Müller *et al.*, 2001). Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass zuerst alle Proteine mit dem TF interagieren. Das SRP übernimmt das entstehende Protein erst dann, wenn eine Signal-Ankersequenz am Ribosom erscheint, und leitet diese Proteine für cotranslationalen Transport zur Membran (Ullers *et al.*, 2006). Alle Proteine, deren Translation im Cytoplasma beendet werden sollen, interagieren zunächst nur mit dem TF und werden anschließend an die zellulären Chaperone übergeben (Tomic *et al.*, 2006). Bei Sec-Substraten wäre dies SecB, bei cytoplasmatischen Proteinen das GroEL System oder DnaK (Ullers *et al.*, 2006). Tat-Substrate interagieren ebenfalls mit dem TF am Ribosom (Jong *et al.*, 2004). Interessanterweise ist bei Tat-Substraten jedoch die Bedeutung des TF geringer als bei anderen Proteinen. Eine Depletierung des TF hatte keinerlei Effekt auf den Transport eines Tat-Substrates und die Depletierung des Chaperons DnaK hatte nur einen sehr schwachen Effekt (Jong *et al.*, 2004). Wir hatten in der Vergangenheit ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf den Tat-abhängigen Transport eines kleinen [4Fe-4S]^{2+/3+}-Cluster beinhaltenden Proteins in einer

DnaK-Mutante festgestellt (Brüser *et al.*, 2003). Dieses Tat-Substrat, das high-potential iron-sulfur protein (HiPIP) aus *Allochromatium vinosum*, dient uns als Modellsubstrat bei vielen Untersuchungen, da es in *E. coli* effizient Tat-abhängig transportiert wird, sehr klein ist, seine Struktur bekannt ist und da reines *precursor*-HiPIP effizient präpariert werden kann.

DnaK ist das einzige allgemeine Chaperon, dessen Interaktion mit einem Tat-Signal in der Vergangenheit gezeigt werden konnte (Oresnik *et al.*, 2001). In jener Studie wurden Interaktionen mit dem Signalpeptid der DMSO-Reduktase DmsA analysiert. Neben DnaK wurde auch ein Signal-spezifisches Chaperon entdeckt, DmsD. DmsD wurde intensiv beforscht (Papish *et al.*, 2003; Ray *et al.*, 2003; Sarfo *et al.*, 2004), wohingegen die Rolle von DnaK unklar blieb. DmsD ist an der Biogenese von DmsA beteiligt. Ähnliche Chaperone finden sich auch für andere Tat-Substrate mit komplexen Cofaktoren, wie z.B. TorD, ein TorA-Signal bindendes Chaperon (Jack *et al.*, 2004). Auch dieser offensichtliche Kandidat für eine TorA-spezifische Signalpeptidbindung wurde intensiv analysiert (Genest *et al.*, 2006; Hatzixanthis *et al.*, 2005a; Li *et al.*, 2005). Diese Studien führten zwar zu einem Verständnis der Nutzung einer Signalpeptidbindung für die Cofaktorinsertion, jedoch nicht zur Entdeckung eines generellen Signalpeptid-Chaperons. Die Chaperone der Signalpeptide einiger Tat-Substrate wurden als *proofreading*-System bezeichnet (Jack *et al.*, 2004), womit gemeint ist, dass durch diese Chaperone eine Faltung vor der Interaktion mit dem Tat-Translokon sichergestellt wird. Die attraktive Bezeichnung *proofreading* wurde nach dessen Postulat in einer ganzen Reihe von Reviews etabliert (Berks *et al.*, 2005; Hatzixanthis *et al.*, 2005a; Hatzixanthis *et al.*, 2005b; Jack *et al.*, 2005; Palmer *et al.*, 2005; Sargent *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 2004). Obwohl die *proofreading*-Aktivität der spezifischen Tat-Signal-bindenden Chaperone wahrscheinlich ist, steht bis heute der klare Beweis aus. Der ursprünglich durchgeführte „*proofreading*-Test“ ist ein Hydrogenase-Aktivitätstest: eine Hydrogenase mit einem TorA-Signalpeptid kann in Gegenwart von TorD besser transportiert werden. Dieses Datenmaterial lässt sich heute besser durch eine reine Signalpeptid-Stabilisierungsfunktion des bindenden TorD erklären als durch ein *proofreading*. Eine Signalpeptid-Stabilisierungsfunktion von TorD wurde inzwischen mehrfach nachgewiesen (Genest *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2005). Ein *proofreading* ist von einem spezifischen Chaperon wie TorD wahrscheinlich nur bei einem zum Signalpeptid gehörenden Protein möglich und nicht bei einem daran fusionierten „Fremdprotein“. Nach erfolgtem Cofaktoreinbau wird das Signalpeptid wahrscheinlich zur Interaktion mit dem Tat-Translokon freigegeben.

Uns interessierte die Möglichkeit, ein generelles Chaperon für Tat-Signalpeptide zu identifizieren. Für die Existenz solcher generellen Chaperone sprechen einige gute Argumente:

- nur für Molybdopterin-haltige Oxidoreduktasen und Hydrogenasen sind spezifische Signalpeptid-Chaperone bekannt, nicht jedoch für die anderen Tat-Substrate,

- einige getestete heterologe Tat-Substrate (z. B. HiPIP aus *Allochromatium vinosum*) werden in *E. coli* effizient transportiert (Brüser *et al.*, 2003),
- das Signalpeptid von HiPIP liegt *per se* völlig ungefaltet in Lösung vor (Kipping *et al.*, 2003) und ist sehr empfindlich gegenüber Proteasen (Brüser *et al.*, 2003).

Um generelle Tat-Signal-Chaperone zu identifizieren, haben wir vollständig gefaltete HiPIP-*precursor* kovalent an eine Säulenmatrix gebunden, interagierende Proteine affinitätschromatographisch angereichert, eluiert und massenspektrometrisch identifiziert. Die einzigen identifizierten Chaperone waren DnaK und SlyD. Wir wiederholten die Experimente mit Signalpeptid-Fusionen, bei denen verschiedene Tat-Signalpeptide an Stelle des original Signalpeptids positioniert waren. In allen Fällen erhielten wir DnaK und SlyD. DnaK hatte auch eine schwache Affinität zu Affinitätsmatrices mit maturem HiPIP (ohne Signalpeptid), wohingegen SlyD das Signalpeptid zur Bindung benötigt. Die so *in vitro* identifizierten Signalpeptid-Bindeproteine wurden bei Reinigungen von Tat-Substraten ebenfalls in Abhängigkeit von der Präsenz eines Signalpeptides mitgereinigt. Beispielhaft sind in **Abbildung 6** die Detektionen von DnaK und SlyD bei der Reinigung des Tat-Substrates YcdB gezeigt. Bei der Reinigung ohne Signalpeptid am YcdB (*mat*-YcdB) ist nur wenig DnaK unabhängig von YcdB im Eluat detektierbar und keinerlei SlyD. Wenn *precursor*-YcdB mitgereinigt wird, so ist deutlich mehr DnaK detektierbar. SlyD eluiert exakt mit dem Tat-Substrat bei Anwesenheit des *precursor*-Proteins.

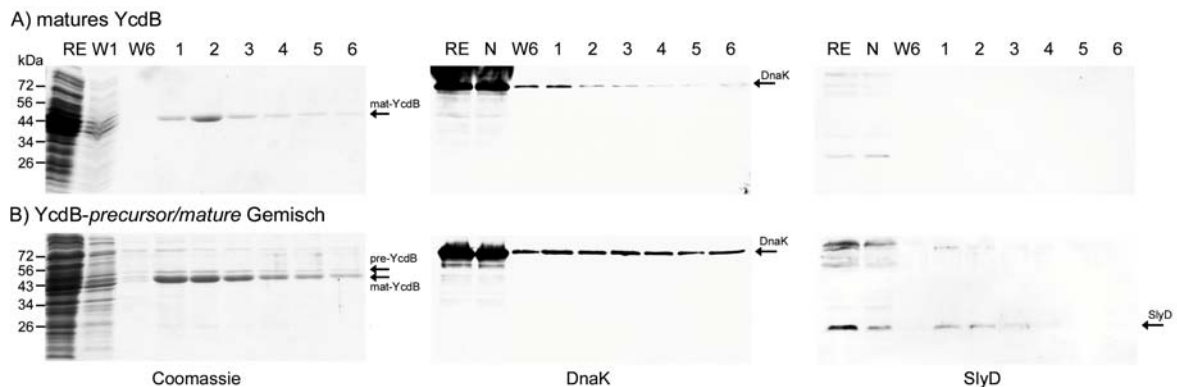


Abbildung 6: DnaK und SlyD binden am *precursor* von YcdB. Analyse der Proteine des Rohextraktes (RE), der Waschfraktionen (W1, W6) und der ersten sechs Elutionsfraktionen einer Streptactin-Superflow affinitätschromatographischen Reinigung von maturem YcdB-Strep (obere Reihe) und YcdB-Strep mit einem Anteil des unprozessierten *precursors* (untere Reihe). SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (links), Detektion von DnaK (Mitte), oder Detektion von SlyD (rechts) mittels Western Blot. Bei den Western-Blots wurde auch das nicht-bindende Material (N) analysiert. (Schüler und Brüser, Manuskript in Vorbereitung)

DnaK wurde nicht unerwartet identifiziert, da eine Bindung von DnaK an das Signalpeptid der DMSO-Reduktase bereits berichtet wurde (Oresnik *et al.*, 2001). Auch wir fanden schon in

der Vergangenheit in einem anderen Kontext eine Bindung von DnaK an das Signalpeptid von HiPIP (Brüser *et al.*, 2003). Damals suchten wir potentielle Membraninteraktionspartner von HiPIP und haben daher solubilisierte Membranproteine affinitätschromatographisch mit HiPIP interagieren lassen. DnaK ist zwar *per se* nicht ein Membranprotein, jedoch interagiert DnaK teilweise mit der Cytoplasmamembran (Bukau *et al.*, 1993) und bindet derart effizient an HiPIP, dass es aus der Membranfraktion angereichert werden konnte. DnaK erkennt exponierte und von positiven Ladungen flankierte hydrophobe Sequenzen (Rüdiger *et al.*, 1997). Solche potentiellen Erkennungssequenzen sind bei allen Sec- und Tat-Signalpeptiden am Übergang der n-Region zur h-Region vorhanden.

Die Chaperonaktivität von DnaK ist ATP-abhängig. ATP-Hydrolyse führt DnaK in eine ADP-gebundene Form über, wodurch die Substratbindung verstärkt wird. Für die Chaperonfunktion ist normalerweise eine transiente Interaktion mit einem Co-Chaperon, DnaJ, sehr wichtig: DnaJ beschleunigt die ATP-Hydrolyse und fördert so die DnaK-Bindung an das Substrat. Zusätzlich gibt es einen ADP-ATP-Austauschfaktor, GrpE, welcher die Freilassung des Substrates von DnaK induziert (Brehmer *et al.*, 2004; Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Bei den von uns durchgeführten Affinitätschromatographien ließ sich DnaK sowohl mit 1 mM ATP als auch mit 0.5 M NaCl eluieren. Weder DnaJ noch GrpE wurden eluiert, so dass alle bisherigen Ergebnisse dafür sprechen, dass DnaK alleine in der Lage ist, Tat-Signalpeptide zu binden. Zudem reicht zumindest *in vitro* die Gegenwart von 1 mM ATP aus, um das gebundene Signalpeptid wieder freizulassen. Die physiologische Rolle von DnaK beim Tat-abhängigen Transport ist nicht einfach zu klären. DnaK ist nicht essentiell für den Transport rekombinanter Tat-Substrate. Dies haben wir erstmals 2003 mit Hilfe von *dnaK*-Mutanten zeigen können (Brüser *et al.*, 2003) und wurde später in einer anderen Studie bestätigt (Jong *et al.*, 2004). Die Rolle von DnaK ist aber noch nicht endgültig geklärt, da weitergehende Studien zum Tat-Transport ohne DnaK erforderlich sind. Wir sind gegenwärtig dabei, diese durchzuführen.

Das zweite identifizierte Signalpeptid-Bindechaperon, SlyD, ist weitaus weniger bekannt. SlyD wurde in der Vergangenheit als ein Chaperon identifiziert, welches essentiell für die Lyse von *E. coli* bei Infektion mit dem ϕ X174 Phagen ist (Sly: *sensitivity to lysis*) (Roof und Young, 1993; Roof *et al.*, 1994). SlyD stabilisiert das Lyseprotein E des Phagen, welches ohne SlyD von zellulären Proteasen abgebaut wird (Bernhardt *et al.*, 2000, 2002). Später wurde eine Prolyl-Isomeraseaktivität bei SlyD nachgewiesen (Hottenrott *et al.*, 1997), sowie eine Rolle im Nickel-Haushalt der Zellen. Die allgemeine Chaperonaktivität von SlyD wurde erst vor kurzer Zeit näher analysiert (Scholz *et al.*, 2006). Tatsächlich ist SlyD aus drei Domänen aufgebaut: einer Chaperondomäne, einer Isomerasedomäne, und einer Histidinreichen Nickel-Bindedomäne. Gegenwärtig analysieren wir in Kooperation mit Prof. Jochen Balbach (Biophysik, Halle) die genaue Bindung von Tat-Signalpeptiden an SlyD. Zudem

analysieren wir die funktionelle Bedeutung von SlyD mit Hilfe von *slyD*-Mutanten *in vivo*. Da die Bindung an das Lyseprotein E des Phagen ϕ X174 keine natürlichen Funktion des SlyD-Chaperons ist, glauben wir nun mit der Signalpeptid-Bindung eine erste physiologisch sinnvolle Funktion von SlyD gefunden zu haben.

2.3 Tat-Signalpeptide als erste Voraussetzung für den Tat-abhängigen Transport

Nach der Entdeckung des Tat-abhängigen Transportes stellte sich die Frage, warum Tat-Substrate nicht zum Sec-Translokon gebracht werden. Schon der Austausch der *twin-arginines* gegen zwei Lysine hatte eine völlige Blockade des Tat-abhängigen Transportes des mutierten Substrates zur Folge, ohne den Sec-Transport zu initiieren (Buchanan *et al.*, 2001; Stanley *et al.*, 2000). Von thylakoidalen Tat-Signalpeptiden wurden sogenannte Sec-avoidance-Mechanismen beschrieben. Die Kombination eines *twin-arginine*-Motives mit einer positiven Ladung in der c-Region konnte den Sec-abhängigen Transport bei einem thylakoidalen Tat-Substrat unterdrücken (Bogsch *et al.*, 1997). Mir fiel das häufige Vorkommen positiver Ladungen in der c-Region von bakteriellen Tat-Signalpeptiden auf, was ich damals ebenfalls mit einer möglichen Sec-avoidance-Funktion assoziierte (Brüser *et al.*, 1998). Auch Studien im *E. coli* System legen eine Sec-avoidance-Funktion positiver Ladungen nahe (Blaudeck *et al.*, 2003). Als weiterer Sec-avoidance-Mechanismus wurde in einem Fall die geringere Hydrophobizität der h-Region von Tat-Signalpeptiden beschrieben (Cristóbal *et al.*, 1999).

Wir haben beide vorgeschlagenen Mechanismen anhand des Tat-Signals von HiPIP getestet. Das Sec-Signalpeptid von PhoA wurde durch das Tat-Signalpeptid von HiPIP ersetzt (RR-PhoA) und der Transport dieses RR-PhoA-Konstruktes wurde analysiert. RR-PhoA konnte nicht Tat-abhängig transportiert werden, was Studien anderer Gruppen bestätigte (DeLisa *et al.*, 2003). Das Signalpeptid von HiPIP konnte aber einen Sec-abhängigen Transport von PhoA initiieren. Offensichtlich funktionierte das Sec-avoidance bei HiPIP nicht vollständig (Richter und Brüser, 2005). Wir konnten daher die Sequenz des Tat-Signalpeptides gezielt mit möglichen Sec-avoidance-Motiven versehen und den Effekt auf den Sec-abhängigen Transport untersuchen. Mit der gleichen Signalpeptid-Veränderung haben wir zudem den Einfluss auf den Tat-abhängigen Transport von HiPIP getestet (**Abbildung 7**). Folgende Mutationen haben wir generiert: zwei negativ geladene Reste in der c-Region, zwei positiv geladene Reste an der gleichen Position der c-Region, eine Hydrophilisierung der h-Region, sowie eine Kombination der positiven Ladungen in der c-Region mit der Hydrophilisierung der h-Region. All diese Austausche haben wir sowohl in Kombination mit dem unveränderten natürlichen *twin-arginine*-Motiv, als auch mit einer Tat-inkompetenten *twin-lysine*-Variante getestet. Die Effizienz des Sec-abhängigen Transports

der verschiedenen Signalpeptid-PhoA-Fusionen konnte über PhoA-Aktivitätsbestimmungen quantifiziert werden (**Abbildung 7A**, oberer Teil). Man erkennt, dass sowohl positive Reste in der c-Region, als auch die Hydrophilisierung der h-Region den Sec-abhängigen Transport unterdrücken, nicht aber negative Reste in der c-Region. Die Kombination einer Hydrophilisierung der h-Region mit positiven Resten in der c-Region wirkt additiv, so dass man folgern kann, dass beide Veränderungen unabhängig voneinander einen negativen Einfluss auf den Sec-abhängigen Transport haben. Sind demnach beide Effekte wichtig für eine Unterdrückung des Sec-abhängigen Transportes von Tat-Substraten? Um diese Frage zu beantworten, haben wir den Tat-abhängigen Transport von HiPIP mit den entsprechenden Signalpeptiden untersucht (**Abbildung 7B**, unterer Teil). HiPIP wurde mit allen Signalpeptidvarianten Tat-abhängig transportiert. Schwache periplasmatische HiPIP-Signale von KK-Varianten entsprachen dem Muster aus dem Cytoplasma und beruhten

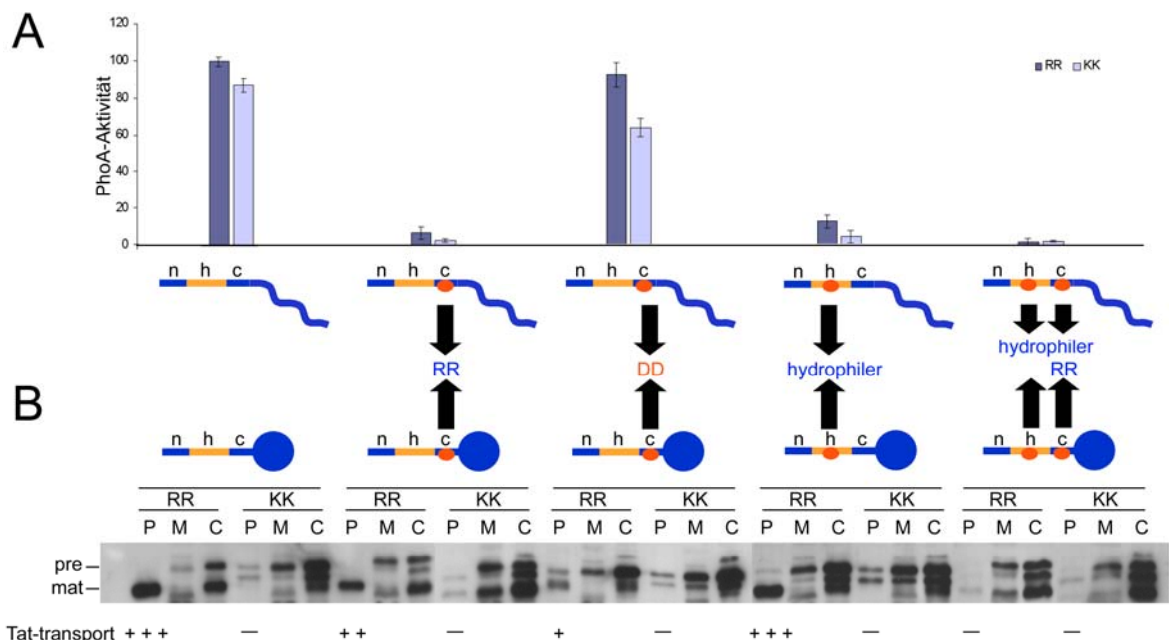


Abbildung 7: Einfluss von postulierten *Sec-avoidance*-Mechanismen auf den Sec- und den Tat-abhängigen Transport. (A) PhoA-Aktivitäten von HiPIP-Signalpeptid-PhoA-Fusionen nach Sec-abhängiger Translokation (Units nach (Brickman und Beckwith, 1975)). *Sec-avoidance*-Mutationen im Signalpeptid sind unter dem Säulendiagramm angezeigt. Entweder wurden in der c-Region zwei positive (RR) oder zwei negative Reste (DD) eingeführt, oder es wurde die Hydrophobizität der h-Region durch M26A und I27A Austausch gesenkt. Als Vergleich wurde das unveränderte Signalpeptid getestet (links). Jeweils wurde mit der Analyse einer RR>KK-*twin-arginine*-Mutation die Tat-Unabhängigkeit des Transportes gezeigt. (B) Tat-abhängiger Transport von HiPIP ohne oder mit eingeführten *Sec-avoidance* Mutationen im Signalpeptid. Alle Konstrukte wurden auch mittels RR>KK-*twin-arginine*-Mutation auf die Tat-Abhängigkeit des Transportes getestet. Unter der Abbildung ist angezeigt, in welcher Periplasmafraktion ein Tat-abhängiger Transport zu sehen ist, wobei die Zeichen +++ , ++ oder + die Effizienz des Transportes symbolisieren. pre: precursor HiPIP; mat: matures HiPIP; Zwischen A) und B) sind die Positionen der Austausche schematisch dargestellt. (Richter und Brüser, Manuskript in Vorbereitung)

daher auf geringer Lyse. Zu unserem Erstaunen war nur die Hydrophilisierung des Signalpeptides kompatibel mit einem effizienten Tat-Transport, wohingegen die Einführung von Ladungen in die c-Region den Tat-Transport schwächte. Die positiven Reste in der c-Region waren aber deutlich besser zur Sec-Verhinderung geeignet als die negativen an der gleichen Position. Bei anderen Tat-Substraten mögen positive Ladungen weniger stark den Tat-Transport behindern und so zum *Sec-avoidance* beitragen. Die Daten zeigen, dass man keine pauschale Sec-Verhinderungsstrategie mittels positiver Ladungen in der c-Region postulieren kann, da solche Ladungen Einfluss auf den Tat-Transport haben können.

Wenn ein Tat-Signalpeptid einen Tat-abhängigen Transport ermöglicht, so bedeutet dies offensichtlich noch nicht, dass es keinen Sec-abhängigen Transport ermöglichen kann. Die Ergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass Tat-Signalpeptide eine *notwendige* Bedingung für den Tat-abhängigen Transport sind, aber nicht eine *hinreichende*. Tat-Signale scheinen also nicht generell vom Sec-System abgelehnt zu werden. Streng genommen sind sie daher keine *Determinanten* für einen Tat-abhängigen Transport, sondern eine *Voraussetzung*. Wenn die mature Domäne Sec-kompatibel ist, dann können viele Tat-Signalsequenzen auch einen Sec-abhängigen Transport initiieren (Blaudeck *et al.*, 2003; Cristóbal *et al.*, 1999; DeLisa *et al.*, 2003).

Umgekehrt ist dies nicht möglich: Typische Sec-Signalpeptide können nach bisherigen Kenntnissen keinen Tat-abhängigen Transport initiieren. Wenn ein Transport von Sec-Signalpeptiden initiiert wird, so ist dies daher ein Sec-abhängiger Transport, der vom Tat-System unabhängig abläuft. Die Spezifität von Sec-Signalpeptid-fusionierten murenen Domänen von Tat-Substraten wurde in thylakoidalen *in vitro* Systemen durch Signalpeptidaustausche gezeigt und in bakteriellen *in vivo* Systemen durch eine Hemmung der ATPase SecA bei Zugabe von Azid (Brüser *et al.*, 1998; Clausmeyer *et al.*, 1993). In bakteriellen Systemen sind Sec-abhängig transportierte Tat-Substrat-Fusionen nach dem Transport weniger stabil als bei Tat-abhängiger Translokation. Dies ist sehr wahrscheinlich auf Faltungsprobleme oder fehlenden Cofaktor-Einbau zurückzuführen. So führte der Sec-abhängige Transport der Glucose-Fructose-Oxidoreduktase zu einem periplasmatischen Abbau des transportierten Proteins (Wiegert *et al.*, 1997). Auch Sec-abhängig transportiertes HiPIP war weniger stabil und wurde durch Azid-Zugabe im Cytoplasma angereichert und so vor einem periplasmatischen Abbau geschützt (Brüser *et al.*, 1998).

Tat-Signalpeptide erscheinen daher als Spezialfall eines Signalpeptides mit Eigenschaften, welche den Tat-abhängigen Transport für den Fall ermöglichen, in dem ein Protein im Cytoplasma faltet und dann nicht mehr Sec-kompatibel ist. Diese Eigenschaft von Tat-Signalpeptiden hat wahrscheinlich eine bisher kaum beachtete, aber enorme Bedeutung für den Transport. Neben den Tat-Substraten, die im Cytoplasma falten müssen um im Periplasma aktiv zu sein, gibt es sehr wahrscheinlich auch Cofaktor-freie Tat-Substrate, die

nur ineffizient von einer Faltung im Cytoplasma abgehalten werden können. Diese Proteine können Sec-abhängig transportiert werden wenn sie ungefaltet vorliegen und Tat-abhängig wenn sie gefaltet vorliegen. Das Tat-Signal erlaubt dann beides. Wahrscheinlich besitzt die Amidase AmiC ein solches Signalpeptid mit Option zum Tat-Weg (Ize *et al.*, 2003). Mit Signalpeptidaustauschen wurde gezeigt, dass AmiC auch Sec-abhängig transportiert werden kann und dann im Periplasma funktionell vorliegt. Es spricht daher nichts dagegen, dass das Signalpeptid von AmiC einen Sec-Transport initiiert, solange AmiC ungefaltet vorliegt. Bei anderen Tat-Signalen konnte die Option zum Sec-Transport nur mit PhoA-Fusionsproteinen gezeigt werden (DeLisa *et al.*, 2003). Hier ist es offen, ob durch die PhoA-Fusion eine unbekannte dominante Sec-Determinante hinzugefügt wurde, oder ob die Tat-Signalpeptide mit ungefalteten Proteinen als Sec-Signale funktionieren. Die letztere Begründung ist einfacher und wahrscheinlicher, da sie keine zusätzlichen unbekanntenen Faktoren voraussetzt.

Das bisherige Wissen erlaubt eine Einteilung von Tat-Substraten in drei Kategorien:

- (1) langsam faltende Tat-Substrate, welche Tat-abhängig transportiert werden müssen, um beispielsweise Molybdän- oder Nickel-Cofaktoren im Cytoplasma assemblieren zu können. Hier müssen individuelle Mechanismen entwickelt worden sein, welche einen Sec-abhängigen Transport verhindern. Spezifische Signalpeptid-bindende Chaperone können an dieser Funktion beteiligt sein.
- (2) schnell faltende Tat-Substrate, welche Tat-abhängig transportiert werden müssen, die aber keine *spezifischen* Biogenese-Chaperone benötigen. Hierzu gehören wahrscheinlich auch Proteine, welche ausschließlich Fe/S-Cluster (wie HiPIP) oder NADP-Cofaktoren (GFOR) besitzen. SecB oder andere Chaperone verhindern nicht die effiziente Faltung dieser Tat-Substrate. Im gefalteten Zustand wird das Protein nicht mehr zum SecYEG-Translokon gebracht.
- (3) Tat-Substrate, welche im ungefalteten Zustand auch Sec-abhängig transportiert werden können, ohne die Funktion nach dem Transport zu gefährden. Hier wird die Faltung nicht effizient verhindert und der Anteil an gefalteten Proteinen muss Tat-abhängig transportiert werden können. Diese Proteine werden also ungefaltet Sec-abhängig oder nach einer Faltung Tat-abhängig transportiert. Die Faltung unterdrückt auch hier das *Sec-targeting*.

Die Signalpeptide müssen demnach jeweils als Teil des Gesamtproteins betrachtet werden und nicht als unabhängige Einheit. So muss man die Frage stellen, warum in *E. coli* nur die Proteine mit einem MPT-Mo-Cofaktor und solche mit einem Ni/Fe-Zentrum spezifische Signalpeptid-Bindeproteine besitzen (Berks *et al.*, 2005). Es liegt nahe, dass solche Proteine besonders viel Zeit zur Faltung beanspruchen. Ein einfacher Schutz des Signalpeptides vor

einem Abbau reicht in solchen Fällen nicht aus: es muss sichergestellt werden, dass die Proteine vor der Interaktion mit dem Translokon ihren Cofaktor eingebaut haben und gefaltet vorliegen (Kategorie 1). Bei schnell faltenden Tat-Substraten wie HiPIP (Kategorie 2), oder bei Tat-Substraten, welche auch Sec-abhängig vor einer Faltung transportiert werden dürfen (Kategorie 3), ist eine solch spezifische Kontrolle nicht notwendig. Signalpeptide der Tat-Substrate der Kategorie 1 werden bis zum Cofaktor-Einbau und der meist damit einhergehenden vollständigen Faltung wahrscheinlich durch spezifische Chaperone wie TorD, DmsD, oder HybE von einem *targeting* zum Sec-System abgehalten (Berks *et al.*, 2005). Sec-Signalpeptid-fusionierte Tat-Substrate können häufig Sec-abhängig transportiert werden, wobei sich Tat-Substrate der Kategorien 1 oder 2 dann nach dem Transport nicht funktionell falten können.

Die hier von mir vorgeschlagene Kategorisierung von Tat-Substraten ist die erste, welche die Faltungseigenschaften der zu transportierenden Substrate berücksichtigt und die Signalpeptide im Kontext des Gesamtproteins betrachtet. In der Vergangenheit gab es durchaus schon Versuche, Tat-Signalpeptide zu kategorisieren. Eine Einteilung in Sec-kompatible und Sec-inkompatible Signalpeptide wurde von DeLisa *et al.* versucht (DeLisa *et al.*, 2003). Hier diente der Sec-abhängige Transport einer Tat-Signalpeptid-PhoA-Fusion als Grundlage für die Kategorisierung. Diese Einteilung ignoriert allerdings die Ansprüche eines transportierten Proteins an sein zugehöriges Signalpeptid. So kann beispielsweise das Tat-Signalpeptid von TorA den Sec-abhängigen Transport von LepB initiieren (Cristóbal *et al.*, 1999), nicht jedoch den Sec-abhängigen Transport von PhoA (DeLisa *et al.*, 2003). Eine zweite Einteilung der Tat-Signalpeptide in Chaperon-abhängige und Chaperon-unabhängige Signalpeptide wurde kürzlich von Tracy Palmer initiiert (Palmer *et al.*, 2005). Diese Einteilung vernachlässigt ebenfalls die Faltungseigenschaften der transportierten Proteine und könnte mit der oben geschilderten Entdeckung genereller Signalpeptid-Chaperone hinfällig werden (→ Abschnitt 2.2).

Das Fazit der geschilderten Studien könnte lauten: Die Vorstellung von der Funktion des Signalpeptides als Determinante für den Sec- oder Tat-Weg ist wahrscheinlich überholt. Tat-Signalpeptide erlauben aber einen Tat-abhängigen Transport, wenn das angehängte Protein mit dem Tat-System kompatibel und mit dem Sec-System inkompatibel ist. Diese Aussage leitet direkt hin zu Aspekten der Faltung von Tat-Substraten, welche im folgenden Abschnitt beleuchtet werden.

2.4 Hydrophilizität, nicht Faltung, als zweite Voraussetzung für den Tat-Transport

Das Tat-System gilt bei Bakterien als ein System, welches auf den Transport gefalteter Proteine spezialisiert ist. Seit der Etablierung des Tat-abhängigen Cotransportes von

Cofaktoren oder ganzen signalpeptidfreien Untereinheiten, sowie des Transportes gefalteter und somit fluoreszierender Tat-Signal-GFP-Fusionen ist der Tat-abhängige Transport gefalteter Proteine bewiesen (Rodrigue *et al.*, 1999; Santini *et al.*, 1998; Santini *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001). Auch thylakoidale Tat-Systeme können gefaltete Proteine transportieren (Clark und Theg, 1997; Hynds *et al.*, 1998). Bis heute wird sogar angenommen, dass zumindest das bakterielle Tat-System ungefaltete Proteine nicht transportieren kann. Diese Annahme beruht zum einen darauf, dass einige Cofaktor-haltige Tat-Substrate nicht ohne gebundene Cofaktoren transportiert werden (Santini *et al.*, 1998), zum anderen gibt es Studien mit Fusionsproteinen, welche zeigen, dass eine Faltung vor dem Transport essentiell für die Tat-abhängige Translokation ist (DeLisa *et al.*, 2003; Sanders *et al.*, 2001). Eine Studie ist dabei besonders hervorzuheben: Darin wurde gezeigt, dass eine Tat-Signalpeptid-fusionierte alkalische Phosphatase (RR-PhoA) nur dann Tat-abhängig transportiert werden kann, wenn cytoplasmatische Disulfidbrücken ermöglicht werden (DeLisa *et al.*, 2003). Normalerweise ist PhoA ein Sec-Substrat, welches im Periplasma unter Bildung zweier Disulfidbrücken faltet (Sone *et al.*, 1997). Ein Thioredoxin- und Glutathionreduktase-negativer Stamm erlaubte die PhoA-Faltung im Cytoplasma und ermöglichte so den Tat-abhängigen Transport. Die Autoren folgerten zu jener Zeit, dass es eine echte „Qualitätskontrolle“ gibt, welche wahrscheinlich am Tat-Translokation selber dafür sorgt, dass ungefaltete Proteine nicht akzeptiert werden (DeLisa *et al.*, 2003). Dabei hatten sie eine weitaus einfachere Erklärung für ihre Daten übersehen: der nicht funktionierende Transport ungefalteter Tat-Substrate konnte ein rein mechanistisches Problem sein. Was wäre, wenn das Tat-Translokation die getesteten ungefalteten Proteine trotz eines Versuchs nicht transportieren *konnte* – diese Substrate also nicht kompatibel mit dem Tat-Mechanismus waren?

Wir hatten zu jener Zeit bereits eine Qualitätskontrolle für das Tat-System postuliert, glaubten aber nicht daran, dass das Translokation selber diese Funktion ausführt (Brüser und Sanders, 2003). Die „Qualitätskontrolle“ am Tat-Translokation konnten wir inzwischen auch experimentell widerlegen. Ansatzpunkt für unsere Analysen war der nicht mögliche Transport einer Tat-Signalpeptid-Fusion mit der alkalischen Phosphatase PhoA (RR-PhoA). Wir untersuchten, ob dieses Fusionsprotein irgendeine Wirkung auf das Wachstum von *E. coli* hatte. Wenn RR-PhoA wirklich vom Tat-Translokation „abgelehnt“ oder gar abgebaut würde, dann wären keine besonderen Auswirkungen auf das Zellwachstum zu erwarten. Wir stellten das Gegenteil fest: Es gab eine offensichtliche Hemmung des Wachstums durch ein Translokation-*targeting* von RR-PhoA (Richter und Brüser, 2005). Wir konnten im Rahmen dieser Studien erstmals eine *in vivo* Interaktion eines Tat-Substrates mit einem bakteriellen Tat-Komplex nachweisen und entdeckten dabei einen Substrat-bindenden TatBC-Komplex von 580 kDa, was im Kapitel 2.6 genauer erläutert wird. Die Wachstumshemmung wurde

durch eine Überexpression der Gene des Tat-Translokons sehr verstärkt und war abhängig vom *twin-arginine*-Motiv des Signalpeptides. Diese physiologischen Effekte hatten jedoch nichts mit einer eventuellen Blockade des Tat-Translokons zu tun, da der Tat-abhängige Transport weiterhin funktionierte. Eine mögliche Tat-Blockade durch ungefaltete Proteine wäre durch eine *tatABC*-Überexpression eher aufgehoben als verstärkt worden. Der Wachstumseffekt musste also trotz seiner Tat-Abhängigkeit andere Ursachen haben. Wir konnten schließlich eine Störung der Membranintegrität nachweisen. Fluoreszenzmessungen belegten, dass invertierte Membranvesikel der RR-PhoA-geschwächten Zellen nur einen geringeren pH-Gradienten aufbauen konnten (Richter und Brüser, 2005). Die Wachstumshemmung war demnach durch einen verringerten Protonengradienten zu erklären, der sich negativ auf die ATP-Syntheseleistung der Zellen auswirkte. Bei erhöhter Menge an Tat-Systemen war die Schwächung der Membran verstärkt und der Protonengradient sehr beeinträchtigt, so dass unter diesen Bedingungen auch ein negativer Effekt auf den Δ pH-abhängigen Transport natürlicher Tat-Substrate wie TorA, AmiA, und AmiC zu messen war (Richter und Brüser, 2005).

Diese Arbeiten legten nahe, dass ungefaltete Proteine Tat-vermittelt Schaden anrichten können. Als Ursache vermuteten wir eine Membraninsertion von hydrophoben Bereichen entfalteter Proteine. Globuläre Proteine bilden in der Regel hydrophobe *core*-Bereiche aus, welche signifikant zur Stabilität des gefalteten Proteins beitragen. Ungefaltete Proteine exponieren solche *core*-Regionen, was im bakteriellen Cytoplasma in der Regel zur Bindung von Chaperonen (z. B. DnaK) führt. Auch Aggregationsprozesse und Abbauprozesse werden häufig durch exponierte hydrophobe Bereiche initiiert. Im Falle von RR-PhoA konnte eine Membraninsertion exponierter hydrophober Domänen Ursache der beschriebenen Effekte sein.

Wir wollten dieses Modell durch einen einfachen Versuch prüfen. Falls unsere Hypothese stimmte, so sollte es möglich sein, ungefaltete Proteine ohne hydrophobe Oberflächen Tat-abhängig über die Membran zu transportieren. Wir suchten daher ein Protein, welches ungefaltet vorliegt, in *E. coli* stabil ist, und keine hydrophoben Bereiche besitzt. Am besten schienen uns Bereiche des Proteins Nsp1 geeignet zu sein. Nsp1 bildet einen essentiellen Bestandteil der eukaryotischen Kernporen und besitzt sogenannte FxFG-Domänen, welche *naturally unfolded* sind, also nicht von sich aus zu einer definierten Struktur falten (Denning *et al.*, 2003). FxFG-Domänen wurden in der Vergangenheit stabil in *E. coli* produziert und sind vollständig hydrophil. Der größte Vorteil der FxFG-Domänen besteht aber darin, dass sie aus fast identischen Sequenzwiederholungen von 19 Aminosäuren aufgebaut sind (*FxFG-repeats*). Diese Sequenzwiederholungen ermöglichten uns die Herstellung von verschiedenen langen ungefalteten Proteinen, welche abgesehen von ihrer Länge praktisch identische Eigenschaften besitzen (R3, R5, R7, R10, R17). Die Proteine wurden N-terminal

mit dem Signalpeptid des Tat-Substrates HiPIP fusioniert, so dass ein *targeting* zum Tat-

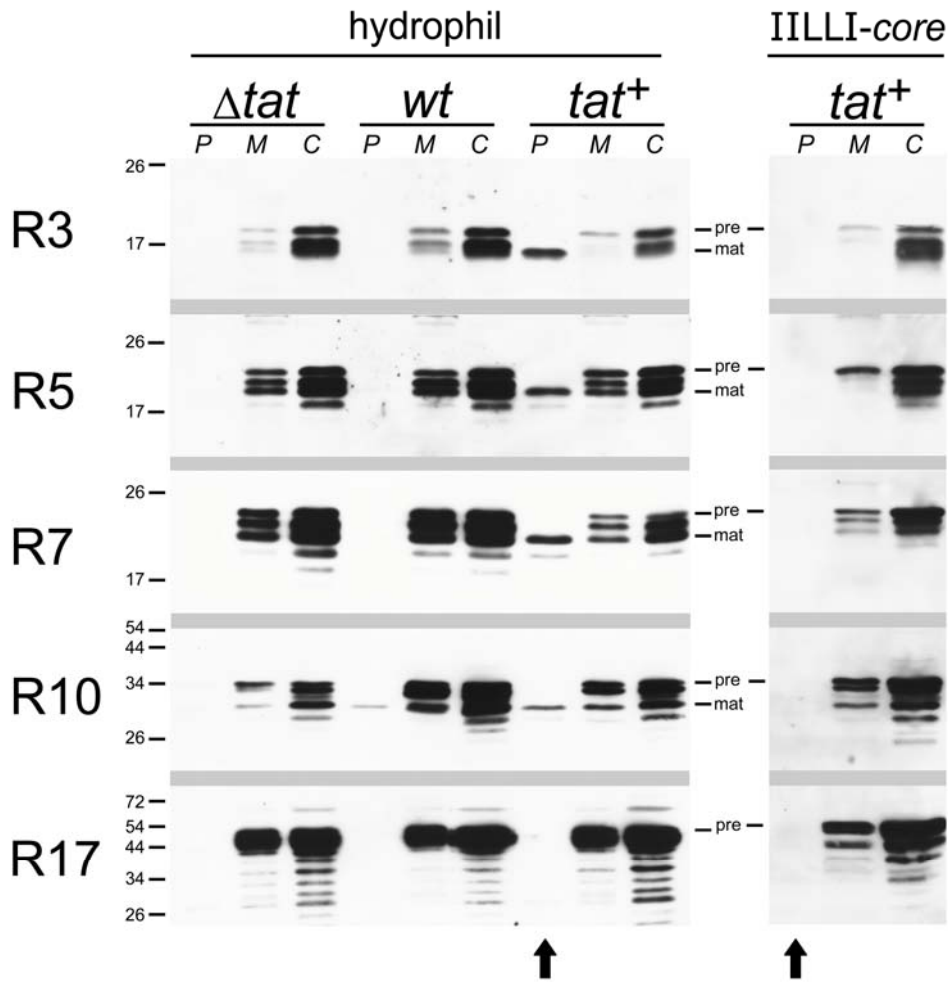


Abbildung 8: Tat-abhängiger Transport ungefalteter FxFG-*repeats* in *E. coli* und Blockade des Transportes durch Einführung von fünf hydrophoben Resten aus der *core*-Region von PhoA. Drei, fünf, sieben, zehn oder 17 FxFG *repeats* wurden an das Tat-Signalpeptid von HiPIP fusioniert und der Transport in das Periplasma wurde in einer Δ *tatABCDE*-Mutante von MC4100 (Δ *tat*), sowie in MC4100 (*wt*) und in einem Stamm mit überexprimierten *tatABC*-Genen (*tat*⁺) getestet (linke Seite; SDS-Page subzellulärer Fraktionen: P: Periplasma, M: Membran; C: Cytoplasma; Western-Blots entwickelt mit anti-His-Tag-Antikörpern). Auf der rechten Seite sind die Transportergebnisse von Derivaten mit eingeführten hydrophoben Resten (IILLI) im *tatABC*-überexprimierenden (*tat*⁺) Stamm gezeigt. Die Pfeile zeigen die Periplasmafraktionen an, wo ein Tat-Transport eindeutig zu sehen ist (links), beziehungsweise wo dieser Transport durch die Einführung hydrophober Reste unterdrückt wurde. pre: *precursor*; mat: *matures Protein*; (Richter und Brüser, Manuskript in Vorbereitung)

Signifikanter Transport benötigte eine *tatABC*-Überexpression. Diese Ergebnisse zeigen ohne Zweifel, dass das Tat-System nicht *per se* auf gefaltete Proteine beschränkt ist. Ungefaltete Proteine können Tat-abhängig transportiert werden. Es gibt daher weder eine Kontrolle des Faltungszustandes, noch – was wichtiger erscheint – eine Beschränkung auf globuläre Proteine mit limitiertem Durchmesser. Diese Aussage ist für das Verständnis des Tat-Mechanismus von besonderer Bedeutung und wird im Mechanismus-bezogenen Abschnitt der vorliegenden Habilitationsschrift noch diskutiert werden werden (→ Kapitel 2.10). Wir wollten nun verstehen, warum Proteine wie etwa PhoA nicht ungefoldet transportiert werden konnten. Auch hier war die Arbeitshypothese klar und wurde bereits erwähnt: Ungefaltete Proteine, welche normalerweise globulär falten, exponieren hydrophobe Segmente an der Oberfläche, welche im gefalteten Zustand in Innern des Proteins verborgen sind. Die Exposition der hydrophoben Reste könnte während des Tat-

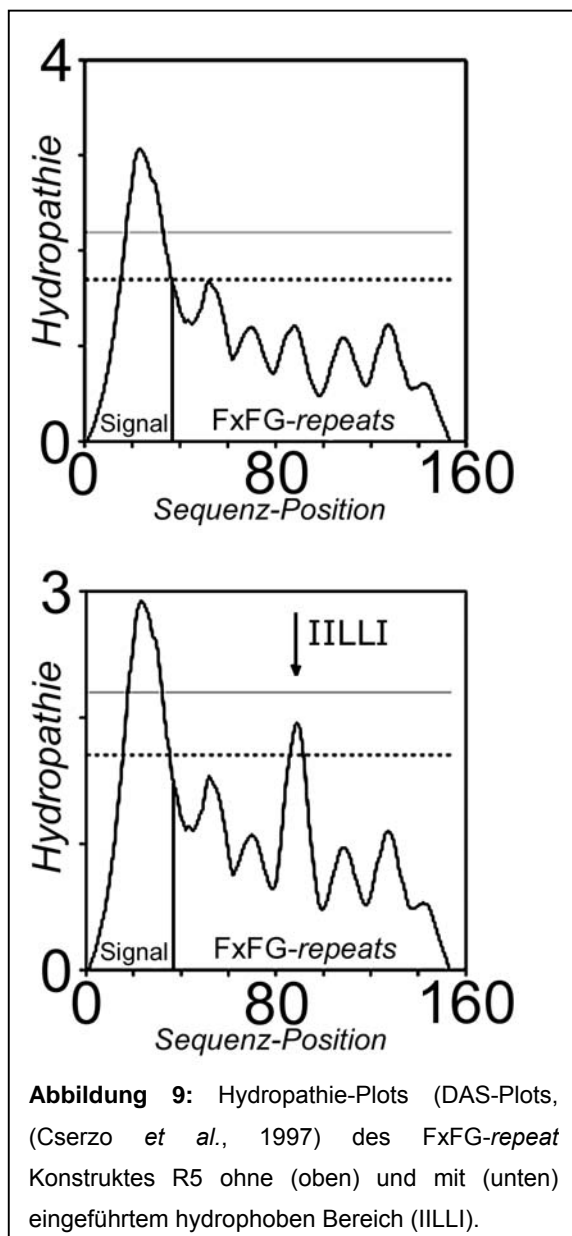


Abbildung 9: Hydrophathie-Plots (DAS-Plots, (Cserzo *et al.*, 1997) des FxFG-repeat Konstruktes R5 ohne (oben) und mit (unten) eingeführtem hydrophoben Bereich (IILLI).

abhängigen Transportes eine Interaktion des Proteins mit der Membran bewirken, die zum Entlassen des Proteins in die Membran und somit zum Abort der Translokation führen kann. Die Präsenz denaturierter Proteine in der Membran würde sich eventuell negativ auf die Funktionalität als Permeabilitätsbarriere auswirken, was eine Erklärung der oben beschriebenen Schwächung des Protonengradienten durch RR-PhoA sein könnte (Richter und Brüser, 2005).

Um diese Hypothese zu prüfen haben wir eine hydrophobe Sequenz aus dem Inneren der alkalischen Phosphatase (IILLI) in unsere ungefalteten FxFG-Tat-Substrate eingeführt. Diese hydrophobe Sequenz erhöht punktuell die Hydrophobizität in den FxFG-repeats, was in Hydrophathie-Plots anschaulich wird (**Abbildung 9**). Die Ergebnisse waren klarer als erwartet. Die eingeführten fünf hydrophoben Reste aus PhoA reichten aus, um den Transport der ungefalteten FxFG-Proteine vollständig zu blockieren (**Abbildung 8**, rechte Seite). Damit ist bewiesen, dass exponierte hydrophobe Bereiche inkompatibel mit dem

Tat-abhängigen Transport sind. Tat-Substrate müssen an ihrer Oberfläche hydrophil sein: dies ist somit die zweite Voraussetzung für den Tat-Transport. Weitere Voraussetzungen scheint es nicht zu geben. Genaue Größenbeschränkungen globulärer Tat-Substrate sind nicht bekannt und wurden nie systematisch ermittelt. Die kleinsten bekannten natürlichen Tat-Substrate sind HiPIPs mit ca. 5-10 kDa, die größten sind heterodimere Formiatdehydrogenasen mit etwa 150 kDa.

2.5 Membraninteraktion zur Vorbereitung auf die Translokon-Interaktion

In der Vergangenheit wurde häufig eine Interaktion von Tat-Substraten mit Membranen beschrieben, welche vor einer Translokation über die Membran stattfand (Asai *et al.*, 1999; Cline und Mori, 2001; Musser und Theg, 2000). Diese Membraninteraktion war unabhängig von einem *twin-arginine*-Motiv im Signalpeptid (Cline und Mori, 2001). Eine Tat-unabhängige Membraninteraktion konnten wir auch mit HiPIP beobachten (Brüser *et al.*, 2003). Die Membraninteraktion wurde durch das Signalpeptid vermittelt, wobei das *twin-arginine*-Motiv für diesen Schritt unbedeutend war. Die damaligen Ergebnisse wurden inzwischen auch mit anderen Methoden und anderen Tat-Signalpeptiden bestätigt (Shanmugham *et al.*, 2006). Die Fülle an Hinweisen auf eine Membraninteraktion von Tat-Substraten brachte mich im Jahr 2003 auf den Gedanken, dass eine Tat-unabhängige Membraninteraktion einer Translokon-Bindung vorausgehen könnte (Brüser und Sanders, 2003; Brüser *et al.*, 2003). Damals konnte aber noch nicht der Transport eines Tat-Substrates nach einer Tat-unabhängigen Membraninteraktion gezeigt werden. Dieser Nachweis bedurfte eines sehr gut funktionierenden *in vitro* Tat-Systems, wie es bis heute nur von Thylakoidmembranen bekannt ist. Tatsächlich ist es inzwischen gelungen, den Beweis für einen Tat-abhängigen Transport eines zuvor Tat-unabhängig membraninsertierten Proteins bei pflanzlichen Thylakoiden zu erbringen (Hou *et al.*, 2006).

Die konsequente Frage aus den Membraninteraktionsstudien lautet: *Warum* integriert zumindest ein Teil der Tat-Substrate in die Membran vor einer Interaktion mit dem Tat-Translokon? Zwei Gründe sind zum jetzigen Zeitpunkt denkbar: (1) Tat-Signale benötigen eine Interaktion mit der Membran, um zu einer definierten Struktur zu falten, welche durch das Tat-System erkennbar ist. (2) Tat-Substrate integrieren N-terminal in die Membran, damit sie nach einer cytoplasmatischen Faltung mit Proteasen interagieren können, welche denaturierte Proteine erkennen und diese abbauen.

Beide Erklärungen werden durch experimentelle Ergebnisse unterstützt:

(1) Bisher wurden zwei Tat-Signale strukturell untersucht. Das Tat-Signal von HiPIP haben wir mit H/D-Austauschkinetiken massenspektrometrisch und in Kooperation mit Prof. Christian Griesinger (MPI für Biochemische Chemie, Göttingen) mittels ^{15}N - ^1H -HSQC-Messungen NMR-spektroskopisch untersucht (Kipping *et al.*, 2003). Die Untersuchungen zeigten eindeutig, dass das Signalpeptid von HiPIP in Gegenwart des vollständig gefalteten

maturen Bereiches ungefaltet vorliegt. CD-spektroskopische Messungen wiesen darauf hin, dass eine Hydrophobisierung des Lösungsmittels eine Struktur im Signalpeptid von HiPIP induzieren kann. Wir haben aber eine zu weit gehende Interpretation vermieden und jene CD-Daten nur auf einem Poster, nicht jedoch in der Veröffentlichung präsentiert.

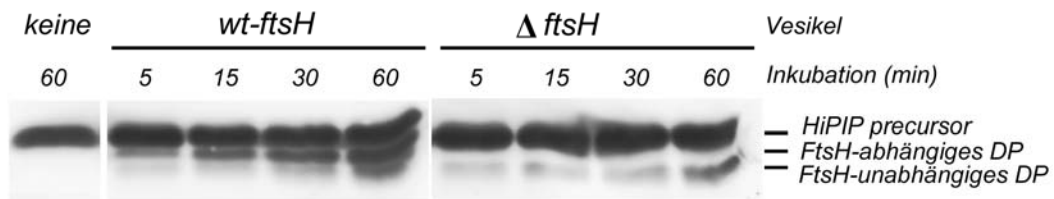
San Miguel *et al.* haben zeitgleich die Struktur des Signalpeptides von Sufl untersucht (San Miguel *et al.*, 2003). Das Signalpeptid wurde von jener Gruppe synthetisiert und ohne angehängte mature Domäne ausschließlich mittels CD-Messungen analysiert. Das Ergebnis war das gleiche wie bei HiPIP: Das Sufl-Signalpeptid lag ungefaltet in Lösung vor. Zugabe von Lösungsmitteln und Detergenzien induzierte helikale Strukturen. Dies wurde als Hinweis auf eine Strukturinduktion bei einer Membraninteraktion interpretiert.

Die strukturellen Studien an Tat-Signalen zeigen also klar, dass Tat-Signale keine geordnete Struktur besitzen, solange sie in wässriger Lösung sind. Eine Membraninsertion könnte daher durchaus eine definierte Struktur induzieren, die das *twin-arginine*-Motiv erkennbar macht. Zudem könnte eine Membraninsertion dazu beitragen, das *twin-arginine*-Motiv derart an der Membranoberfläche zu platzieren, dass es von den Komponenten des Tat-Translokons erkannt werden kann.

(2) Die Interaktion von Tat-Signalen mit der Membran könnte vor einer Tat-Translokation-Interaktion dazu genutzt werden, denaturierte Tat-Substrate zu erkennen und zu entfernen. Wie bereits ausführlich im Zusammenhang mit dem *targeting* ungefalteter Tat-Substrate geschildert, gibt es bisher keinen Beweis für eine solche Qualitätskontrolle. Unsere Arbeiten mit RR-PhoA zeigen sogar, dass eine mögliche Qualitätskontrolle - falls vorhanden - bei rekombinanten Expressionen definitiv nicht greift, also keine strikte Kopplung eines Qualitätskontrollschrittes an die Translokation besteht. Man kann aber nicht ausschließen, dass ungefaltete Tat-Substrate von Membranproteasen unter physiologischen Expressionsbedingungen abgebaut werden.

Bereits 2003 hatten wir auf die Möglichkeit einer Funktion der Membranprotease FtsH bei der Beseitigung ungefalteter Proteine hingewiesen (Brüser und Sanders, 2003). FtsH ist eine Zink-abhängige Protease der AAA-Familie (Ito und Akiyama, 2005). Man kennt sowohl lösliche als auch membrangebundene Proteine, die FtsH-abhängig abgebaut werden. Im Falle der membrangebundenen Proteine ist bekannt, dass FtsH spezifisch nicht-assemblierte Untereinheiten von Proteinkomplexen abbaut, sowie denaturierte Proteine, welche hydrophobe Bereiche an der Oberfläche der Membran exponieren (Akiyama *et al.*, 1996; Kihara *et al.*, 1995, 1999). FtsH besitzt daher für Membranproteine eine Qualitätskontrollfunktion. Sollte es so sein, dass Tat-Substrate nach ihrer Faltung in die Cytoplasmamembran integrieren, so wäre FtsH tatsächlich prädestiniert für eine Erkennung und den Abbau von denaturierten Tat-Substraten. Dies wäre dann allerdings kein zwingender Schritt auf dem Weg zum Translokon, sondern ein Vorgang, welcher von der

A (*in vitro*)



B (*in vivo*)

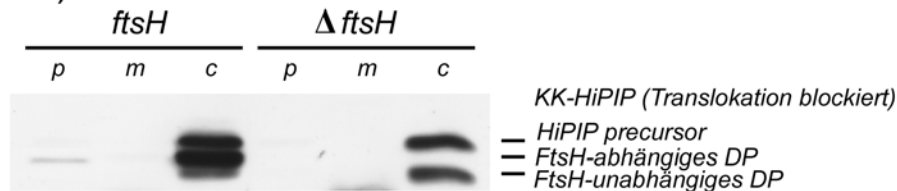


Abbildung 10: FtsH schneidet HiPIP sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. A) Kinetik der FtsH-abhängigen Prozessierung von nativem HiPIP precursor *in vitro*. Membranvesikel wurden von einem *E. coli*-Stamm mit FtsH (*wt-ftsH*) und von einem Derivat ohne FtsH (Δ *ftsH*) hergestellt und mit vollständig gefaltetem HiPIP precursor inkubiert. Nach Entfernung der Vesikel zu den angegebenen Zeiten (Ultrazentrifugation) wurden die löslichen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. HiPIP wurde mit spezifischen Antikörpern detektiert. DP: *degradation product*. B) Detektion der FtsH-abhängigen HiPIP-Abbaubande in subzellulären Fraktionen von Stämmen mit FtsH (*ftsH*, linke Seite) und ohne FtsH (Δ *ftsH*), in denen HiPIP als nicht Tat-kompatible RR>KK-Variante produziert wurde. p: Periplasma, c: Cytoplasma, m: Membran. (Richter und Brüser, Manuskript in Vorbereitung)

Häufigkeit der Interaktion der beteiligten Komponenten (FtsH, Tat-Translokation, Tat-Substrat) abhängt.

Wir haben versucht, eine mögliche Interaktion von Tat-Substraten mit FtsH mittels einer *ftsH*-Mutante nachzuweisen. Zunächst konnten wir in *in vitro*-Experimenten mit invertierten Membranvesikeln beobachten, dass eine Abbau-Bande des Tat-Substrates HiPIP von FtsH abhing (**Abbildung 10**). Es handelte sich um eine Abbaubande zwischen maturaer Größe und der vollen *precursor*-Größe, die bei Abwesenheit von FtsH in den Membranvesikeln völlig fehlte. Wir konnten diese HiPIP-Abbaubande massenspektrometrisch analysieren und fanden so heraus, dass FtsH HiPIP direkt vor dem *twin-arginine*-Motiv schneidet (\downarrow SRRDAVK). Die FtsH-abhängige Prozessierung von HiPIP konnte anschließend auch durch *in vivo*-Experimente bestätigt werden, wobei eine Blockade der Translokation bei einer *twin-lysine*-Variante von HiPIP zur Prozessierung durch FtsH führte. In dieser Variante sind beide Arginine des *twin-arginine*-Motives durch Lysine ausgetauscht, was den Tat-abhängigen Transport verhindert (Brüser *et al.*, 2003). *In vivo* und *in vitro* Experimente hatten gemeinsam, dass die FtsH-abhängige Prozessierung unter Bedingungen gezeigt werden konnte, unter denen der Transport über die Membran blockiert oder sehr ineffizient war. Bei den *in vitro*-Experimenten lag dies an den unzureichenden Bedingungen für einen effizienten

in vitro-Transport im bakteriellen Tat-System. Bei den *in vivo*-Bedingungen lag dies am Austausch der Arginine. Besonders die *in vivo*-Ergebnisse legen nahe, dass FtsH nur dann effizient Tat-Substrate angreift, wenn die Bindung an das Tat-Translokons ineffizient ist. Zwar zeigen die Experimente klar die Interaktion mit FtsH und sogar eine Unterdrückung dieser Interaktion durch einen effizienten Tat-abhängigen Transport, es bleibt aber zu zeigen, ob FtsH in der Lage ist, denaturierte Tat-Substrate vor einer Interaktion mit dem Tat-System abzubauen.

2.6 Analyse der Komponenten des Tat-Translokons

Das Tat-Translokons ist eine komplexe Maschinerie, die mit wenigen Komponenten gleichzeitig mehrere Funktionen erfüllen muss:

- (1) Das Translokons muss Tat-Substrate spezifisch erkennen und binden, bis der Transport beendet ist.
- (2) Es muss eine *Arbeit* am Tat-Substrat verrichten, also eine Kraft auf das Tat-Substrat einwirken lassen, so dass es gerichtet über die Membran bewegt wird. Dazu muss Energie in Bewegung umgewandelt werden, was einem molekularen Motor entspricht.
- (3) Das Translokons muss die Ionenundurchlässigkeit der Membran garantieren, obwohl Proteine mit deutlich verschiedenen Durchmessern und Oberflächenstrukturen transportiert werden.

Die bisherigen Erkenntnisse zum Translokons beschreiben hauptsächlich Interaktionen von Untereinheiten untereinander und mit Tat-Substraten. Mehrere Studien haben klar gezeigt, dass das Tat-Translokons zunächst über TatC die Signalpeptide im Bereich des *twin-arginine*-Motives und über TatB in der h-Region und den angrenzenden Bereichen bindet, gefolgt von einer Assoziation von TatA (Alami *et al.*, 2003; Cline und Mori, 2001; Dabney-Smith *et al.*, 2003, 2006; Gerard und Cline, 2006; Mori und Cline, 2002). Wenn TatA assembliert ist, erfolgt der eigentliche Transport.

Die Assoziation von TatA an den ternären TatBC-Substrat-Komplex ist zumindest unter *in vitro*-Bedingungen abhängig vom Protonengradienten. Bei thylakoidalem TatA (= Tha4) kann dies mit der Protonierung eines vollständig konservierten und essentiellen Glutamat-Restes im N-Terminus der Untereinheit zusammenhängen (Dabney-Smith *et al.*, 2003, 2006). Der entsprechende Rest ist bei TatA der bakteriellen Tat-Systeme nicht konserviert. Dennoch wurde auch hier eine Δ pH-Abhängigkeit der TatA-Assoziation gefunden (Alami *et al.*, 2003). Die genannten Studien entwerfen ein Bild eines *transienten Translokons*, welches für jedes Tat-Substrat erneut assemblieren muss und nach dem Transport auseinanderfällt.

Die Gene der Komponenten TatA, TatB und TatC werden in *E. coli* konstitutiv im Verhältnis 50 (TatA) : 2 (TatB) : 1 (TatC) exprimiert (Jack *et al.*, 2001). Auf Proteinebene wurde von einem 15-23-fachen Überschuss an TatA gegenüber TatB berichtet (Sargent *et al.*, 2001).

TatC ist aus mehreren Gründen besonders interessant:

- (1) TatC hat die Fähigkeit, selektiv mit *twin-arginine*-Motiven zu interagieren. TatC *erkennt* und *bindet* also die Tat-Substrate. Diese Bindung könnte von TatC als Motor des Tat-Systems zur Translokation genutzt werden (Brüser und Sanders, 2003).
- (2) TatC ist das einzige polytope Membranprotein des Tat-Komplexes und kann so das Translokon fest in der Membran verankern, auch wenn erhebliche Widerstände bei der Translokation großer globulärer Proteine überwunden werden müssen.
- (3) TatC ist die am stärksten konservierte essentielle Komponente des Tat-Systems, wohingegen bei TatA und TatB nur die N-terminalen Trans-Membran-Domänen und ein kurzer darauf folgender Abschnitt wichtig für den Transport sind.

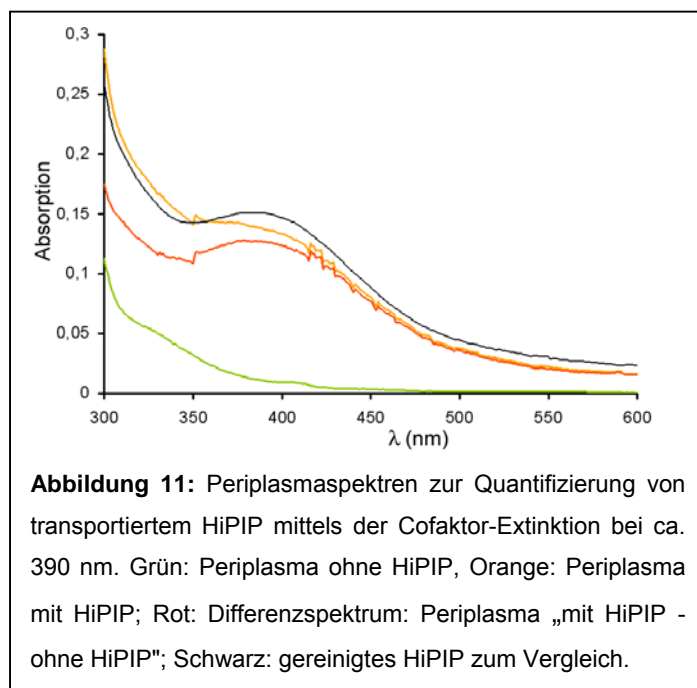
Für weitergehende Analysen der Translokon-Funktionen ist eine genaue Kenntnis der Topologie von TatC von Bedeutung. Sechs Trans-Membran-Domänen werden für TatC vorhergesagt, aber die experimentelle Analyse brachte zuerst widersprüchliche Ergebnisse: Die Arbeitsgruppe um Long-Fei Wu ermittelte mittels UidA- und PhoA-Fusionen vier Trans-Membran-Domänen für TatC (Gouffi *et al.*, 2002). Zumindest die PhoA-Fusionen stellten dabei eine anerkannte Methode zur Topologiebestimmung von Membranproteinen dar, da PhoA nur im Periplasma Disulfidbrücken ausbilden kann, welche essentiell für die Faltung und Aktivität des Enzyms sind (Manoil, 1990; Manoil *et al.*, 1990). UidA-Fusionen sind im Gegensatz zu LacZ-Fusionen nicht etabliert zum Nachweis einer cytoplasmatischen Lokalisation. Ungeachtet dessen war in jener Studie nur die dritte cytoplasmatische Domäne von TatC strittig, da sie von den damaligen Autoren in das Periplasma platziert wurde. In recht aufwendigen Experimenten mit LacZ- und PhoA-Fusionen konnten wir nachweisen, dass die strittige Domäne cytoplasmatisch lokalisiert ist. Bei den Konstrukten der Wu-Gruppe wurden die fehlerhaften Ergebnisse durch einen langen Linker zwischen Fusionsstelle und fusioniertem Markerenzym verursacht. Bei sukzessiver Verkürzung des Linkers konnten wir unsere Topologie-Ergebnisse bestätigen (Behrendt *et al.*, 2004). Unser Topologie-Modell entsprach dem vorhergesagten und wurde später auch von anderen mit einer völlig anderen Methode bestätigt (Ki *et al.*, 2004). Die von uns als cytoplasmatisch bestimmte Domäne interagiert im *Bacillus subtilis*-TatA_dC_d-System mit TatA – die cytoplasmatische Lokalisation ist also wahrscheinlich funktionell wichtig (Schreiber *et al.*, 2006).

In den letzten Jahren wurde vielfach versucht, ein Tat-Translokon zu isolieren. Dabei stellte sich die ausgeprägte Labilität der Interaktionen als erschwerend heraus. Man fand alleine bei *E. coli* 460 kDa TatA-Komplexe (Porcelli *et al.*, 2002), 600 kDa TatA-Komplexe mit sehr wenig TatB (Sargent *et al.*, 2001), variable TatA-Komplexe mit wenig TatB (Gohlke *et al.*, 2005), 600 kDa TatAB-Komplexe (Bolhuis *et al.*, 2000); Spuren von TatAB-Komplexen

unbekannter Größe (Oates *et al.*, 2005), TatABC-Komplexe von etwa 600 kDa (Bolhuis *et al.*, 2001), sowie einen TatABC-Komplex von 370 kDa (Oates *et al.*, 2005).

Unsere eigenen Arbeiten am Tat-Translokon haben uns zu einer vorsichtigen Sicht der vielen Publikationen über verschiedene Tat-Komplexe geführt. Wir sehen Interaktionsstudien nach sehr starken Überexpressionen kritisch. So wurden die Tat-Gene bei vielen Studien mittels voll induzierter T7-Promotoren überexprimiert, was zu Aggregationen und nach kurzer Zeit zum Zelltod führt. Die von uns detektierten Komplexe werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

Um Tat-Komplexe zu studieren, haben wir Expressionssysteme entwickelt, welche zu einer deutlichen Verbesserung des Tat-abhängigen Transportes *in vivo* führen, ohne eine signifikante Beeinträchtigung des Zellwachstums hervorzurufen. In Kontrollexperimenten haben wir den Transport von HiPIP unter Bedingungen einer Substratsättigung analysiert. Wird der Transport verbessert, so kann man von funktioneller Überproduktion der Tat-Komponenten ausgehen. Zur besseren Quantifizierung haben wir eine einfache Methode entwickelt, bei der UV-vis Spektren von Periplasma-Fractionen aufgenommen werden. In diesen Spektren kann man den Gehalt an HiPIP im Periplasma anhand des Extinktionskoeffizienten bestimmen (**Abbildung 11**).



Mit dieser Methode kann bei Berücksichtigung der Zellzahl auch die absolute Zahl transportierter HiPIP-Proteine pro Zelle errechnet werden. Mit unseren besten konstitutiven Expressionssystemen kommen wir so auf etwa 100.000 transportierte HiPIP-Moleküle pro Zelle. Diese Zahl mag hoch erscheinen, liegt aber deutlich niedriger als die Zahl der natürlich Sec-abhängig transportierten Moleküle in *E. coli* Zellen. Allein das Sec-Substrat OmpA wird ohne

jegliche Überexpression in gleicher Größenordnung schon von Wildtyp-Mengen des Sec-Systems transportiert (Koebnik *et al.*, 2000).

Wir konnten mit diesen HiPIP-Transportexperimenten zeigen, dass unsere *tatABCDE*-Expressionssysteme nicht nur *tatABCDE*-Deletionen komplementieren, sondern zu einer deutlichen Verbesserung des Tat-abhängigen Transportes führen. Die funktionell exprimierten *tat*-Gene ermöglichen eine einfache direkte Detektion der einzelnen Tat-

Komponenten mittels spezifischer Antikörper. Zur milden Analyse von Tat-Komplexen haben wir im Labor die Methode der *blue-native*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) etabliert. Diese Methode erlaubte uns die Detektion von Komplexen ohne Aufreinigung. Zur Solubilisierung der Membranen wurde zumeist das sehr milde Detergenz Digitonin verwendet. Andere nicht-ionische Detergenzien wie Dodecylmaltosid, Octylglucosid oder

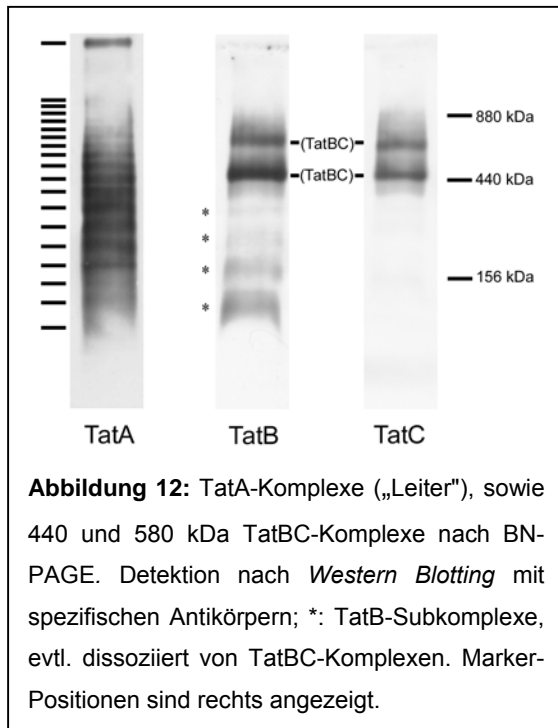


Abbildung 12: TatA-Komplexe („Leiter“), sowie 440 und 580 kDa TatBC-Komplexe nach BN-PAGE. Detektion nach *Western Blotting* mit spezifischen Antikörpern; *: TatB-Subkomplexe, evtl. dissoziiert von TatBC-Komplexen. Marker-Positionen sind rechts angezeigt.

Mega 9 (Nonanoyl-N-methylglucamid) griffen die Tat-Komplexe eher an als Digitonin. Die Analysen ergaben, dass TatA-Oligomere miteinander interagieren und so in BN-PAGE-Analysen eine „Leiter“ ausbilden, wohingegen TatB und TatC gemeinsam zwei Komplexe bilden (**Abbildung 12**): einen Komplex bei 440 kDa und einen bei 580 kDa (Richter und Brüser, 2005). Die beiden TatBC-Komplexe haben wir auch ohne Überexpression nachgewiesen, so dass wir uns sicher sind, dass sie natürlichen Komplexen entsprechen (Richter und Brüser, 2005). Die Leiter-Bildung von TatA entsprach den Erwartungen, da von TatA eine starke Tendenz zur Selbstassoziation bekannt war (de

Leeuw *et al.*, 2001; de Leeuw *et al.*, 2002). Die Präsenz zweier TatBC-Komplexe war eher unerwartet, da kurz vor unserer Publikation der BN-PAGE-Studien die Gruppe um Colin Robinson (Warwick, GB) mit der gleichen Methode nur einen 370 kDa TatBC-Komplex nachgewiesen hatte, in dem zudem TatA detektiert wurde (Oates *et al.*, 2005). Bei der Darstellung unserer Ergebnisse auf der Proteintransport-Gordon-Konferenz im Jahr 2005 stimmte Colin Robinson mit mir darin überein, dass unser 440 kDa Komplex seinem 370 kDa Komplex entspricht. Wir glauben, dass die beiden TatBC-Komplexe bei 440 und 580 kDa ineinander überführbar sind. Auffallend war, dass wir nur am 580 kDa Komplex ein gebundenes Tat-Substrat nachweisen konnten (Richter und Brüser, 2005). Es ist bisher ungeklärt, wie sich die beiden TatBC-Komplexe strukturell und funktionell unterscheiden. Die Detektion von TatA-Spuren im TatBC-Komplex der Gruppe um Colin Robinson (Oates *et al.*, 2005) beruht wahrscheinlich auf den Überexpressionsbedingungen, die zu einem Fehleinbau von TatA in die TatBC-Komplexe führen können. TatA und TatB sind sequenzverwandt (Yen *et al.*, 2002b) und einzelne Aminosäureaustausche im N-Terminus von TatA können die TatB-Funktion auf TatA übertragen und TatB unnötig machen (Blaudeck *et al.*, 2005). Es ist also nicht verwunderlich, dass nach Überexpression aller Komponenten eine Spur von TatA in TatBC-Komplexen nachweisbar sein kann. Wir konnten aber bisher mit unseren

Expressionssystemen keinerlei TatA in TatBC-Komplexen detektieren. Dies stimmt mit *crosslinking*-Daten aus dem Thylakoid-System überein, mit denen gezeigt wurde, dass TatA nur bei vorhandenem Protonengradient und gebundenem Tat-Substrat mit dem TatBC-Komplex interagiert (Mori und Cline, 2002). Bei der Solubilisierung der Membran wird jeglicher Protonengradient zerstört und somit die Assoziation von TatA mit den TatBC-Einheiten aufgehoben. Experimentell strittig ist ein Bericht über TatAB-Komplexe und eine Stabilisierung von TatBC-Komplexen durch TatA, weil darin wichtige Kontrollen fehlen, wie etwa die Kontrolle der wahrscheinlichen Beeinflussung der *tatB*-Expression in *tatAE*-Deletionsmutanten (Mangels *et al.*, 2005).

Insgesamt betrachtet weiss man trotz vieler Mutagenesen und Interaktionsstudien abgesehen von der spezifischen Erkennung der *twin-arginine*-Motive durch TatC noch erschreckend wenig von den Funktionen der einzelnen Tat-Komponenten. Weder weiss man, wie die Assemblierung von TatA zur Translokation beiträgt, noch ist bekannt, welche Rolle TatB am TatBC-Komplex spielt.

2.7 Subzelluläre Organisation des Tat-Translokons

Wir haben 2004 erstmals Komponenten des Tat-Systems mit GFP-Fusionen in einzelnen Zellen von *E. coli* lokalisiert. Dabei fiel einerseits auf, dass TatA in der Cytoplasmamembran mehr oder weniger gleichmäßig verteilt vorliegt, andererseits stellten wir für TatB-GFP eine eindeutig polare Lokalisation fest (Berthelmann und Brüser, 2004). Die gleichmäßigere Verteilung von TatA-GFP korreliert mit den beobachteten eigenständigen TatA-Komplexen, welche transient beim Transport an TatBC-Komplexe binden. Die Gruppe um Colin Robinson hat ein Jahr später die Ergebnisse reproduziert (Ray *et al.*, 2005). Auch diese Gruppe erhielt mit TatA-GFP eine gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz in der Cytoplasmamembran, wohingegen mit TatB-GFP eine starke Polarität beobachtet wurde. TatC-GFP war ähnlich verteilt wie TatA-GFP, jedoch wurde TatC-GFP nur in Spuren in TatBC-Komplexe eingebaut, so dass noch keinerlei Klarheit bezüglich der Verteilung der TatBC-Komplexe in *E. coli* geschaffen wurde. Die Gründe für die Polarität von TatB-GFP werden gegenwärtig in meiner Arbeitsgruppe intensiv mit einer großen Bandbreite alternativer Methoden beforscht, was hoffentlich bald zur Aufklärung des verantwortlichen *sorting*-Mechanismus führen wird.

2.8 YcdB - Das erste Tat-Substrat mit Häm-Cofaktor

Der Transport von Tat-Substraten ist energetisch sehr aufwendig. Man berechnete für das Tat-System der Thylakoiden einen Verbrauch von etwa 80.000 Protonen pro transportiertes Protein (Alder und Theg, 2003b). Es ist daher nicht verwunderlich, dass Organismen möglichst das billigere Sec-System für den Transport von Proteinen benutzen. Bisher gibt es

bei Bakterien zwei bekannte Gründe für einen notwendigen Tat-abhängigen Transport: (1) eine notwendige Heterodimerisierung vor dem Transport (Rodrigue *et al.*, 1999) und (2) einen notwendigen cytoplasmatischen Cofaktor-Einbau (Halbig *et al.*, 1999b; Santini *et al.*, 1998). Bei extrem-halophilen Archaea fanden wir einen wahrscheinlichen dritten Grund für den Tat-Transport: eine notwendige cytoplasmatische Faltung in einer Umwelt, bei der Proteine außerhalb der Zelle nur sehr schlecht falten können (Rose *et al.*, 2002). Es gibt aber eine Anzahl von vorhergesagten Tat-Substraten, deren Tat-Abhängigkeit völlig unverstanden ist. Es ist durchaus wahrscheinlich, bei der Untersuchung dieser putativen Tat-Substrate neue Gründe für einen Tat-abhängigen Transport zu finden. Wir haben daher zwei postulierte Tat-Substrate näher untersucht, YcdO und YcdB. Die Gene beider Proteine sind wahrscheinlich in einem Operon gemeinsam mit dem Gen eines putativen Eisen^{II/III}-Transporters (beide Oxidationszustände wurden für den Transport postuliert) der Ftr1-Familie lokalisiert (McHugh *et al.*, 2003).

Während YcdO zwar periplasmatisch war, aber nicht Tat-abhängig transportiert wurde, konnten wir bei YcdB einen eindeutigen Tat-abhängigen Transport nachweisen (Sturm *et al.*, 2006). Wir haben daraufhin YcdB gereinigt und festgestellt, dass das gereinigte Protein intensiv rotbraun gefärbt war. UV-vis-spektroskopische Analysen haben dann gezeigt, dass YcdB einen Häm-Cofaktor besitzt. Der Cofaktor kann durch Dithionit nur langsam reduziert werden und bindet im reduzierten Zustand Kohlenmonoxid. Das Differenzspektrum zeigte, dass der Cofaktor ein *high-spin*-Eisen-Porphyrinsystem sein musste. Mittels Massenspektrometrie konnten wir den Cofaktor als Eisen-Protoporphyrin IX identifizieren. Isoliert wird YcdB im Fe^{III} Redoxzustand. Wir konnten im isolierten YcdB auch Anteile eines Addukt-Spektrums nachweisen, welches sich als H₂O₂-Addukt-Spektrum herausstellte. Wir fanden daraufhin, dass YcdB eine Peroxidaseaktivität besitzt, die besonders gut mit dem künstlichen Elektronendonator Dianisidin messbar ist (Sturm *et al.*, 2006).

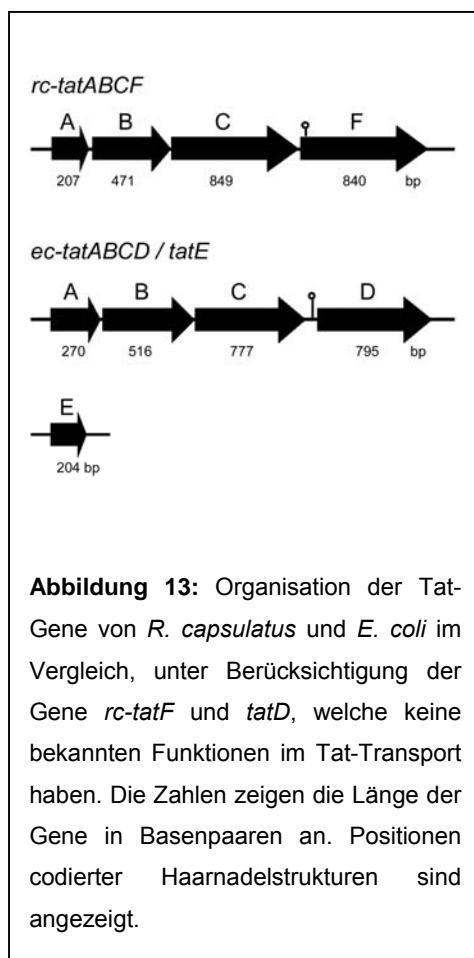
Wir konnten mit Hilfe einer Peroxidase-Färbung in nativen Polyacrylamidgelen nachweisen, dass der Häm-Cofaktor bereits im Cytoplasma assemblieren kann. Diese Assemblierung findet bereits am *precursor* von YcdB statt (Sturm *et al.*, 2006). Dies war nicht selbstverständlich, weil im Cytoplasma in signifikanter Menge eine proteolytische Prozessierung des Signalpeptides beobachtet wurde. Wir mussten also einen Weg finden, um zwischen *precursor* und maturem YcdB zu differenzieren, was uns mit nativen Gelen gelang.

Die zentrale Frage, die sich uns seit dieser Entdeckung des ersten Häm-haltigen Tat-Substrates stellt, ist: warum wird YcdB Tat-abhängig transportiert? Man kennt von *c*-Typ-Cytochromen den periplasmatischen Häm-Einbau (Thöny-Meyer, 2002) und wenige Studien mit *b*-Typ-Cytochromen zeigen, dass auch nicht-covalenter Häm-Einbau im Periplasma effizient möglich ist (Goldman *et al.*, 1996; Throne-Holst *et al.*, 1997). Häm-Einbau *per se*

sollte also nicht ein Grund für einen Tat-abhängigen Transport sein. Wir haben verschiedene Ideen zur Erklärung des Tat-abhängigen Transportes von YcdB und sind gegenwärtig dabei, die wahren Gründe aufzuklären. So könnte es sein, dass das oxidative Milieu im Periplasma die Faltung etwa durch unerwünschte Disulfidbrückenbildung behindert (Collet und Bardwell, 2002) oder dass der Häm-Cofaktor unter aeroben Bedingungen nicht im Periplasma für einen Einbau zur Verfügung steht. Auch ein Bedarf an cytoplasmatischen Chaperonen für die Faltung ist nicht auszuschließen.

2.9 Heterologe Tat-Translokons

Die Frage nach der Anpassung von Tat-Translokons an die spezifischen Substrate eines Organismus flammt immer wieder auf und wurde bisher nicht abschließend geklärt. Einzelne Tat-Substrate wurden getestet, wobei die Ergebnisse kein einheitliches Bild ergaben. So wird unser Modell-Tat-Substrat HiPIP aus *Allochromatium vinosum* in *Escherichia coli* problemlos transportiert. Bei geringer Expressionsrate mit *low copy* Plasmiden wurde dabei sogar ein vollständiger Transport beobachtet (Brüser *et al.*, 2003). Auch die Tap Phosphatase von *Thermus thermophilus* ist kompatibel mit dem *E. coli* Tat-System (Angelini *et al.*, 2001), sowie die Phospholipase PlcH von *Pseudomonas aeruginosa* (Snyder *et al.*, 2006). Die



TMAO-Reduktase TorA aus *E. coli* ist kompatibel mit den Tat-Systemen von *Salmonella typhimurium* und *Agrobacterium tumefaciens* (Oates *et al.*, 2003). Es werden jedoch nicht alle Tat-Substrate von allen Tat-Systemen transportiert. Die Glucose:Fructose Oxidoreduktase (GFOR) von *Zymomonas mobilis* wurde in *E. coli* nur nach Austausch des Signalpeptides durch ein Signalpeptid aus *E. coli* transportiert (Blaudeck *et al.*, 2001) und eine *Bacillus subtilis* PhoD-LacZ Fusion konnte in *E. coli* nur durch ein PhoD-spezifisches Translokons aus *B. subtilis* transportiert werden (Pop *et al.*, 2002).

Wir haben die Translokons-Substrat-Kompatibilität mit Hilfe eines vollständigen Translokons-Transfers aus *Rhodobacter capsulatus* in *Escherichia coli* analysiert (Lindenstrauss und Brüser, eingereicht). Alle *tat*-Gene von *R. capsulatus* sind in einem *rc-tatABCF*-Operon organisiert, welches dem *tatABCD*-Operon von *E. coli* ähnelt, wobei aber *tatD* und *rc-tatF* keinerlei

Sequenzähnlichkeiten zeigen (**Abbildung 13**). Das Gen *rc-tatF* überlappt in vier Nukleotiden mit dem Gen *rc-tatC*, so dass eine Translationskopplung sehr wahrscheinlich ist. Die gleiche Überlappung findet sich bei den Genen *rc-tatB* und *rc-tatC*. Da *rc-tatF* im *R. capsulatus* *tat*-Operon an einer ähnlichen Position wie *tatD* im *E. coli* *tat*-Operon lokalisiert ist, haben wir *rc-TatF* mit einem C-terminalen Hexahistidin-Tag nach rekombinanter Expression in *E. coli* mittels Affinitätschromatographie und anschließender Gelfiltration gereinigt und konnten nachweisen, dass es keine TatD-typische Nukleaseaktivität besitzt.

Das *rc-tatABCF*-Operon komplementiert in *E. coli* eine Reihe von Δ *tat*-Phänotypen.

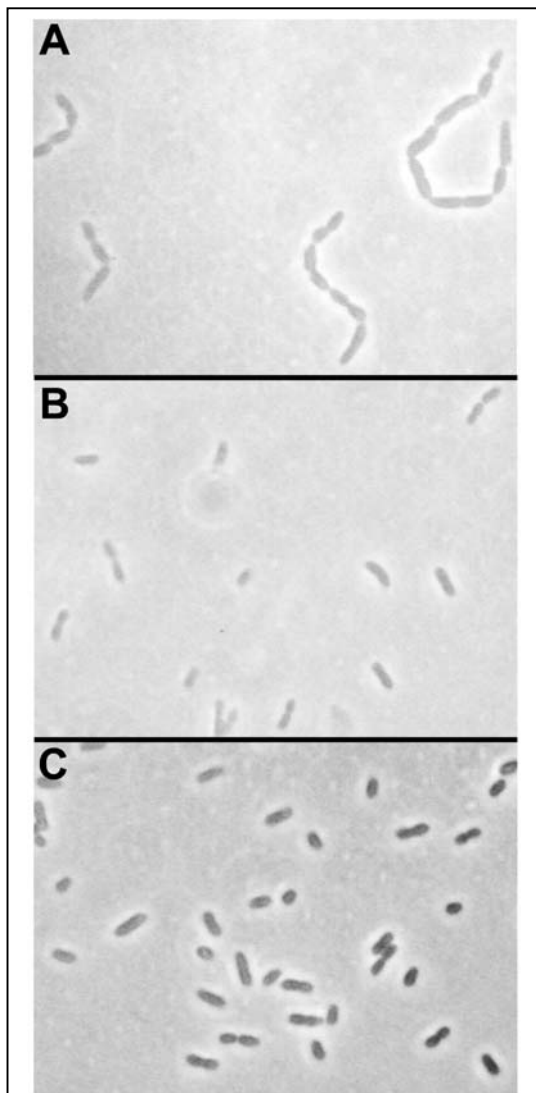


Abbildung 14: Aufhebung des Kettenphänotyps durch das Tat-System von *R. capsulatus*. Phasenkontrastaufnahmen von *E. coli*-Stämmen ohne Tat-System (A), mit einem rekombinanten *E. coli* TatABC-System (B), oder mit einem rekombinanten *R. capsulatus* TatABCF-System (C).

Beispielhaft sei hier gezeigt, dass die Zellen keine Ketten mehr ausbilden (**Abbildung 14**). Der Kettenphänotyp von Tat-Mutanten beruht auf der Tat-Abhängigkeit des Transportes der Amidasen AmiA und AmiC, die bei der Auflösung des Murein-Septums am Ende von Zellteilungen eine wichtige Rolle spielen (Bernhardt und de Boer, 2003; Heidrich *et al.*, 2001; Ize *et al.*, 2003). Auch der Phänotyp der SDS-Empfindlichkeit, der auf noch nicht bekannte Weise ebenfalls mit den Tat-Substraten AmiA und AmiC zusammenhängt (Ize *et al.*, 2003), wird vollständig komplementiert.

Ein physiologischer Funktionalitätstest für das Tat-System ist das Wachstum mit TMAO-Atmung (Berthelmann und Brüser, 2004). Die TMAO-Reduktase TorA muss Tat-abhängig transportiert werden, so dass anaerobes Wachstum mit dem nicht fermentierbaren Glycerin als Kohlenstoff-Quelle und mit TMAO als terminalen Elektronenakzeptor ein funktionierendes Tat-System anzeigt. Das Tat-System von *R. capsulatus* erlaubt ein effizientes TMAO-Wachstum, wobei der Transport von aktiver TMAO-Reduktase auch biochemisch durch Aktivitätsfärbung von nativen Gelen nach subzellulären Fraktionierungen nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 15 A/B**). Die Komponente *rc-TatF* wird für die Translokationsfunktion nicht benötigt. Sehr

interessant ist, dass die DMSO-Reduktase DmsA nicht vom *R. capsulatus* Tat-System in die Cytoplasmamembran eingebaut wird, so wie es das *E. coli* Tat-System vermag (**Abbildung 15 C/D**). Offensichtlich gibt es hier einen Spezialfall einer Inkompatibilität mit einem besonderen Tat-Substrat, welches in *R. capsulatus* nicht ähnlich vorkommt. In der Tat gibt es in *R. capsulatus* kein MPT-Mo-haltiges fest membrangebundenes Tat-Substrat wie DmsA. *R. capsulatus* besitzt zwar eine DMSO-Reduktase, DorA, jedoch ist diese nicht mit DmsA verwandt, sondern gehört - vielleicht nicht zufällig - zur Familie des gut transportierten TorA. Wir folgern aus unseren Translokon-Austausch-Experimenten, dass Tat-Substrate normalerweise auch von Tat-Translokons anderer Spezies transportiert werden. Ausnahmen existieren aber, die besondere Anpassungen von Tat-Systemen an einzelne Tat-Substrate widerspiegeln.

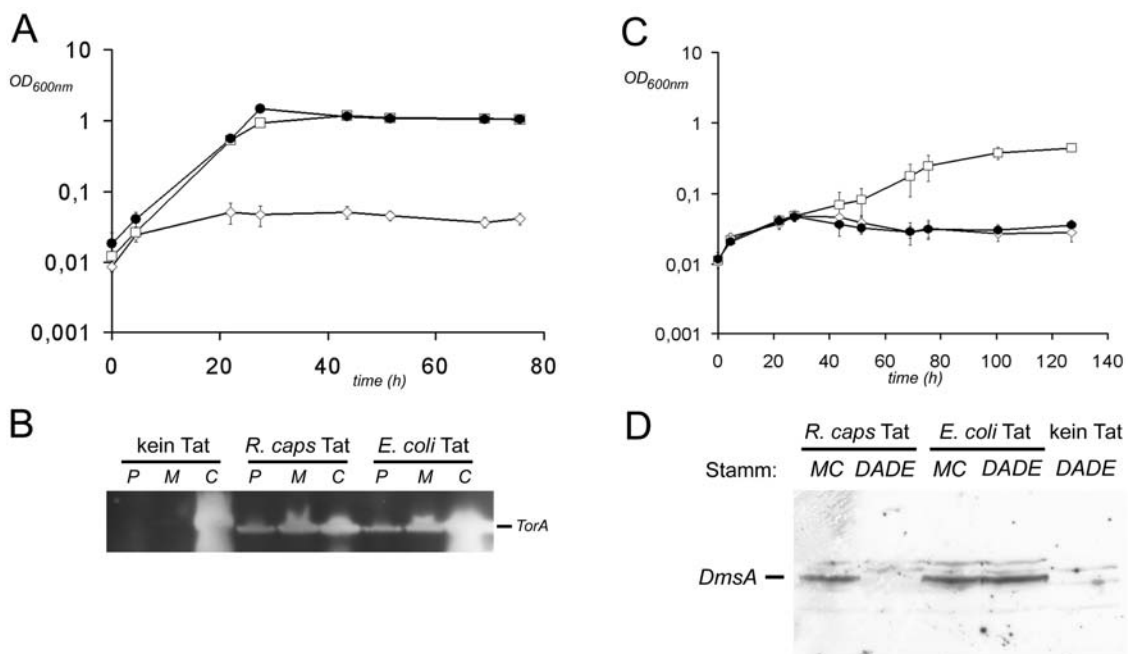


Abbildung 15: Physiologische und biochemische Analysen des Transportes von TorA und DmsA. A) Wachstum durch TMAO-Atmung bei einem *E. coli* *tatABCDE*-Deletionsstammes mit rekombinantem *E. coli* Tat-System (weiße Quadrate, Positivkontrolle), mit rekombinantem *R. capsulatus* Tat-System (schwarze Punkte) und ohne Tat-System (weiße Karos, Negativkontrolle). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung bei drei Kulturen an. B) Nachweis der TorA-Aktivität im Periplasma und in der Membranfraktion des *E. coli* *tatABCDE*-Deletionsstammes nach Komplementation mit den Genen der Tat-Systeme aus *R. capsulatus* und *E. coli* (Positivkontrolle). Der Leervektor komplementiert nicht (kein Tat: Negativkontrolle). P: Periplasma; M: Membranen; C: Cytoplasma. C) Wachstum durch DMSO-Atmung bei einem *E. coli* *tatABCDE*-Deletionsstammes mit rekombinantem *E. coli* Tat-System (weiße Quadrate, Positivkontrolle), mit rekombinantem *R. capsulatus* Tat-System (schwarze Punkte) und ohne Tat-System (weiße Karos, Negativkontrolle). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung bei drei Kulturen an. D) Nachweis von DmsA in den Membranen von *E. coli* MC4100 (mit eigenem Tat-System) und dem Stamm DADE (= MC4100 Δ *tatABCDE*) mit zusätzlichen rekombinanten Tat-Systemen aus *R. capsulatus* oder *E. coli*. Negativkontrolle: Leervektor ohne *tat*-Gene im DADE-Stamm. (Lindenstraus und Brüser, eingereicht)

2.10 Modelle des Tat-Transportes

Das größte Ziel der Tat-Forschung ist sicherlich die Aufklärung des Transportmechanismus. Zu dieser Frage habe ich zu Beginn meiner Arbeit in Halle gemeinsam mit Carsten Sanders ein Modell entwickelt, welches in leicht modifizierter Form bis heute Bestand hat und in diesem Abschnitt noch näher erläutert wird (Brüser und Sanders, 2003). Modelle zum Mechanismus des Tat-Transportes sollten über eine Beschreibung der Interaktionen hinausgehen und insbesondere eine Vorstellung zur Energetisierung und prinzipiellen Ermöglichung des Transportes entwickeln.

Während 2003 noch nicht angezweifelt wurde, dass der Tat-Transport ausschließlich vom Protonengradienten an energetisierten Membranen angetrieben wird, hat in den letzten Jahren ein Umdenken eingesetzt. Am Anfang des Zweifels an der Energetisierung durch den pH-Gradienten standen *in vivo* Studien mit *Chlamydomonas reinhardtii*, welche zeigten, dass das thylakoidale Tat-System auch ohne einen signifikanten pH-Gradienten funktioniert (Finazzi *et al.*, 2003). Die vorherige Annahme der alleinigen Abhängigkeit des Transportes vom pH-Gradienten stützte sich in erster Linie auf *in vitro*-Transportexperimente, bei denen der Transport eindeutig vom pH-Gradienten abhing (Alami *et al.*, 2002; Alder und Theg, 2003b; Brock *et al.*, 1995; Klösgen *et al.*, 1992). Ursprünglich wurde dabei formuliert, dass der pH-Gradient die für die Energetisierung des Tat-Transports dominante Komponente der *proton motif force* (PMF; $\Delta\mu_{H^+}$) sei (Klösgen *et al.*, 1992). Inzwischen wird genau diese Sicht der Energetisierung von den meisten Gruppen geteilt. Die PMF berechnet sich additiv aus dem pH-Gradienten (ΔpH) und dem elektrischen Membranpotential ($\Delta\Psi$) unter Einbeziehung einiger physikalischer Konstanten ($\text{PMF} = 2.3RT\Delta\text{pH} + F\Delta\Psi$; R: Gaskonstante, T: Temperatur, F: Faradaykonstante). Bei *in vitro*-Systemen - selbst bei *in organello* Systemen - scheint der pH-Gradient die dominante Komponente der PMF zu sein. Bei *in vivo* Situationen soll aber eine Energetisierung auch alleine durch das elektrische Membranpotential $\Delta\Psi$ den Transport antreiben können (Theg *et al.*, 2005). Die einzige experimentelle Veröffentlichung dazu ist bisher die oben genannte *Chlamydomonas*-Studie, so dass noch eine gewisse Vorsicht bei der Akzeptanz dieser These vorherrscht (Finazzi *et al.*, 2003). Nur in einem Review findet sich ein Hinweis auf eine experimentelle Bestätigung des Finazzi-Artikels: „*Preliminary data suggest that the E. coli Tat-pathway can also be powered by the electrochemical potential (I. Lüke and M. Müller, unpublished results)*“ (Müller, 2005). Für die ersten Schritte der Translokation, besonders für die Membranassoziation des Substrates vor dem eigentlichen Transport, ist kein Membranpotential notwendig (Di Cola *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2006).

Diese unerwartete Wendung im Verständnis der Energetisierung des Tat-Transportes hat ganz entscheidende Konsequenzen: Es gibt eventuell keinerlei definierten Protonenfluss durch das Tat-Translokation, welcher eine Konformationsänderung des Translokons antreibt. Sicherlich werden Protonen im Rahmen des Transportes über die Membran geleitet. Wenn ein Transport aber keinen direkten Antrieb durch Protonierungen und Deprotonierungen am Translokation benötigt, so muss es das Membranpotential $\Delta\Psi$ sein, welches den Transport antreibt. Es kann nicht je nach Anteil an der PMF mal der pH-Gradient und mal das Membranpotential genutzt werden. Dies würde implizieren, dass das Translokation mehr als *einen* Mechanismus nutzt, was sehr unwahrscheinlich ist.

Eine Lösung der Frage nach dem Protonenverbrauch könnte sein, dass der Protonengradient in vielen Fällen einen signifikanten Beitrag zum $\Delta\Psi$ liefert. Beim Transport kann wahrscheinlich das transiente Strömen großer Mengen von Protonen nicht verhindert werden, was zu der gemessenen Zahl von 80.000 Protonen / transportiertes Protein führen kann (Alder und Theg, 2003b). Dies bedeutet aber nicht zwingend, dass Protonen direkt für den Transport genutzt werden.

Falls ein Protonentransport die Translokation direkt antreibt, so sollte man protonierbare konservierte Reste in den Trans-Membran-Domänen von Tat-Komponenten finden. In der Trans-Membran-Domäne von TatA gibt es keine protonierbaren Reste, bei TatB gibt es ein konserviertes Glutamat (E8), dessen Austausch durch Alanin aber keinen Effekt auf die Aktivität hat (Hicks *et al.*, 2003), und bei TatC gibt es wie bei TatA ebenfalls keine streng konservierten protonierbaren Reste in Trans-Membran-Domänen. Diese Fakten sprechen gegen einen protonierungsabhängigen Translokationsmechanismus. Sind andere konservierte Reste wichtig für den Tat-abhängigen Transport? Wir sind nicht die ersten, die diese Frage stellen. Konservierte Reste von TatA, TatB und TatC wurden in einer ganzen Reihe von Studien der Gruppen von Colin Robinson (Allen *et al.*, 2002; Barrett *et al.*, 2003; Barrett *et al.*, 2005; Barrett und Robinson, 2005), Tracy Palmer und Ben Berks (Buchanan *et al.*, 2002; Hicks *et al.*, 2003; Hicks *et al.*, 2005; McDevitt *et al.*, 2005) und Ken Cline (Dabney-Smith *et al.*, 2003, 2006) untersucht. Die Arbeiten von Colin Robinson und Tracy Palmer / Ben Berks befassten sich mit den *E. coli* Tat-Komponenten, wohingegen Ken Cline das Thylakoid-System analysierte. Der laut Tracy Palmer einzige wirklich essentielle Rest der konservierten Positionen in TatC ist E103. E103A, E103R und sogar der konservative E103D-Austausch soll den Tat-Transport vollständig blockieren (Buchanan *et al.*, 2002). Nur beim E103Q-Austausch war ein sehr schwaches anaerobes Wachstum auf Glycerin/TMAO zu beobachten, was einen geringen Transport von TorA in diesem Austausch indiziert. Sollte E103 wichtig für einen Protonen-Antiport sein? Die Bedeutung von E103 konnte von der Gruppe von Colin Robinson nicht bestätigt werden, so dass die Datenlage strittig war (Allen *et al.*, 2002; Barrett und Robinson, 2005). Wir haben daher E103 ausgetauscht (E103A,

E103Q, E103T) und bei allen drei Austausch in physiologischen Tests keine Blockierung des Tat-abhängigen Transportes von TorA, AmiA und AmiC festgestellt (Behrendt und Brüser, Manuskript in Vorbereitung). Offensichtlich ist der konservierte Rest E103 von TatC ohne essentielle Bedeutung.

Diese Daten weisen gemeinsam mit den Sequenzanalysen und den bekannten Arbeiten an TatABC darauf hin, dass ein protonierungsabhängiger Tat-Mechanismus unwahrscheinlich ist. Eine ΔpH -Abhängigkeit wurde auch für die Assoziation von TatA an den TatBC/Tat-Substrat-Komplex beschrieben (Alami *et al.*, 2003; Dabney-Smith *et al.*, 2003, 2006; Mori und Cline, 2002). Im Unterschied zum *E. coli* System könnte dies beim thylakoidalen System auf eine ΔpH -abhängige Protonierung eines streng konservierten Glutamates in der Trans-Membran-Domäne zurückzuführen sein (Fincher *et al.*, 2003). In den TatA-Komponenten der TatABC-Tat-Systeme der Proteobacteria befindet sich kein geladener Rest an dieser Position. Da aber auch hier eine ΔpH -Abhängigkeit der Komplexbildung beobachtet wurde, könnte eine Substrat-induzierte und ΔpH -abhängige Protonierungsreaktion am TatBC-Komplex die TatA-Bindung induzieren. Auch ein $\Delta\Psi$ -abhängiger Mechanismus der TatA-Assoziation wäre denkbar, etwa nach $\Delta\Psi$ -abhängigen Konformationsänderungen im Zuge der Substratbindung an TatC.

Der Tat-abhängige Transport über die Membran muss mit großen Konformationsänderungen des Translokons einhergehen. Unsere 440 kDa und 580 kDa TatBC-Komplexe könnten zwei stabile Konformationen des gleichen Komplexes darstellen. Auch eine beobachtete Kooperativität des Tat-Transportes ließe sich am besten mit einem großen, den TatBC-Komplex beinhaltenden Translokon mit mehreren Bindestellen für Tat-Substrate erklären (Alder und Theg, 2003a). Sehr ungewöhnliche Topologiestudien mit *E. coli* TatA bilden die Basis für eine in eine andere Richtung laufende Hypothese: Gouffi *et al.* postulierten bei TatA zwei verschiedene Topologien, welche eventuell in einem natürlichen Gleichgewicht vorliegen oder während des Transportes angenommen werden können (Gouffi *et al.*, 2004). Diese Hypothese beruht auf Topologiebestimmungen mit Markerenzym-Fusionen, genauer mit PhoA-Fusionen als periplasmatischen Marker und mit UidA-Fusionen als cytoplasmatischen Marker. Wie bereits bei der inkorrekten Topologie von TatC (Gouffi *et al.*, 2002) wurden bei jenen Studien wieder lange Linkersequenzen an den Fusionsstellen genutzt. Zudem ist UidA kein etablierter Marker für eine cytoplasmatische Lokalisation. In jener Studie waren PhoA- und UidA-Fusionen im C-terminalen Bereich von TatA aktiv, was sowohl eine periplasmatische als auch eine cytoplasmatische Lokalisation des C-Terminus implizierte. TatA könnte also zwei Trans-Membran-Domänen besitzen, wobei eine die vorhergesagte N-terminale Trans-Membran-Helix wäre und die andere eine membraninsertierte amphipathische Helix (Sargent *et al.*, 2006). Diese *dual topology* von TatA ist aus zwei Gründen attraktiv: Sie lokalisiert einen funktionell wichtigen Bereich von

TatA transient in die Membran, was impliziert, dass eine transiente Membraninsertion wichtig für den Transportmechanismus sein könnte (Gouffi *et al.*, 2004; Sargent *et al.*, 2006). Zudem platziert sie einen streng konservierten negativen Rest in die Membran, D31, der offensichtlich essentiell für den Tat-abhängigen Transport ist (Hicks *et al.*, 2005; Sargent *et al.*, 2006). Die bisher immer noch rein hypothetische TatA-Struktur mit zwei Trans-Membran-Domänen wurde kurzerhand *hairpin*-Struktur genannt und interessant klingende Vermutungen wurden entwickelt: TatA-Ringe in dieser *hairpin*-Konformation könnten eine ATP-Synthase-analoge, durch Protonierung angetriebene Drehung durchführen (Sargent *et al.*, 2006). Alternativ dazu wurde von den gleichen Autoren ein Modell mit gedeckelten alleine aus TatA bestehenden Poren vorgeschlagen (Gohlke *et al.*, 2005), sowie ein Modell von transient in die Membran insertierenden amphipathischen Helices von TatA, was das Ergebnis mit den PhoA-Fusionen erklären könnte (Sargent *et al.*, 2006). Als Argument wurde eine Monolayer-Interaktion von TatA ohne N-terminale Trans-Membran-Helix angeführt (Porcelli *et al.*, 2002). Bei jenen Experimenten fehlte allerdings die Kontrolle einer Membraninteraktionsmessung von TatA ohne amphipathischer Helix. Auffallend ist, dass in TatA Protease-Zugänglichkeitstests mit Sphaeroplasten der C-Terminus von TatA nicht angegriffen wurde, was damals eine mit allen nötigen Kontrollen durchgeführte klare biochemische Evidenz für eine cytoplasmatische Lokalisation der C-terminalen Domäne von TatA war (Porcelli *et al.*, 2002).

Man weiss also bisher noch nicht, (1) ob die postulierte amphipathische Helix *in vivo* mit der Membran interagiert, (2) ob die postulierte amphipathische Helix überhaupt als solche existiert, oder gar (3) ob die *dual topology* von TatA korrekt ist. Die Modelle des kreisenden TatA-Translokationsmotors, der transienten *hairpin*-Struktur oder der gedeckelten TatA-Poren der kooperierenden Gruppen um Berks, Palmer und Sargent haben eines gemeinsam: In jedem Falle werden dabei Tat-Substrate nach ihrer Bindung an TatBC auf einen TatA-Komplex übertragen, der dann die Translokation bewerkstelligt. Ein solcher *hand-over*-Mechanismus wird durch keinerlei Daten untermauert. Im Gegenteil:

- Ein *hand-over*-Mechanismus würde bedingen, dass TatA ein Tat-Substrat losgelöst von TatC und TatB binden kann. Dies wurde nie gezeigt. Stattdessen wurde gezeigt, dass kovalent an TatC gekoppelte Tat-Substrate effizient transportiert werden können (Gerard und Cline, 2006). Offensichtlich bewirkt die Bindung des Signalpeptides an TatC keine Hinderung für den Transport, was gegen einen *hand-over*-Mechanismus spricht.
- Für die volle Funktion von TatA sind nur etwa 49 N-terminale Reste ausreichend, also der Membrananker und zusätzliche 29 Aminosäuren (Lee *et al.*, 2002). Es ist sehr unwahrscheinlich, dass dieses Peptid neben der bewiesenen Interaktion mit dem TatBC-Tat Substrat-Komplex noch zusätzlich eigenständig Tat-Substrate spezifisch binden kann und den Transport alleine energetisieren kann.

- Von TatA ist im Unterschied zu TatBC bisher kein definierter Komplex bekannt, sondern eine sehr große Zahl von Komplexen aus Assoziationen von Tri- oder Tetrameren (Oates *et al.*, 2005). TatA Porenstrukturen, welche mittels *single-particle*-Analysen erhalten wurden, sind von geringer Auflösung (Gohlke *et al.*, 2005; Sargent *et al.*, 2001). Flexible Bereiche werden bei der Analyse herausgemittelt, was die Porenstruktur erklären kann, da der C-Terminus von TatA unstrukturiert sein soll (Porcelli *et al.*, 2002).
- Es wurde im bakteriellen Tat-System festgestellt, dass Tat-Substrat-Signalpeptide schwach mit TatA interagieren (Alami *et al.*, 2003). Die Interaktionen mit TatB waren gleichzeitig weitaus stärker als die Interaktionen mit TatA. Im Thylakoid-System wurde sogar keinerlei Interaktion mit TatA festgestellt (Gerard und Cline, 2006). Die TatA-Interaktion im bakteriellen System sind wahrscheinlich auf eine geringe expressionsbedingte Einfügung von TatA an die Stelle von TatB zurückzuführen, da in jenen Studien sehr starke induzierbare *tatABC*-Überexpressionssysteme genutzt wurden. Es ist bekannt, dass rekombinantes TatA im geringen Umfang TatB ersetzen kann (Blaudeck *et al.*, 2005).

Ein plausibles Modell für den Tat-abhängigen Transport muss die wichtigsten Funktionen erklären und muss insbesondere von folgenden Fakten ausgehen:

- Das *twin-arginine* Motiv der Tat-Substrate wird von TatC erkannt.
- TatA bindet am TatBC/Tat-Substrat-Komplex und ermöglicht dadurch den Transport.
- Das Tat-Signal muss nicht TatC verlassen um transportiert zu werden.
- Das Tat-Translokon transloziert nur Substrate mit polaren Oberflächen.
- Die Translokation wird von der PMF energetisiert.

Das von uns entwickelte *membrane weakening and pulling*-Modell erklärt den Tat-abhängigen Transport folgendermaßen (Brüser und Sanders, 2003):

1. Durch eine N-terminale Membraninteraktion taucht das Signalpeptid tief in die Membran ein und positioniert das *twin-arginine*-Motiv an der Membranoberfläche, wo es durch TatC erkannt und fest gebunden wird.
2. Diese Bindung induziert eine Konformationsänderung, welche viele Kopien von TatA an den TatBC/Tat-Substrat-Komplex assemblieren lässt.
3. Punktuell wird die Membran von den vielen TatA- und TatB-Untereinheiten geschwächt, weil TatA und TatB einzelne Membrandurchgänge besitzen, die sehr flexibel sind und durch die punktuelle Assoziation in Bereich des Tat-Substrates gehalten werden. Die Schwächung der Membran könnte bei der lokalen Anhäufung von TatA-Komponenten auch durch eine spontane Membraninsertion von amphipathischen Helices gesteigert werden.

4. TatC führt induziert durch die TatA-Assemblierung eine Konformationsänderung aus, welche eine Zugkraft auf das *twin-arginine*-Motiv ausübt und das Tat-Substrat eine Strecke weit über die punktuell geschwächte (hydrophilisierte) Membran zieht und dann entlässt. Bei globulären Proteinen reicht diese Strecke für einen vollständigen Transport aus, bei hydrophilen ungefalteten Proteinen verteilt sich das Substrat statistisch auf beide Seiten der Membran (die Effizienz des Transportes sinkt mit der Länge des ungefalteten hydrophilen Substrates; Kapitel 2.4), und bei denaturierten Proteinen bleiben die hydrophoben *core*-Bereiche in der Membran stecken: sie werden abgebaut und/oder aggregieren.
5. Das Translokon benötigt für den *membrane weakening and pulling* Mechanismus keine wässrige Pore. Lipide bleiben in direkter Umgebung des transportierten Substrates. Dies ist bedingt durch die transiente Assemblierung des Translokons am gebundenen Substrat.

Die Ergebnisse mit den natürlich-ungefalteten Tat-Substraten (*FxFG-repeats*, Kapitel 2.4) zeigen, dass das Tat-System nicht auf globuläre Proteine fixiert ist und der Mechanismus daher kein *pushing*-Mechanismus sein kann. Das in der Vergangenheit von anderen postulierte Drücken durch hydrophile oder amphipathische Domänen von TatA und TatB ist daher sehr unwahrscheinlich (Wu *et al.*, 2000). Am besten lassen sich die Ergebnisse somit durch einen *pulling*-Mechanismus erklären.

TatA-Assemblierung über eine kritische Konzentration hinaus kann den TatBC/Tat-Substrat-Komplex zu der Konformationsänderung bewegen, wobei das Membranpotential genutzt werden könnte. Es ist möglich, dass die konservierte *hinge*-Region und ein darauf folgender Bereich, die postulierte amphipathische Helix, dabei von Bedeutung ist. Eventuell ist bei den TatA-Komponenten der Proteobakterien ein streng konserviertes essentielles Aspartat (D31 bei *E. coli*; (Hicks *et al.*, 2005)) wichtig für die Interaktion mit dem TatBC-Komplex – analog zum konservierten Glutamat in der Trans-Membran-Domäne bei thylakoidalem TatA oder bei vielen TatA Komponenten aus TatAC-Systemen in Bakterien. Es sei an dieser Stelle in Erinnerung gerufen, dass die pflanzlichen TatABC-Systeme von TatAC-Systemen der Cyanobakterien abstammen, also von „Zwei-Komponenten-Tat-Systemen“ (Abbildung 4). BLAST-Analysen der pflanzlichen Tat-Komponenten ergeben, dass sie tatsächlich am nächsten verwandt zu den cyanobakteriellen Tat-Komponenten der Gattungen *Anabaena*, *Nostoc*, *Synechocystis*, *Synechococcus* und *Gloeobacter* sind. Zwar besitzen Cyanobakterien kein TatB, jedoch hat bei ihnen etwa die Hälfte aller Arten zwei *tatA*-Gene. Hcf106, das thylakoidale TatB, hat die größte Ähnlichkeit zu einem TatA von *Gloeobacter*, einem Cyanobakterium mit zwei *tatA*-Genen. Diese Ähnlichkeit zu TatA ist weitaus größer als Ähnlichkeiten zu den TatB Proteinen der Proteobakterien. TatA / TatB Differenzierungen

evolvierten daher wahrscheinlich mindestens zweimal aus unabhängigen *tatA* Genduplikationen bei Cyanobakterien und Proteobakterien.

Das aktualisierte *membrane weakening and pulling*-Modell berücksichtigt, dass TatC keinerlei strikt konservierte protonierbare Aminosäure in den Membrandurchgängen hat und ein Membranpotential-getriebener Transport eine Alternative zu einem rein protonengetriebenen Transport darstellt. Das Modell ist einfacher als ein *hand-over*-Mechanismus, weil es keinen spekulativen Substrattransfer von TatC zu TatA voraussetzt. Zudem erklärt das Modell, wie der Transport von polaren natürlich ungefalteten Substraten möglich ist. Die Präsenz der Lipide im Bereich des transportierten Tat-Substrates erklärt auch die Inkompatibilität des Systems mit hydrophoben Oberflächen und die Entlassung solcher Substrate in die Membran, was wahrscheinlich zu den von uns beschriebenen Phänotypen führt (Richter und Brüser, 2005). Unser Modell wird inzwischen durch eine Vielzahl experimenteller Daten gestützt und findet in jüngster Zeit vermehrt Zustimmung bei amerikanischen und deutschen Tat-Gruppen (Dabney-Smith *et al.*, 2006; Gerard und Cline, 2006; Hou *et al.*, 2006).

2.11 Zusammenfassung und Perspektiven

Die vorhergehenden Abschnitte haben die Fortschritte auf dem Gebiet der Tat-abhängigen Translokation dargelegt und die Bedeutung der eigenen Forschungsarbeiten dabei diskutiert. Folgende Erkenntnisse wurden bei den einzelnen Teilprojekten gewonnen:

1. Tat-Signalpeptide besitzen recht klar definierte Charakteristika, die im Programm TATFIND genutzt wurden, um eine Identifizierung von Tat-Substraten zu erlauben.
2. Das Tat-Signalpeptid von HiPIP ist in wässriger Lösung unstrukturiert.
3. Tat-Signalpeptide binden die cytoplasmatischen Chaperone DnaK und SlyD. Durch diese Chaperon-Bindung könnte ein proteolytischer Abbau der ungefalteten Tat-Signalpeptide vor einer Membran-Interaktion verhindert werden.
4. Tat-Signalpeptide stellen eine notwendige Bedingung für einen Tat-abhängigen Transport dar. Häufig können sie aber auch einen Sec-abhängigen Transport initiieren, wenn ein Sec-kompatibles Protein am Signalpeptid fusioniert vorliegt.
5. Faltung ist keine notwendige Bedingung für den Tat-abhängigen Transport. Völlig ungefaltete Proteine können dann Tat-abhängig transportiert werden, wenn sie keine übermäßig hydrophoben Bereiche auf der Oberfläche besitzen.

6. Ungefaltete Proteine werden dann nicht Tat-abhängig transportiert, wenn sie im gefalteten Zustand eine globuläre Struktur mit hydrophobem Zentrum ausbilden würden. Wenn solche Proteine im ungefalteten Zustand zum Tat-Translokation geleitet werden, führt dies zum Abbruch der Translokation und bei starker Expression zu auffälligen Wachstumsstörungen.
7. Eine Membraninteraktion von Tat-Substraten konnte gezeigt werden, die bei ineffizientem Transport zur selektiven Prozessierung durch die Membran-Protease FtsH führte. Bei den getesteten vollständig gefalteten Tat-Substraten erfolgte kein weiterer Abbau.
8. Die Komponenten des Tat-Systems konnten funktionell überproduziert werden. Die Komplexe bestehend aus TatA, TatB oder TatC wurden identifiziert. Ein neuer TatBC-Komplex von etwa 580 kDa wurde entdeckt, bei dem die Bindung eines Tat-Substrates gezeigt wurde. Die strittige Topologie von TatC konnte aufgeklärt werden.
9. Erstmals wurden mit funktionellen GFP-Fusionen Lokalisationsstudien von TatA, TatB und TatC durchgeführt. TatB ist stark polar lokalisiert. TatA ist weniger polar in der Membran verteilt, was mit der transienten Assemblierung an TatBC korreliert.
10. Mit YcdB aus *E. coli* konnte das erste Häm-haltige Tat-Substrat identifiziert und charakterisiert werden. Der Cofaktor ist nicht-kovalent gebunden und kann bereits vor dem Transport assembliert werden.
11. Das Tat-Translokation von *R. capsulatus* konnte funktionell das Tat-Translokation von *E. coli* ersetzen. Nur ein getestetes Tat-Substrat aus *E. coli*, DmsA, war nicht kompatibel mit dem heterologen Tat-System. Es gibt daher eine weitgehende Verträglichkeit von Tat-Substraten und Tat-Translokation verschiedener Arten, wobei einzelne Ausnahmen wie DmsA existieren.
12. Ein Modell zum Tat-abhängigen Transport wurde etabliert. Darin wird ein Mechanismus vorgeschlagen, der auf einer Zugbewegung von TatC beruht. Die Assoziierung von TatA an einen TatBC/Substrat-Komplex initiiert die Konformationsänderungen, die zum Transport führen.

In Zukunft wird zu klären sein, wie weitgehend die Funktionen der allgemeinen Chaperone DnaK und SlyD für den Tat-abhängigen Transport sind. Wir werden die Interaktion der Chaperone mit den Tat-Substraten so genau wie möglich strukturell analysieren, wobei essentielle Kooperationen mit Biophysikern bereits etabliert wurden. Wir werden versuchen zu klären, welche Funktion die Membraninteraktion der Tat-Substrate vor der Translokation-Bindung hat. Dazu werden wir insbesondere das neu entdeckte Tat-Substrat YcdB nutzen. Wir werden auch versuchen, Tat-Komplexe zu kristallisieren und so die Strukturaufklärung von Tat-Komplexen voranzutreiben. Physiologische Aspekte werden generell in unsere Arbeiten einbezogen. So ist die Funktion vieler Tat-Substrate noch ungeklärt und auch die Cofaktor-Assemblierungswege sind häufig ungeklärt und spannend.

Eine neue Entwicklung betrifft auch die Funktion von TatA bei „Zwei-Komponenten-Tat-Systemen“. In *Streptomyces coelicolor* und in *Bacillus subtilis* liegt ein großer Anteil des TatA-Pools löslich in der Zelle vor (De Keersmaecker *et al.*, 2005b; Pop *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass dieses TatA mit den Tat-Substraten bereits im Cytoplasma interagiert und zu TatC bringt, wo anschließend die Translokation erfolgt. Diese Idee wird bisher insbesondere von Bindungsstudien und Lokalisationsstudien unterstützt (Schreiber *et al.*, 2006; Westermann *et al.*, 2006). Da die Bindung von TatA an Tat-Substrate im Cytoplasma anscheinend nicht *twin-arginine*-spezifisch ist, bleibt die weitere Entwicklung abzuwarten. Eine Targeting-Funktion von TatA könnte aber durchaus eine Variante bei Gram-positiven Tat-Systemen darstellen. Insbesondere muss man bei dem untersuchten TatA_dC_d-System aus *Bacillus subtilis* bedenken, dass hier spezifisch nur die Phosphatase PhoD als einziges Substrat transportiert wird. Eine Erkennung von PhoD durch TatA_d könnte daher auch unabhängig vom *twin-arginine*-Motif stattfinden. Das *twin-arginine*-Motif wäre dann nur wichtig für die anschließende Bindung des Signalpeptides an TatC, wodurch der Transport ermöglicht würde. Die Frage steht im Raum, ob sich die Funktionen von TatA in „Zwei-Komponenten-Tat-Systemen“ grundlegend von denen in „Drei-Komponenten-Tat-Systemen“ unterscheiden. Ich bin zuversichtlich, dass die Studien in den kommenden Jahren zu einer einheitlicheren Sicht der Funktionsweisen der verschiedenen Tat-Systeme führen werden.

3 Literatur

- Akiyama, Y., Kihara, A., and Ito, K. (1996) Subunit a of proton ATPase F_0 sector is a substrate of the FtsH protease in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **399**: 26-28.
- Alami, M., Trescher, D., Wu, L.F., and 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., and 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., and Theg, S.M. (2003a) Protein transport via the cpTat pathway displays cooperativity and is stimulated by transport-incompetent substrate. *FEBS Lett* **540**: 96-100.
- Alder, N.N., and Theg, S.M. (2003b) Energetics of protein transport across biological membranes. a study of the thylakoid Δ pH-dependent/cpTat pathway. *Cell* **112**: 231-242.
- Alder, N.N., and Johnson, A.E. (2004) Cotranslational membrane protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **279**: 22787-22790.
- Allen, S.C., Barrett, C.M., Ray, N., and Robinson, C. (2002) Essential cytoplasmic domains in the *Escherichia coli* TatC protein. *J Biol Chem* **277**: 10362-10366.
- Angelini, S., Moreno, R., Gouffi, K., Santini, C., Yamagishi, A., Berenguer, J., and Wu, L. (2001) Export of *Thermus thermophilus* alkaline phosphatase via the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **506**: 103-107.
- Asai, T., Shinoda, Y., Nohara, T., Yoshihisa, T., and Endo, T. (1999) Sec-dependent pathway and Δ pH-dependent pathway do not share a common translocation pore in thylakoidal protein transport. *J Biol Chem* **274**: 20075-20078.
- Barrett, C.M., Mathers, J.E., and Robinson, C. (2003) Identification of key regions within the *Escherichia coli* TatAB subunits. *FEBS Lett* **537**: 42-46.
- Barrett, C.M., Mangels, D., and Robinson, C. (2005) Mutations in subunits of the *Escherichia coli* twin-arginine translocase block function via differing effects on translocation activity or Tat complex structure. *J Mol Biol* **347**: 453-463.
- Barrett, C.M., and 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.
- Behrendt, J., Standar, K., Lindenstrauss, U., and Brüser, T. (2004) Topological studies on the twin-arginine translocase component TatC. *FEMS Microbiol Lett* **234**: 303-308.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., Widdick, D., Palmer, T., and Brunak, S. (2005) Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics* **6**: 167.
- Berks, B.C. (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* **22**: 393-404.
- Berks, B.C., Palmer, T., and Sargent, F. (2005) Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr Opin Microbiol* **8**: 174-181.
- Bernhardt, T.G., Roof, W.D., and Young, R. (2000) Genetic evidence that the bacteriophage ϕ X174 lysis protein inhibits cell wall synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4297-4302.
- Bernhardt, T.G., Roof, W.D., and Young, R. (2002) The *Escherichia coli* FKBP-type PPIase SlyD is required for the stabilization of the E lysis protein of bacteriophage ϕ X174. *Mol Microbiol* **45**: 99-108.
- Bernhardt, T.G., and 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., and Brüser, T. (2004) Localization of the Tat translocon components in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **569**: 82-88.
- Blaudeck, N., Sprenger, G.A., Freudl, R., and Wiegert, T. (2001) Specificity of signal peptide recognition in Tat-dependent bacterial protein translocation. *J Bacteriol* **183**: 604-610.

- Blaudeck, N., Kreutzenbeck, P., Freudl, R., and 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., and 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., and 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., and 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., Bogsch, E.G., and Robinson, C. (2000) Subunit interactions in the twin-arginine translocase complex of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **472**: 88-92.
- Bolhuis, A., Mathers, J.E., Thomas, J.D., Barrett, C.M., and 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.
- Bolhuis, A. (2004) The archaeal Sec-dependent protein translocation pathway. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**: 919-927.
- Braun, V., and Wolff, H. (1970) The murein-lipoprotein linkage in the cell wall of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **14**: 387-391.
- Brehmer, D., Gassler, C., Rist, W., Mayer, M.P., and Bukau, B. (2004) Influence of GrpE on DnaK-substrate interactions. *J Biol Chem* **279**: 27957-27964.
- Breyton, C., Haase, W., Rapoport, T.A., Kühlbrandt, W., and Collinson, I. (2002) Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* **418**: 662-665.
- Brickman, E., and 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.
- Brink, S., Bogsch, E.G., Edwards, W.R., Hynds, P.J., and Robinson, C. (1998) Targeting of thylakoid proteins by the Δ pH-driven twin-arginine translocation pathway requires a specific signal in the hydrophobic domain in conjunction with the twin-arginine motif. *FEBS Lett* **434**: 425-430.
- Brock, I.W., Mills, J.D., Robinson, D., and Robinson, C. (1995) The Δ pH-driven, ATP-independent protein translocation mechanism in the chloroplast thylakoid membrane. Kinetics and energetics. *J Biol Chem* **270**: 1657-1662.
- Brüser, T., Trüper, H.G., and Dahl, C. (1997) Cloning and sequencing of the gene encoding the high potential iron-sulfur protein (HiPIP) from the purple sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Biochim Biophys Acta* **1352**: 18-22.
- Brüser, T., Deutzmann, R., and 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., and Sanders, C. (2003) An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiol Res* **158**: 7-17.
- Brüser, T., Yano, T., Brune, D.C., and Daldal, F. (2003) Membrane targeting of a folded and cofactor-containing protein. *Eur J Biochem* **270**: 1211-1221.
- Buchanan, G., Sargent, F., Berks, B.C., and Palmer, T. (2001) A genetic screen for suppressors of *Escherichia coli* Tat signal peptide mutations establishes a critical role for the second arginine within the twin-arginine motif. *Arch Microbiol* **177**: 107-112.
- Buchanan, G., Leeuw, E., Stanley, N.R., Wexler, M., Berks, B.C., Sargent, F., and Palmer, T. (2002) Functional complexity of the twin-arginine translocase TatC component revealed by site-directed mutagenesis. *Mol Microbiol* **43**: 1457-1470.
- Bukau, B., Reilly, P., McCarty, J., and Walker, G.C. (1993) Immunogold localization of the DnaK heat shock protein in *Escherichia coli* cells. *J Gen Microbiol* **139**: 95-99.

- Büttner, D., and Bonas, U. (2002) Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J* **21**: 5313-5322.
- Cascales, E., and Christie, P.J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **1**: 137-149.
- Chaddock, A.M., Mant, A., Karnauchoy, I., Brink, S., Herrmann, R.G., Klösgen, R.B., and Robinson, C. (1995) A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the Δ pH-dependent thylakoidal protein translocase. *EMBO J* **14**: 2715-2722.
- Cid, H., Bunster, M., Canales, M., and Gazitua, F. (1992) Hydrophobicity and structural classes in proteins. *Protein Eng* **5**: 373-375.
- Clark, S.A., and Theg, S.M. (1997) A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes. *Mol Biol Cell* **8**: 923-934.
- Clausmeyer, S., Klösgen, R.B., and Herrmann, R.G. (1993) Protein import into chloroplasts. The hydrophilic luminal proteins exhibit unexpected import and sorting specificities in spite of structurally conserved transit peptides. *J Biol Chem* **268**: 13869-13876.
- Cline, K., Ettinger, W.F., and 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., Henry, R., Li, C., and Yuan, J. (1993) Multiple pathways for protein transport into or across the thylakoid membrane. *EMBO J* **12**: 4105-4114.
- Cline, K., and Mori, H. (2001) Thylakoid Δ pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J Cell Biol* **154**: 719-729.
- Collet, J.F., and Bardwell, J.C. (2002) Oxidative protein folding in bacteria. *Mol Microbiol* **44**: 1-8.
- Cristóbal, S., de Gier, J.W., Nielsen, H., and von Heijne, G. (1999) Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *EMBO J* **18**: 2982-2990.
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G., and Elofsson, A. (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng* **10**: 673-676.
- Dabney-Smith, C., Mori, H., and Cline, K. (2003) Requirement of a Tha4-conserved transmembrane glutamate in thylakoid Tat translocase assembly revealed by biochemical complementation. *J Biol Chem* **278**: 43027-43033.
- Dabney-Smith, C., Mori, H., and Cline, K. (2006) Oligomers of Tha4 organize at the thylakoid Tat translocase during protein transport. *J Biol Chem* **281**: 5476-5483.
- Dalbey, R.E., and Chen, M. (2004) Sec-translocase mediated membrane protein biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 37-53.
- De Keersmaeker, S., Van Mellaert, L., Lammertyn, E., Vrancken, K., Anne, J., and Geukens, N. (2005a) Functional analysis of TatA and TatB in *Streptomyces lividans*. *Biochem Biophys Res Commun* **335**: 973-982.
- De Keersmaeker, S., Van Mellaert, L., Schaerlaekens, K., Van Dessel, W., Vrancken, K., Lammertyn, E., Anne, J., and Geukens, N. (2005b) Structural organization of the twin-arginine translocation system in *Streptomyces lividans*. *FEBS Lett* **579**: 797-802.
- de Leeuw, E., Porcelli, I., Sargent, F., Palmer, T., and Berks, B.C. (2001) Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway. *FEBS Lett* **506**: 143-148.
- de Leeuw, E., Granjon, T., Porcelli, I., Alami, M., Carr, S.B., Müller, M., Sargent, F., Palmer, T., and Berks, B.C. (2002) Oligomeric properties and signal peptide binding by *Escherichia coli* Tat protein transport complexes. *J Mol Biol* **322**: 1135-1146.
- Delepelaire, P. (2004) Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 149-161.
- DeLisa, M.P., Tullman, D., and Georgiou, G. (2003) Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6115-6120.

- Denning, D.P., Patel, S.S., Uversky, V., Fink, A.L., and Rexach, M. (2003) Disorder in the nuclear pore complex: the FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 2450-2455.
- Di Cola, A., Bailey, S., and Robinson, C. (2005) The thylakoid $\Delta\text{pH}/\Delta\Psi$ are not required for the initial stages of Tat-dependent protein transport in tobacco protoplasts. *J Biol Chem* **280**: 41165-41170.
- Dilks, K., Rose, R.W., Hartmann, E., and Pohlschröder, M. (2003) Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey. *J Bacteriol* **185**: 1478-1483.
- Driessen, A.J., and Wickner, W. (1991) Proton transfer is rate-limiting for translocation of precursor proteins by the *Escherichia coli* translocase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 2471-2475.
- Driessen, A.J. (2001) SecB, a molecular chaperone with two faces. *Trends Microbiol* **9**: 193-196.
- Driessen, A.J. (2005) Cell biology: two pores better than one? *Nature* **438**: 299-300.
- Filloux, A. (2004) The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 163-179.
- Finazzi, G., Chasen, C., Wollman, F.A., and de Vitry, C. (2003) Thylakoid targeting of Tat passenger proteins shows no ΔpH dependence *in vivo*. *EMBO J* **22**: 807-815.
- Fincher, V., Dabney-Smith, C., and Cline, K. (2003) Functional assembly of thylakoid ΔpH -dependent/Tat protein transport pathway components *in vitro*. *Eur J Biochem* **270**: 4930-4941.
- Garduno, R.A., Phipps, B.M., and Kay, W.W. (1995) Physical and functional S-layer reconstitution in *Aeromonas salmonicida*. *J Bacteriol* **177**: 2684-2694.
- Genest, O., Seduk, F., Ilbert, M., Mejean, V., and Iobbi-Nivol, C. (2006) Signal peptide protection by specific chaperone. *Biochem Biophys Res Commun* **339**: 991-995.
- Gentle, I.E., Burri, L., and Lithgow, T. (2005) Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins. *Mol Microbiol* **58**: 1216-1225.
- Gerard, F., and 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**: 6130-6135.
- Gohlke, U., Pullan, L., McDevitt, C.A., Porcelli, I., de Leeuw, E., Palmer, T., Saibil, H.R., and Berks, B.C. (2005) The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10482-10486.
- Goldman, B.S., Gabbert, K.K., and Kranz, R.G. (1996) Use of heme reporters for studies of cytochrome biosynthesis and heme transport. *J Bacteriol* **178**: 6338-6347.
- Gouffi, K., Santini, C.L., and Wu, L.F. (2002) Topology determination and functional analysis of the *Escherichia coli* TatC protein. *FEBS Lett* **525**: 65-70.
- Gouffi, K., Gerard, F., Santini, C.L., and Wu, L.F. (2004) Dual topology of the *Escherichia coli* TatA protein. *J Biol Chem* **279**: 11608-11615.
- Gutensohn, M., Fan, E., Frielingsdorf, S., Hanner, P., Hou, B., Hust, B., and Klösgen, R.B. (2006) Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *J Plant Physiol* **163**: 333-347.
- Halbig, D., Hou, B., Freudl, R., Sprenger, G.A., and Klösgen, R.B. (1999a) Bacterial proteins carrying twin-R signal peptides are specifically targeted by the ΔpH -dependent transport machinery of the thylakoid membrane system. *FEBS Lett* **447**: 95-98.
- Halbig, D., Wiegert, T., Blaudeck, N., Freudl, R., and Sprenger, G.A. (1999b) 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.
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**: 1852-1858.

- Hatzixanthis, K., Clarke, T.A., Oubrie, A., Richardson, D.J., Turner, R.J., and Sargent, F. (2005a) Signal peptide-chaperone interactions on the twin-arginine protein transport pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8460-8465.
- Hatzixanthis, K., Richardson, D.J., and Sargent, F. (2005b) Chaperones involved in assembly and export of N-oxide reductases. *Biochem Soc Trans* **33**: 124-126.
- Heidrich, C., Templin, M.F., Ursinus, A., Merdanovic, M., Berger, J., Schwarz, H., de Pedro, M.A., and Holtje, J.V. (2001) Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**: 167-178.
- Heiland, I., and Erdmann, R. (2005) Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J* **272**: 2362-2372.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., and Ala'Aldeen, D. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 692-744.
- Henry, R., Kapazoglou, A., McCaffery, M., and Cline, K. (1994) Differences between lumen targeting domains of chloroplast transit peptides determine pathway specificity for thylakoid transport. *J Biol Chem* **269**: 10189-10192.
- Henry, R., Carrigan, M., McCaffrey, M., Ma, X., and Cline, K. (1997) Targeting determinants and proposed evolutionary basis for the Sec and the Δ pH protein transport systems in chloroplast thylakoid membranes. *J Cell Biol* **136**: 823-832.
- Hicks, M.G., de Leeuw, E., Porcelli, I., Buchanan, G., Berks, B.C., and 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.
- Hicks, M.G., Lee, P.A., Georgiou, G., Berks, B.C., and Palmer, T. (2005) Positive selection for loss-of-function *tat* mutations identifies critical residues required for TatA activity. *J Bacteriol* **187**: 2920-2925.
- Hinsley, A.P., Stanley, N.R., Palmer, T., and Berks, B.C. (2001) A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the 'invariant' arginine residues of the consensus targeting motif. *FEBS Lett* **497**: 45-49.
- Hoeren, F.U., Berks, B.C., Ferguson, S.J., and McCarthy, J.E. (1993) Sequence and expression of the gene encoding the respiratory nitrous-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. New and conserved structural and regulatory motifs. *Eur J Biochem* **218**: 49-57.
- Hottenrott, S., Schumann, T., Plückthun, A., Fischer, G., and Rahfeld, J.U. (1997) The *Escherichia coli* SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *J Biol Chem* **272**: 15697-15701.
- Hou, B., Frielingsdorf, S., and Klösgen, R.B. (2006) Unassisted membrane insertion as the initial step in Δ pH/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., and Deisenhofer, J. (2002) Nucleotide control of interdomain interactions in the conformational reaction cycle of SecA. *Science* **297**: 2018-2026.
- Hutcheon, G.W., and Bolhuis, A. (2003) The archaeal twin-arginine translocation pathway. *Biochem Soc Trans* **31**: 686-689.
- Hynds, P.J., Robinson, D., and Robinson, C. (1998) The sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malfolded proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* **273**: 34868-34874.
- Ito, K., and Akiyama, Y. (2005) Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu Rev Microbiol* **59**: 211-231.
- Ize, B., Stanley, N.R., Buchanan, G., and Palmer, T. (2003) Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity. *Mol Microbiol* **48**: 1183-1193.
- Ize, B., Porcelli, I., Lucchini, S., Hinton, J.C., Berks, B.C., and Palmer, T. (2004) Novel phenotypes of *Escherichia coli* *tat* mutants revealed by global gene expression and phenotypic analysis. *J Biol Chem* **279**: 47543-47554.
- Jack, R.L., Sargent, F., Berks, B.C., Sawers, G., and 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., and Sargent, F. (2004) Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins. *EMBO J* **23**: 3962-3972.
- Jack, R.L., Dubini, A., Palmer, T., and Sargent, F. (2005) Common principles in the biosynthesis of diverse enzymes. *Biochem Soc Trans* **33**: 105-107.
- Jong, W.S., ten Hagen-Jongman, C.M., Genevaux, P., Brunner, J., Oudega, B., and Luirink, J. (2004) Trigger factor interacts with the signal peptide of nascent Tat substrates but does not play a critical role in Tat-mediated export. *Eur J Biochem* **271**: 4779-4787.
- Jongbloed, J.D., Antelmann, H., Hecker, M., Nijland, R., Bron, S., Airaksinen, U., Pries, F., Quax, W.J., van Dijl, J.M., and Braun, P.G. (2002) Selective contribution of the twin-arginine translocation pathway to protein secretion in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **277**: 44068-44078.
- Jongbloed, J.D., Grieger, U., Antelmann, H., Hecker, M., Nijland, R., Bron, S., and van Dijl, J.M. (2004) Two minimal Tat translocases in *Bacillus*. *Mol Microbiol* **54**: 1319-1325.
- Jongbloed, J.D., van der Ploeg, R., and van Dijl, J.M. (2006) Bifunctional TatA subunits in minimal Tat protein translocases. *Trends Microbiol* **14**: 2-4.
- Karamyshev, A.L., and Johnson, A.E. (2005) Selective SecA association with signal sequences in ribosome-bound nascent chains: a potential role for SecA in ribosome targeting to the bacterial membrane. *J Biol Chem* **280**: 37930-37940.
- Ki, J.J., Kawarasaki, Y., Gam, J., Harvey, B.R., Iverson, B.L., and Georgiou, G. (2004) A periplasmic fluorescent reporter protein and its application in high-throughput membrane protein topology analysis. *J Mol Biol* **341**: 901-909.
- Kihara, A., Akiyama, Y., and Ito, K. (1995) FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4532-4536.
- Kihara, A., Akiyama, Y., and Ito, K. (1999) Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis. *Embo J* **18**: 2970-2981.
- Kim, J., and Kendall, D.A. (1998) Identification of a sequence motif that confers SecB dependence on a SecB-independent secretory protein *in vivo*. *J Bacteriol* **180**: 1396-1401.
- Kipping, M., Lilie, H., Lindenstrauss, U., Andreesen, J.R., Griesinger, C., Carlomagno, T., and Brüser, T. (2003) Structural studies on a twin-arginine signal sequence. *FEBS Lett* **550**: 18-22.
- Klöggen, R.B., Brock, I.W., Herrmann, R.G., and Robinson, C. (1992) Proton gradient-driven import of the 16 kDa oxygen-evolving complex protein as the full precursor protein by isolated thylakoids. *Plant Mol Biol* **18**: 1031-1034.
- Koebnik, R., Locher, K.P., and Van Gelder, P. (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* **37**: 239-253.
- Lee, H.C., and 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 U S A* **98**: 3471-3476.
- Lee, P.A., Buchanan, G., Stanley, N.R., Berks, B.C., and Palmer, T. (2002) Truncation analysis of TatA and TatB defines the minimal functional units required for protein translocation. *J Bacteriol* **184**: 5871-5879.
- Li, S.Y., Chang, B.Y., and Lin, S.C. (2005) Coexpression of TorD enhances the transport of GFP via the TAT pathway. *J Biotechnol*.
- Li, X., Henry, R., Yuan, J., Cline, K., and Hoffman, N.E. (1995) A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit SRP54 is involved in the posttranslational integration of a protein into thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3789-3793.
- Llamas, M.A., and Bitter, W. (2006) Iron gate: the translocation system. *J Bacteriol* **188**: 3172-3174.
- Luirink, J., and Sinning, I. (2004) SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 17-35.

- Luirink, J., von Heijne, G., Houben, E., and de Gier, J.W. (2005) Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **59**: 329-355.
- Mangels, D., Mathers, J., Bolhuis, A., and Robinson, C. (2005) The core TatABC complex of the twin-arginine translocase in *Escherichia coli*: TatC drives assembly whereas TatA is essential for stability. *J Mol Biol* **345**: 415-423.
- Manoil, C. (1990) Analysis of protein localization by use of gene fusions with complementary properties. *J Bacteriol* **172**: 1035-1042.
- Manoil, C., Mekalanos, J.J., and Beckwith, J. (1990) Alkaline phosphatase fusions: sensors of subcellular location. *J Bacteriol* **172**: 515-518.
- McDevitt, C.A., Hicks, M.G., Palmer, T., and Berks, B.C. (2005) Characterisation of Tat protein transport complexes carrying inactivating mutations. *Biochem Biophys Res Commun* **329**: 693-698.
- McHugh, J.P., Rodriguez-Quinones, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D.A., Poole, R.K., Cooper, C.E., and Andrews, S.C. (2003) Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem* **278**: 29478-29486.
- Mitra, K., Schaffitzel, C., Shaikh, T., Tama, F., Jenni, S., Brooks, C.L., 3rd, Ban, N., and Frank, J. (2005) Structure of the *E. coli* protein-conducting channel bound to a translating ribosome. *Nature* **438**: 318-324.
- Molik, S., Karnauchov, I., Weidlich, C., Herrmann, R.G., and Klösgen, R.B. (2001) The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/f complex in chloroplasts: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? *J Biol Chem* **276**: 42761-42766.
- Mori, H., and 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.
- Mota, L.J., Sorg, I., and Cornelis, G.R. (2005) Type III secretion: the bacteria-eukaryotic cell express. *FEMS Microbiol Lett* **252**: 1-10.
- Müller, M., Koch, H.G., Beck, K., and Schäfer, U. (2001) Protein traffic in bacteria: multiple routes from the ribosome to and across the membrane. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **66**: 107-157.
- Müller, M. (2005) Twin-arginine-specific protein export in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **156**: 131-136.
- Müller, M., and Klösgen, R.B. (2005) The Tat pathway in bacteria and chloroplasts. *Mol Membr Biol* **22**: 113-121.
- Musser, S.M., and 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.
- Mussmann, M., Schulz, H.N., Strotmann, B., Kjaer, T., Nielsen, L.P., Rosselló-Mora, R.A., Amann, R.I., and Jørgensen, B.B. (2003) Phylogeny and distribution of nitrate-storing *Beggiatoa* spp. in coastal marine sediments. *Environ Microbiol* **5**: 523-533.
- Nassoury, N., and Morse, D. (2005) Protein targeting to the chloroplasts of photosynthetic eukaryotes: getting there is half the fun. *Biochim Biophys Acta* **1743**: 5-19.
- Neumann-Haefelin, C., Schäfer, U., Müller, M., and Koch, H.G. (2000) SRP-dependent co-translational targeting and SecA-dependent translocation analyzed as individual steps in the export of a bacterial protein. *EMBO J* **19**: 6419-6426.
- Niviere, V., Wong, S.L., and Voordouw, G. (1992) Site-directed mutagenesis of the hydrogenase signal peptide consensus box prevents export of a beta-lactamase fusion protein. *J Gen Microbiol* **138**: 2173-2183.
- Oates, J., Mathers, J., Mangels, D., Kühlbrandt, W., Robinson, C., and 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., and 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., and Turner, R.J. (2001) Identification of a twin-arginine leader-binding protein. *Mol Microbiol* **40**: 323-331.

- Osborne, A.R., Rapoport, T.A., and van den Berg, B. (2005) Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 529-550.
- Palmer, T., Sargent, F., and Berks, B.C. (2005) Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol* **13**: 175-180.
- Papish, A.L., Ladner, C.L., and Turner, R.J. (2003) The twin-arginine leader-binding protein, DmsD, interacts with the TatB and TatC subunits of the *Escherichia coli* twin-arginine translocase. *J Biol Chem* **278**: 32501-32506.
- Parsons, L.M., Lin, F., and Orban, J. (2006) Peptidoglycan recognition by Pal, an outer membrane lipoprotein. *Biochemistry* **45**: 2122-2128.
- Pemberton, L.F., and Paschal, B.M. (2005) Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* **6**: 187-198.
- Peterson, J.H., Szabady, R.L., and Bernstein, H.D. (2006) An unusual signal peptide extension inhibits the binding of bacterial presecretory proteins to the signal recognition particle, trigger factor, and the SecYEG complex. *J Biol Chem* **281**: 9038-9048.
- Pieper-Fürst, U., Madkour, M.H., Mayer, F., and Steinbüchel, A. (1994) Purification and characterization of a 14-kilodalton protein that is bound to the surface of polyhydroxyalkanoic acid granules in *Rhodococcus ruber*. *J Bacteriol* **176**: 4328-4337.
- Pohlschröder, M., Hartmann, E., Hand, N.J., Dilks, K., and Haddad, A. (2005) Diversity and evolution of protein translocation. *Annu Rev Microbiol* **59**: 91-111.
- Pop, O., Martin, U., Abel, C., and Müller, J.P. (2002) The twin-arginine signal peptide of PhoD and the TatAd/Cd proteins of *Bacillus subtilis* form an autonomous Tat translocation system. *J Biol Chem* **277**: 3268-3273.
- Pop, O.I., Westermann, M., Volkmer-Engert, R., Schulz, D., Lemke, C., Schreiber, S., Gerlach, R., Wetzker, R., and Müller, J.P. (2003) Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatAd indicates protein-mediated targeting of the Tat export in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **278**: 38428-38436.
- Porcelli, I., de Leeuw, E., Wallis, R., van den Brink-van der Laan, E., de Kruijff, B., Wallace, B.A., Palmer, T., and 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.
- Posey, J.E., Shinnick, T.M., and Quinn, F.D. (2006) Characterization of the Twin-Arginine Translocase Secretion System of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **188**: 1332-1340.
- Prickril, B.C., Czechowski, M.H., Przybyla, A.E., Peck, H.D., Jr., and LeGall, J. (1986) Putative signal peptide on the small subunit of the periplasmic hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris*. *J Bacteriol* **167**: 722-725.
- Pugsley, A.P. (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 50-108.
- Randall, L.L., Crane, J.M., Liu, G., and Hardy, S.J. (2004) Sites of interaction between SecA and the chaperone SecB, two proteins involved in export. *Protein Sci* **13**: 1124-1133.
- Randall, L.L., Crane, J.M., Lilly, A.A., Liu, G., Mao, C., Patel, C.N., and Hardy, S.J. (2005) Asymmetric binding between SecA and SecB two symmetric proteins: implications for function in export. *J Mol Biol* **348**: 479-489.
- Ray, N., Oates, J., Turner, R.J., and 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.
- Ray, N., Nenner, A., Mullineaux, C.W., and Robinson, C. (2005) Location and mobility of twin arginine translocase subunits in the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Biol Chem* **280**: 17961-17968.
- Richter, S., and Brüser, T. (2005) Targeting of unfolded PhoA to the TAT translocon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**: 42723-42730.
- Robinson, C., Klösgen, R.B., Herrmann, R.G., and Shackleton, J.B. (1993) Protein translocation across the thylakoid membrane--a tale of two mechanisms. *FEBS Lett* **325**: 67-69.

- Rodrigue, A., Chanal, A., Beck, K., Müller, M., and Wu, L.F. (1999) Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial Tat pathway. *J Biol Chem* **274**: 13223-13228.
- Roof, W.D., and Young, R. (1993) ϕ X174 E complements lambda S and R dysfunction for host cell lysis. *J Bacteriol* **175**: 3909-3912.
- Roof, W.D., Horne, S.M., Young, K.D., and Young, R. (1994) *slyD*, a host gene required for ϕ X174 lysis, is related to the FK506-binding protein family of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerases. *J Biol Chem* **269**: 2902-2910.
- Rose, R.W., Brüser, T., Kissinger, J.C., and Pohlschröder, M. (2002) Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Mol Microbiol* **45**: 943-950.
- Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J., and Bukau, B. (1997) Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J* **16**: 1501-1507.
- San Miguel, M., Marrington, R., Rodger, P.M., Rodger, A., and 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., and Lill, H. (2001) Transport of cytochrome *c* derivatives by the bacterial Tat protein translocation system. *Mol Microbiol* **41**: 241-246.
- Santini, C.L., Ize, B., Chanal, A., Müller, M., Giordano, G., and 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., and Wu, L.F. (2001) Translocation of jellyfish green fluorescent protein via the Tat system of *Escherichia coli* and change of its periplasmic localization in response to osmotic up-shock. *J Biol Chem* **276**: 8159-8164.
- Sara, M., and Sleytr, U.B. (2000) S-Layer proteins. *J Bacteriol* **182**: 859-868.
- Sarfo, K.J., Winstone, T.L., Papish, A.L., Howell, J.M., Kadir, H., Vogel, H.J., and Turner, R.J. (2004) Folding forms of *Escherichia coli* DmsD, a twin-arginine leader binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **315**: 397-403.
- Sargent, F., Bogsch, E.G., Stanley, N.R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B.C., and 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., and 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., and 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., and Palmer, T. (2006) Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins. *FEMS Microbiol Lett* **254**: 198-207.
- Sauer, F.G., Remaut, H., Hultgren, S.J., and Waksman, G. (2004) Fiber assembly by the chaperone-usher pathway. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 259-267.
- Schaerlaekens, K., Lammertyn, E., Geukens, N., De Keersmaecker, S., Anne, J., and Van Mellaert, L. (2004) Comparison of the Sec and Tat secretion pathways for heterologous protein production by *Streptomyces lividans*. *J Biotechnol* **112**: 279-288.
- Schierle, C.F., Berkmen, M., Huber, D., Kumamoto, C., Boyd, D., and Beckwith, J. (2003) The DsbA signal sequence directs efficient, cotranslational export of passenger proteins to the *Escherichia coli* periplasm via the signal recognition particle pathway. *J Bacteriol* **185**: 5706-5713.
- Scholz, C., Eckert, B., Hagn, F., Schaarschmidt, P., Balbach, J., and Schmid, F.X. (2006) SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities. *Biochemistry* **45**: 20-33.

- Schreiber, S., Stengel, R., Westermann, M., Volkmer-Engert, R., Pop, O.I., and Müller, J.P. (2006) Affinity of TatCd for TatAd elucidates its receptor function in the *Bacillus subtilis* Tat translocase system. *J Biol Chem, Epub (May 12) ahead of print*.
- Settles, A.M., Yonetani, A., Baron, A., Bush, D.R., Cline, K., and Martienssen, R. (1997) Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science* **278**: 1467-1470.
- Seufferheld, M., Vieira, M.C., Ruiz, F.A., Rodrigues, C.O., Moreno, S.N., and Docampo, R. (2003) Identification of organelles in bacteria similar to acidocalcisomes of unicellular eukaryotes. *J Biol Chem* **278**: 29971-29978.
- Seufferheld, M., Lea, C.R., Vieira, M., Oldfield, E., and Docampo, R. (2004) The H(+)-pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* is predominantly located in polyphosphate-rich acidocalcisomes. *J Biol Chem* **279**: 51193-51202.
- Shanmugham, A., Wong Fong Sang, H.W., Bollen, Y.J., and Lill, H. (2006) Membrane binding of twin arginine preproteins as an early step in translocation. *Biochemistry* **45**: 2243-2249.
- Snyder, A., Vasil, A.I., Zajdowicz, S.L., Wilson, Z.R., and Vasil, M.L. (2006) Role of the *Pseudomonas aeruginosa* PlcH Tat signal peptide in protein secretion, transcription, and cross-species Tat secretion system compatibility. *J Bacteriol* **188**: 1762-1774.
- Sone, M., Kishigami, S., Yoshihisa, T., and Ito, K. (1997) Roles of disulfide bonds in bacterial alkaline phosphatase. *J Biol Chem* **272**: 6174-6178.
- Stanley, N.R., Palmer, T., and Berks, B.C. (2000) The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**: 11591-11596.
- Sturm, A., Schierhorn, A., Lindenstrauss, U., Lilie, H., and Brüser, T. (2006) YcdB from *Escherichia coli* reveals a novel class of Tat-dependently translocated hemoproteins. *J Biol Chem* **281**: 13972-13978.
- Theg, S.M., Bauerle, C., Olsen, L.J., Selman, B.R., and Keegstra, K. (1989) Internal ATP is the only energy requirement for the translocation of precursor proteins across chloroplastic membranes. *J Biol Chem* **264**: 6730-6736.
- Theg, S.M., Cline, K., Finazzi, G., and Wollman, F.A. (2005) The energetics of the chloroplast Tat protein transport pathway revisited. *Trends Plant Sci* **10**: 153-154.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Büttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D.H., Niesbach-Klöggen, U., Patschkowski, T., Rückert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S.C., Vorhölter, F.J., Weber, E., Pühler, A., Bonas, U., Bartels, D., and Kaiser, O. (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol* **187**: 7254-7266.
- Thomas, J.D., Daniel, R.A., Errington, J., and 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.
- Thöny-Meyer, L. (2002) Cytochrome *c* maturation: a complex pathway for a simple task? *Biochem Soc Trans* **30**: 633-638.
- Throne-Holst, M., Thöny-Meyer, L., and Hederstedt, L. (1997) *Escherichia coli* *ccm* in-frame deletion mutants can produce periplasmic cytochrome *b* but not cytochrome *c*. *FEBS Lett* **410**: 351-355.
- Tokuda, H., and Matsuyama, S. (2004) Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E. coli*. *Biochim Biophys Acta* **1693**: 5-13.
- Tomic, S., Johnson, A.E., Hartl, F.U., and Etchells, S.A. (2006) Exploring the capacity of trigger factor to function as a shield for ribosome bound polypeptide chains. *FEBS Lett* **580**: 72-76.
- Turner, R.J., Papish, A.L., and Sargent, F. (2004) Sequence analysis of bacterial redox enzyme maturation proteins (REMPs). *Can J Microbiol* **50**: 225-238.
- Ullers, R.S., Luirink, J., Harms, N., Schwager, F., Georgopoulos, C., and Genevaux, P. (2004) SecB is a bona fide generalized chaperone in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7583-7588.

- Ullers, R.S., Houben, E.N., Brunner, J., Oudega, B., Harms, N., and Luirink, J. (2006) Sequence specific interactions of nascent *E. coli* polypeptides with trigger factor and SRP. *J Biol Chem*.
- Van den Berg, B., Clemons, W.M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., and Rapoport, T.A. (2004) X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* **427**: 36-44.
- van der Laan, M., Nouwen, N.P., and Driessen, A.J. (2005) YidC--an evolutionary conserved device for the assembly of energy-transducing membrane protein complexes. *Curr Opin Microbiol* **8**: 182-187.
- van Dongen, W., Hagen, W., van den Berg, W., and Veeger, C. (1988) Evidence for an unusual mechanism of membrane translocation of the periplasmic hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough), as derived from expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **50**: 5-9.
- van Niftrik, L.A., Fuerst, J.A., Sinnighe Damste, J.S., Kuenen, J.G., Jetten, M.S., and Strous, M. (2004) The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **233**: 7-13.
- von Heijne, G. (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem* **133**: 17-21.
- von Heijne, G. (1984) How signal sequences maintain cleavage specificity. *J Mol Biol* **173**: 243-251.
- Voulhoux, R., Filloux, A., and Schalk, I.J. (2006) Pyoverdine-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: the Tat system is required for PvdN but not for FpvA transport. *J Bacteriol* **188**: 3317-3323.
- Weiner, J.H., Bilous, P.T., Shaw, G.M., Lubitz, S.P., Frost, L., Thomas, G.H., Cole, J.A., and Turner, R.J. (1998) A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell* **93**: 93-101.
- Westermann, M., Pop, O.I., Gerlach, R., Appel, T.R., Schlormann, W., Schreiber, S., and Müller, J.P. (2006) The TatA(d) component of the *Bacillus subtilis* twin-arginine protein transport system forms homo-multimeric complexes in its cytosolic and membrane embedded localisation. *Biochim Biophys Acta*: in press.
- Wexler, M., Bogsch, E.G., Klösgen, R.B., Palmer, T., Robinson, C., and 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., and Palmer, T. (2000) TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export. *J Biol Chem* **275**: 16717-16722.
- Wickner, W., and Schekman, R. (2005) Protein translocation across biological membranes. *Science* **310**: 1452-1456.
- Wiedemann, N., Frazier, A.E., and Pfanner, N. (2004) The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* **279**: 14473-14476.
- Wiegert, T., Sahm, H., and Sprenger, G.A. (1997) Expression of the *Zymomonas mobilis* gfo gene or NADP-containing glucose:fructose oxidoreductase (GFOR) in *Escherichia coli*. Formation of enzymatically active preGFOR but lack of processing into a stable periplasmic protein. *Eur J Biochem* **244**: 107-112.
- Wild, J., Altman, E., Yura, T., and Gross, C.A. (1992) DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **6**: 1165-1172.
- Wu, L.F., Ize, B., Chanal, A., Quentin, Y., and Fichant, G. (2000) Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**: 179-189.
- Yamamoto, I., Wada, N., Ujiiye, T., Tachibana, M., Matsuzaki, M., Kajiwara, H., Watanabe, Y., Hirano, H., Okubo, A., Satoh, T., and et al. (1995) Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**: 1850-1855.

- Yen, M.R., Peabody, C.R., Partovi, S.M., Zhai, Y., Tseng, Y.H., and Saier, M.H. (2002a) Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1562**: 6-31.
- Yen, M.R., Tseng, Y.H., Nguyen, E.H., Wu, L.F., and Saier, M.H., Jr. (2002b) Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. *Arch Microbiol* **177**: 441-450.
- Yoshida, Y., Takai, M., Satoh, T., and Takami, S. (1991) Molybdenum requirement for translocation of dimethyl sulfoxide reductase to the periplasmic space in a photodenitrifier, *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. *J Bacteriol* **173**: 3277-3281.
- Yuan, J., and Cline, K. (1994) Plastocyanin and the 33-kDa subunit of the oxygen-evolving complex are transported into thylakoids with similar requirements as predicted from pathway specificity. *J Biol Chem* **269**: 18463-18467.
- Yuan, J., Henry, R., McCaffery, M., and Cline, K. (1994) SecA homolog in protein transport within chloroplasts: evidence for endosymbiont-derived sorting. *Science* **266**: 796-798.
- Zhang, W.Y., and Wu, H.C. (1992) Alterations of the carboxyl-terminal amino acid residues of *Escherichia coli* lipoprotein affect the formation of murein-bound lipoprotein. *J Biol Chem* **267**: 19560-19564.
- Zhou, J., and Xu, Z. (2005) The structural view of bacterial translocation-specific chaperone SecB: implications for function. *Mol Microbiol* **58**: 349-357.

4 Anhang

4.1 Ausgewählte Publikationen (2002 – 2006)

- I. Rose, R.W.¹, Brüser, T.¹, Kissinger, J.C., and Pohlschröder, M. * (2002) Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Mol Microbiol* **45**: 943-950. (¹ contributed equally)
- II. Brüser, T.*, and Sanders, C. (2003) An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiol Res* **158**: 7-17.
- III. Brüser, T.*, Yano, T., Brune, D.C., and Daldal, F. (2003) Membrane targeting of a folded and cofactor-containing protein. *Eur J Biochem* **270**: 1211-1221.
- IV. Kipping, M., Lilie, H., Lindenstrauss, U., Andreesen, J.R., Griesinger, C., Carlomagno, T., and Brüser, T.* (2003) Structural studies on a twin-arginine signal sequence. *FEBS Lett* **550**: 18-22.
- V. Behrendt, J., Standar, K., Lindenstrauss, U., and Brüser, T.* (2004) Topological studies on the twin-arginine translocase component TatC. *FEMS Microbiol Lett* **234**: 303-308.
- VI. Berthelmann, F., and Brüser, T.* (2004) Localization of the Tat translocon components in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **569**: 82-88.
- VII. Richter, S., and Brüser, T.* (2005) targeting of unfolded PhoA to the TAT translocon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**: 42723-42730.
- VIII. Sturm, A., Schierhorn, A., Lindenstrauss, U., Lilie, H., and Brüser, T.* (2006) YcdB from *Escherichia coli* reveals a novel class of Tat-dependently translocated hemoproteins. *J Biol Chem*, **281**, 13972-13978.

*corresponding author

4.2 Verzeichnis aller wissenschaftlichen Veröffentlichungen des Verfassers

4.2.1 Originalartikel in Fachzeitschriften

1. Howes, B.D., Abraham, Z.H.L., Lowe, D.J., Brüser, T., Eady, R.R., and Smith, B.E.* (1994) EPR and electron nuclear double resonance (ENDOR) studies show nitrite binding to type two copper centers of the dissimilatory nitrite reductase of *Alcaligenes xylosoxidans* (NCIMB 11015). *Biochemistry* **33**, 3171-3177
2. Strange, R.W., Dodd, F.E., Abraham, Z.H.L., Grossmann, J.G., Brüser, T., Eady, R.R., Smith, B.E., and Hasnain, S.S.* (1995) The substrate binding site in nitrite reductase and its similarity to Zn carbonic anhydrase. *Nature Struct. Biol.* **2**, 287-292
3. Brüser, T.*, Trüper, H.G., and Dahl, C. (1997) Cloning and sequencing of the gene encoding the high potential iron-sulfur protein (HiPIP) from the purple sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1352**, 18-22
4. Reinartz, M., Tschäpe, J., Brüser, T., Trüper, H. G., and Dahl, C.* (1998) Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **170**, 59-68
5. Brüser, T.*, Deutzmann, R., and 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
6. Brüser, T., Selmer, T., and Dahl, C.* (2000) "ADP sulfurylase" from *Thiobacillus denitrificans* is an adenylylsulfate:phosphate adenylyltransferase and belongs to a new family of nucleotidyltransferases. *J. Biol. Chem.* **275**, 1691-1698
7. Brüser, T.* (2000) Bakterielle APS:Phosphat Adenylyltransferasen. *Biospektrum* **4**, 308
8. Rose, R. W.¹, Brüser, T.¹, Kissinger, J. C., and Pohlschröder, M.* (2002) Adaptation of protein secretion to extremely high salt conditions by extensive use of the twin arginine translocation pathway. *Mol. Microbiol.* **45**, 943-950 (¹contributed equally)
9. Brüser, T.*, and Sanders, C. (2003) An alternative model of the twin-arginine translocation system, *Microbiol. Res.* **158**, 7-17

10. Brüser, T.*, Brune, D., Yano, T., and Daldal, F. (2003) Membrane *targeting* of a folded and cofactor containing protein., *Eur. J. Biochem.* **270**, 1211-1221

11. Kipping, M., Lilie, H., Lindenstrauss, U., Andreessen, J.R., Griesinger, C., Carlomagno, T., and Brüser, T.* (2003) Structural studies on a twin-arginine signal sequence., *FEBS Lett.* **550**, 18-22

12. Behrendt, J., Standar, K., Lindenstrauss, U., and Brüser, T.* (2004) Topological studies on the twin-arginine translocase component TatC. *FEMS Microbiol. Lett.*, **234**, 303-308

13. Berthelmann, F., and Brüser, T.* (2004) Localization of the Tat translocon components in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **569**, 82-88

14. Richter, S., and Brüser, T.* (2005) *targeting* of unfolded PhoA to the Tat translocon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **280**, 42723-42730

15. Sturm, A., Schierhorn, A., Lindenstrauss, U., Lilie, H., and Brüser, T.* (2006) YcdB from *Escherichia coli* reveals a novel class of Tat-dependently translocated hemoproteins. *J. Biol. Chem.*, **281**, 13972-13978.

16. Lindenstrauss, U., and Brüser, T.* (2006) Variation between *Rhodobacter capsulatus* and *Escherichia coli* Tat systems. *FEBS J.*, eingereicht

*corresponding author

4.2.2 Fachbuchbeiträge

1. Brüser, T., Lens, P., and Trüper, H.G. (2000) The biological sulfur cycle. In: *Environmental technologies to treat the sulfur pollution - principles and engineering* (Editors: Lens, P. and Hulshoff Pol, L.) pp. 47-86, IWA Publishing, London

4.3 Lehrtätigkeit

Praktika für Grundstudium

SS 02, 03, 04, 05, 06	Grundpraktikum "Mikrobiologie für Biochemiker", MLU (5 x)
SS 02	Grundpraktikum "Mikrobiologie für Biologen", MLU
SS 06:	Molekulares Querschnittspraktikum, MLU

Praktika für Hauptstudium

SS 98 - WS 99/00	Blockkurs "Bakterienphysiologie" an der Universität Bonn (4 x)
WS 02/03:	Praktikum "Gentechnologie", MLU Großpraktikum "Mikrobiologie", MLU
02 - 05	Forschungsgruppenpraktika (insgesamt neun individuelle 6-Wochen Forschungspraktika), MLU
WS 03/04, 04/05, 05/06	Praktikum "Molekulare Mikrobiologie" für Biologen (3 x), MLU
WS 04/05, 05/06	Praktikum "Molekulare Mikrobiologie" f. Biochemiker (2 x), MLU

Seminare

SS 98 seit 02	"Metalloproteine in Mikroorganismen" an der Universität Bonn "Proteintransport", Arbeitsgruppenseminare, MLU
------------------	---

Vorlesungen

SS 99	"Mikrobielle Ökologie" (3 x in Vertretung von Prof. Dr. H.G. Trüper, Universität Bonn)
WS 99/00	"Allgemeine Mikrobiologie" (2 x in Vertretung von Prof. Dr. H.G. Trüper, Universität Bonn)
SS 03	"Allgemeine Mikrobiologie", (2 x in Vertretung v. Prof. Dr. Jan R. Andreesen; Genomik);
SS 04	"Allgemeine Mikrobiologie" (4 x in Vertr. v. Prof. Dr. Jan R. Andreesen, MLU; Viren, Proteintransport);
SS 05	"Bakterielle Metalloproteine"; <u>eigene neue Vorlesung</u> (1 SWS, ganzes Semester, MLU); "Allgemeine Mikrobiologie" (2 x in Vertretung v. Prof. Dr. Jan R. Andreesen, MLU; Thema: "Viren")

Betreute Bachelor-Arbeit

- Angela Franz (FH Bonn)

"The translocation efficiency of recombinant Tat substrates subject to the abundance of the Tat system components"

Betreute Diplomanden

- Andreas Post

"Die Faltung als Determinante beim Tat-abhängigen Transport von HiPIP"

- Silke Trautmann

"Untersuchungen zur Interaktion von Tat-Substraten mit der Cytoplasmamembran von *Escherichia coli*"

- Felix Berthelmann

"Lokalisation der Komponenten des *twin-arginine translocation*-Systems in *Escherichia coli*"

- Jana Behrendt

"Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Tat-Translokons in *Escherichia coli*"

- Kerstin Standar

"Untersuchungen zur Struktur und Funktion von PspA aus *Escherichia coli*"

- Wenke Schüler

"Interaktion cytoplasmatischer Proteine mit Tat-Signalpeptiden"

- Alexander Sturm (seit Nov. 05)

"Untersuchungen zur Biogenese von YcdB in *Escherichia coli*"

- Denise Mehner (seit Januar 06)

"Untersuchungen zur Struktur und Funktion von TatA und TatB aus *Escherichia coli*"

- Antje Vogel (seit April 06)

"Gründe für einen Tat-abhängigen Transport in *Escherichia coli*"

Betreute Doktoranden

- Silke Trautmann (seit Nov. 2003)

"Faltungsansprüche des Tat-abhängigen Transports"

- Felix Berthelmann (seit Januar 2005)

"Subzelluläres *sorting* von Tat-Komponenten"

- Jana Behrendt (seit April 2005)

"Interaktionen und Konformationsänderungen der Tat-Translokase"

- Wenke Schüler (seit Juli 2005)

"Chaperone des Tat-Systems"

4.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Thomas Brüser
Geburtsdatum: 15.06.1969
Geburtsort: Olpe (Westfalen)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Ausbildung

1976-1980 Kath. Grundschule Gerlingen
1980-1989 Städt. Gymnasium für Jungen und Mädchen Olpe, Abitur (1,2)

WS 89/90 – SS 94 Studium der Biologie an der Universität zu Köln
WS 92/93 Studium der Biochemie an der University of Sussex (Brighton, England)

WS 92/93, WS 93/94 Diplomarbeit bei Prof. Robert R. Eady (Nitrogen Fixation Laboratory, Brighton, England); Betreuer in Köln: Prof. Helmut W. Klein (Biochemie)
Thema: "Studies on denitrification: Type 2 copper depleted nitrite reductase and cytochrome *cc'* of *Alcaligenes xylosoxidans*"

Juli 1994 Diplom-Prüfung (sehr gut)
Hauptfach: Biochemie (Nebenfächer: Genetik und Org. Chemie)

WS 94/95 – SS 95 Studium der Chemie an der Universität Karlsruhe
WS 94/95 Wissenschaftliche Hilfskraft bei Prof. Walter G. Zumft (Mikrobiologie, Universität Karlsruhe): Arbeiten an N₂O-Reduktase und NosR

Juli 1995-April 1999 Doktorand am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Bonn bei Prof. Hans G. Trüper
Thema: Enzymatik des oxidativen Schwefelstoffwechsels: Biochemie und Genetik bakterieller APS:Phosphat Adenylyltransferasen

6. April 1999 Promotion im Fach Mikrobiologie (summa cum laude)

Beruflicher Werdegang

- April 1999-Jan. 2000 Postdoc am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Bonn
- Jan. 2000-Dez. 2001 Postdoc an der University of Pennsylvania (Philadelphia / USA) bei Prof. Fevzi Daldal (Department of Biology);
Themen:
- "*targeting*" gefalteter Proteine in *Escherichia coli*
- *cbb₃*-Cytochromoxidase von *Rhodobacter capsulatus*
- HiPIP und Cytochrom *c₈* in *Allochromatium vinosum*
- Tat-abhängiger Transport in Archaea
- seit Januar 2002 Wissenschaftlicher Assistent (C1) am Institut für Mikrobiologie der Universität Halle bei Prof. Jan Remmer Andreesen
Leiter einer neu gebildeten selbständigen Arbeitsgruppe
Thema: Transport gefalteter Proteine in Bakterien

Stipendien und Ehrungen

- SS 91 – SS 94: Stipendiat in der Grundförderung des Cusanuswerkes
- Juli 1995 – Dez. 1997: Stipendiat in der Promotionsförderung des Cusanuswerkes
- Jan. 2000 - Dez. 2001: Postdoc-Stipendiat in der Forschungsförderung der Akademie der Naturforscher Deutschlands Leopoldina
- März 2000: Promotionspreis der VAAM (Verein für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie)

4.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Jan R. Andreesen bedanken, der mir die Rückkehr aus den USA ermöglichte und mir erlaubte, eine eigene Arbeitsgruppe zu einem eigenen Thema aufzubauen. Ich danke ihm für seine stete Unterstützung, sein immer großes Interesse und für viele erörternde Gespräche, die mir wertvolle Anregungen gaben und bei denen ich sehr viel gelernt habe.

Ich danke auch allen heutigen und ehemaligen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe (Jana Behrendt, Felix Berthelmann, Angela Franz, Ute Lindenstrauß, Denise Mehner, Andreas Post, Wenke Schüler, Kerstin Standar, Alexander Sturm, Silke Trautmann, Antje Vogel) für ihren Einsatz.

Mein Dank geht auch an alle weiteren Mitglieder des Instituts für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle, an Prof. Dietrich Nies und seine Mitarbeiter auf der dritten Etage genauso wie an alle Mitarbeiter der Abteilung von Prof. Jan R. Andreesen für die freundschaftliche Atmosphäre im Institut.

Ich möchte mich auch herzlich bei allen Kooperationspartnern aus Halle und anderen Orten für die gute Zusammenarbeit bedanken, besonders bei Prof. Jochen Balbach, Dr. Richard Bayliss (London), Prof. Alfred Blume, Prof. Karin Breunig, Prof. Christian Griesinger (Göttingen), Dr. Gerd Hause, Dr. Marc Kipping, Prof. Ralf-Bernd Klösken, Prof. Peter M. H. Kroneck (Konstanz), Dr. Hauke Lilie, Dr. Heinrich Lünsdorf (Braunschweig), Dr. Carsten Sanders (Philadelphia), Dr. Cordelia Schiene-Fischer, Dr. Angelika Schierhorn, sowie bei Prof. Milton Stubbs und allen weiteren Mitgliedern des GRK1026 und des Forschungsclusters B.

Bei Prof. Hans G. Trüper (Bonn) möchte ich mich für seine Unterstützung bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, ohne deren Verständnis diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Diese Arbeit wurde finanziell durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, das Land Sachsen-Anhalt und durch den Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Habilitationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), den 7. Juni 2006