



# **Genetische Analyse von Substrat-Translokase- Wechselwirkungen bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *Escherichia coli***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Frank Lausberg**  
aus Mönchengladbach

Jülich, August 2009

Aus dem Institut für Biotechnologie I des Forschungszentrums Jülich GmbH,  
Mitglied der Helmholtz-Gemeinschaft

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. R. Freudl  
Institut für Biotechnologie I  
Forschungszentrum Jülich GmbH

Koreferent: Prof. Dr. J. F. Ernst  
Institut für Mikrobiologie  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1. Der generelle Sekretionsweg in <i>E. coli</i> .....	2
2. Der Tat-Weg.....	4
2.1 Das Tat-Signalpeptid.....	4
2.1.1 Das Tat-Konsensus-Motiv S-R-R-x-F-L-K .....	5
2.1.2 Funktion der Tat-Signalpeptid h-Region in der Tat-abhängigen Proteintranslokation .....	7
2.1.3 Die Rolle der c-Region von Tat-Signalpeptiden und des frühen reifen Proteinteils bei der Einhaltung der Tat-Exportweg Spezifität.....	8
2.2 Der reife Proteinteil von Tat-Substraten .....	9
2.3 Der Ausschluss von falsch gefalteten Tat-Substraten vom Export.....	10
2.4 Bindung von generellen und spezifischen Chaperonen an Tat-Substrate .....	12
2.5 Der Tat-Translokationsapparat.....	14
2.5.1 Die Entdeckung und die Zusammensetzung der Tat-Translokase(n) .....	14
2.5.2 Die <i>E. coli</i> tat-Gene.....	15
2.5.3 Das TatA-Protein und seine Oligomerisierungsformen .....	16
2.5.4 Das TatB-Protein.....	19
2.5.5 Das TatC-Protein.....	21
2.5.6 Der TatBC-Rezeptorkomplex .....	22
2.6 Die Interaktionen der Tat-Signalpeptide mit der Tat-Translokase.....	22
2.7 Die Energetisierung der Tat-abhängigen Proteintranslokation .....	24
2.8 Modell zum Mechanismus der Tat-abhängigen Proteintranslokation.....	25
2.9 Zielsetzungen dieser Arbeit.....	27
<b>II. Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
1. Chemikalien und Enzyme .....	29
2. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide .....	29
3. Mikrobiologische Methoden .....	34
3.1 Kultivierung von Bakterien.....	34
3.1.1 Nährmedien .....	34
3.1.2 Kultivierungsbedingungen .....	35
3.2 Stammhaltung.....	36
3.3 Transformation von <i>E. coli</i> Stämmen .....	36
3.3.1 Transformation von <i>E. coli</i> Stämmen (nach Cohen <i>et al.</i> , 1972, verändert).....	36
3.3.2 Transformation von <i>E. coli</i> Stämmen durch Elektroporation (nach Dower <i>et al.</i> , 1988, verändert) .....	37

4. Molekularbiologische Methoden.....	38
4.1 Präparation von Plasmid-DNA.....	38
4.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden .....	38
4.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	38
4.2.2 Entsalzen von DNA.....	38
4.2.3 Fällung von DNA aus wässriger Lösung (nach Sambrook <i>et al.</i> , 1989, verändert) .....	39
4.2.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	39
4.2.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	39
4.2.6 Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase .....	40
4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten .....	40
4.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki <i>et al.</i> , 1988).....	40
4.2.9 Nicht radioaktive DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode .....	41
4.2.10 Ortsgerichtete Mutagenese.....	41
4.2.11 Ungerichtete Mutagenese von DNA-Fragmenten durch fehlerhafte Polymerasekettenreaktion („error-prone“-PCR).....	43
5. Proteinchemische Methoden .....	43
5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, variiert nach Lämmli, 1970). 43	
5.2 Western-Blot .....	45
5.3 Präparation von <i>E. coli</i> -Membranen .....	46
5.4 Fraktionierung von <i>E. coli</i> Zellen mittels osmotischen Schocks .....	47

### **III. Ergebnisse.....49**

1. Das TorA-MalE-Reportersystem:Aufbau und Anwendungsmöglichkeiten zur Untersuchung von Substrat-Translokase-Interaktionen bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation in <i>E. coli</i> .....	49
1.1 Das TorA-MalE-Reporterprotein.....	49
1.2 Experimenteller Ansatz zur Untersuchung von Substrat-Translokase-Interaktionen bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation in <i>E. coli</i> .....	51
2. Die Erkennung des Tat-Signalpeptides an der Tat-Translokase .....	53
2.1 Ortsgerichtete Mutagenese des Phenylalanins im Tat-Konsensus-Motivs .....	54
2.1.1 Die Position des Phenylalanins im Tat-Konsensus-Motivs kann eine kritische Determinante für den Tat-abhängigen Export des TorA-MalE-Reporters darstellen. . 54	
2.2 Untersuchung der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch die KQ-Suppressortranslokasen .....	59
2.3 Selektion und Isolierung von Tat-gekoppelten Suppressormutanten des exportdefekten TorA[F14D]-MalE-Reporters .....	61
2.4 Identifizierung der Mutationsorte in den F14D-Suppressormutanten SPS-F14D-UM1 , SPS-F14D-UM2, SPS-F14D-UM3 und SPS-F14D-UM4 .....	63
2.5 Charakterisierung ausgewählter Tat-Mutantentranslokasen .....	66
2.5.1 Vergleich der Tat-Proteinmengen in der Cytoplasmamembran der Stämme mit den mutierten Tat-Translokasen.....	67

2.5.2 Genetische Hinweise auf eine Kooperation des TatB N-Terminus und des TatC N-Terminus bei der Erkennung/Bindung des Signalpeptids des TorA[F14D]-MalE-Reporters .....	69
2.5.2.1 Die Phänotypen der Stämme mit den mutierten Tat-Translokasen zeigen eine Steigerung des TorA[F14D]-MalE Exports durch die Kombination von Suppressormutationen .....	70
2.5.2.2 Der gesteigerte TorA[F14D]-MalE Export in den Stämmen mit den Tat-Suppressortranslokasen mit den paarweise eingefügten Suppressormutationen wird auf Proteinebene bestätigt .....	75
2.5.3 Auch der Export des TorA[KQ]-MalE-Reporters wird durch die Kombination von Suppressormutationen aus dem TatB N-Terminus und dem TatC N-Terminus gesteigert .....	79
2.5.3.1 Die Suppressortranslokasen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters vermitteln auch den Export des TorA[KQ]-MalE-Reporters .....	80
2.5.3.2 Die Tat-Translokasen mit den paarweise eingefügten Suppressormutationen zeigen einen stark gesteigerten Export des TorA[KQ]-MalE-Reporters .....	83
2.5.4 Untersuchung zum Export des unveränderten TorA-MalE-Reporters durch die Suppressortranslokasen .....	87
2.5.4.1 Die Suppressortranslokasen vermitteln auch den Export des unveränderten TorA-MalE-Reporters .....	87
2.5.4.2 Die Suppressortranslokasen mit der Mutation L9Q in TatB zeigen einen verringerten Export des TorA-MalE-Reporters .....	89
2.6 Die Effekte von einzelnen Suppressormutationen auf den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters summieren sich auch bei Kombination von drei Suppressormutationen in einer Tat-Translokase.....	93
2.6.1 Vergleich der Tat-Proteinmengen in der Cytoplasmamembran der <i>E. coli</i> Stämme mit den synthetischen Suppressortranslokasen .....	95
2.6.2 Die synthetischen Suppressortranslokasen SPS-L9Q(B)/K18E(C) und SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C) vermitteln einen Export des TorA[F14D]-MalE-, des TorA[KQ]-MalE- und des unveränderten TorA-MalE-Reporters .....	97
2.6.3 Die synthetischen Suppressortranslokasen zeigen einen zunehmend gesteigerten Export des TorA[F14D]-MalE und des TorA[KQ]-MalE-Reporters bei Erhöhung der Suppressormutationszahl aber einen reduzierten Export des unveränderten TorA-MalE-Reporters .....	98
3. Genetische Untersuchungen zu Wechselwirkungen innerhalb der Tat-Translokase .....	103
3.1 Untersuchungen zum Export des TorA-MalE Reporterproteins durch die TatABC-P48A und TatABC-F94A Translokasen .....	106
3.2 Untersuchungen zum Export des authentischen TorA durch die TatABC-P48 und die TatABC-F94A Translokase.....	107
3.3 Selektion und Isolierung von Tat-gekoppelten Suppressormutanten der Tat-inaktivierenden Mutation P48A in TatC, bei denen der TorA Export durch „second site“ Suppressormutationen wiederhergestellt ist.....	109
3.4 Identifizierung der Mutationsorte in den P48A-Suppressortranslokasen P48A-S-UM4 und P48A-S-UM5, und Bestimmung der für die Suppression verantwortlichen Mutationen .....	111
3.5 Charakterisierung der Suppressortranslokasen der Tat-inaktivierenden Mutation P48A in TatC.....	114
3.5.1 Vergleich der Tat-Proteinmengen in der Cytoplasmamembran von <i>E. coli</i> GSJ101 mit der TatABC-Translokase, der TatABC-P48A-Translokase und den P48A-Suppressortranslokasen .....	114

3.5.2 Genetische Hinweise auf Bereiche in TatB und in TatC die an der Interaktion von TatB und TatC im TatBC-Rezeptorkomplex beteiligt sind .....	117
3.5.2.1 Sowohl in der P48A-S-UM4- als auch in der P48A-S-UM5-Ursprungssuppressortranslokase ist die volle Suppression jeweils durch die Kombination von zwei P48A-Suppressormutationen bedingt.....	117
3.5.2.2 Die Untersuchung zum Export des TorA-MalE-Reporters durch die P48A-Suppressortranslokalen auf Proteinebene bestätigt, dass in P48A-S-UM4 und in P48A-S-UM5 jeweils beide Suppressormutationen zusammen für die volle Suppression verantwortlich sind .....	122

## **IV. Diskussion ..... 127**

1. Substrat-Translokase-Interaktion während der Tat-abhängigen Proteintranslokation...	127
1.1 Die Aminosäure an der Phenylalanin-Position im Tat-Konsensus-Motiv kann eine kritische Determinante für die Funktionalität des TorA-Signalpeptides darstellen.....	128
1.2 Die Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[KQ]-Reporters supprimieren auch den Exportdefekt des TorA[F14D]-Reporters.....	131
1.3 Isolierung und Charakterisierung von Suppressortranslokalen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters .....	132
1.3.1 Die Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters finden sich, wie die Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters, in den N-Termini von TatB und TatC .....	132
1.3.2 Alle isolierten Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters vermitteln auch einen Export des jeweils anderen exportdefekten TorA-MalE-Reporters.....	133
1.3.3 Ein Einfluss der reduzierten Tat-Proteinmengen in den mutierten Tat-Translokalen auf die Effizienz der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters ist nicht auszuschließen .....	135
1.3.4 Die Mutation L9Q im TatB N-Terminus bewirkt möglicherweise eine Veränderung in der Signalpeptidbindetasche, die zur Folge hat, dass das unveränderte TorA-Signalpeptid schlechter gebunden werden kann .....	137
1.3.5 Erklärungsmöglichkeiten zur Wirkungsweise der Suppressormutationen in den N-Termini von TatB und TatC und zur Kooperation beider Bereiche bei der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters .....	140
1.3.5.1 Der TatC N-Terminus bildet wahrscheinlich einen Teil einer Signalpeptidbindetasche.....	141
1.3.5.2 Die Suppressormutationen im N-Terminus von TatB bewirken möglicherweise einen direkten Kontakt vom TatB N-Terminus zum Tat-Signalpeptid, der gleichzeitig mit dem Kontakt des Tat-Signalpeptids zu TatC stattfindet.....	143
1.4 Modell zur Bindung/Erkennung von Tat-Signalpeptiden an der Tat-Translokase am Beispiel der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters.....	145
1.5 Die Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters erinnern an die Prl-Mutationen aus der Sec-abhängigen Proteintranslokation .....	149

2. Genetische Untersuchungen zu Wechselwirkungen innerhalb der Tat-Translokase .....	150
2.1 Die Tat-inaktivierende Mutation P48A in TatC als Ausgangspunkt zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen TatB und TatC in der Tat-Translokase .....	151
2.2 Genetische Hinweise für eine Beteiligung der TatB-Transmembranhelix, eines Bereichs in der cytoplasmatischen Domäne von TatB und des extremen N-Terminus von TatC, an der Interaktion von TatB und TatC im TatBC-Rezeptorkomplex .....	153

<b>V. Zusammenfassung .....</b>	<b>159</b>
---------------------------------	------------

<b>VI. Summary.....</b>	<b>161</b>
-------------------------	------------

<b>VII. Literatur .....</b>	<b>163</b>
-----------------------------	------------

## Abkürzungen:

A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cm	Chloramphenicol
d	Tage
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat (N steht für eines der Nukleoside A: Adenosin, C: Cytidin, G: Guanosin, T: Thymidin)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanin
g	Gramm
g/l	Gramm/Liter
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunden
IgG	Immunglobulin G
IM	Innere Membran / Cytoplasmamembran
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilo Dalton
kV	Kilovolt
l	Liter
$\Delta p$	Membranpotential
mA	Milliampère
$\mu\text{F}$	Mikrofarad
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{g/ml}$	Mikrogramm/Milliliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mg	Milligramm
mg/l	Milligramm/Liter
mg/ml	Milligramm/Milliliter
min	Minuten
M	Molar
mM	Millimolar
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
$\Omega$	Ohm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. „rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur

sek	Sekunden
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Laemmli
SP	Signalpeptid
SPase	Signalpeptidase
T	Thymin
TAE	Tris- Acetat- EDTA
TEMED	N,N,N',N' -Tetramethylethyldiamin
TMS	Transmembransegment
TMAO	Trimethylaminoxid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtskultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

**Drei- und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren:**

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



## I. Einleitung

*Escherichia coli* ist ein Gram-negatives, fakultativ aerobes Bakterium aus der Klasse der Gamma Proteobakterien, dessen natürliches Habitat hauptsächlich der menschliche und der tierische Darm ist. *E. coli* wird weit verbreitet als prokaryontischer Modellorganismus zur Untersuchung mikrobieller, aber auch ubiquitär konservierter zellulärer Prozesse verwendet. Vorteilhaft hierbei ist, dass die *E. coli* Zelle im Vergleich zu eukaryontischen Zellen recht einfach aufgebaut ist. Sie ist leicht kultivierbar, hat eine schnelle Generationsfolge und ist genetisch sehr gut zugänglich. Trotz des vergleichbar einfachen Aufbaus besteht *E. coli* aber trotzdem noch aus fünf separaten Reaktionsräumen, den so genannten Kompartimenten. Hierbei handelt es sich um das Cytoplasma, die innere Membran welche das Cytoplasma nach außen abgrenzt (auch als Cytoplasmamembran bezeichnet), den darauf folgenden periplasmatischen Raum (auch als Periplasma bezeichnet), die äußere Membran, welche die Zelle von der Umgebung abschirmt und den extrazellulären Raum. Das *E. coli* Genom hat eine Größe von ca. 4,6 Megabasen und kodiert für über 4200 Proteine. Alle diese Proteine werden im Cytoplasma an den Ribosomen synthetisiert. Circa ein Drittel dieser Proteine haben ihren Bestimmungsort aber nicht im Cytoplasma, sondern in einem der vier anderen Kompartimente der *E. coli* Zelle. Um diese Proteine an ihren Bestimmungsort zu bringen, haben sich in der prokaryontischen Zelle Sortierungsmechanismen entwickelt, die die korrekte Verteilung dieser nicht cytosolischen Proteine gewährleisten. Jedes Protein, dessen Zielort nicht das Cytoplasma ist, trägt neben der Information für seine Faltung auch eine Information für seine subzelluläre Lokalisation, kodiert in seiner Aminosäureabfolge. Unterscheiden kann man bei den nicht cytosolischen Proteinen zunächst einmal zwischen integralen Proteinen der Cytoplasmamembran, welche direkt in die Membran integriert werden und jenen Proteinen, die für ihre korrekte Lokalisation die Cytoplasmamembran passieren müssen. Der Prozess des Transports von Proteinen durch eine Membran wird als Translokation bezeichnet. Die Translokation über die Cytoplasmamembran erfolgt über membranintegrale Multienzymkomplexe, den so genannten Translokasen.

In *E. coli* gibt es im Wesentlichen zwei Möglichkeiten wie das dafür vorgesehene Protein über die Cytoplasmamembran transloziert werden kann. Die erste ist der generelle Sekretionsweg, welcher als Sec-Weg (Sec vom engl. Secretion) bezeichnet wird. Der bakterielle Sec-Weg transloziert in den allermeisten Spezies den Großteil aller exportierten Proteine über die Cytoplasmamembran. Der Transport der Substrate erfolgt hierbei in einer ungefalteten Konformation. Die zweite Möglichkeit ist der Transport über den so genannten

## I. Einleitung

Tat-Weg (twin arginine translocation). Der Tat-Weg ist im Speziellen dadurch charakterisiert, dass er seine Substrate in einer vollständig gefalteten Konformation über die Cytoplasmamembran transloziert. Ein gemeinsames Merkmal beider Wege ist die Erkennung ihrer Substrate über N-terminale Signalpeptide. Im Folgenden soll neben einer kurzen Erläuterung der wichtigsten Vorgänge bei der Sec-abhängigen Proteintranslokation vor allem der derzeitige Wissenstand zur Tat-abhängigen Proteintranslokation detailliert dargestellt werden.

### **1. Der generelle Sekretionsweg in *E. coli***

Der Sec-Weg ist ein Mechanismus zur Translokation von Exportproteinen über- und zur Insertion von Membranproteinen in biologische Membranen. Er kommt sowohl in der Cytoplasmamembran von Bakterien und Archaea als auch in den Membranen eukaryontischer Organellen wie dem Endoplasmatischen Retikulum und den Thylakoiden in Pflanzen-Chloroplasten vor.

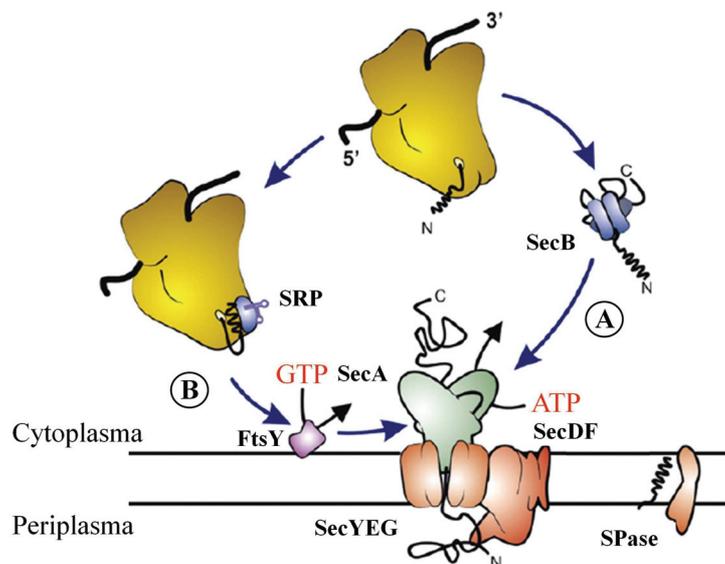
Beim Sec-Weg von *E. coli* erfolgt die Translokation eines ungefalteten Substrates durch eine sehr kleine Pore (~4 Angström an der engsten Stelle) innerhalb eines heterotrimeren Komplexes der Proteine SecY, SecE und SecG in der Cytoplasmamembran (Driessen und Nouwen, 2007). Neben diesen Porenkomponenten gibt es noch akzessorische Proteine, wie SecD und SecF, die durch Interaktion mit der SecYEG-Pore zu einem effizienten Translokationsprozess beitragen (Papanikou *et al.*, 2007).

Damit die Substrate der Sec-Translokase auch an diese gelangen, tragen sie meistens eine N-terminal gelegene Signalsequenz vor dem reifen Proteinteil, die die Erkennung durch die Translokase und auch ihr „targeting“ zur Translokase gewährleistet. Diese Signalpeptide haben einen dreigliedrigen Aufbau und bestehen aus einer positiv geladenen n-Region, einer hydrophoben h-region und einer polaren c-Region, welche die Erkennungsstelle für die membranständige Signalpeptidase (SPase) beinhaltet (von Heijne, 1990). Diese spaltet das Signalpeptid während oder kurz nach der Translokation vom reifen Protein ab. Die Erkennungssequenz für diese SPase bilden hierbei kleine aliphatische Aminosäuren an Position -1 und -3 des Signalpeptides (häufig sind es Alanine), ausgehend von der Schnittstelle (von Heijne, 1990).

In *E. coli* werden die meisten Substrate der Sec-Translokase über den SecB/SecA-abhängigen „targeting“-Weg zur SecYEG-Pore geleitet (Abbildung 1A). SecB ist ein molekulares

Chaperon, welches das Exportsubstrat bindet und in einem ungefalteten Zustand hält (Fekkes und Driessen, 1999), da es nur so exportkompetent ist. SecB übergibt das Substrat an das an SecYEG gebundene SecA-Protein (Driessen und Nouwen, 2007), welches als Nanomotor der Translokation das Substrat durch den Kanal aus SecYEG treibt. Dieses geschieht durch Konformationsänderungen in SecA, welche durch Zyklen von ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse hervorgerufen werden (Driessen und Nouwen, 2007).

Die meisten Cytoplasmamembranproteine werden nicht über den SecB/SecA- sondern über den SRP-(signal recognition partikel) „targeting“-Weg zur Sec-Pore geleitet (Abbildung 1B). SRP bindet an das naszierende Membranprotein während es noch am Ribosom synthetisiert wird. Anschließend geleitet SRP diesen Komplex aus naszierendem Membranprotein und Ribosomen an seinen Rezeptor, das FtsY-Protein. Von hieraus wird das Substrat mitsamt dem anhängenden Ribosom nach GTP-Hydrolyse am SRP/FtsY-Komplex an die SecYEG-Translokase übergeben (Valent *et al.*, 1998), wo dieses durch ein laterales „gate“ der SecYEG-Pore in die Membran integriert wird (Driessen und Nouwen, 2007).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Sec-abhängigen Proteintranslokation in *E. coli*.** Auf der rechten Seite ist unter (A) das SecB/SecA-abhängige posttranslationale „targeting“ dargestellt. Links unter (B) ist das SRP-abhängige „targeting“ zur Sec-Translokase dargestellt, welches cotranslational abläuft. Weitere Informationen sind dem Text zu entnehmen (Abbildung verändert nach Natale *et al.*, 2007)

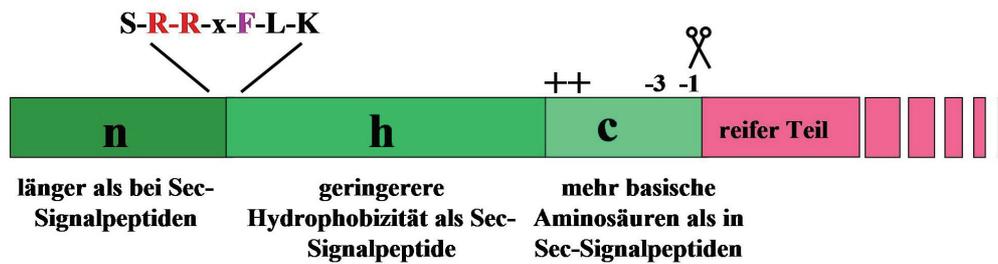
## **2. Der Tat-Weg**

Der bakterielle Tat-Weg ist ein alternativer Weg, über den Proteine aus dem Cytosol über die Cytoplasmamembran transportiert werden. Dieser Weg findet sich auch in der Thylakoidmembran von Chloroplasten und in der Cytoplasmamembran von Archaeobakterien (Sargent, 2007). Als hauptsächliche Modellsysteme für die Untersuchung des Tat-Weges dienten bislang vor allem *E. coli* sowie pflanzliche Chloroplasten. In Chloroplasten wird dieser Transportweg, welcher Proteine über die Thylakoidmembran transloziert, auch als cpTat-Weg oder als  $\Delta$ pH-Weg bezeichnet.

Die auffälligste Besonderheit des Tat-Wegs im Vergleich zum Sec-Weg ist seine Fähigkeit, seine Substrate in einer vollständig gefalteten Konformation zu translozieren.

### **2.1 Das Tat-Signalpeptid**

Tat-Signalpeptide weisen in ihrem Aufbau ebenso wie Sec-Signalpeptide eine Unterteilung in drei Bereiche auf. Wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt bestehen sie ebenfalls aus einer positiv geladenen n-Region, einer hydrophoben h-Region und einer polaren c-Region, welche die Erkennungsstelle für die Signalpeptidase beinhaltet. Jedoch unterscheiden sich Tat-Signalpeptide in einigen Aspekten deutlich von Sec-Signalpeptiden. Bei einigen dieser Unterschiede konnte gezeigt werden, dass diese von besonderer Wichtigkeit für die spezifische Einschleusung von Tat-Substraten in den Tat-Weg sind. Die wichtigste Besonderheit ist die Existenz eines konservierten Motivs von Aminosäuren, welches am Übergang von der n- zur h-Region zu finden ist und die Konsensussequenz SRRxFLK besitzt (Palmer *et al.*, 2005). Die zwei benachbarten Arginine (RR) sind hierbei besonders hoch konserviert, während die anderen Konsensus-Reste variabler sind, was die möglichen Aminosäuren an diesen Positionen angeht. Da das nahezu invariable Zwillingarginin das herausragende Charakteristikum im Signalpeptid eines Tat-Substrates ist, wurde es auch zur Namensgebung des Tat-Wegs herangezogen (Tat als Abkürzung für „twin arginine translocation“) (Sargent *et al.*, 1998).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Tat-Signalpeptides.** Nähere Informationen sind dem Text zu entnehmen

Generell sind Tat-Signalpeptide mit durchschnittlich 37 Aminosäuren deutlich länger als Sec-Signalpeptide mit ca. 23 Aminosäuren (Palmer *et al.*, 2005). Dieser Unterschied ist hauptsächlich auf eine verlängerte n-Region zurückzuführen. Ein weiterer Unterschied zu Sec-Signalpeptiden ist die geringere Hydrophobizität der h-Region (Cristobal *et al.*, 1999). Weiterhin ist die c-Region von Tat-Signalpeptiden reicher an basischen Aminosäuren als die c-Region in Sec-Signalpeptiden und eben diese basischen Aminosäuren sind ein Faktor, der eine Einschleusung eines Tat-Substrates in den Sec-Weg verhindert (Bogsch *et al.*, 1997; Cristobal *et al.*, 1999; Blaudeck *et al.*, 2003; Tullman-Ercek *et al.*, 2007). Mit den genannten Besonderheiten der Tat-Signalpeptide haben sich mittlerweile ein ganze Reihe von Arbeiten im Detail beschäftigt. Die wichtigsten Erkenntnisse hierzu werden im Folgenden beschrieben.

### 2.1.1 Das Tat-Konsensus-Motiv S-R-R-x-F-L-K

Als herausragendes Charakteristikum eines Tat-Signalpeptides war das nahezu invariable Zwillingarginin im Tat-Konsensus-Motiv Gegenstand zahlreicher experimenteller Untersuchungen.

Bereits der konservative Austausch eines der beiden Arginine gegen das ebenfalls positiv geladene Lysin führt zumindest zu einer verringerten Exporteffizienz (Halbig *et al.*, 1999; Buchanan *et al.*, 2001; Stanley *et al.*, 2000; DeLisa *et al.*, 2002). Auffällig hierbei ist, dass ein Austausch des zweiten Arginins die Exporteffizienz zumeist stärker beeinträchtigt. In denselben Studien führte der Austausch beider Arginine gegen zwei Lysine zu einem kompletten Block des Tat-abhängigen Exports des entsprechenden Substrates. In anderen Studien konnte aber anhand von sehr sensitiven Reporterproteinen gezeigt werden, dass selbst bei einem Austausch des Zwillingarginins gegen zwei Lysine noch ein restlicher Tat-abhängiger Export nachweisbar war (Ize *et al.*, 2002; Kreutzenbeck *et al.*, 2007). Im Fall von Kreutzenbeck *et al.* (2007) führte erst der weitere Austausch von einem der positiv geladenen

## I. Einleitung

Lysine gegen das ungeladene Glutamin (KK zu KQ) zu einem kompletten Block des Tat-abhängigen Exports eines TorA-MalE Reporterproteins, welches aus dem Signalpeptid der Trimethylaminoxid- (TMAO) Reduktase TorA fusioniert an den reifen Teil des Maltosebindeproteins (MalE) besteht. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Zwillingsarginin zwar eine sehr wichtige Rolle spielt, aber nicht absolut essentiell für den Tat-abhängigen Proteinexport im mechanistischen Sinne zu sein scheint. So gibt es tatsächlich auch einige wenige natürliche Tat-Substrate, bei denen nur eines der beiden Arginine vorhanden ist. (Hinsley *et al.*, 2001; Molik *et al.*, 2001; Ignatova *et al.*, 2002).

Da auch die anderen Aminosäuren im Tat-Konsensus-Motiv mit einer Frequenz von über 50% konserviert sind (Palmer *et al.*, 2005), müssen auch sie folglich eine Rolle in der Tat-abhängigen Proteintranslokation spielen. Die bemerkenswerteste Aminosäure hierbei ist das Phenylalanin (F), welches 2 Aminosäuren C-terminal vom zweiten Arginin liegt. So bewirkt ein Austausch des hydrophoben Phenylalanins gegen hydrophile Aminosäuren und sogar gegen schwächer hydrophobe Reste mitunter eine drastische Reduktion des Tat-abhängigen Exports der entsprechenden Substrate, die abhängig von der Art der Substitution sogar bis zu einem kompletten Exportblock führen können (Stanley *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006; Mendel *et al.*, 2008). Interessanterweise ist das Phenylalanin in Signalpeptiden der Substrate des Tat-Wegs in der Thylakoidmembran von Chloroplasten für gewöhnlich nicht vorhanden (Stanley *et al.*, 2000, Gérard und Cline, 2007). Wird es dort aber künstlich eingefügt, kommt es sogar in Abwesenheit des Protonengradienten zu einer starken Bindung des Signalpeptids an die Tat-Translokase, die sonst nur durch den Protonengradienten hervorgerufen wird (Gérard und Cline, 2007). Da das Phenylalanin an anderen Positionen im Signalpeptid diese stärkere Bindung nicht hervorruft, wird davon ausgegangen, dass dieser Effekt nicht nur durch die Hydrophobizität des Phenylalanins hervorgerufen wird, sondern dass das Phenylalanin genau an dieser Position im Tat-Konsensus-Motiv als strukturelle Determinante für die Bindung des Signalpeptids an die Translokase dient (Gérard und Cline, 2007). Substitutionen der anderen Reste im Konsensus-Motiv haben zumeist keinen großen Einfluss auf den Tat-abhängigen Export des entsprechenden Substrates. Einzig bei einer Substitution der Serin-Konsensus-Position (S) mit Alanin wurden in einer Studie mit verschiedenen Signalpeptiden größere Effekte beobachtet, die in einem Fall sogar zu einem Exportblock führten (Mendel *et al.*, 2008).

Wie bereits oben beschrieben ist das Zwillingsarginin nahezu essentiell um den effizienten Export eines Tat-Substrates durch die Tat-Translokase zu vermitteln. Jedoch ist es, zusammen mit den ebenfalls wichtigen restlichen Aminosäuren des Tat-Konsensus-Motivs, nicht die

einzigste Voraussetzung für eine Tat-abhängige Translokation eines Exportsubstrates. Platziert man das Zwillingsarginin an entsprechender Stelle in einem Sec-Signalpeptid, so hat dies nicht zwingend die Umleitung dieses Substrates in den Tat-Weg zur Folge (Brüser *et al.*, 1998). Es muss demnach noch andere Kriterien in Tat-Signalpeptiden geben, die zu einer spezifischen Einhaltung des Tat-Weges beitragen.

### **2.1.2 Funktion der Tat-Signalpeptid h-Region in der Tat-abhängigen Proteintranslokation**

Die h-Region von Tat-Signalpeptiden weist eine signifikant geringere Hydrophobizität auf als die h-Region von Sec-Signalpeptiden. Cristobal *et al.* (1999) konnten zeigen, dass die Hydrophobizität der h-Region ein wichtiger Faktor für die Einhaltung der Tat-Spezifität eines Tat-Substrates ist. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten artifiziellen Tat-Substrat handelte es sich um die periplasmatische Domäne P2 der Signalpeptidase LepB, welche an das Signalpeptid der Trimethylaminoxid- (TMAO) Reduktase TorA fusioniert wurde. Eine Erhöhung der Hydrophobizität der h-Region dieses Tat-abhängigen Konstruktes TorA-LepB führte zu seiner Umleitung in den Sec-Weg.

Neben ihrer Funktion bei der spezifischen Einhaltung des Tat-Weges suggerieren neuere Studien eine Beteiligung der h-Region an einem der Translokation vorgeschalteten Tat-unabhängigen „targeting“-Schritt. So konnte bereits gezeigt werden, dass Tat-Substrate in Abhängigkeit von ihrem Signalpeptid, aber unabhängig vom Zwillingsarginin sowie von der Präsenz von Tat-Translokase Komponenten in die Cytoplasmamembran inserieren (Brüser *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2006; Schanmugham *et al.*, 2006). Basierend auf ihren experimentellen Daten favorisieren Schanmugham *et al.* (2006) hierbei ein sehr spekulatives Modell, bei dem die positiv geladenen Reste in der Signalpeptid n-Region mit den negativ geladenen Lipid Kopfgruppen interagieren und die h-Region in die Cytoplasmamembran eintaucht. Das Vorläuferprotein würde dann lateral entlang der Membran diffundieren, was in der Bindung des Substrates an der Translokase endet. Hou *et al.* (2006) spekulieren darüber, dass die der Translokation vorgeschaltete Membraninsertion dazu dienen könnte das Konsensus-Motiv mit seinem Zwillingsarginin korrekt für die Bindung an der Tat-Translokase zu positionieren.

### **2.1.3 Die Rolle der c-Region von Tat-Signalpeptiden und des frühen reifen Proteinteils bei der Einhaltung der Tat-Exportweg Spezifität**

In der c-Region von Tat-Signalpeptiden finden sich häufig positiv geladene Aminosäuren. Diese sind in der c-Region von Sec-Signalpeptiden hingegen nahezu nie zu finden (von Heijne, 1986). Es konnte gezeigt werden, dass diese positiv geladenen Aminosäuren als „Sec-avoidance“-Signal fungieren und einen Transport über den Sec-Weg verhindern (Bogsch *et al.*, 1997; Cristobal *et al.*, 1999; Blaudeck *et al.*, 2003). Eine neuere Untersuchung hat darüber hinaus gezeigt, dass nicht nur positiv geladene Aminosäuren in der c-Region des Tat-Signalpeptides, sondern auch die Ladungseigenschaften der ersten Aminosäuren des reifen Proteinteils beeinflussen, ob ein Substrat strikt Tat-abhängig exportiert wird oder ob es gegebenenfalls auch Sec-abhängig exportiert werden kann (Tullman-Ercek *et al.*, 2007). Bereits in älteren Studien konnte gezeigt werden, dass positiv geladene Aminosäuren, platziert im N-terminalen Bereich des reifen Proteinteils eines Sec-Substrates, dessen Sec-abhängige Translokation stark behindern oder sogar blockieren (Li *et al.*, 1988; Yamane und Mizushima, 1988; Andersson und von Heijne, 1991; Geller *et al.*, 1993; Kajava *et al.*, 2000). Auf welcher Ebene der Sec-abhängigen Proteintranslokation beziehungsweise an welcher Komponente des Sec-Weges dieses „Sec-avoidance“ stattfindet, ist bisher nicht geklärt. Jedoch konnte mit dem TorA-MalE-Fusionsprotein gezeigt werden, dass dieses „Sec-avoidance“-Signal eine Bindung des „targeting“-Chaperons SecB wohl nicht verhindert, da es Hinweise darauf gibt, dass SecB an das TorA-MalE-Fusionsprotein bindet, obwohl dieses effektiv durch ein „Sec-avoidance“-Signal im TorA-Signalpeptid von der Sec-abhängigen Proteintranslokation ausgeschlossen wird (Blaudeck *et al.*, 2003).

Es ist zu erwähnen, dass für einige Tat-Signalpeptide gezeigt werden konnte, dass sie grundsätzlich sowohl einen Tat- als auch einen Sec-abhängigen Proteinexport vermitteln können (Sanders *et al.*, 2001; DeLisa *et al.*, 2003; Tullman-Ercek *et al.*, 2007). Sehr häufig ist es aber so, dass der reife Teil des zu exportierenden Proteins einen Export über den Sec-Weg unmöglich macht. Welche Substrate es sind, die über den Tat-Weg exportiert werden müssen und warum sie inkompatibel mit dem Sec-Weg sind, wird im nächsten Abschnitt detailliert beschrieben.

## 2.2 Der reife Proteinteil von Tat-Substraten

Viele der bislang in der Literatur beschriebenen Tat-Substrate sind Cofaktor-haltige Redoxproteine wie z.B. die Trimethylaminoxid- (TMAO) Reduktase TorA. Darüberhinaus gibt aber auch Beispiele für den Export von multimeren Proteinen. Beispielsweise besitzt *E. coli* mindestens 4 Proteine die Tat-abhängig exportiert werden aber selber kein Signalpeptid haben (Berks *et al.*, 2005). Diese Proteine werden zusammen mit ihrem Partner, welcher das Tat-Signalpeptid besitzt, im sogenannten „hitchhiker“ (engl. Anhalter) Verfahren als Heterodimer exportiert. Ein Beispiel hierfür ist die [NiFe]-Hydrogenase-2 aus *E. coli*. HybO, die kleinere der beiden Untereinheiten, besitzt hierbei ein Tat-Signalpeptid, die größere Untereinheit HybC hat kein eigenes Signalpeptid und bedarf der Hilfe der kleineren Untereinheit und deren Signalpeptid um exportiert zu werden (Rodrigue *et al.*, 1999). Darüberhinaus besitzen beide Untereinheiten einen eigenen Cofaktor, HybO hat ein Eisenschwefel-Cluster- und HybC einen Nickel-Cofaktor. Neben solchen heterodimeren Tat-Substraten gibt es aber auch homooligomere Tat-Substrate wie die NADP-abhängige Glucose-Fruktose-Oxidoreduktase (GFOR) aus dem Gram-negativen Organismus *Zymomonas mobilis*. Diese wird in *Z. mobilis* Tat-abhängig exportiert und bildet ein Homotetramer, wobei jedes einzelne Monomer eine Signalsequenz besitzt (Halbig *et al.*, 1999; Nurizzo *et al.*, 2001). Hierbei konnte allerdings bisher nicht gezeigt werden, dass die GFOR tatsächlich als Homotetramer exportiert wird. Die GFOR muss aber wohl zumindest als Dimer exportiert werden, da die Cofaktorbindung über Bereiche zwischen 2 Monomeren geschieht.

Alle oben beschriebenen Proteine haben gemeinsam, dass sie mindestens einen Cofaktor besitzen. Damit Cofaktor-haltige Proteine eine aktive Form annehmen können, müssen sie vollständig gefaltet und der Cofaktor dabei eingebaut sein. In den meisten Fällen kann der Cofaktoreinbau nur im Cytoplasma vorgenommen werden, so dass ein vollständig gefaltetes Protein mit eingebautem Cofaktor exportiert werden muss. Bei multimeren Proteinen kommt hierbei noch erschwerend hinzu, dass sich alle Untereinheiten korrekt assemblieren müssen. Vollständig gefaltete Proteine oder Proteinkomplexe können aber nicht über den Sec-Weg exportiert werden, denn hier müssen die Substrate in einer ungefalteten Form und ohne Cofaktor vorliegen. Somit sind Cofaktor-haltige Enzyme und multimeren Proteinkomplexe für ihren Export auf den Tat-Weg angewiesen.

Neben der Gruppe an Proteinen mit Cofaktoren und multimeren Proteinkomplexen gibt es interessanterweise auch monomere Proteine ohne Cofaktoren die Tat-abhängig exportiert

## I. Einleitung

werden. In *E. coli* sind dies z.B. die Zellwandamidasen AmiA und AmiC oder das SufI Protein, welches an der Zellteilung beteiligt ist (Bernhardt und de Boer, 2003; Sargent *et al.*, 1999; Tarry *et al.*, 2009). Bei diesen Proteinen wird angenommen, dass ihre Faltungskinetik so schnell ist, dass sie inkompatibel zum Sec-Weg sind, bei dem eine ungefaltete Form des Substrates eine Voraussetzung für den Export ist (Lee *et al.*, 2006b).

### 2.3 Der Ausschluss von falsch gefalteten Tat-Substraten vom Export

Wie bereits in Punkt 2.2 erwähnt werden das TorA Protein aus *E. coli*, die heterodimere Hydrogenase-2 aus *E. coli*, und die homotetramere GFOR aus *Z. mobilis* Tat-abhängig in einer aktiven Form mit eingebauten Cofaktor exportiert. Bei allen drei Fällen war sehr auffällig, dass diese bei einem gestörten Cofaktoreinbau nur schlecht, beziehungsweise bei einem blockierten Cofaktoreinbau gar nicht mehr Tat-abhängig exportiert wurden (Santini *et al.*, 1998; Rodrigue *et al.*, 1999; Halbig *et al.*, 1999). Es gibt somit einen Mechanismus, der dafür sorgt, dass Tat-Substrate nur in einer korrekt gefalteten und aktiven Form exportiert werden. Ob es sich hierbei um eine aktive, von der Translokase ausgeübte Qualitätskontrolle handelt, bei der der Faltungszustand der Substrate vor der Translokation durch die Translokase überprüft wird, oder ob falsch- bzw. ungefaltete Substrate schlicht inkompatibel mit dem Translokationsmechanismus sind, wird gegenwärtig in der Literatur kontrovers diskutiert und ist Ziel zahlreicher experimenteller Ansätze.

Die Idee der Qualitätskontrolle durch die Tat-Translokase wurde von DeLisa *et al.* (2003) aufgegriffen. Es wurde gezeigt, dass die alkalische Phosphatase PhoA, fusioniert an Tat-spezifische Signalpeptide, nur dann exportiert werden konnte, wenn sie gefaltet in einer aktiven Form im Cytoplasma vorlag. PhoA ist eigentlich ein *E. coli* Sec-Substrat und es bedarf der Bildung zweier Disulfidbrücken damit sie eine stabile und aktive Form annehmen kann (Sone *et al.*, 1997). Die Bildung von Disulfidbrücken ist natürlicherweise nur im oxidierenden Milieu des Periplasmas möglich, nicht jedoch im reduzierenden Cytoplasma. Es konnte gezeigt werden, dass die Tat-Signalpeptid-PhoA-Fusionen nur dann Tat-abhängig exportiert werden, wenn man genetisch modifizierte *E. coli* Stämme verwendet, die eine Disulfidbrückenbildung und somit eine Faltung des Substrates auch im Cytoplasma zulassen. Diese Art des Ausschlusses von ungefalteten Substraten, beziehungsweise die Tatsache, dass nur korrekt gefaltetes Substrat exportiert wurde, wurde als eine Art Qualitätskontrolle durch die Tat-Translokase interpretiert. Hinweise für eine Qualitätskontrolle bei falsch gefalteten

Eisen-Schwefel-Cluster enthaltenden Tat-Substraten wurden auch in einer anderen Arbeit gewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass das *E. coli* Tat-Substrat NrfC, welches 4 Eisen-Schwefel-Cluster als Cofaktor hat, nicht exportiert wird, wenn der Einbau eines dieser FeS-Cluster durch Punktmutationen verhindert wird (Matos *et al.*, 2008). Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass das fehlerhafte NrfC in der Gegenwart der Tat-Translokase und nur mit einem funktionierenden Tat-Signalpeptid abgebaut wird. Im Tat-Deletionsstamm und mit einem nicht funktionellen, mutierten Tat-Signalpeptid bleibt es hingegen stabil. Hieraus schlossen die Autoren, dass es nicht nur zu einer Erkennung von fehlerhaften NrfC an der Tat-Translokase kommt, sondern dass dieses falsch gefaltete NrfC auch durch die Tat-Translokase dem proteolytischen Abbau zugeführt wird. Hierbei konnte den *E. coli* Tat-Komponenten TatA und TatE, welche wahrscheinlich erst in einem späten Schritt des Tat-Translokations-Mechanismus involviert sind (siehe Kapitel 2.8), eine entscheidende Funktion zugeordnet werden.

Ein Gegenargument für eine Qualitätskontrolle durch die Tat-Translokase wurde durch eine Arbeit von Richter und Brüser (2005) erbracht. Es wurde gezeigt, dass reduziertes und somit ungefaltetes PhoA, fusioniert an das Tat-Signalpeptid des „high-potential iron-sulfur protein“ HiPIP aus *Allochromatium vinosum*, in Abhängigkeit des Zwillingsarginins an den TatBC-Rezeptorkomplex binden kann. Es wurden auch Hinweise dafür präsentiert, dass durch diese Bindung der Translokationsprozess des ungefalteten HiPIP-PhoA eingeleitet, aber nicht vollendet werden konnte. Bei einer strikten Qualitätskontrolle durch die Tat-Translokase wäre aber zu erwarten, dass dieses Substrat schon vorher vom energetisch kostspieligen Translokationsprozess ausgeschlossen wird. In neueren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es sogar möglich ist ein komplett ungefaltetes, artifizielles Substrat Tat-abhängig zu translokieren (Cline und McCaffery, 2007; Richter *et al.*, 2007). Im Fall von Richter *et al.* (2007) handelte es sich um die 19 Aminosäuren lange „FG repeat“ Domäne des Hefe Kernporen Proteins Nsp1p. Für diese polare Domäne konnte gezeigt werden, dass sie natürlicherweise nahezu ungefaltet vorliegt (Denning *et al.*, 2003). Die FG „repeat“ Domäne wurde als dreier-, fünfer-, siebener-, zehner- und siebzehner-„repeat“ an das HiPIP-Signalpeptid fusioniert. Hierbei zeigte sich, dass die erfolgreiche Translokation dieser Konstrukte mit der Größe der Konstrukte abnahm, somit scheint die Translokation eines ungefalteten Substrates durch seine Größe limitiert zu sein. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die erfolgreiche Translokation dadurch bedingt ist, dass die verwendeten Konstrukte einen sehr polaren Charakter, ohne größere hydrophobe Bereiche, aufweisen. Nach dem Einfügen einer 6 Aminosäuren langen hydrophoben Sequenz aus dem PhoA-Protein konnte

## I. Einleitung

nämlich keine Tat-abhängige Translokation mehr beobachtet werden. Aus diesen Experimenten schlossen die Autoren, dass es keine generelle, durch die Tat-Translokase ausgeübte Qualitätskontrolle gibt, die ungefaltete oder falsch gefaltete Proteine von der Translokation ausschließt. Vielmehr werden diese dadurch von der Translokation ausgeschlossen, dass sie ungefaltet zu groß sind um exportiert zu werden, und/oder dass sie hydrophobe Bereiche exponieren, die im korrekt gefalteten Zustand im Inneren des Proteins verborgen wären.

### **2.4 Bindung von generellen und spezifischen Chaperonen an Tat-Substrate**

Wie bereits in Punkt 2.3 beschrieben, ist die korrekte Faltung bzw. Assemblierung von natürlichen Tat-Substraten eine Voraussetzung für deren Export. Als Folge dessen wird ein fehlerhaftes Tat-Substrat von der Translokation ausgeschlossen, sei es nun durch eine Qualitätskontrolle oder durch eine mechanistische Inkompatibilität mit der Tat-Translokase.

Damit möglichst nur fertig gefaltete Substrate an die Translokase gelangen, gibt es in der Zelle für viele Cofaktor-haltige Tat-Substrate spezifische Chaperone. Bei diesen Chaperonen handelt es sich um die sogenannten REMPs (redox enzyme maturing proteins) (Turner *et al.*, 2004). Eines der am besten studierten REMPs ist das TorD-Protein, die potentielle Funktion der REMPs soll im Folgenden an diesem Beispiel erläutert werden. TorD ist das spezifische Chaperon der Trimethylaminoxid- (TMAO) Reduktase TorA. TorD bindet an das TorA Apoprotein bereits vor dem Molybdän-Cofaktor Einbau und schützt es so wahrscheinlich vor dem proteolytischen Abbau (Pommier *et al.*, 1998; Ilbert *et al.*, 2003; Genest *et al.*, 2006). Physiologisch erfüllt es somit z.B. unter Molybdän Mangelbedingungen eine wichtige Funktion. Das TorA Apoprotein wird so durch TorD bereitgehalten, bei der Verfügbarkeit von Molybdän kann dieses dann direkt von TorA gebunden werden, welches dann vollständig falten kann (Genest *et al.*, 2006). Außerdem ist TorD bei hohen Temperaturen essentiell für die Reifung von TorA (Genest *et al.*, 2005), was seine wichtige Rolle in der TorA Biogenese unterstreicht.

Was den molekularen Mechanismus der Wirkung von TorD auf TorA betrifft, konnte gezeigt werden, dass TorD an mehr als an einer Stelle an TorA bindet. Da TorD *in vitro* einen positiven Effekt auf die Reifung von TorA hat, unabhängig davon ob dieses mit oder ohne dessen Signalpeptid vorliegt (Ilbert *et al.*, 2004), kann daraus geschlossen werden, dass TorD den reifen Teil von TorA binden muss. Zum anderen konnte aber auch gezeigt werden, dass

TorD an das TorA Signalpeptid bindet (Jack *et al.*, 2004; Hatzixanthis *et al.*, 2005), wobei das Zwillingsarginin wohl aber keine Rolle spielt (Hatzixanthis *et al.*, 2005). Und genau für diese Bindung von TorD an das TorA-Signalpeptid konnte gezeigt werden, dass sie eine entscheidende Wirkung auf die korrekte Reifung des zu transportierenden Substrates hat. So kann das TorA Signalpeptid, fusioniert an die heterodimere Hydrogenase-2 anstelle des nativen Signalpeptids, den HybC/HybO-Hydrogenasekomplex nur vollständig assembliert und aktiv an die Tat-Translokase bringen, wenn zusätzlich TorD in großer Menge exprimiert wird (Jack *et al.*, 2004). Ohne TorD wird nur die Signalpeptid tragende Untereinheit HybO transloziert. Durch die Bindung von TorD an die TorA-Signalsequenz werden somit eine korrekte Assemblierung beider Hydrogenase-2 Untereinheiten und der Einbau der Cofaktoren vor der Translokation gewährleistet, damit nur ein vollständig gefalteter und aktiver Enzymkomplex exportiert wird. Der genaue Mechanismus wie TorD dieses bewerkstelligt und wie sich TorD wieder von dem Signalpeptid löst, ist bisher nicht verstanden. Aufgrund dieser außergewöhnlichen Fähigkeiten von TorD und ähnlichen Chaperonen hat sich mittlerweile in der Literatur der Begriff „proofreading“-Chaperon eingebürgert (Dubini und Sargent, 2003; Jack *et al.*, 2004; Hatzixanthis *et al.*, 2005).

Neben der Bindung dieser meist nur für ein bestimmtes Signalpeptid spezifischen Chaperone konnte aber auch die Bindung von generellen Chaperonen wie GroEL oder DnaK an Tat-Signalpeptide gezeigt werden (Oresnik *et al.*, 2001; Graubner *et al.*, 2007). Hierbei wurde aber bislang nicht gezeigt, dass diese Bindung an das Signalpeptid einen Einfluss auf den Export von Tat Substraten hat. Für DnaK konnte allerdings gezeigt werden, dass es für das „targeting“ von CueO, einer Tat-abhängig exportierten Multi-Kupfer-Oxidase aus *E. coli*, an die Tat-Translokase essentiell ist (Graubner *et al.*, 2007). Hierbei ist aber wohl nicht die Bindung von DnaK an das CueO-Signalpeptid ausschlaggebend, da das CueO-Signalpeptid sehr wohl auch in einem *dnaK*-Deletionsstamm einen Tat-abhängigen Export vermitteln kann. Dies wurde anhand einer Fusion des CueO-Signalpeptides vor den reifen Teil des heterologen HiPIP gezeigt (Graubner *et al.*, 2007). Für DnaK wurde zudem gezeigt, dass es generell eine stabilisierende Wirkung auf überexprimierte Tat-Substrate hat (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2007). Wahrscheinlich werden die Substrate durch DnaK vor einem proteolytischen Abbau und vor einer Interaktion mit der Tat-Translokase vor ihrer vollständigen Reifung geschützt.

## 2.5 Der Tat-Translokationsapparat

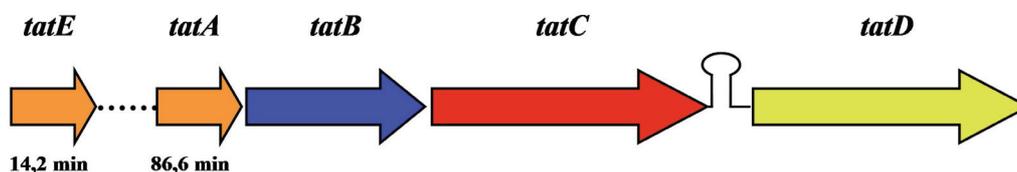
### 2.5.1 Die Entdeckung und die Zusammensetzung der Tat-Translokase(n)

Die erste Komponente des Tat-Apparates, die entdeckt wurde, war das Hcf106-Protein in der Thylakoidmembran von Chloroplasten aus *Zea mays* (Settles *et al.*, 1997). In pflanzlichen Chloroplasten kommen neben dem Hcf106-Protein noch zwei weitere Proteine vor, die an der Bildung der so genannten cpTat-Translokase beteiligt sind. Zum einen ist dies das Tha4-Protein und zum anderen das cpTatC-Protein (Mori *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2001). Bereits bei der Erstpublikation zum Hcf106-Proteins durch Settles *et al.* (1997) wurde durch Sequenzvergleiche deutlich, dass orthologe Proteine zum Hcf106 auch in Bakterien vorkommen. Als erstes wurden die Komponenten des bakteriellen Tat-Wegs in *Escherichia coli* identifiziert (Weiner *et al.*, 1998; Sargent *et al.*, 1998). Auch in *Escherichia coli* sind im Wesentlichen drei funktionell unterschiedliche Komponenten an der Bildung der Tat-Translokase beteiligt. Diese Komponenten sind die Proteine TatA, TatB und TatC, welche die orthologen Proteine zu den pflanzlichen Tha4- Hcf106- und cpTatC-Proteinen sind (Berks *et al.*, 2003). Je nach Organismus kann die Anzahl der Tat-Komponenten, die an der Bildung der Tat-Translokase beteiligt sind, aber variieren. Die minimale Anforderung an eine Tat-Translokase ist das Vorhandensein einer Kopie je eines zu TatC und eines zu Tata orthologen Proteins. Solche TatAC-Typ Translokasen kommen ohne TatB aus, indem Tata die Funktion von TatB in bifunktionseller Weise mit übernimmt (Blaudeck *et al.*, 2005). TatAC-Typ-Translokasen finden sich hauptsächlich in Gram-positiven Bakterien wie *Bacillus subtilis* oder *Staphylococcus aureus* (Jongbloed *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2007). Aber auch in einigen Gram-negativen Bakterien wie *Rickettsia prowazekii* konnte nur ein zu *tatA* und ein zu *tatC* orthologes Gen identifiziert werden (Wu *et al.*, 2000; Yen *et al.*, 2002).

Die am besten untersuchten Systeme sind allerdings das bakterielle *E. coli* Tat-System und das pflanzliche cpTat-System, bei denen zusätzlich das TatB-Protein, beziehungsweise das Hcf106-Protein für die volle Funktionsfähigkeit benötigt wird (Settles *et al.*, 1997; Sargent *et al.*, 1998 und 1999). Im Wesentlichen soll im Folgenden detailliert auch nur auf diese TatABC-Typ Translokasen eingegangen werden, wobei hier das Hauptaugenmerk auf dem *Escherichia coli* Tat-Apparat liegen soll.

### 2.5.2 Die *E. coli* *tat*-Gene

In *E. coli* konnten vier Gene (*tatA*, *tatB*, *tatC* und *tatE*) identifiziert werden, deren Genprodukte an der Bildung der Tat-Translokase beteiligt sind (Weiner *et al.*, 1998; Sargent *et al.*, 1998; Bogsch *et al.*, 1998; Sargent *et al.*, 1999). Die Gene kodieren für die Proteine TatA, TatB, TatC und TatE. Die Gene für *tatA*, *tatB* und *tatC* sind hierbei in einem Operon mit einem vierten, mit *tatD* benannten Gen angelegt. *tatE* liegt monocystronisch an einer anderen Stelle im *E. coli* Genom (Jack *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der *tat*-Gene nicht reguliert ist und sie somit konstitutiv exprimiert werden (Jack *et al.*, 2001).



**Abbildung 3: Die *E. coli* *tat*-Gene und ihre Lage im Genom.** Dargestellt ist das *E. coli* *tatE* Gen, welches monocystronisch im Genom vorliegt und das *tat*-Operon bestehend aus *tatA*, *tatB*, *tatC* und *tatD*. Abbildung verändert nach Berks *et al.* (2000a).

TatA und TatE zeigen mehr als 50% Sequenzhomologie und können sich gegenseitig funktionell ersetzen (Sargent *et al.*, 1998; Sargent *et al.*, 1999). Nur ein Stamm der keines der beiden Proteine exprimiert zeigt einen komplett defekten Tat-Weg (Sargent *et al.*, 1998; Sargent *et al.*, 1999). TatA ist hierbei wohl die wichtigere Komponente, da es in wesentlich größerer Menge als TatE exprimiert wird (50-200x) (Jack *et al.*, 2001). Sehr wahrscheinlich handelt es sich beim *tatE*-Gen um eine kryptische Genduplikation des *tatA*-Gens (Yen *et al.*, 2002). Das oben erwähnte TatD-Protein ist ein cytosolisches Protein (Wexler *et al.*, 2000). Es wurde lange Zeit angenommen, dass es keine Rolle bei der Tat-Translokation spielt, da diese durch eine *tatD*-Deletion nicht beeinflusst wird. Lediglich eine DNase-Aktivität konnte für dieses Protein gezeigt werden (Wexler *et al.*, 2000). Eine aktuelle Studie hingegen deutet darauf hin, dass TatD eine Funktion bei der Induzierung des Abbaus von bestimmten überschüssigen oder falsch gefalteten Tat-Substraten an der Tat-Translokase ausübt (Matos *et al.*, 2009).

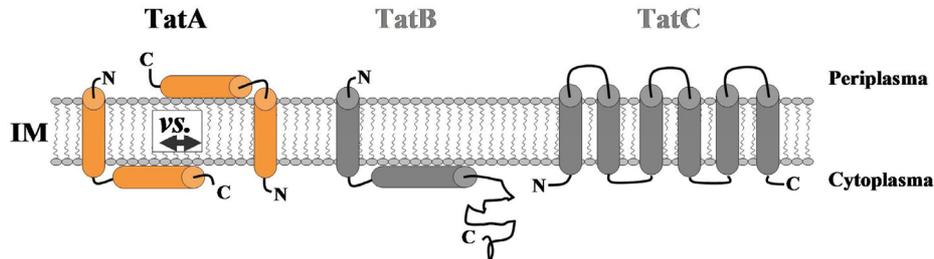
Im folgenden Abschnitt sollen die wesentlichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften der wichtigsten Tat-Proteine TatA, TatB und TatC beschrieben werden, welche direkt an der Bildung der membranständigen Translokase beteiligt sind.

### 2.5.3 Das TatA-Protein und seine Oligomerisierungsformen

Das aus 89 Aminosäuren bestehende TatA-Protein ist ein integrales Cytoplasmamembranprotein (Wexler *et al.*, 2000). Die einheitliche Vorstellung in der Literatur ist, dass das TatA-Protein bzw. TatA-Oligomere dafür verantwortlich sind, dem Tat-Substrat die Passage durch die Cytoplasmamembran zu ermöglichen (Berks *et al.*, 2000a; Cline und Mori, 2001; Mori und Cline 2002).

Strukturvorhersagen zum *E. coli* TatA-Protein und orthologen Proteinen besagen, dass der N-terminale Bereich eine Transmembranhelix ausbildet, wobei der Aminoterminus auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran liegen soll. An die Transmembranhelix schließt eine entlang der Cytoplasmamembran liegende amphipathische Helix an, auf die ein eher unstrukturierter C-Terminus folgt (Settles *et al.*, 1997; Sargent *et al.*, 1998; Berks *et al.*, 2000b). An dem zum *E. coli* TatA orthologen TatAd-Protein aus *B. subtilis* konnte in einer neuen Arbeit anhand von „solid-state (15)N-NMR“-Untersuchungen an einer verkürzten Variante dieses Proteins gezeigt werden, dass die Vorhersage für die generelle Struktur wohl zutreffend ist (Müller *et al.*, 2007). Allerdings bleibt vor allem die Lokalisation des TatA N-Terminus, und somit die Orientierung des TatA-Proteins in der Cytoplasmamembran umstritten. Untersuchungen in *E. coli* haben gezeigt, dass der TatA C-Terminus von der cytoplasmatischen Seite mit Protease verdaubar ist, nicht jedoch von der periplasmatischen Seite (Porcelli *et al.*, 2002). Dieses ist im Einklang mit den Strukturvorhersagen, da der nicht membranintegrale C-Terminus auf dieser Seite liegen soll. Ein physiologischer Hinweis, dass diese Vorhersage zutreffend ist, konnte anhand einer Studie am Gram-negativen, humanpathogenen Bakterium *Providencia stuartii* von Stevenson *et al.* (2007) erbracht werden. Es wurde gezeigt, dass das TatA-Protein von *Providencia stuartii* ungewöhnlicherweise als inaktives Protein mit einer 7 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Verlängerung synthetisiert wird. Zur Aktivierung des TatA-Proteins bedarf es der Abspaltung dieser 7 Aminosäuren durch die Rhomboid Protease AarA, welche zur GlpG Familie der Rhomboid-Serin-Proteasen gehört (Stevenson *et al.*, 2007). Kristallstrukturen dieser membranintegralen Proteasen zeigen, dass das aktive Zentrum dieser Protease in der Membran liegt, aber näher an der periplasmatischen Seite der Membran lokalisiert ist (Wang *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006, Sargent, 2007). Somit liegt der N-Terminus des *P. stuartii* TatA wohl auf der periplasmatischen Seite der Membran, da dieser sehr wahrscheinlich nur dort für eine Prozessierung zugänglich ist (Sargent *et al.*, 2007). Eine neuere Arbeit von Chan *et al.* (2007), bei der die Lokalisation verschiedener Aminosäuren aus TatA direkt mittels Thiol-

spezifischen „crosslinking“-Experimenten untersucht wurde, brachte hierzu widersprüchliche Ergebnisse. Hier wurde gezeigt, dass der N-Terminus auf der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert ist und dass der C-Terminus in Abhängigkeit des Membranpotentials entweder als amphipathische Helix entlang der periplasmatischen Seite der Membran liegt (in Abwesenheit des Membranpotentials), oder in Anwesenheit des Membranpotentials eine zweite Transmembranhelix ausgebildet wird, wobei dann sowohl der N- als auch der C-Terminus im Cytoplasma lokalisiert sind. Eine solche duale Topologie des C-Terminus wurde ebenfalls in einer anderen Studie beschrieben (Gouffi *et al.*, 2004). Ob diese duale Topologie des TatA-Proteins aber tatsächlich etwas mit seiner physiologischen Funktion zu tun hat, ist bisher nicht klar. Es konnte gezeigt werden, dass ein Tat-abhängiger Export des TorA-Proteins durch eine TatAC-Minimaltranslokase mit einem bifunktionellen TatA-Protein in Abwesenheit von TatB selbst dann stattfindet, wenn der TatA C-Terminus an den TatC N-Terminus fusioniert ist (Barrett *et al.*, 2007) (zur weiteren Erklärung siehe auch Kapitel 2.5.4). Letzterer ist auf der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert (Ki *et al.*, 2004; Behrendt *et al.*, 2004, Punginelli *et al.*, 2007), was eine Bewegung des TatA C-Terminus im Fusionsprotein höchst wahrscheinlich nicht zulässt.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der gegenwärtigen Vorstellung zur Topologie des TatA-Proteins in der Cytoplasmamembran.** In der Abbildung sind für TatA beide bisher in der Literatur vorgeschlagenen Topologien dargestellt. Links mit dem N-Terminus lokalisiert auf der periplasmatischen Seite der Membran, rechts mit dem N-Terminus auf der cytoplasmatischen Seite. Nähere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

Was die Bereiche von TatA angeht, die für die TatA-Funktion wichtig sind, konnte in Studien an C-terminal verkürzten Varianten dieses Proteins aus *E. coli* und auch anhand von Mutationsstudien gezeigt werden, dass nur die N-terminalen Bereiche bis circa zum Ende der amphipathischen Helix (bis ca. zu den Aminosäuren 40-50) essentiell für die Funktion des TatA-Proteins sind (Lee *et al.*, 2002; Hicks *et al.*, 2005; Warren *et al.*, 2009). Weiterhin konnten durch Mutationsstudien einige Aminosäurereste in diesem essentiellen Bereich identifiziert werden, die für die Funktion des TatA-Proteins wichtig sind. In der Transmembranhelix ist dies lediglich das Glutamin an Position 8 (Greene *et al.*, 2007),

## I. Einleitung

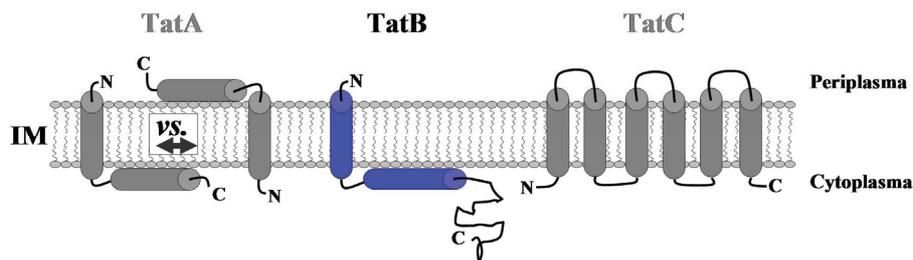
welches die einzige Aminosäure mit polarem Charakter in der Transmembranhelix ist. In der so genannten „hinge“-Region (engl. für Gelenk) (Berks *et al.*, 2000b), welche die Transmembranhelix mit der amphipathischen Helix verbindet, und in der amphipathischen Helix selbst finden sich einige Reste, deren Austausch mitunter große Auswirkungen auf die TatA-Funktion haben (Hicks *et al.*, 2003; Barrett *et al.*, 2003; Hicks *et al.*, 2005; Barrett *et al.*, 2005; Greene *et al.*, 2007). In der amphipathischen Helix liegen die entsprechenden Reste zumeist auf der hydrophoben Seite der Helix (Hicks *et al.*, 2005; Greene *et al.*, 2007).

Bei Untersuchungen zum Oligomerisierungszustand von TatA konnte mehrfach gezeigt werden, dass TatA homooligomere Komplexe variabler Größe bildet (De Leeuw *et al.*, 2001; Porcelli *et al.*, 2002). Zum Beispiel zeigen „blue native PAGE“-Experimente mit solubilisierten *E. coli* Cytoplasmamembranen TatA Komplexe variierender Größe, von unter 100 kDa bis über 500 kDa (Oates *et al.*, 2005). Elektronenmikroskopische Aufnahmen mit anschließender dreidimensionaler Modellierung von isolierten TatA-Komplexen zeigten weiterhin, dass TatA ringförmige Strukturen variierender Größe bildet (Gohlke *et al.*, 2005), die eventuell einen Kanal für Tat-Substrate bilden könnten. Eine andere Studie zeigt, dass TatA bei Überexpression dreidimensionale, parallel verlaufende, quasikristalline Kanäle im Cytoplasma ausbildet, deren Bildung von der Gegenwart von TatC abhängig ist (Berthelmann *et al.*, 2008). Es ist jedoch zu erwähnen, dass diese Studien alle mit überexprimierten Tat-Komponenten durchgeführt wurden und dass in den meisten Studien die Proteine aus ihrer natürlichen Membranumgebung herausgelöst wurden. In einer aktuellen Studie von Leak *et al.* (2008) konnte TatA im nativen Expressionslevel durch ein C-terminal fusioniertes „gelb fluoreszierendes Protein“ YFP, einer Variante des „grün fluoreszierenden Proteins“ GFP aus der Qualle *Aequorea victoria*, in lebenden *E. coli* Zellen visualisiert werden. Auch hier zeigte sich, dass TatA oligomere Komplexe von variabler Größe bildet. Die Komplexe hatten eine Größe von 4 bis zu 100 TatA-Molekülen, mit einem Mittel von 25 Molekülen. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass diese größeren TatA-Komplexe aus TatA-Tetrameren zusammengesetzt sind (Leak *et al.*, 2008). Die Bildung der größeren Komplexe war strikt von der Präsenz von TatB und TatC abhängig (Leak *et al.*, 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass die Transmembranhelix an der Oligomerisierung von TatA-Molekülen beteiligt ist (De Leeuw *et al.*, 2001; Porcelli *et al.*, 2002; Greene *et al.*, 2007). Eine neuere Studie zeigt zudem, dass neben der Transmembranhelix auch eine Folge von sauren Aminosäuren im Anschluss an die amphipathische Helix wichtig für die Oligomerisierung von TatA-Molekülen ist (Warren *et al.*, 2009).

### 2.5.4 Das TatB-Protein

Das 171 Aminosäuren lange TatB-Protein ist, wie das TatA-Protein, ein integrales Cytoplasmamembranprotein (Wexler *et al.*, 2000). Es ist zu dem mit dem TatA-Protein verwandt, zu welchem es 25 % Sequenzhomologie aufweist (Sargent *et al.*, 1999). Für TatB wurde zudem eine Topologie ähnlich der des TatA-Proteins vorausgesagt, mit einer N-terminalen Transmembranhelix gefolgt von einer amphipathischen Helix, welche an der cytoplasmatischen Seite der Membran aufliegt, sowie einem langen, unstrukturierten C-Terminus (Settles *et al.*, 1997; Sargent *et al.*, 1998; Berks *et al.*, 2000b). Im Einklang mit dieser Topologie-Vorhersage konnte gezeigt werden, dass TatB nur von der cytoplasmatischen Seite, nicht aber von der periplasmatischen Seite für einen Proteaseverdau zugänglich ist (Lee *et al.*, 2006a). Ein wesentlicher struktureller Unterschied zu TatA ist, dass TatB eine längere amphipathische Helix und auch einen längeren unstrukturierten C-Terminus besitzt (Sargent *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2002; Berks *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006a).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der gegenwärtigen Vorstellung zur Topologie des TatB-Proteins in der Cytoplasmamembran.** Nähere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

Trotz der Ähnlichkeiten zu TatA hat das TatB-Protein aber eine andere Aufgabe als TatA und kann dieses nicht funktionell ersetzen (Sargent *et al.*, 1999). TatB ist essentiell für den Export der natürlichen *E. coli* Tat-Substrate (Sargent *et al.*, 1999). Es konnte jedoch mit Hilfe der sehr sensitiven Reporterproteine TorA-Colicin V (TorA-Signalpeptid fusioniert vor Colicin V) und TorA-MalE gezeigt werden, dass in Abwesenheit von TatB ein Tat-abhängiger Export dieser Reporter durch eine TatAC-Minimaltranslokase im geringen Maße möglich ist (Ize *et al.*, 2002; Blaudeck *et al.*, 2005). Blaudeck *et al.* (2005) konnten zudem nach einer chemischen Mutagenese fünf verschieden mutierte TatA Varianten identifizieren, die in der Lage waren, TatB bedingt funktionell zu ersetzen. Im Gegensatz zum Wildtyp-TatA-Protein waren diese TatA-Varianten in der Lage zusammen mit TatC, in Abwesenheit von TatB, eine TatAC-Minimaltranslokase zu bilden, die das natürliche Tat-Substrat TorA relativ effizient

## I. Einleitung

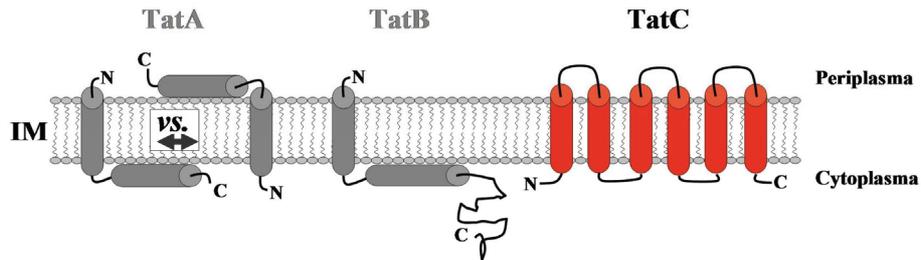
exportieren konnte (Blaudeck *et al.*, 2005; Barrett *et al.*, 2007). Alle Mutationen in diesen bifunktionellen TatA-Proteinen lagen in den ersten sechs Aminosäuren des TatA-Proteins, was darauf schließen lässt, dass genau dieser Bereich im N-Terminus ein wichtiger Bereich für die spezifische TatB-Funktion ist (Blaudeck *et al.*, 2005). Es wäre möglich, dass TatB als ein physikalisches Bindeglied zwischen TatA und TatC dient (Blaudeck *et al.*, 2005).

Bei Untersuchungen zu den funktionell wichtigen Bereichen konnte, ähnlich wie beim TatA Protein, durch Studien an C-terminal verkürzten Varianten des TatB-Proteins aus *E. coli* gezeigt werden, dass der unstrukturierte C-Terminus für die TatB-Funktion in der Translokase nicht essentiell ist (Lee *et al.*, 2002). Erst ab Verkürzungen auf ca. 100 Aminosäuren und weniger zeigen sich drastische Auswirkungen auf den Tat-abhängigen Export des natürlichen Tat-Substrates TorA (Lee *et al.*, 2002). Somit haben die, im Vergleich zum TatA-Protein verlängerten,  $\alpha$ -helicalen Bereiche wohl eine funktionelle Bedeutung für das TatB-Protein (Lee *et al.*, 2002), welche bisher aber noch völlig unklar ist. Weiterhin haben Mutationsstudien gezeigt, dass die Funktion des TatB-Proteins, anders als beim TatA-Protein, wesentlich weniger anfällig gegenüber Mutationen ist. Lediglich einige Mutationen in der „hinge“-Region und in der amphipathischen Helix zeigen einen größeren Einfluss auf die TatB-Funktion (Weiner *et al.*, 1998; Hicks *et al.*, 2003; Barrett *et al.*, 2003; Barrett und Robinson., 2005; Lee *et al.*, 2006a). Dies lässt vermuten, dass eher die strukturellen Eigenschaften des TatB-Proteins, als einzelne Reste im Speziellen, wichtig für seine Funktion im Tat-Weg sind (Lee *et al.*, 2006a).

Wie für TatA konnte auch für TatB gezeigt werden, dass es Homooligomere ausbildet (De Leeuw *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006a). Bisher wurde hierbei in einer Studie von Homodimeren (De Leeuw *et al.*, 2001), in einer anderen von mindestens homotetrameren Einheiten berichtet (Lee *et al.*, 2006a). Die Interaktion hierfür erfolgt wahrscheinlich über die Transmembranhelix (Lee *et al.*, 2006a). Neben diesen Interaktionen mit anderen TatB Proteinen wechselwirkt TatB vor allem mit TatC. Zusammen bilden sie den sogenannten TatBC-Rezeptorkomplex in der Cytoplasmamembran (Bolhuis *et al.*, 2001; Cline und Mori 2001; Alami *et al.*, 2003). Der TatBC-Rezeptorkomplex und seine Funktion im Tat-abhängigen Proteinexport werden in Kapitel 2.5.6 eingehender behandelt.

### 2.5.5 Das TatC-Protein

Das polytopische integrale Cytoplasmamembranprotein TatC-Protein bildet 6 Transmembranhelices aus, wobei sowohl der N- als auch der C-Terminus im Cytoplasma lokalisiert sind (Ki *et al.*, 2004; Behrendt *et al.*, 2004, Punginelli *et al.*, 2007).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung zur Topologie des TatC-Proteins in der Cytoplasmamembran.** Nähere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

Durch ortsgerichtete Mutagenese von konservierten Positionen im TatC-Protein sind bislang zahlreiche Austausche bekannt, welche die Tat-abhängige Translokationseffizienz negativ beeinflussen (Allen *et al.*, 2002; Buchanan *et al.*, 2002; Barrett und Robinson, 2005; Holzapfel *et al.*, 2007; Punginelli *et al.*, 2007), wobei hier die Effekte der einzelnen Mutationen nicht in jeder Publikation dieselben Ausmaße haben und auch mit der Art des Austausches variieren können. Die meisten der oben erwähnten Mutationen, welche einen Effekt auf die TatC-Funktion zeigen, befinden sich in den cytoplasmatischen Regionen, diese scheinen somit besonders wichtig für die Funktion von TatC zu sein (Lee *et al.*, 2006b).

Bei den oben erwähnten Mutationsstudien ergaben sich auch Hinweise darauf, dass zumindest zwei TatC Moleküle in einem Tat-Translokon zusammen vorkommen (Buchanan *et al.*, 2002). So konnte gezeigt werden, dass bei einer gleichzeitigen Expression einer TatC-Variante mit den TatC-Defektmutationen F94A oder E103A und einer TatC-Variante mit der D211A Defektmutation, wieder ein Tat-abhängiger Export der natürlichen Tat-Substrate TorA und SufI zu detektieren war, der bei der alleinigen Expression der mutierten TatC-Proteine nicht stattfand. Die beiden TatC-Varianten kreuzkomplementieren sich somit (Buchanan *et al.*, 2002). Die wichtigste Funktion des TatC-Proteins ist zweifelsohne seine Aufgabe als Bindestelle für Tat-Signalpeptide in der Translokase (Alami *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Funktion und der engen Assoziation mit dem TatB-Protein wurde der Komplex der beiden Proteine als TatBC-Rezeptorkomplex bezeichnet.

### 2.5.6 Der TatBC-Rezeptorkomplex

Die Tat-Translokase Komponenten TatB und TatC bilden zusammen einen heterooligomeren Komplex in der *E. coli* Cytoplasmamembran (Bolhuis *et al.*, 2001). Die Größe dieses TatBC-Komplexes variiert hierbei in verschiedenen Arbeiten und je nach experimentellem Vorgehen zwischen ~370 und ~670 kDa (Bolhuis *et al.*, 2001; De Leeuw *et al.*, 2002; Oates *et al.*, 2005; Richter und Brüser, 2005; McDevitt *et al.*, 2006). Dies lässt zumindest darauf schließen, dass dieser Komplex aus mehreren TatB und TatC Molekülen bestehen muss. Es konnte bestimmt werden, dass TatB und TatC im TatBC-Komplex in einem äquimolaren Verhältnis vorliegen (Bolhuis *et al.*, 2001). Welche Bereiche im TatB- respektive im TatC-Protein für die Interaktion mit dem jeweils anderen Protein verantwortlich sind, ist weitestgehend unbekannt. Es konnte lediglich bei zwei Aminosäureaustauschen im TatC-Protein gezeigt werden, dass diese die Integrität des TatBC-Rezeptorkomplexes beeinflussen (Buchanan *et al.*, 2002; Barrett *et al.*, 2005). Hierbei handelt es sich um die Mutation P48A in der ersten periplasmatischen Schleife und um die Mutation D211A im Grenzbereich des fünften Transmembrandurchgangs und der dritten periplasmatischen Schleife.

Ein TatBC-Komplex (bzw. Hcf106-cpTatC-Komplex) wurde auch im thylakoidalen cpTat-Weg identifiziert (Cline und Mori, 2001). Sowohl im thylakoidalen cpTat-Weg als auch im bakteriellen Tat-Weg dient der TatBC-Komplex als erste Bindestelle für das Tat-Konsensus-Motiv der Tat-Signalpeptide (Cline und Mori, 2001; Alami *et al.*, 2003). Der derzeitige Wissensstand zu Erkennung bzw. zur Bindung von Tat-Signalpeptiden an die Translokase wird im folgenden Abschnitt näher behandelt.

### 2.6 Die Interaktionen der Tat-Signalpeptide mit der Tat-Translokase

Wie bereits im obigen Abschnitt beschrieben, entsteht der erste Kontakt zwischen dem Tat-Konsensus-Motiv im Signalpeptid und der Translokase am TatBC-Rezeptorkomplex (Cline und Mori, 2001; Alami *et al.*, 2003). Alami *et al.* (2003) konnten durch „crosslinking“-Versuche zeigen, dass das Tat-Konsensus-Motiv sowohl in Kontakt zum TatC- als auch zum TatB-Protein steht. In beiden Fällen ist dieser Kontakt abhängig von einem intaktem Zwillingsarginin (Alami *et al.*, 2003). Der Kontakt zu TatB ist hierbei strikt von der Präsenz des TatC-Proteins abhängig (Alami *et al.*, 2003). Der Kontakt zu TatC wird hingegen nicht

durch die Abwesenheit von TatB beeinflusst, was eine hierarchische Abfolge bei der Signalpeptidbindung impliziert, bei der TatC als erster Rezeptor dient und TatB erst anschließend an das Signalpeptid bindet (Alami *et al.*, 2003). TatB kontaktiert neben dem Bereich des Konsensus-Motivs außerdem die h-Region des Signalpeptids (Alami *et al.*, 2003). Neuere Studien haben gezeigt, dass der Zwillingsarginin-abhängigen Bindung des Tat-Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex wohl eine Bindung Vorrang geht, die unabhängig vom intaktem Zwillingsarginin ist (McDevitt *et al.*, 2006; Panahandeh *et al.*, 2008). Für diese Bindung, wird das Tat-Signalpeptid als solches aber benötigt (McDevitt *et al.*, 2006).

Darüber, welche Bereiche im TatBC-Rezeptorkomplex an der Bindung des Tat-Signalpeptides beteiligt sind, ist bisher erst wenig bekannt. Holzapfel *et al.* (2007) haben Hinweise darauf, dass die ganze N-terminale Hälfte des TatC-Proteins für die Signalpeptidbindung wichtig ist. In dieser Studie wurden Alaninsubstitutionen im TatC-Protein untersucht, die bekannterweise die Tat-Funktion beeinflussen. Es wurde getestet, ob die entsprechenden Translokasen noch das Tat-Substrat SufI binden können. Da die Mutationen, welche im N-terminalen Teil von TatC lokalisiert sind, dieses nicht mehr vermochten, schlossen die Autoren dabei auf eine Beteiligung dieses Bereichs an der Signalpeptidbindung.

Durch eine genetische Selektion auf Tat-gekoppelte Suppressormutanten des exportdefekten TorA-MalE Reporters, bei dem das Zwillingsarginins (RR) im Konsensusmotiv gegen Lysin-Glutamin (KQ) ausgetauscht war, ist es gelungen, Tat-Mutanten mit einem wiederhergestellten Tat-abhängigen Export dieses TorA[KQ]-MalE-Proteins zu isolieren (Kreutzenbeck *et al.*, 2007) (siehe auch Punkt 2.1.1). Nahezu alle Mutationsorte befinden sich im extremen N-terminalen Bereich des TatC-Proteins. Es ist somit wahrscheinlich, dass dieser Bereich an der Bindung beziehungsweise Erkennung des Zwillingsarginin-Bereiches des Tat-Signalpeptides zumindest beteiligt ist. Eine weitere Suppressormutation wurde im extremen N-Terminus des TatB-Proteins auf der periplasmatischen Seite der Membran gefunden. Da die Signalpeptiderkennung aber höchst wahrscheinlich auf der *cis*-Seite der Membran stattfindet, wurde dieser Mutation eine konformationelle Beteiligung innerhalb des TatBC-Rezeptorkomplexes zugeordnet. Da alle Suppressormutanten immer noch in der Lage waren das unveränderte TorA[RR]-MalE zu exportieren, ist davon auszugehen, dass es sich nicht um eine spezifische Erkennung des Zwillingsarginins nach dem „Schlüssel-Schloss“-Prinzip handelt. Es ist wahrscheinlich, dass eine fehlende oder geschwächte Bindung an der Position des Zwillingsargininmotivs durch eine stärkere Bindung an einem anderen Bereich der

## I. Einleitung

Signalpeptidbindestelle kompensiert wird. Ein ähnlicher Ansatz von Strauch und Georgiou (2007) mit einem TorA-GFP-Reporter, bei dem das Zwillingsarginin gegen ein Zwillingslysin ausgetauscht war, brachte Suppressormutationen hervor, die hauptsächlich im Grenzbereich zwischen der zweiten Transmembranhelix und der ersten cytoplasmatischen Schleife lokalisiert sind. Eine weitere Mutation lag auf der *trans*-Seite der Membran in der zweiten periplasmatischen Schleife. Anders als bei Kreutzenbeck *et al.* (2007) war bei diesen Mutanten die Fähigkeit den unveränderten Reporter zu erkennen zumeist stark reduziert. Zusammenfassend ist zu sagen, dass man tatsächlich der N-terminalen Hälfte des TatC-Proteins eine Rolle bei der Erkennung beziehungsweise Bindung des Zwillingsarginin von Tat-Signalpeptiden zuordnen kann, wobei hier hauptsächlich die cytoplasmatischen Regionen vor den ersten beiden Transmembrandurchgängen hervorgehoben werden müssen. Auch dem TatB-Protein kann aufgrund der Daten von Kreutzenbeck *et al.* (2007) eine Beteiligung an der Signalpeptidbindung zugeordnet werden, wobei hier die Art der Beteiligung völlig unklar ist, da die entsprechende Mutation auf der periplasmatischen Seite der Membran liegt.

Alle oben beschriebenen Arbeiten konzentrieren sich auf die Suppression der durch Mutation verloren gegangenen Bindung an den Zwillingsarginin Positionen. Untersuchungen, welche Bereiche der Tat-Translokase an der Bindung beziehungsweise Erkennung der übrigen Aminosäuren des Konsensus-Motivs beteiligt sind, existieren bislang nicht. Wie bereits in Kapitel 2.1.1 beschrieben, sind aber auch diese Positionen des Motivs für die Bindung an den TatBC-Rezeptorkomplex wichtig.

## 2.7 Die Energetisierung der Tat-abhängigen Proteintranslokation

Anders als der generelle Sekretionsweg wird der Tat-Weg ausschließlich vom Membranpotential  $\Delta p$  angetrieben und benötigt keine Nukleotidtriphosphate zur Energetisierung. Im thylakoidalen Tat-System konnte dies als erstes gezeigt werden (Cline *et al.*, 1992). Das Membranpotential setzt sich aus dem elektrischen Potential  $\Delta\psi$  und dem pH-Gradienten  $\Delta\text{pH}$  zusammen, wobei der größere Anteil hierbei vom  $\Delta\text{pH}$  kommt. Aus den ersten Arbeiten am thylakoidalen System wurde durch *in vitro* Experimente darauf geschlossen, dass die Energetisierung ausschließlich vom pH-Gradienten angetrieben wird (Mould und Robinson, 1991; Cline *et al.*, 1992). Eine neuere *in vitro* Arbeit am thylakoidalen Tat-System zeigt jedoch, dass auch das elektrische Potential zur Energetisierung der Tat-abhängigen Proteintranslokation beiträgt (Braun *et al.*, 2007).

Auch bei *in vitro* Versuchen mit invertierten Membranvesikeln von *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Tat-abhängige Proteintranslokation auch hier unabhängig von ATP ist und bei einem zerstörtem Membranpotential zum Erliegen kommt (Yahr und Wickner, 2001; Alami *et al.*, 2002). Eine neuere Arbeit konnte für *E. coli* bei *in vitro* Versuchen zur Translokation von SufI in invertierte Membranvesikel zeigen, dass es wahrscheinlich nur  $\Delta\psi$  ist, welches die Tat-abhängige Proteintranslokation in *E. coli* antreibt, und dass sich zwei distinkte  $\Delta\psi$ -abhängige Schritte beschreiben lassen (Bageshwar und Musser, 2007).

## 2.8 Modell zum Mechanismus der Tat-abhängigen Proteintranslokation

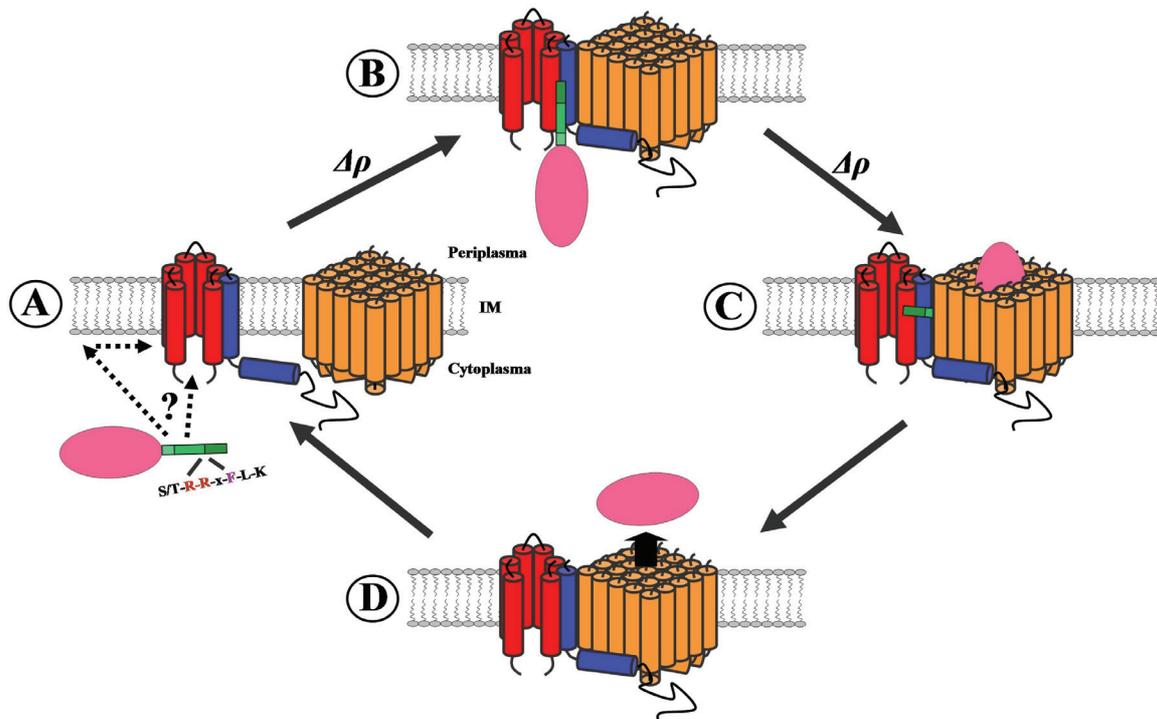
Ein Modell zur Tat-abhängigen Proteintranslokation nach dem derzeitigen Wissensstand ist in Abbildung 7 dargestellt. Nach der Synthese des Tat-Substrates an den Ribosomen, kommt es bei vielen Cofaktor-haltigen Redoxproteinen zu einer Bindung von spezifischen Chaperonen (in Abbildung 7 nicht dargestellt), den sogenannten REMPs (siehe Kapitel 2.4). Diese Bindung verhindert eine Translokation des Substrates vor der vollständigen Reifung. Nach der vollständigen Reifung des Substrates bindet dieses mit seinem Signalpeptid (dunkelgrün) an den TatBC-Rezeptorkomplex und initiiert somit die Translokation (Abbildung 7A). Möglich wäre, dass das „targeting“ des Substrats direkt an die Translokase hin stattfindet. Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, dass ein vorgeschaltetes, unspezifisches „targeting“ an die Cytoplasmamembran stattfinden könnte, welches dazu dient, das Signalpeptid beziehungsweise das Konsensus-Motiv korrekt für eine nachfolgende Bindung an die Translokase auszurichten (siehe auch Punkt 2.1.2). Die Translokase bindet das Signalpeptid in der Nähe des Konsensus-Motivs. Diese Bindung ist abhängig von einem intakten Zwillingsarginin (Alami *et al.*, 2003; Gérard und Cline, 2006; Kreutzenbeck *et al.*, 2007; Panahandeh *et al.*, 2008). Es gibt auch Hinweise darauf, dass der Bindung des Bereiches des Zwillingsarginin eine erste, vom Zwillingsarginin unabhängige Bindung vorausgeht (McDevitt *et al.*, 2006; Panahandeh *et al.*, 2008). Studien am cpTat-Weg und am bakteriellen Tat-weg zeigen, dass für die Bindung des Substrates an die Translokase das Membranpotential  $\Delta\mu$  wohl nicht benötigt wird (Ma und Cline, 2000; Alami *et al.*, 2002). In Abhängigkeit vom Membranpotential  $\Delta\mu$  assoziiert dann TatA (wahrscheinlich in großer Menge) mit dem TatBC-Rezeptorkomplex zum kompletten Tat-Translokon (Abbildung 7B) (Cline und Mori, 2001; Mori und Cline, 2002). Das Substrat wird dann im nächsten Schritt vom Tat-Apparat durch die Membran transloziert (Abbildung 7C). Bisher ist hierbei klar, dass

## I. Einleitung

bei diesem Schritt keine vollständige Übergabe des Substrates vom TatBC-Rezeptorkomplex an TatA erforderlich ist. „Crosslinking“-Versuche haben gezeigt, dass selbst ein mit dem Signalpeptid kovalent an TatC gebundenes Substrat exportiert werden kann (Gérard und Cline, 2006). Das heißt, beim Translokationsvorgang ist TatC, und somit wohl auch TatB, immer noch in unmittelbarer Nähe des Substrates. Es ist jedoch die allgemeine Annahme, dass die Passage des Substrates durch die Membran durch TatA vermittelt wird. Deutliche Hinweise hierauf kommen aus einer neueren Arbeit, bei der *in vitro* ein Translokationsintermediat von TorA-PhoA „crosslinking“-Produkte mit TatA produzierte, was eine nahe Assoziation von TatA zum Substrat während der Translokation vermuten lässt (Panahandeh *et al.*, 2008). Strittig ist hingegen der Punkt, wie TatA die Passage des Substrates im Detail bewirkt. Zum einem wird ein Modell vorgeschlagen, nach dem TatA einen Kanal für das Substrat bildet, wobei dieser dann im Durchmesser auch mit dem Durchmesser des Substrates variieren müsste. Dieses Modell basiert auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von TatA-Komplexen, die eine Kanal-ähnliche Form zeigen und tatsächlich mit unterschiedlichen Durchmessern vorlagen (Sargent *et al.*, 2001; Gohlke *et al.*, 2005).

Durch Ergebnisse einer anderen Studie wurde dieses Kanal-Modell in Frage gestellt. Cline und McCaffery (2007) konnten für den thylakoidalen cpTat-Weg zeigen, dass die Tat-abhängige Translokation des pOE17-GS15-(mOE17)<sub>2</sub> Fusionsproteins unvollständig verläuft und dieses Substrat, wahrscheinlich aufgrund seiner Länge, in der Membran stecken bleibt. Das pOE17-GS15-(mOE17)<sub>2</sub> Fusionsprotein besteht aus dem cpTat-Substrat OE17, gefolgt von einem langen unstrukturierten „linker“-Polypeptid (GS15) und einem langen gefalteten Proteinteil, bestehend aus zwei aneinander fusionierten reifen OE17-Proteinen. Für das Translokationsintermediat dieses Fusionsproteins konnte kein Kontakt zu Tat-Komponenten nachgewiesen werden. Diese Beobachtung impliziert, dass sich das Substrat entweder nie in einer Kanal ähnlichen Pore befunden haben kann, oder aber, dass es nach dem Abbruch der Translokation von dem Translokationskanal lateral in die Membran entlassen wurde. Derzeit wird ein Modell vorgeschlagen, in dem TatA-Moleküle die Membran punktuell destabilisieren und so dem Substrat die Passage ermöglichen. (Brüser und Sanders, 2003; Cline und McCaffery, 2007). Wie genau das Substrat letztendlich über die Membran bewegt wird, ist bisher vollkommen unklar. Brüser und Sanders (2003) schlagen vor, dass die Kraft für die Translokation von TatC kommen könnte, welches das Substrat über die Membran zieht.

Nach der Abspaltung des Signalpeptids vom reifen Protein durch die Signalpeptidase (Yahr und Wickner, 2001) wird das Substrat dann im letzten Schritt von der Translokase entlassen (Abbildung 7D). Anschließend dissoziieren die verschiedenen Tat-Komplexe wieder voneinander (Mori und Cline, 2002).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Tat-abhängigen Proteintranslokation.** Das Vorläuferprotein ist pink mit einem grünen Signalpeptid dargestellt. TatA ist orange dargestellt, TatB in blau und TatC in rot. Details sind dem Text zu entnehmen (Abbildung verändert nach Palmer *et al.*, 2005).

## 2.9 Zielsetzungen dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten Aspekte der Substrat-Translokase-Wechselwirkung bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation untersucht werden. Auf der Seite des Tat-Signalpeptids sollte hierbei eine der Aminosäuren im Fokus stehen, welche neben dem Zwillingsarginin im Tat-Konsensus-Motiv (S-R-R-X-F-L-K) stark konserviert sind. Durch den Austausch einer Aminosäure im Konsensus-Motiv, an einer nicht Zwillingsarginin Position, sollte zunächst ein Tat-abhängiges Reporterprotein mit einem stark verringerten bis defekten Tat-abhängigen Export generiert werden. Mit einem genetischen Ansatz sollte ausgehend von diesem Reporterprotein auf Tat-gekoppelte Suppressormutanten selektiert werden, die einen wiederhergestellten Tat-abhängigen Export des Reporterproteins zeigen. Alle bisherigen

## I. Einleitung

Arbeiten, die ausgehend von einem defektem Signalpeptid auf genetischem Wege die Bereiche der Translokase kartiert haben, die an der Bindung von Tat-Signalpeptiden beteiligt sind, gingen bisher ausschließlich vom Zwillingsarginin aus (Kreutzenbeck *et al.*, 2007; Strauch und Georgiou, 2007). Durch einen Ansatz, welcher die Substrat-Translokase-Wechselwirkungen nun ausgehend von einer anderen Position des Tat-Konsensus-Motivs genetisch untersucht, sollten weiterführende Informationen darüber gewonnen werden, welche Bereiche der Tat-Translokase / des TatBC-Rezeptorkomplexes an der Erkennung bzw. Bindung von Tat-Signalpeptiden beteiligt sind. Die einzige Position im Konsensus-Motiv, für die neben den Zwillingsarginin Positionen (RR) gezeigt werden konnte, dass Austausche einen großen Einfluss auf den Tat-abhängigen Export ausüben können, ist die Position des Phenylalanins (F). Aus diesem Grund sollte die Position des Phenylalanins in dieser Arbeit als Ausgangspunkt für die weiterführende genetische Kartierung der Signalpeptidbindetasche des TatBC-Rezeptorkomplexes eingesetzt werden.

Ein ebenfalls wichtiger Punkt auf dem Weg zum Verständnis des Mechanismus des Tat-abhängigen Proteinexports ist die Aufdeckung von Wechselwirkungen innerhalb und zwischen den einzelnen Komponenten der Tat-Translokase, die für eine funktionierende Translokation benötigt werden. Zur Untersuchung von Wechselwirkungen innerhalb der Tat-Translokase sollte in dieser Arbeit die zentrale Komponente der Tat-Translokase, das TatC-Protein, als Ausgangspunkt dienen. TatC ist der Erstrezeptor der Tat-Substrate, welche in Abhängigkeit des Zwillingsarginins an TatC binden (Alami *et al.*, 2003). Ebenso wie für die Untersuchung von Substrat-Translokase-Wechselwirkungen bot sich hierfür ein genetischer Ansatz an, bei dem ausgehend von einer Defektmutation in TatC auf Suppressormutanten selektiert wird, bei denen der Tat-abhängige Proteinexport durch eine „second site“ Mutation in anderen Bereichen der Tat-Translokase wieder instand gesetzt ist.

## II. Material und Methoden

### 1. Chemikalien und Enzyme

In der vorliegenden Arbeit wurden analysenreine Chemikalien der Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) und SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg) verwendet. Biochemikalien und Enzyme mit den dazugehörigen Puffern stammten von den Firmen Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) und New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main). Zusätze für Nährmedien stammten von Becton Dickinson/Difco GmbH (Heidelberg). Nitrocellulosemembranen wurden von Schleicher und Schüll/Whatman (Dassel) bezogen. Produkte anderer Hersteller sind an entsprechender Stelle aufgelistet.

### 2. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

**Tabelle 1:** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 $\alpha$	<i>F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG <math>\Phi</math>80dlacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+), <math>\lambda</math>-</i>	Hannahan <i>et al.</i> , 1983
XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq <math>\Delta</math>(lacZ)M15] hsdR17(rK-mK+)</i>	Stratagene, Heidelberg
SCS110	<i>rpsL (Str<sup>r</sup>) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 <math>\Delta</math>(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI<sup>f</sup>Z<math>\Delta</math>M15]</i>	Stratagene, Heidelberg
GSJ101	<i>F- araD139 <math>\Delta</math>(argF-lac)U169 rspL150 relA1 flbB5301 fruA25 deoC1 ptsF25 e14- <math>\Delta</math>tatA-tatD <math>\Delta</math>tatE x P1.MM129&gt;TetR <math>\Delta</math>malE444 zjb729::Tn10</i>	Blaudeck <i>et al.</i> , 2003

## II. Material und Methoden

**Tabelle 2:** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Plasmid	Resistenz	Beschreibung	Referenz
pHSG575 (auch als pLV bezeichnet)	cm	pSC101 Replicon; <i>lacI</i> + $Z\alpha^+$	Takeshita <i>et al.</i> , 1987
pBBR1MCS2	kan	<i>mob rep lacZ</i> $\alpha^+$	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pTatABCE	cm	pHSG575, <i>tatABC E.c.</i> ; <i>tatE E.c.</i>	Kreutzenbeck <i>et al.</i> , 2007
pTatABCE-SPS-L9F(C)	cm	Derivat von pTatABCE: TatC(L9→F)	Kreutzenbeck <i>et al.</i> , 2007
pTatABCE-SPS-K18E(C)	cm	Derivat von pTatABCE: TatC(K18→E)	Kreutzenbeck <i>et al.</i> , 2007
pTatABCE-SPS-N22I(C)	cm	Derivat von pTatABCE: TatC(N22→I)	Kreutzenbeck <i>et al.</i> , 2007
pTatABCE-SPS-E8K(B)	cm	Derivat von pTatABCE: TatB(E8→K)	Kreutzenbeck <i>et al.</i> , 2007
pTatABCE-SPS-F14D-UM1	cm	Derivat von pTatABCE: TatA(D58→G); TatB(L9→P, N119→K, T133→M); TatC(L9→F, R19→C, M159→T); TatE(Q59→R)	diese Arbeit
pTatABCE-SPS-L9P(B)	cm	Derivat von pTatABCE: TatB(L9→P)	diese Arbeit
pTatABCE-SPS-L9P(B)/L9F(C)	cm	Derivat von pTatABCE: TatB(L9→P); TatC(L9→F)	diese Arbeit
pTatABCE-SPS-F14D-UM2	cm	Derivat von pTatABCE: TatB(P152→R); TatC(L9→F, K18→E, L34→Q, F118→L, V167→A)	diese Arbeit
pTatABCE-SPS-L9F(C)/K18E(C)	cm	Derivat von pTatABCE: TatC(L9→F, K18→E)	diese Arbeit
pTatABCE-SPS-F14D-UM3	cm	Derivat von pTatABCE: TatB(L9→Q); TatC(L9→F, M163→L)	diese Arbeit
pTatABCE-SPS-L9Q(B)	cm	Derivat von pTatABCE: TatB(L9→Q)	diese Arbeit
pTatABCE-SPS-L9Q(B)/L9F(C)	cm	Derivat von pTatABCE: TatB(L9→Q); TatC(L9→F)	diese Arbeit
pTatABCE-SPS-F14D-UM4	cm	Derivat von pTatABCE: TatA(K49→M, K86→I); TatB(V12→G, Q87→R); TatC(N22→I, M77→V)	diese Arbeit
pTatABCE-SPS-V12G(B)	cm	Derivat von pTatABCE: TatB(V12→G)	diese Arbeit
pTatABCE-SPS-V12G(B)/N22I(C)	cm	Derivat von pTatABCE: TatB(V12→G); TatC(N22→I)	diese Arbeit
pTatABCE-SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)	cm	Derivat von pTatABCE: TatB(L9→Q); TatC(L9→F, K18E)	diese Arbeit
pTatABCE-SPS-L9Q(B)/K18E(C)	cm	Derivat von pTatABCE: TatB(L9→Q); TatC(K18→E)	diese Arbeit

Plasmid	Resistenz	Beschreibung	Referenz
pTatABC	cm	pHSG575, <i>tatABC E.c.</i>	Blaudeck <i>et al.</i> , 2003
pTatABC-P48A	cm	Derivat von pTatABC: TatC (P48→A)	diese Arbeit
pTatABC-F94A	cm	Derivat von pTatABC: TatC (F94→A)	diese Arbeit
pTatABC-P48A-S-UM4	cm	Derivat von pTatABC: TatB (T31A→G, S91→G, V150→I); TatC (S2→P, L9→F, P48→A)	diese Arbeit
pTatABC-P48A-S-T31A(B)	cm	Derivat von pTatABC: TatB (T31→A); TatC (P48→A)	diese Arbeit
pTatABC-P48A-S-S91P(B)	cm	Derivat von pTatABC: TatB (S91→G); TatC (P48→A)	diese Arbeit
pTatABC-P48A-S-S2P(C)	cm	Derivat von pTatABC: TatC (S2→P, P48→A)	diese Arbeit
pTatABC-P48A-S-L9F(C)	cm	Derivat von pTatABC: TatC (L9→F, P48→A)	diese Arbeit
pTatABC-P48A-S-S91P(B)/L9F(C)	cm	Derivat von pTatABC: TatB (S91→G); TatC (L9→F, P48→A)	diese Arbeit
pTatABC-P48A-S-UM5	cm	Derivat von pTatABC: TatB (L17→H, E84→G); TatC (P48→A)	diese Arbeit
pTatABC-P48A-S-L17H(B)	cm	Derivat von pTatABC: TatB (L17→H); TatC (P48→A)	diese Arbeit
pTatABC-P48A-S-E84G(B)	cm	Derivat von pTatABC: TatB (E84→G); TatC (P48→A)	diese Arbeit
pTatABC-P48A-S-L17H(B)/E84G(B)	cm	Derivat von pTatABC: TatB (L17→H, E84→G); TatC (P48→A)	diese Arbeit
pTorA-MalE	kan	pBBR1MCS-2, <i>torA<sup>SP</sup> E. c Fusion mit malE</i> reif <i>E. c</i>	Blaudeck <i>et al.</i> , 2003
pTorA[KQ]-MalE	kan	Derivat von pTorA-MalE: R11→K, R12→Q	Kreutzenbeck <i>et al.</i> , 2007
pTorA[F14S]-MalE	kan	Derivat von pTorA-MalE: F14→S im TorA <sup>SP</sup>	Persönliche Mitteilung Dr. P.J. Kreutzenbeck
pTorA[F14R]-MalE	kan	Derivat von pTorA-MalE: F14→R im TorA <sup>SP</sup>	diese Arbeit
pTorA[F14D]-MalE	kan	Derivat von pTorA-MalE: F14→D im TorA <sup>SP</sup>	diese Arbeit

**Tabelle 3:** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Verwendung
Ep_TatABCE_For	CAGTGAGCGCAACGCAATTAATG	Vektorprimer pHSG575: epPCR-, „cross-over“-PCR- und Sequenzier-Primer
Ep_TatABCE_Rev	GCTGCGCAACTGTTGGGAAG	Vektorprimer pHSG575: epPCR-, „cross-over“-PCR- und Sequenzier-Primer

## II. Material und Methoden

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Verwendung
TatB_L9P_Ex_for	GGTTTTAGCGAACCGCTATTGGTG	Aminosäureaustausch L9→P in TatB
TatB_L9P_Ex_rev	CACCAATAGCGGTTTCGCTAAAACC	Aminosäureaustausch L9→P in TatB
TatB_L9Q_Ex_for	GGTTTTAGCGAACAGCTATTGGTG	Aminosäureaustausch L9→Q in TatB
TatB_L9Q_Ex_rev	CACCAATAGCTGTTCGCTAAAACC	Aminosäureaustausch L9→Q in TatB
TatB_V12G_Ex_for	CTGCTATTGGGGTTCATCATCG	Aminosäureaustausch V12→G in TatB
TatB_V12G_Ex_rev	CGATGATGAACCCCAATAGCAG	Aminosäureaustausch V12→G in TatB
TatC_P48A_EX_for	CTGGTATCCGCGGCGTTGATCAAGCAG	Aminosäureaustausch P48→A in TatC
TatC_P48A_EX_rev	CTGCTTGATCAACGCCGCGGATACCAG	Aminosäureaustausch P48→A in TatC
TatC_F94A_EX_for	GGTGTGGGCAGCTATCGCCCCAG	Aminosäureaustausch F94→A in TatC
TatC_F94A_EX_rev	CTGGGGCGATAGCTGCCACACC	Aminosäureaustausch F94→A in TatC
TatB_T31A_Ex_for	CGGTAAAAGCGGTAGCGGGC	Aminosäureaustausch T31→A in TatB
TatB_T31A_Ex_rev	GCCCGCTACCGCTTTTACCG	Aminosäureaustausch T31→A in TatB
TatB_S91P_Ex_for	CCGCGGAGCCGATGAAGCGTTC	Aminosäureaustausch S91→P in TatB
TatB_S91P_Ex_rev	GAACGCTTCATCGGCTCCGCGG	Aminosäureaustausch S91→P in TatB
TatB_S2P_Ex_for	GATAAACCGTAAACATGCCTGTAGAA GATAC	Aminosäureaustausch S2→P in TatB
TatB_S2P_Ex_rev	GTATCTTCTACAGGCATGTTTACGGTT TATC	Aminosäureaustausch S2→P in TatB
TatB_L17H_Ex_for	CATCATCGGCCACGTCGTTCTGGG	Aminosäureaustausch L17→H in TatB
TatB_L17H_Ex_rev	CCCAGAACGACGTGGCCGATGATG	Aminosäureaustausch L17→H in TatB
TatB_E84G_Ex_for	CGTCGATGGATGGACTACGCCAGG	Aminosäureaustausch E84→G in TatB
TatB_E84G_Ex_rev	CCTGGCGTAGTCCATCCATCGACG	Aminosäureaustausch E84→G in TatB
TatA_vorne_for	GATTATTGCCGTCATCGTTGTACTGC	Sequenzierung des <i>tatABC</i> - und des <i>tatABCE</i> -Operons
TatA_vorne_rev	GCAGTACAACGATGACGGCAATAATC	Sequenzierung des <i>tatABC</i> - und des <i>tatABCE</i> -Operons
TatA_Ende_rev	CACCTGCTCTTTATCGTGCC	Sequenzierung des <i>tatABC</i> - und des <i>tatABCE</i> -Operons
TatC_Ende_rev	GTCGTTTTCTCTTCCCGATTTC	Sequenzierung des <i>tatABC</i> - und des <i>tatABCE</i> -Operons

## II. Material und Methoden

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Verwendung
TatB_Ende_for	CTTCCCCTTCGTCGAGTGATAAACC	epPCR- , „cross-over“-PCR- und Sequenzier-Primer für das <i>tatABC</i> - und das <i>tatABCE</i> -Operon
TatB_Ende_rev	GGTTTATCACTCGACGAAGGGGAAG	epPCR- , „cross-over“-PCR- und Sequenzier-Primer für das <i>tatABC</i> - und das <i>tatABCE</i> -Operon
TatB-for	CTGAAAAAGGTTGAAAAGGCG	Sequenzierung des <i>tatABC</i> - und des <i>tatABCE</i> -Operons
TatB-rev	TAGGAACGCTTCATCGACTC	Sequenzierung des <i>tatABC</i> - und des <i>tatABCE</i> -Operons
TatC-for-start	CGCCATTGATCAAGCGTTG	Sequenzierung des <i>tatABC</i> - und des <i>tatABCE</i> -Operons
TatC-for-end	GATGTCTTCTCGCAAACGCT	Sequenzierung des <i>tatABC</i> - und des <i>tatABCE</i> -Operons
TatC-rev	TGACAGAATCAGCGACACCA	Sequenzierung des <i>tatABC</i> - und des <i>tatABCE</i> -Operons
M13/pUCrev11.01	TTGTGTGGAATTGTGAGCGG	Vektorprimer zur Sequenzierung von pHSG575- und pBBR1MCS2-Derivaten
M13uniCSneu	AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTT	Vektorprimer zur Sequenzierung von pHSG575- und pBBR1MCS2-Derivaten
RRF14Rfor53	CTCTTTCAGGCATCACGTCGGCGTCGC CTGGCACAACTCGGC	Aminosäureaustausch F14→R im TorA <sup>SP</sup>
RRF14Rrev53	GCCGAGTTGTGCCAGGCGACGCCGAC GTGATGCCTGAAAGAG	Aminosäureaustausch F14→R im TorA <sup>SP</sup>
RRF14Dfor53	CTCTTTCAGGCATCACGTCGGCGTGAT CTGGCACAACTCGGC	Aminosäureaustausch F14→D im TorA <sup>SP</sup>
RRF14Drev53	GCCGAGTTGTGCCAGATCACGCCGAC GTGATGCCTGAAAGAG	Aminosäureaustausch F14→D im TorA <sup>SP</sup>
torAmalEintfor	GCCTGTTGGCTGAAATCACCCC	Sequenzierung von TorA-MalE-Reporter
torAmalEintre	CGCTTTCAGTTCTTTATCCAGCG	Sequenzierung von TorA-MalE-Reporter

### **3. Mikrobiologische Methoden**

#### **3.1 Kultivierung von Bakterien**

##### **3.1.1 Nährmedien**

###### **LB (Luria-Bertani)-Medium (Miller, 1972):**

Pro l:	10 g	Bacto-Trypton,
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl

Zur Herstellung von festen Nährmedien wurden dem LB-Medium zusätzlich 20g Agar pro l zugesetzt. Dieses Medium diente standardmäßig zur Anzucht von *E. coli* Stämmen.

###### **MacConkey-Agar**

40g MacConkey-Agar Base und 7,5 g Agar wurden pro l Aqua dest. verwendet. Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium Maltose in einer Endkonzentration von 1% steril zugesetzt.

###### **Minimalmedium (Tanaka *et al.*, 1967)**

Die anorganischen Komponenten des Minimalmediums nach Tanaka *et al.* (1967) setzten sich wie folgt zusammen:

Lösung A (10x):	pro l	46,9 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
		111,5 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		26,4 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Lösung B (100x):	pro l	7,4 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
		147 mg	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
		13,6 mg	ZnCl <sub>2</sub>
		28 mg	Fe(II)SO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
		1 ml	1 M HCl

-Zur Herstellung fester Nährböden wurden zunächst Lösung B und Aqua dest. mit Agar (20 g/l) autoklaviert, Lösung A wurde nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

-Zur Herstellung von Minimalmedium-Agarplatten mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle wurden dem Medium folgenden Komponenten steril in der entsprechenden Endkonzentration zugegeben: Maltose (0,4%), Thiamin (10 mg/l)

-Zur Herstellung von Minimalmedium-Agarplatten zur anaeroben Ansucht von *E. coli* Zellen mit TMAO als terminalen Elektronenakzeptor wurden dem Medium folgenden Komponenten steril in der entsprechenden Endkonzentration zugegeben: TMAO (50mM), Glycerin (0,4%), Thiamin (10 mg/l)

Zur Selektion auf die jeweiligen Antibiotikaresistenzen wurden dem jeweiligen Medium Antibiotika in folgender Endkonzentration zugefügt:

Kanamycin	(in Aqua bidest.):	50 mg/l
Chloramphenicol	(in 70% Ethanol):	25 mg/l
Tetracyclin	(in 70% Ethanol):	15 mg/l

Falls erforderlich wurde den Nährmedien IPTG (in 70% Ethanol) in einer Endkonzentration von 0,1 mM steril zugesetzt.

### 3.1.2 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung der *E. coli* Stämme erfolgte standardmäßig in LB-Medium mit den erforderlichen Antibiotika bei 37°C. Bis zu einem Kulturvolumen von 5 ml erfolgte die Kultivierung in Reagenzgläsern bei 170 rpm. Ab einem Volumen von 10 ml erfolgte die Kultivierung in Erlenmeyerkolben bei 120-170 rpm.

Die anaerobe Kultivierung von *E. coli* Stämmen erfolgte in einem Anaerobtopf (Oxoid, Wesel, Deutschland) bei 37°C. Die anaeroben Bedingungen (H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Gasgemisch) wurden hierbei durch das „Gas Generating Kit“ und einem Edelmetallkatalysator (beides Oxoid, Wesel, Deutschland) eingestellt.

### 3.2 Stammhaltung

Die langfristige Stammhaltung erfolgte in Glycerin-Dauerkulturen. Hierzu wurden 500µl einer Kultur mit 500µl sterilem 87% Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei – 75°C bis -80°C. Die kurzfristige Haltung erfolgte auf LB-Agarplatten mit erforderlichen Antibiotika bei 4°C.

### 3.3 Transformation von *E. coli* Stämmen

#### 3.3.1 Transformation von *E. coli* Stämmen (nach Cohen *et al.*, 1972, verändert)

Zur standardmäßigen Transformation mit Plasmid-DNA wurden kompetente *E. coli* Zellen verwendet, die nach der Calciumchlorid-Methode hergestellt wurden. Hierzu wurden 50 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit 400 µl einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C auf einem Schüttler bei 150 – 170 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,8 angezogen. Die Zellen wurden nach Erreichen der erforderlichen OD<sub>600</sub> für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min und 4°C geerntet. Das Pellet wurde in 40 ml eiskaltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und für mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min und 4°C wurde das Pellet in 10 ml eiskaltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> mit einer Endkonzentration von 10% Glycerin, aufgenommen und für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in Aliquots eingeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, die Lagerung erfolgte bei - 75°C bis - 80°C.

Zur Transformation wurden die kompetenten *E. coli* Zellen entweder vor dem Einfrieren direkt verwendet, oder es wurden die eingefrorenen Zellen auf Eis aufgetaut. 100-200 µl der Zellsuspension wurden mit circa 50-150 ng Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz vorsichtig gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Hitzeschock-Behandlung des Ansatzes für 90 sek bei 42°C, anschließend eine Inkubation für 2 min auf Eis. Zur Ausprägung der Plasmid-kodierten Antibiotikaresistenz wurde der Ansatz nach Zugabe von 700 µl LB-Medium für 60 - 120 min bei 37°C und ca. 150 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.3.2 Transformation von *E. coli* Stämmen durch Elektroporation (nach Dower *et al.*, 1988, verändert)

Zur Herstellung elektroporationskompetenter *E. coli* Zellen wurden 50 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit 400 µl einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,8 auf einem Schüttler bei 150 – 170 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 5000 rpm, 4°C) wurden die pelletierten *E. coli* Zellen zweimal mit 25 ml und einmal mit 10 ml einer eiskalten, 10%igen Glycerinlösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl dieser Lösung aufgenommen und in 40-50 µl Aliquots entweder direkt zur Elektroporation eingesetzt oder bei -75°C bis -80°C zur späteren Verwendung gelagert.

Zur Transformation wurden die elektrokompenten *E. coli* Zellen mit ca. 40 ng entsalzter Plasmid-DNA oder mit einem vollständig entsalzten Ligationsansatz in einer eisgekühlten Elektroporationsküvetten (2 mm Elektrodenabstand, Typ 16 S 2086, Biorad, München) gemischt. Die Elektroporation der *E. coli* Zellen erfolgte im „Gene Pulser“ (Biorad, München) mit folgenden Einstellungen: Kapazität 25µF, Spannung 2,5 kV, Widerstand 200 Ω.

Unmittelbar nach dem Puls wurden 1 ml LB-Medium zugesetzt, der Ansatz in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und dann für 60 - 120 min bei 37°C und ca. 150 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Bei dem Ausplattieren der Ansätze auf Minimalmediumplatten wurden die Zellen nach der Regeneration zwei mal in Tanaka-Minimalmedium gewaschen, im selben Medium resuspendiert und auf den Minimalmediumplatten ausplattiert. Die Platten wurden für 2 bis 6 Tage unter den erforderlichen Bedingungen (aerob oder anaerob) bei 37°C inkubiert.

### **4. Molekularbiologische Methoden**

#### **4.1 Präparation von Plasmid-DNA**

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen (Birnboim & Doly, 1979). Hierfür wurde das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Gegebenenfalls wurden die verwendeten Kulturmengen und die Puffervolumina variiert.

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* im größeren Maßstab erfolgte nach demselben Prinzip, hierfür wurde das „Nucleobond AX500 Kit“ (Macherey-Nagel, Düren), das „CompactPrep Plasmid Midi Kit“ oder das „CompactPrep Plasmid Maxi Kit“ (beides Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Gegebenenfalls wurden die verwendeten Kulturmengen und die Puffervolumina variiert.

#### **4.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden**

##### **4.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen**

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme erfolgte in den vom Enzymhersteller (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim und New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main) mitgelieferten Puffern nach Angaben des Herstellers und bei der erforderlichen Temperatur.

##### **4.2.2 Entsalzen von DNA**

Für die Entsalzung von Restriktionsverdau oder PCR-Ansätzen wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ oder das „MinElute Gel Extraction Kit“ (beides Qiagen, Hilden) verwendet. Hierbei wurde das „QIAquick PCR Purification Kit Protocol“ beziehungsweise das „MinElute PCR Purification Kit Protocol“ des Herstellers verwendet.

#### **4.2.3 Fällung von DNA aus wässriger Lösung (nach Sambrook *et al.*, 1989, verändert)**

Zur Fällung wurde die DNA mit 1/10 Volumen 4 M Natriumacetat pH 4,8 gemischt. Anschließend wurde das 0,6 – 0,8 Fache Volumen (vor Salzzugabe) an abs. Isopropanol zugegeben. Die Fällung erfolgte entweder über Nacht bei -20°C oder für mindestens 20 min auf Eis oder bei -20°C. Anschließend wurde die Lösung 20 min bei 15.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500µl 70% Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nach dem Trocknen des DNA-Pellets in einer Vakuumzentrifuge wurde dieses in der erforderlichen Menge Aqua bidest. oder in EB-Puffer (Qiagen, Hilden) aufgenommen.

#### **4.2.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ oder dem „MinElute Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

#### **4.2.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld nach ihrer Größe erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hierzu wurden 0,8% – 2% Agarose (w/v) in 1 × TAE aufgekocht und nach dem Abkühlen auf unter 60°C in einen Gelträger gegossen. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit  $\frac{1}{5}$  Volumen 6 × Probenpuffer versetzt und die Elektrophorese wurde in 1 × TAE-Puffer bei bis zu 120 V (je nach Gelgröße) bis zur gewünschten Auftrennung durchgeführt. Zur Visualisierung der DNA unter UV-Licht wurde das Agarosegel nach der Elektrophorese:

- a) Für 10 min in verdünnter Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und anschließend in Wasser für 5 – 10 min entfärbt.
- b) Für 30 min mit GelRed<sup>TM</sup> (Biotium, Inc., Hayward Ca/USA ) nach Angaben des Herstellers angefärbt.

## II. Material und Methoden

10 × TAE-Puffer:	pro l :	48,4 g	Tris
		11,42 ml	Essigsäure (96%)
		7,44 g	EDTA/Na <sub>2</sub>
6 × Probenpuffer:		10 mM	Tris-HCl (pH 7,6)
		60 mM	EDTA/Na <sub>2</sub>
		0,03 %	Bromphenolblau
		0,03 %	Xylencyanol
		60 %	Glycerin

### 4.2.6 Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Die Entfernung von 5'-Phosphatresten zur Verhinderung der Religation von linearisierten Vektoren erfolgte durch eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Schrimps „Shrimp alkaline phosphatase“ (SAP). Hierzu wurden die Enzyme (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) nach Angaben der Hersteller verwendet.

### 4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte entweder mittels T4 DNA-Ligase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim oder Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) oder mittels „Rapid DNA Ligation Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim oder Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) unter Verwendung des jeweils mitgelieferten Puffers. Bei Verwendung der T4 DNA-Ligase erfolgte eine Ligation bei 16°C über Nacht. Bei Verwendung eines „Rapid DNA Ligation Kit“ erfolgte die Ligation entweder für bis zu 1h bei RT oder ebenfalls bei 16°C über Nacht. Vor der Ligation erfolgte eine Behandlung der bereits gespaltenen Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase. Zur Ligation wurden Vektor und DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt.

### 4.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988)

Die *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988). Hierzu wurden zwei komplementäre, konvergierende Oligonukleotide (Primer) verwendet, die das zu amplifizierende Fragment flankieren. Für die

PCR-Reaktion wurden die „High-Fidelity“- oder die „Pwo“-DNA-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Angaben des Herstellers in einem Reaktionsvolumen von 50 µl verwendet. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Plasmid-DNA als „template“, wurden 5 – 20 ng der entsprechenden Plasmid-DNA eingesetzt. Die Durchführung der PCR-Reaktionen erfolgte in Thermocyclern der Firma Biometra (T3 oder T3000), nach Angaben des Polymerase-Herstellers. Die Anpassung der „annealing“-Temperatur erfolgte unter Berücksichtigung der vom Hersteller (OPERON Biotechnologies, Köln) angegebenen Schmelztemperatur der Oligonukleotide.

### **4.2.9 Nicht radioaktive DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode**

Bei dieser nicht radioaktiven Sequenzierungsmethode nach Sanger *et al.* (1977) wird der Abbruch der DNA-Polymerasekettenreaktion beim Einbau von Didesoxynukleotiden genutzt. Die Durchführung der Sequenzier-PCR-Reaktion erfolgte unter Verwendung normaler unmarkierter Oligonukleotide (OPERON Biotechnologies, Köln) mit dem „BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers. Die vier verschiedenen Didesoxynukleotide waren hierbei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Aufreinigung der Sequenzreaktionen erfolgte mit dem „DyeEx 2.0 Spin Kit“ (Qiagen, Hilden). Die Sequenzierung wurde mit dem „3100- *Avant* Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und mit der zugehörigen „Data Collection Software 2.0“ ausgewertet.

### **4.2.10 Ortsgerichtete Mutagenese**

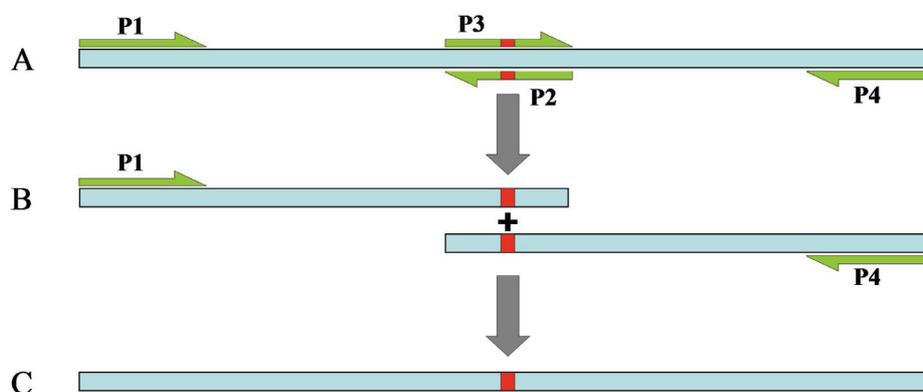
Das Einführen von einzelnen oder mehreren Basenaustauschen in DNA-Fragmente erfolgte entweder mit Hilfe des „QuikChange<sup>®</sup> Site Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers oder mittels einer „cross-over“-PCR Variante. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Ein generelles Schema zur Einführung von Basenaustauschen via „cross-over“-PCR ist in Abbildung 5 dargestellt. Es wurden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide verwendet, die auf der Ziel-DNA binden können und die den gewünschten Basenaustausch bzw. Basenaustausche beinhalten. Mit jedem dieser Primer wurde zusammen mit einem

## II. Material und Methoden

flankierenden Primer ein separates DNA-Fragment mittels PCR generiert (Abbildung 5A, Primer 1 und Primer 2 sowie Primer 3 und Primer 4 erzeugen je ein separates Fragment). Beide Fragmente beinhalten nun den gewünschten Basenaustausch (Abbildung 5B, dargestellt in rot), und haben durch die komplementären Primer einen identischen, überlappenden Bereich. Dieser Bereich dient in der folgenden PCR zur Fusion beider Fragmente. Durch den Überhang und durch die flankierenden Primer kann so wieder das Ausgangsfragment generiert werden, welches nun den gewünschten Basenaustausch beinhaltet (Abbildung 5C, dargestellt in rot). Dieses Fragment kann über Restriktionsschnittstellen, welche bereits in der „template“-DNA vorhanden sind, oder über Schnittstellen, die gegebenenfalls durch die flankierenden Primer eingebracht werden, für eine Klonierung verwendet werden.

Für die ortsgerichtete Mutagenese der TorA-Signalsequenz, kodiert durch pTorA-MalE, wurde die „QuikChange“-Methode verwendet. Für die ortsgerichtete Mutagenese der *tat*-Gene auf pTatABCE oder pTatABC wurde die „cross-over“-PCR Methode angewandt. Gegebenenfalls wurde ein Basenaustausch in einem Gen auch über eine Klonierung eingefügt, wenn der entsprechende Austausch im selben Gen bereits in einem anderen Plasmid vorlag. In diesem Fall wurde ein DNA-Fragment nach einer Spaltung mit geeigneten Restriktionsendonukleasen in den entsprechend vorbereiteten Ziel-Vektor ligiert.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung zur ortsgerichteten Mutagenese mittels „cross-over“-PCR.** Die Ziel-DNA ist in blau dargestellt, die Primer in grün und entsprechend mit P (Abkürzung für Primer) gekennzeichnet. Der einzufügende Basenaustausch ist sowohl in den Primern als auch in der DNA als roter Balken dargestellt. Die Erläuterungen zu den einzelnen Teilschritten sind dem Text zu entnehmen.

#### **4.2.11 Ungerichtete Mutagenese von DNA-Fragmenten durch fehlerhafte Polymerasekettenreaktion („error-prone“-PCR)**

Die ungerichtete Mutagenese von DNA-Fragmenten mittels „error-prone“-PCR (epPCR) wurde abgeändert nach Jaeger *et al*, (2001) durchgeführt. Diese Technik basiert darauf, die natürliche Rate des fehlerhaften Baseneinbaus einer PCR-Polymerase zu erhöhen. Dieses wird durch eine erhöhte Magnesiumionen-Konzentration und die Zugabe von Manganionen zum PCR-Ansatz erreicht. Für die Amplifikation der zu mutagenisierenden DNA wurde die Taq-Polymerase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet.

Standardprotokoll für „error-prone“-PCR:

1. 5 min Denaturierung bei 95°C
2. 15 sek Denaturierung bei 95°C
3. 60 sek „annealing“ (Temperatur variiert je nach verwendeten Primern)
4. Elongation bei 72°C (Dauer variiert je nach „template“-Länge)
5. 7 min finale Elongation bei 72°C

Die Schritte 2 bis 4 wurden 29-mal wiederholt.

Die PCR-Reaktionen wurden im 50µl Maßstab angesetzt:

„template“ DNA:	10-20ng
5-fach PCR-Puffer:	5 µl
dNTP-Mix:	0,2 mM
Primer:	je 0,02 µM
MgCl <sub>2</sub> :	6 mM
MnCl <sub>2</sub> :	0,1 – 0,3 mM
Taq-Polymerase:	5 U
ddH <sub>2</sub> O :	ad 50µl

### **5. Proteinchemische Methoden**

#### **5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, variiert nach Lämmli, 1970)**

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe im elektrischen Feld erfolgte in 10%igen oder in 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen (Acrylamid:Bisacrylamid; 30:0,8; Karl Roth, Karlsruhe) nach der Standardmethode von Lämmli (1970). Vor dem Auftragen wurden die Proteine in Protein-Probenpuffer aufgenommen und für 10 min bei 95°C aufgeköcht.

## II. Material und Methoden

Membranproteinproben die zur Detektion von *E. coli* TatB und TatC im Western-Blot eingesetzt werden sollten, wurden für 30 min bei 37°C unter leichten schwenken Inkubiert.

Als Proteinstandard wurden die Produkte „Prestained Protein Marker Broad Range“ (New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main) oder „PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder“ (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet. Die Auftrennung erfolgte in Minigel-Elektrophoresekammern der Firma Biometra, in 1 × Laufpuffer bei 16 mA pro Minigel.

10 × Laufpuffer, pro l:	144 g	Glycin	
	30 g	Tris	
	10 g	SDS	
Trenngel (10%):	6,25 ml	Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)	
	3,75 ml	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	
	100 µl	10% SDS	
	3,1 ml	Aqua dest.	
	1,62 ml	Glycerin (87%)	
	10 µl	TEMED	
	150 µl	APS (10%)	
Trenngel (12,5%):	7,5 ml	Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)	
	3,8 ml	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	
	100 µl	10% SDS	
	1,9 ml	Aqua dest	
	1,62 ml	Glycerin (87%)	
	10 µl	TEMED	
	150 µl	APS (10%)	
Sammelgel (6,5%):	1,1 ml	Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)	
	0,6 ml	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	
	50 µl	10% SDS	
	3,2 ml	Aqua dest	
	3 µl	TEMED	
	50 µl	APS (10%)	
2 × Protein-Probenpuffer (100ml) :	40 ml	0,2 M	Tris
		0,02 M	EDTA
		PH 7,0	HCl (2M)
	50 ml	83,3 mM	Tris
		8,3 %	SDS
		29 %	Glycerin
		0,15 %	Bromphenolblau
	10 ml	1 M	DTT

## 5.2 Western-Blot

Der immunologische Nachweis einzelner Proteine mit spezifischen Antikörpern wurde variiert nach der Methode von Towbin *et al.* (1979) durchgeführt. Die Proteine wurden zunächst in einer SDS-PAGE aufgetrennt und dann mittels Elektroblob (Mini Trans-Blot™ Kammer; Biorad, München) auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Der Aufbau der Blotapparatur erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das Blotten erfolgte dabei in Tris/Glycin Westernblot-Puffer (pro l: 3g Tris, 14,4 g Glycin) für 45 min bei 350 mA. Sowohl die Nitrocellulose-Membran als auch das Whatman-Filterpapier (Schleicher & Schüll, Dassel) wurden vorher mit Westernblot-Puffer getränkt. Nach dem Blotten wurde die Membran zur Blockierung der unspezifischen Bindestellen für 1h in TBS-T mit 5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde die Membran einmal kurz in TBS-T gewaschen bevor sie mit spezifischen Antikörpern für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C unter leichten Schwenken inkubiert wurde. Die Antikörper wurden hierzu in TBS-T 1:1000 verdünnt. Es folgten drei Waschschrte für je 10 min in TBS-T unter leichtem Schwenken. Zur Bindung des sekundären Antikörpers wurde die Membran für 90 min unter leichtem Schwenken in TBS-T mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert. Anschließend folgte ein Waschschrte für 15 min und drei Waschschrte für 5 min in TBS-T.

Der Nachweis von Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern erfolgte über die Erzeugung von Chemolumineszenz mit Hilfe des „Amersham ECL™ Western Blotting System“ (GE Healthcare, München) nach Angaben des Herstellers. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte mit der „LAS-3000 Mini“ CCD-Kamera (Fujifilm). Die Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe des Programms AIDA 4.15 (Raytest, Straubenhardt).

Für den Nachweis von alkalische Phosphatase-gekoppelten sekundären Antikörpern wurde die Membran nach dem Waschen für ca. 10 min in Entwicklungspuffer inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 66 µl BCIP-Lösung und 66 µl NBT-Lösung gestartet. Gestoppt wurde die Farbreaktion durch Waschen der Membran in 3 %iger TCA-Lösung.

TBS-T:                    8 g    NaCl  
                               20 ml 1M Tris/HCl pH 7,5  
                               0,1 % Tween 20

## II. Material und Methoden

Entwicklungspuffer: 100 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM Tris/HCL (pH 9,5)

BCIP-Lösung: 50 mg/ml BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat) als *p*-Toluidin-Salz in 100% DMF (N,N-Dimethylformamid)

NBT-Lösung: 50 mg/ml NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) in 70% DMF

Primäre Antikörper (alle 1:1000 in TBS-T eingesetzt):

- Anti-MalE *E. coli* (Maltose Bindeprotein), aus Hase (Dr. K-L Schimz)
- Anti-TalB *E. coli* (Transaldolase B), aus Meerschwein (Prof. Dr. G.A. Sprenger)
- Anti-TatA *E. coli*, aus Hase (Peptidantiserum, Dr. P.J. Kreutzenbeck; Eurogentec (Herstal, Belgien))
- Anti-TatB *E. coli*, aus Hase (Peptidantiserum Dr. P.J. Kreutzenbeck; Eurogentec (Herstal, Belgien))
- Anti-TatC *E. coli*, aus Hase (Peptidantiserum, Dr. P.J. Kreutzenbeck; Eurogentec (Herstal, Belgien))

Sekundäre Antikörper:

- Anti-Rabbit IgG Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt (1:10000 verdünnt) (GE Healthcare, München)
- Anti-Guinea Pig IgG Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt (1:20000 verdünnt) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
- Anti-Rabbit IgG alkalische Phosphatase-gekoppelt (1:15000 verdünnt) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

### 5.3 Präparation von *E. coli*-Membranen

Zur Präparation von *E. coli* Membranen wurden 10 ml LB-Medium mit 0,1 mM IPTG und den erforderlichen Antibiotika in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit einer Einzelkolonie des gewünschten *E. coli* Stammes angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 170 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die 10 ml Kultur wurde in einem 50 ml Falcon-Gefäß abzentrifugiert (10 min, 5000 rpm, 4°C). Bei unterschiedlichen OD<sub>600</sub> Werten zwischen einzelnen Kulturen wurden alle auf dieselbe OD<sub>600</sub> eingestellt. Das Zellpellet wurde mit 5 ml eiskaltem 10 mM Tris/HCl pH 7,5 gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 5000 rpm, 4°C) wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem 30 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert und in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss via Ultraschall im Eiswasserbad mittels eines Ultraschallprozessors (UP 200 S, Dr. Hielscher GmbH, Teltow; Amplitude 60 %; Cycle 0,6) über 6 min mit abwechselnd 45 sek Beschallung und 15 sek Pause. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (15 min, 15300 rpm, 4°C)

vom Überstand, welcher die Membranen enthielt, getrennt. Der Überstand wurde einer Ultrazentrifugation (60 min, 50000 rpm, 4°C; Beckman TI-70i Rotor) unterzogen. Die pelletierten Membranen wurden mit 1 ml 1 M Kaliumacetat gewaschen und erneut ultrazentrifugiert. Abschließend wurden die Membranproteine zur Solubilisierung in 200 µl 1 % Triton-X 100; 10 mM Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Der Proteingehalt wurde nach Bradford (1976) bestimmt.

### 5.4 Fraktionierung von *E. coli* Zellen mittels osmotischen Schocks

Die Fraktionierung von *E. coli* Zellen in Periplasma- und Cytoplasma/Cytoplasmamembran-Fraktion erfolgte mittels osmotischen Schocks. Diese Methode beruht auf der Destabilisierung der äußeren *E. coli* Membran durch Zugabe von EDTA und der Zellwand durch Lysozymbehandlung.

Es wurden 50 ml LB-Medium mit 0,1 mM IPTG und den erforderlichen Antibiotika in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit 700 µl einer ÜNK beimpft und bei 37°C und 170 rpm für 4h auf einem Schüttler inkubiert. Bei Stämmen mit unterschiedlichen OD<sub>600</sub>-Werten wurden die einzelnen Kulturen alle auf eine identische OD<sub>600</sub> (OD<sub>600</sub> von ca. 0,06) angeimpft. Für den osmotischen Schock wurden je 55 x 10<sup>9</sup> Zellen genommen (OD<sub>600</sub> von 1 bei *E. coli* entspricht in etwa 10<sup>9</sup> Zellen/ml), in einem 50 ml Falcon-Gefäß abzentrifugiert (10 min, 4800 rpm, 4°C) und in 2,5 ml eiskaltem 30 mM Tris/HCl pH 8,0 vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und nach sorgfältigem Abpipettieren des Überstandes in 40 µl eiskalter Saccharoselösung (20 % Saccharose; 30 mM Tris/HCl pH 8,0) vorsichtig resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 20 µl Lysozymbelösung (1 mg/ml in 0,1 M EDTA pH 8,0) wurde kurz vorsichtig „gevortext“ und die Proben wurden genau 5 min auf Eis inkubiert.

Nach Zentrifugation (15 min, 15300 rpm, 4°C) wurden vom Überstand (Periplasmafraktion) vorsichtig 60 µl abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Das Volumen des restlichen Überstandes wurde bestimmt, und anschließend verworfen. Das Pellet (Sphäroplasten) wurde zur Verhinderung vorzeitiger Lyse mit 80 µl Saccharoselösung abgespült und in 1 ml 30 mM Tris/HCl pH 8,0 gleichmäßig resuspendiert. Nach der Zugabe von 300 mg Glaskugeln (Ø 0,1–0,2 mm, Clauss, Nidderau) wurden die Sphäroplasten in einer Kugelmühle (Retsch) für 10 min bei maximaler Schüttelfrequenz aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelltrümmer und die Glaskugeln durch Zentrifugation (10 min bei

## II. Material und Methoden

15300 rpm, 4°C) vom Überstand (Cytoplasma/Membranfraktion) getrennt. 200 µl des Überstandes wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt.

### III. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte die Interaktion der *E. coli* Tat-Translokase mit dem Tat-Signalpeptid, genauer mit dem Tat-Konsensus-Motiv S-R-R-x-F-L-K, im Vordergrund stehen und mit genetischen Mitteln untersucht werden. Für diese genetischen Untersuchungen sollte das TorA-MalE-Reporterprotein als Tat-abhängiges Modellsubstrat dienen (Blaudeck *et al.*, 2003). Der Aufbau des TorA-MalE-Reporterproteins und seine Anwendungsmöglichkeiten zur Untersuchung von Substrat-Translokase-Interaktionen bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *E. coli* werden zunächst erläutert.

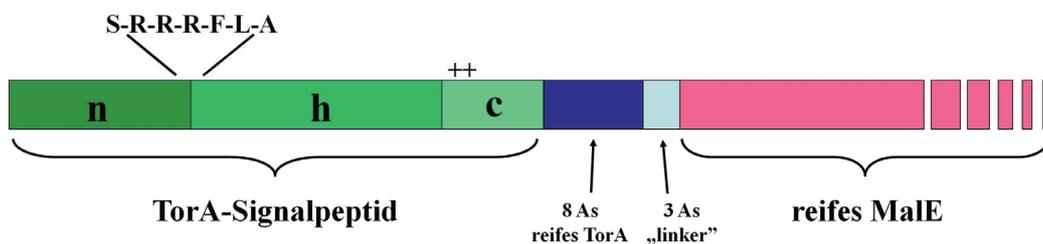
#### **1. Das TorA-MalE-Reportersystem:Aufbau und Anwendungsmöglichkeiten zur Untersuchung von Substrat-Translokase-Interaktionen bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *E. coli***

##### **1.1 Das TorA-MalE-Reporterprotein**

Das TorA-MalE-Reporterprotein ist ein Fusionsprotein aus dem Tat-Signalpeptid der *E. coli* Trimethylaminoxid- (TMAO) Reduktase TorA und dem reifen Teil des Maltose-Bindeproteins MalE aus *E. coli*, welches strikt Tat-abhängig exportiert wird (Blaudeck *et al.*, 2003). Fusioniert sind das TorA-Signalpeptid und das Maltose-Bindeprotein über die ersten acht Aminosäuren des reifen TorA-Proteins und einen drei Aminosäuren umfassenden „linker“ (Blaudeck *et al.*, 2003) (siehe Abbildung 9). Das TorA-Signalpeptid wurde bereits in zahlreichen Studien erfolgreich als Tat-spezifisches Signalpeptid für den Export verschiedener Proteine in *E. coli* eingesetzt (z.B. Sargent *et al.*, 1998; Cristobal *et al.*, 1999; Strauch und Georgiou 2007; Blaudeck *et al.*, 2003; DeLisa *et al.*, 2003). Das TorA-Signalpeptid umfasst 39 Aminosäuren und ist somit etwas länger als ein durchschnittliches Tat-Signalpeptid mit 37 Aminosäuren (Palmer *et al.*, 2005). Zudem weist das TorA-Signalpeptid mit S-R-R-R-F-L-A ein nahezu perfektes Tat-Konsensus-Motiv auf, es weicht lediglich an der letzten Position, mit einem Alanin anstatt eines Leucins, vom idealen Konsensus ab. In der c-Region des TorA-Signalpeptids befindet sich ein sogenanntes „Sec-avoidance“-Motiv, welches aus zwei positiv geladenen Aminosäuren besteht (zwei Arginine), die den Export über den Sec-Weg effektiv verhindern (Blaudeck *et al.*, 2003). Das Maltose-

### III. Ergebnisse

Bindeprotein aus *E. coli* ist normalerweise ein authentisches Sec-Substrat und wurde in der Vergangenheit als eines der Modellsubstrate für die Sec-abhängige Proteintranslokation in *E. coli* verwendet (z.B. Ryan und Bassford, 1985; Fikes und Bassford, 1989; Puziss *et al.*, 1989; Puziss *et al.*, 1992; Derman *et al.*, 1993; Francetic *et al.*, 1993; Snyder und Silhavy, 1995; Bieker *et al.*, 1990). Da das reife MalE ohne sein authentisches Sec-Signalpeptid in der Lage ist schnell in seine aktive Form zu falten (Weiss und Bassford, 1990), ist das MalE-Protein auch ideal geeignet, um auch als Reporter für die Tat-abhängige Proteintranslokation zu dienen. Das Fusionsprotein aus dem TorA-Signalpeptid und dem reifen MalE wurde bereits mehrfach erfolgreich für die genetische Untersuchung des Tat-abhängigen Proteinexports in *E. coli* eingesetzt (Blaudeck *et al.*, 2003 und 2005; Kreutzenbeck *et al.*, 2007).



**Abbildung 9: Schematische Darstellung des TorA-MalE-Reporterproteins.** Das TorA-MalE-Reporterprotein besteht aus dem 39 Aminosäuren umfassenden TorA-Signalpeptid, auf das noch 8 Aminosäuren des reifen TorA-Proteins folgen. Über einen 3 Aminosäuren langen „linker“ ist hieran das reife Maltose-Bindeprotein fusioniert.

Bei der Verwendung von *malE*-negativen *E. coli* Stämmen lässt sich das Plasmid-kodierte TorA-MalE Protein experimentell einfach anwenden. Nur bei intaktem Tat-abhängigen Export des MalE-Proteins ins Periplasma kann *E. coli* Maltose mit Hilfe von MalE aufnehmen und verwerten. In Folge des MalE Exports und der damit verbundenen Maltose Aufnahme wachsen die Zellen auf MacConkey-Agar mit Maltose als Kohlenstoffquelle zu roten Kolonien heran. Die Rotfärbung beruht dabei auf einem Farbumschlag des im MacConkey-Agar enthaltenen pH-Indikators Neutralrot, welcher durch organische Säuren hervorgerufen wird, die bei der Verstoffwechslung der aufgenommenen Maltose gebildet werden. Die Intensität der Rotfärbung ist ein Maß für die Tat-abhängige Exporteffizienz des TorA-MalE-Reporterproteins. Zellen mit defektem Tat-abhängigen Export des TorA-MalE-Reporters können Maltose nicht aufnehmen, die Kolonien bleiben weiß. Alternativ zum MacConkey-Agar können Minimalmedium-Agarplatten mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle verwendet werden. Nur bei intaktem Tat-abhängigen Export des MalE-Proteins können die *E. coli* Zellen auf diesen Platten wachsen. Zusätzlich zu diesen

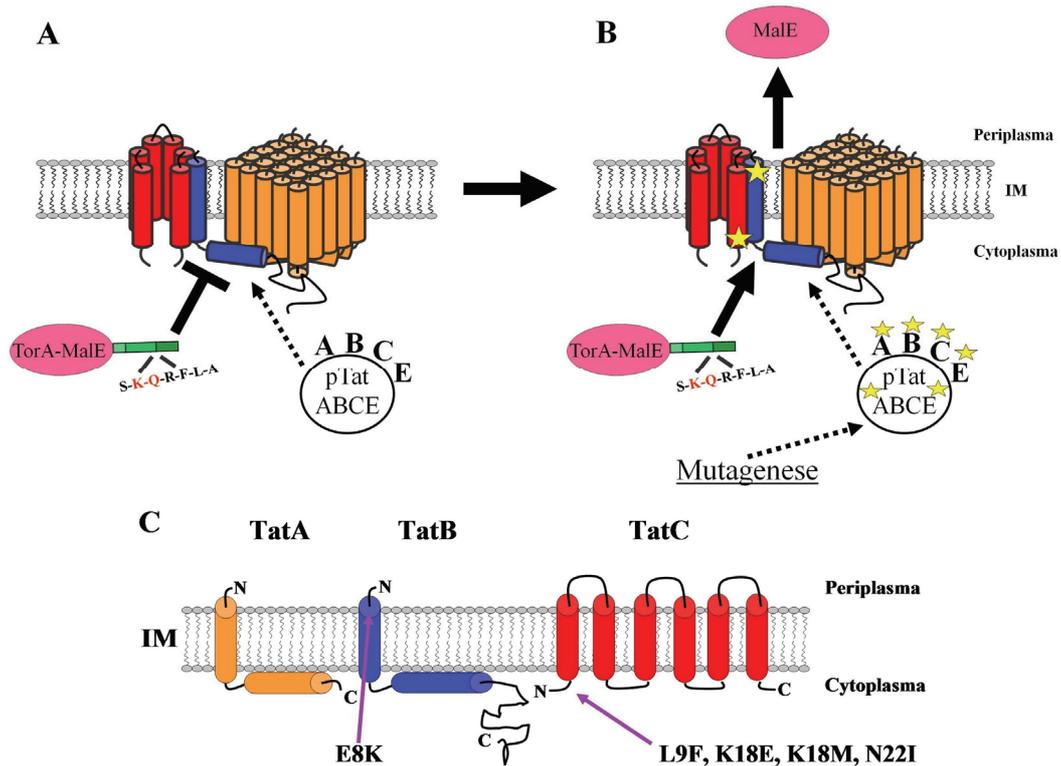
Plattentests, kann MalE auch direkt auf Proteinebene mit Hilfe von MalE-spezifischen Antikörpern im „Western“-Blot nachgewiesen werden.

Im Folgenden sollen die Einsatzmöglichkeiten des TorA-MalE-Reporters zur Untersuchung der Substrat-Translokase- Interaktion beim Tat-abhängigen Proteinexport in *E. coli* anhand der Daten aus Kreutzenbeck *et al.* (2007) dargestellt werden. Sowohl das experimentelle Vorgehen, als auch die Daten aus dieser Studie bilden den Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit und sind daher für das Verständnis der Daten aus der vorliegenden Arbeit wichtig.

## **1.2 Experimenteller Ansatz zur Untersuchung von Substrat-Translokase-Interaktionen bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *E. coli***

Der experimentelle Ansatz von Kreutzenbeck *et al.* (2007) war, die Substrat-Translokase-Interaktion beim Tat-abhängigen Proteinexport in *E. coli* ausgehend von einem TorA-MalE-Reporter zu untersuchen, der aufgrund einer Mutation des Zwillingsarginins im Tat-Konsensus-Motiv exportdefekt ist. Das Zwillingsarginin wurde als erstes „target“ gewählt, da es nahezu invariabel ist und somit das herausragende Charakteristikum von Tat-Signalpeptiden darstellt. Zudem ist das Zwillingsarginin essentiell für eine effektive Bindung des Tat-Signalpeptids an die Tat-Translokase (Alami *et al.*, 2003). Kreutzenbeck *et al.* (2007) konstruierten eine exportdefekte Variante des TorA-MalE-Reporters, indem sie das Zwillingsarginin (RR) gegen Lysin-Glutamin (KQ) austauschten (Abbildung 10 A) (siehe auch Kapitel 2.1.1). Dieser exportdefekte TorA[KQ]-MalE-Reporter war nicht mehr in der Lage, ein Wachstum eines *malE*-negativen *E. coli* Stammes auf Minimalmedium mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermitteln.

### III. Ergebnisse



**Abbildung 10: Schematische Darstellung zur Selektion von Tat-gekoppelten Suppressormutanten des TorA[KQ]-MalE-Reporters.** A) Durch eine Veränderung im Tat-Signalpeptid (hier der Austausch des RR im Tat-Konsensus-Motiv gegen KQ) wird der TorA-MalE-Reporter nicht mehr Tat-abhängig exportiert. B) Nach einer ungerichteten Mutagenese der Plasmid-kodierten *tat*-Gene kann in den Plattentests auf die Klone selektiert werden, bei denen durch eine Mutation (angedeutet durch die gelben Sterne) in den Tat-Proteinen ein Export des ursprünglich exportdefekten TorA-MalE-Reporters jetzt möglich ist. Durch die Identifikation der Suppressormutationen in den Tat-Proteinen können die Bereiche der Tat-Translokase identifiziert werden, die an der Erkennung/Bindung des Tat-Signalpeptides beteiligt sind. C) Schematische Darstellung der Tat-Proteine TatA, TatB und TatC mit der Lage der Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters aus Kreutzenbeck *et al.* (2007).

Durch die Verwendung eines Plasmid-kodierten *tatABCE*-Operons in einem  $\Delta$ *tatABCD,E* Stammhintergrund gelang es dann im nachfolgenden Schritt, nach ungerichteter Mutagenese der Plasmid-kodierten *tat*-Gene, Tat-gekoppelte Mutanten zu isolieren. Hierbei wurden in einer Selektion die Klone isoliert, die wieder auf Maltose-Minimalmedium wachsen konnten. Diese Tat-Mutanten zeigen einen Tat-abhängigen Export des TorA[KQ]-MalE-Reporters (Abbildung 10 B). Anschließend wurden die Mutationsorte in den Tat-Proteinen bestimmt, die für die Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters verantwortlich sind. Nahezu alle Mutationsorte befinden sich im N-terminalen Bereich des TatC-Proteins (siehe Abbildung 10 C). Dies zeigt, dass dieser Bereich des TatC-Proteins an der Bindung von Tat-Signalpeptiden beteiligt ist. Eine weitere Suppressormutation fand sich im extremen N-Terminus des TatB-Proteins (siehe Abbildung 10 C), auf der periplasmatischen Seite der

Cytoplasmamembran. Da es unwahrscheinlich schien, dass dieser Bereich direkt an der Bindung des Tat-Signalpeptids beteiligt ist, wurde hier darauf geschlossen, dass dieser Suppressor die Signalpeptidbindung über einen konformationellen Effekt innerhalb des TatBC-Rezeptorkomplexes beeinflusst.

Interessanterweise akzeptierten alle KQ-Suppressormutanten immer noch den unveränderten TorA-MalE Reporter mit intaktem Zwillingsarginin. Dieses zeigt, dass die Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters nicht dadurch zustande kommt, dass die Translokase nun spezifisch Lysin-Glutamin anstelle des Zwillingsarginins nach einem „Schlüssel-Schloss“-Prinzip erkennt. Die Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters, durch die Suppressormutationen in den Tat-Proteinen muss demnach durch einen stärkeren oder neuen Kontakt von der Tat-Translokase zum TorA-Signalpeptid, an einer anderen Position des Tat-Signalpeptides als der des Zwillingsarginin, entstanden sein. Auf diese Weise wird das Fehlen des Zwillingsarginin im TorA[KQ]-MalE-Reporter kompensiert. Die Suppressortranslokasen zeigen somit eine gelockerte Spezifität bei der Tat-Signalpeptiderkennung, bei der das Zwillingsarginin im Tat-Signalpeptid keine essentielle Determinante mehr für eine effektive Bindung/Erkennung an der Tat-Translokase ist.

## **2. Die Erkennung des Tat-Signalpeptides an der Tat-Translokase**

Da das Zwillingsarginin in Tat-Signalpeptiden nahezu strikt konserviert ist, ist es der auffälligste Bestandteil eines Tat-Signalpeptids. Zudem ist das Zwillingsarginin zweifelsohne eine wichtige Determinante für die effektive Bindung des Signalpeptides an der Tat-Translokase. Da auch die anderen Aminosäuren des Tat-Konsensus-Motiv stark konserviert sind ist es wahrscheinlich, dass auch diese Aminosäuren zur Bindung des Tat-Signalpeptides an der Translokase beitragen.

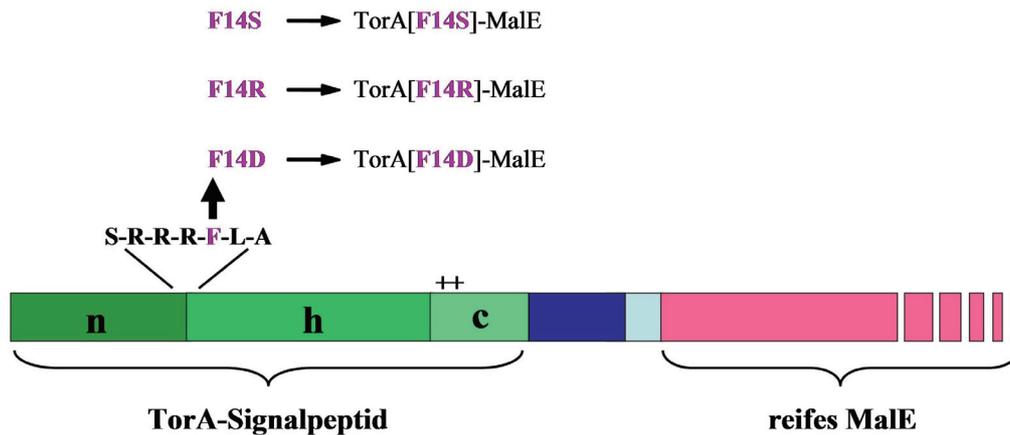
In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst mit genetischen Mitteln untersucht ob es möglich ist, den Tat-abhängigen Proteinexport des TorA-MalE-Reporterproteins durch einen Austausch im Tat-Konsensus-Motivs an einer anderen Konsensus-Position als der der Zwillingsarginine so zu vermindern, dass eine genetische Selektion auf Tat-gekoppelte Suppressormutanten des entsprechenden TorA-MalE-Reporters möglich ist.

## 2.1 Ortsgerichtete Mutagenese des Phenylalanins im Tat-Konsensus-Motiv

Zu Beginn dieser Arbeit gab es nur wenige Arbeiten, die sich mit den Aminosäuren des Konsensus-Motivs, neben dem Zwillingsarginin beschäftigt haben. Die einzige Arbeit die sich umfassend mit Mutationsstudien des kompletten Tat-Konsensus-Motivs beschäftigte war die Arbeit von Stanley *et al.* (2000). In dieser Arbeit wurden alle Konsensus-Positionen einer ortsgerechten Mutagenese unterzogen und es wurde die Auswirkung dieser Austausche auf die Prozessierungskinetik des authentischen *E. coli* Tat-Substates SufI betrachtet. Die einzige Aminosäure neben den Zwillingsargininen, bei der mehrere Austausche eine größere negative Auswirkung auf die Prozessierungskinetik von SufI hatten, war die Position des Phenylalanins, zwei Aminosäuren C-terminal vom zweiten Arginin. Neben den beiden Argininen ist es auch genau diese Aminosäure, welche im Tat-Konsensus-Motiv am stärksten konserviert ist (Stanley *et al.*, 2000). Stanley *et al.* (2000) konnten zeigen, dass es wahrscheinlich der hydrophobe Charakter der Aminosäure an dieser Konsensus-Position ist, welcher wichtig für die Funktion dieser Konsensus-Position in der Tat-abhängigen Proteintranslokation ist.

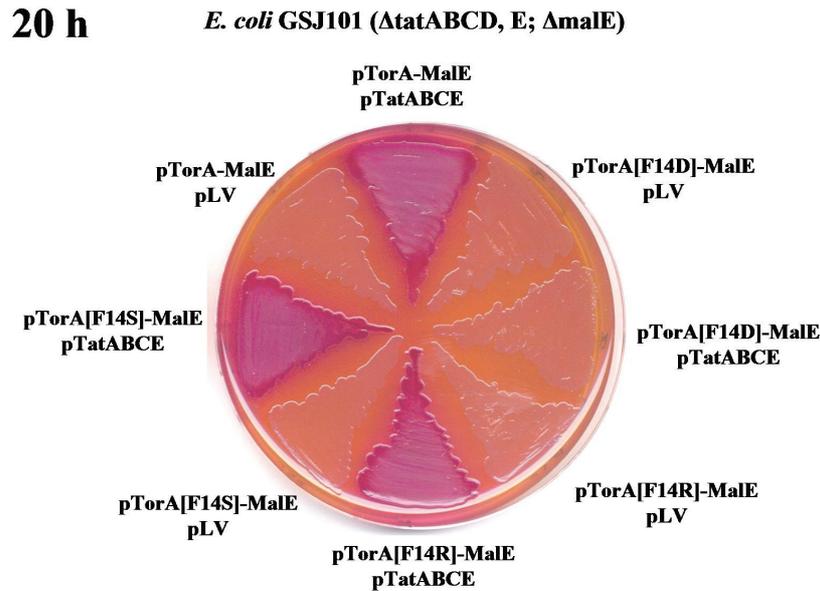
### 2.1.1 Die Position des Phenylalanins im Tat-Konsensus-Motiv kann eine kritische Determinante für den Tat-abhängigen Export des TorA-MalE-Reporters darstellen.

Basierend auf den Ergebnissen von Stanley *et al.* (2000) wurde das hydrophobe Phenylalanin im TorA-MalE-Reporter gegen hydrophile Aminosäuren ausgetauscht. Hierzu wurden gezielt Aminosäuren ausgewählt, die unterschiedliche Ladungseigenschaften aufweisen: das neutrale Serin, das positiv geladene Arginin und das negativ geladene Aspartat. Das Kodon welches für das Phenylalanin im Tat-Konsensus-Motiv des TorA-MalE-Reporters kodiert wurde mittels ortsgerechter Mutagenese gegen Kodons von Serin, Arginin oder Aspartat ausgetauscht. Die vorgenommenen Aminosäureaustausche sind nochmals schematisch in Abbildung 11 dargestellt. Die so neu konstruierten TorA-MalE-Reporter werden im Folgenden mit TorA[F14S]-MalE, TorA[F14R]-MalE und TorA[F14D]-MalE bezeichnet.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung des TorA-MalE-Reporters mit Austausch an der Konsensus-Phenylalanin-Position.** Das Phenylalanin im Tat-Konsensus-Motiv wurde gegen Serin (S), Arginin (R) und gegen Aspartat (D) ausgetauscht. Die für die Mutagenese des pTorA-MalE-Plasmides verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Der Tat-abhängige Export der TorA-MalE-Varianten mit den Aminosäureaustauschen an der Konsensus-Phenylalanin-Position wurde im *E. coli* Stamm GSJ101 (*E. coli* MC4100 Derivat;  $\Delta male \Delta tatABCD,E$ ) untersucht. Als Positivkontrolle diente der Export des unveränderten TorA-MalE Reporterproteins im gleichen Stamm. Zunächst wurde der Export dieser Reporter in einem Plattentest mit MacConkey-Maltose-Platten untersucht (Siehe auch III 1.1). Die *tat*-Gene waren hierbei Plasmid-kodiert (pTatABCE). Außerdem wurde der Export jedes Reporters zusätzlich in einem Stamm untersucht, welcher keine *tat*-Gene exprimiert (pLV). Diese Leervektorkontrolle wird benötigt um sicherzustellen, dass der jeweilige Reporter aufgrund des vorgenommenen Aminosäureaustauschs im Tat-Signalpeptid nicht in den Sec-Weg umgeleitet wird, und dass somit ein beobachteter MalE-Export strikt Tat-abhängig zustande gekommen ist.



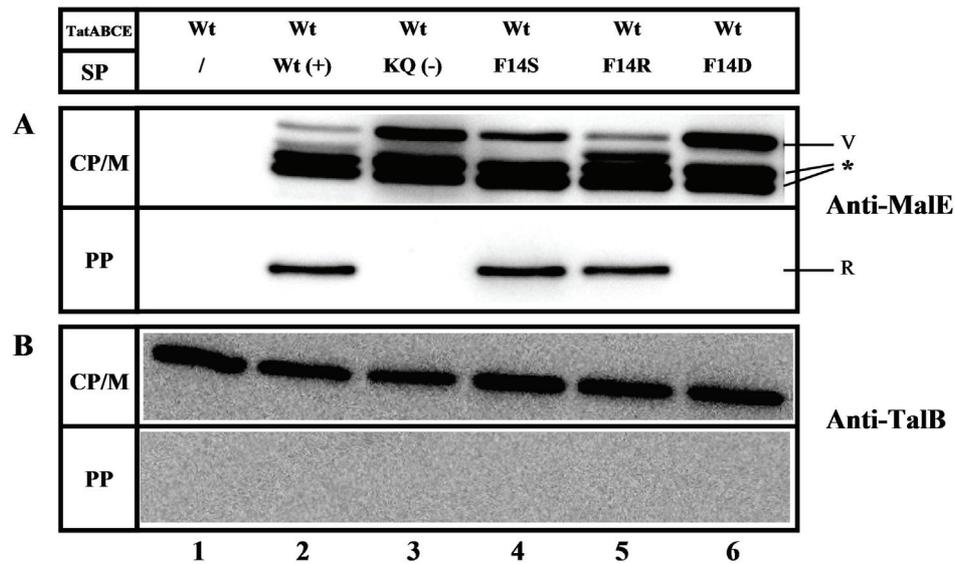
**Abbildung 12: Untersuchung des Tat-abhängigen Exports der TorA-MalE Reportervarianten TorA[F14S]-MalE, TorA[F14R]-MalE und TorA[F14D]-MalE.** Gezeigt ist der Phänotyp von *E. coli* GSJ101 mit den TorA-MalE-Reportervarianten TorA[F14S]-MalE, TorA[F14R]-MalE oder TorA[F14D]-MalE, mit und ohne Tat-Translokase auf MacConkey-Agar mit Maltose (nach 20h). Die Rotfärbung der einzelnen Zellen ist ein Maß für den Export des jeweiligen TorA-MalE-Reporters. Alle Reportervarianten, wie auch die *tat*-Gene, wurden Plasmid-kodiert exprimiert: pTatABCE, pTorA-MalE, pTorA[F14S]-MalE, pTorA[F14R]-MalE und pTorA[F14D]-MalE. Jeder Reporter wurde zudem einmal zusammen mit dem pHS575-Leervektor (pLV) exprimiert. Als Positivkontrolle diente der Stamm mit dem unveränderten TorA-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase.

In Abbildung 12 ist zu erkennen, dass sowohl bei dem Stamm mit dem TorA[F14S]-MalE-Reporter und der Tat-Translokase als auch bei dem Stamm mit dem TorA[F14R]-MalE-Reporter und der Tat-Translokase eine deutliche Rotfärbung zu sehen ist, die einen Export des MalE-Proteins widerspiegelt. Diese ist nicht von der Rotfärbung zu unterscheiden, welche die Positivkontrolle (pTorA-MalE/pTatABCE) zeigt, was darauf hindeutet, dass der Austausch des Konsensus-Phenylalanins gegen Serin oder Arginin keine großen Auswirkungen auf den Export des TorA-MalE-Reporters hat. In beiden Fällen handelt es sich um Tat-spezifischen Export, da beide Reportervarianten in den Stämmen mit dem Leervektor, und somit ohne Tat-Translokase, nicht exportiert werden und die Zellen hier weiß bleiben. Erstaunlicherweise zeigte sich bei dem Stamm mit der Tat-Translokase und dem TorA[F14D]-MalE-Reporter ein anderes Bild. Es war keine Rotfärbung der Zellen und somit auch kein Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters zu detektieren (siehe Abbildung 12).

Anhand dieses Plattentests kann allerdings nur gezeigt werden, dass die Austausche an der Konsensus-Phenylalanin-Position gegen Serin oder Arginin toleriert werden. Bei dem

Austausch gegen Aspartat besteht immer noch die Möglichkeit, dass dieser Reporter nicht exprimiert wird. Deshalb wurde der Export der drei Reportervarianten im nächsten Schritt auf Proteinebene untersucht. Als Negativkontrolle diente hier der exportdefekte TorA[KQ]-MalE-Reporter, bei dem das Zwillingsarginin gegen ein Lysin-Glutamin-Paar ausgetauscht ist und von dem bereits gezeigt wurde, dass dieser nicht Tat-abhängig exportiert wird und im Cytoplasma akkumuliert (Kreutzenbeck *et al.*, 2007). Die Zellen der entsprechenden Stämme wurden mittels osmotischen Schocks in eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion (CP/M) und in eine Periplasma-Fraktion (PP) getrennt. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und via „Western-Blot“ auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die *malE*-Genprodukte wurden mit MalE-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Qualität der Zellfraktionierung wurde durch den Nachweis der strikt cytoplasmatisch lokalisierten Transaldolase B (TalB) überprüft. Bei einer sauberen Trennung von PP-Fraktion und CP/M-Fraktion darf TalB nur in der CP/M-Fraktion nachweisbar sein. Diese Lysis-Kontrolle soll hier einmal exemplarisch gezeigt werden und wird im Folgenden nur noch dann gezeigt, wenn sie für das entsprechende Experiment von Bedeutung ist.

### III. Ergebnisse



**Abbildung 13: Zellfraktionierung von *E. coli* GSJ101 zur Untersuchung des Exports der TorA-MalE-Reporter mit den Aminosäureaustauschen an der Phenylalanin-Konsensus-Position auf Proteinebene.** Dargestellt sind Proben von *E. coli* GSJ101 mit Plasmid-kodierter Tat-Translokase (pTatABCE) und verschiedenen Plasmid-kodierten TorA-MalE-Reportern bzw. dem Leervektor. Spur: 1. pBBR1MCS2 (Leervektorkontrolle); 2. pTorA-MalE (Positivkontrolle); 3. pTorA[KQ]-MalE (Negativkontrolle); 4. pTorA[F14S]-MalE; 5. pTorA[F14R]-MalE; 6. pTorA[F14D]-MalE. Die Zellen wurden in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma- und Membranfraktion (CP/M) getrennt. Für die CP/M Fraktion wurden 3µg Protein aufgetragen. Die Menge der Periplasmafraktion wurde so berechnet, dass eine identische Zellzahl wie in der CP/M Fraktion zu Grunde lag. Zu sehen ist **(A)** der Nachweis der *malE*-Genprodukte durch MalE-spezifische Antikörper. Im Periplasma ist die reife Form des MalE zu sehen (R). In der Cytoplasma/Membranfraktion repräsentiert die oberste Bande den unprozessierten TorA-MalE-Vorläufer (V). Bei den beiden darunter liegenden Banden handelt es sich um cytoplasmatische Abbauprodukte (\*). **(B)** Nachweis des strikt cytoplasmatisch lokalisierten TalB-Proteins durch TalB-spezifische Antikörper. Im oberen Feld sind der Übersichtlichkeit halber die pTatABCE und die pTorA-MalE Varianten abgekürzt aufgelistet, für die Signalpeptide sind nur die Konsensus-Veränderungen im TorA-Signalpeptid aufgeführt (SP=Signalpeptid; Wt= Wildtyp-Tat-Translokase bzw. unveränderter TorA-MalE-Reporter).

Wie in Abbildung 13 A zu sehen ist, kann auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass der Austausch des Phenylalanin im Tat-Konsensus-Motiv gegen Serin (Spur 4) oder Arginin (Spur 5) keinen großen Einfluss auf die Exporteffizienz des entsprechenden TorA-MalE-Reporters hat. Anhand der Bandenstärke des reifen MalE in der PP-Fraktion beider Stämme, ist deutlich zu erkennen, dass diese sich nur geringfügig von der des unveränderten TorA-MalE-Reporters (Abbildung 13A, Spur 2) unterscheidet. Dass es sich bei dem MalE in der PP-Fraktion um exportiertes MalE handelt, ist deutlich an der Lysis-Kontrolle zu erkennen (Abbildung 13B), wo in den gleichen Spuren das TalB-Signal ausschließlich in der CP/M-Fraktion zu sehen ist, nicht aber in der PP-Fraktion. Dass es sich bei den detektierten MalE-Polypeptiden um die Plasmid-kodierten TorA-MalE-Reporter handelt, ist an der

Leervektorkontrolle zu erkennen (Abbildung 13A, Spur 1), wo weder in der PP-Fraktion noch in der CP/M-Fraktion ein MalE-Signal zu sehen ist.

Im Falle des Reporters mit dem Austausch des Konsensus-Phenylalanins gegen Aspartat (Abbildung 13A, Spur 6) ist deutlich zu erkennen, dass dieser zwar exprimiert wird (CP/M), jedoch nicht ins Periplasma exportiert wird. Hier ist wie im Falle der Negativkontrolle (Abbildung 13A, Spur 2) kein reifes MalE im Periplasma zu detektieren. Dieses Ergebnis steht im vollen Einklang mit dem Ergebnis aus dem MacConkey-Agar Plattentest (Abbildung 12), wo bereits *in situ* kein Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters zu detektieren war. Dass durch den Austausch gegen Aspartat der Tat-abhängige Export komplett zum Erliegen kommt zeigt, dass nicht jeder Austausch an dieser Konsensus-Position toleriert wird. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Aminosäure an der Phenylalanin-Position im Konsensusmotiv eine kritische Determinante für den Tat-abhängigen Export eines Tat-Substrates darstellen kann. Aufgrund des kompletten Exportdefektes ist der TorA[F14D]-MalE-Reporter ein idealer Ausgangspunkt, um auf Suppressormutationen in der Tat-Translokase zu selektieren, die den Export des TorA[F14D]-MalE-Reporter wieder ermöglichen.

## **2.2 Untersuchung der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch die KQ-Suppressortranslokasen**

Vor einer neuen Selektion auf Suppressortranslokasen, welche den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters supprimieren können, wurde zunächst getestet, ob die bekannten Suppressortranslokasen des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters auch in der Lage sind, den Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters zu vermitteln. Wie bereits in Kapitel III 1.2 beschrieben, supprimieren diese sogenannten KQ-Suppressortranslokasen den Exportdefekt des TorA[KQ]-MalE-Reporters nicht über eine spezifische Erkennung des Lysin-Glutamin-Paares anstelle des Zwillingsarginin, da sie den unveränderten TorA-MalE-Reporter mit intaktem Zwillingsarginin ebenfalls noch als Substrat akzeptieren (siehe auch III 1.2).

Im Folgenden wurde daher überprüft, ob die KQ-Suppressortranslokasen auf die gleiche Weise auch den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters supprimieren können. Hierzu wurde der Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters in Stämmen mit ausgewählten KQ-Suppressortranslokasen aus Kreutzenbeck *et al.* (2007) in MacConkey-Agar mit Maltose und Maltose-Minimalmedium Plattentests untersucht und mit dem Export des TorA[KQ]-MalE-

### III. Ergebnisse

Reporters und des unveränderten TorA-MalE-Reporters verglichen. Ausgewählt wurden die Suppressortranslokasen mit den KQ-Suppressormutationen L9F (TatC), K18E (TatC), N22I (TatC), E8K (TatB). Die entsprechenden Suppressortranslokasen werden in der vorliegenden Arbeit im Folgenden als SPS-L9F(C), SPS-K18E(C), SPS-N22I(C) und SPS-E8K(B) bezeichnet (SPS für Signalpeptidsuppressor). Die Ergebnisse zur Rotfärbung der entsprechenden Stämme auf MacConkey-Agar mit Maltose und zum Wachstum dieser Stämme auf Minimalmedium-Agarplatten mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4: Phänotyp von *E. coli* GSJ101 mit dem TorA-MalE-, dem TorA[KQ]-MalE- und dem TorA[F14D]-MalE-Reporter und ausgewählten KQ-Suppressortranslokasen auf MacConkey-Agar mit Maltose und Minimalmediums- Agarplatten mit Maltose**

<i>E. coli</i> GSJ101						
	pTorA-MalE		pTorA[KQ]-MalE		pTorA[F14D]-MalE	
	MC-M	MM-M	MC-M	MM-M	MC-M	MM-M
pTatABCE	rot	+++	weiß	-	weiß	-
pTatABCE-SPS-L9F(C)	rot	+++	rot	++	weiß	(+)
pTatABCE-SPS-K18E(C)	rot	+++	pink	+	weiß	(+)
pTatABCE-SPS-N22I(C)	rot	+++	pink	+	weiß	(+)
pTatABCE-SPS-E8K(B)	rot	+++	rot	+	rot	++

Beschrieben sind die beobachteten Phänotypen von *E. coli* GSJ101 mit den angegebenen Plasmiden nach ca. 48h. MC-M= MacConkey-Agarplatten mit Maltose; MM-M= Minimalmedium-Agarplatten mit Maltose. Phänotypen auf MM-M: +++ normales Wachstum; ++ reduziertes Wachstum; + langsames Wachstum; (+) sehr langsames Wachstum (erst sichtbar nach ca. 48h und mehr).

Wie anhand der aufgelisteten Phänotypen der entsprechenden Stämme in Tabelle 4 zu sehen ist, sind prinzipiell alle getesteten KQ-Suppressortranslokasen in der Lage, einen Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters zu vermitteln. Die Effektivität mit der sie den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters supprimieren ist allerdings sehr unterschiedlich, wenn man diese mit der Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters vergleicht. Die getesteten KQ-Suppressortranslokasen, die auf einer Mutation im TatC N-Terminus beruhen [SPS-L9F(C), SPS-K18E(C) und SPS-N22I(C)] sind alle nur sehr schwache Suppressoren des exportdefekten TorA[F14D]-MalE-Reporters. Hier ist der TorA[F14D]-MalE Export so gering, dass dieser nicht ausreicht um beim entsprechenden Stamm einen sichtbaren Farbumschlag von weiß zu pink auf MacConkey-Agar mit Maltose zu bewirken, lediglich beim Test des Wachstums auf Maltose-Minimalmedium war zu erkennen, dass die KQ-Suppressortranslokasen SPS-L9F(C) , SPS-K18E(C) und SPS-N22I(C) in der Lage sind, einen sehr geringen Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters und somit ein sehr langsames

Wachstum des entsprechenden Stammes auf Maltose-Minimalmedium innerhalb von 48h zu bewirken.

Anders verhielt es sich beim Stamm mit der Suppressortranslokase SPS-E8K(B). Hier wird die Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters durch die Mutation E8K im N-Terminus des TatB-Protein hervorgerufen. SPS-E8K(B) ist in Kreuzenbeck *et al.* (2007) als die zweitstärkste Suppressortranslokase des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters beschrieben. Erstaunlicherweise supprimiert SPS-E8K(B) den Exportdefekt von TorA[F14D]-MalE aber stärker als den Exportdefekt des TorA[KQ]-MalE-Reporter (siehe Tabelle 4). Die Suppressionsstärke ist mit der Suppression von TorA[KQ]-MalE durch SPS-L9F(C), der stärksten KQ-Suppressortranslokase vergleichbar (siehe Tabelle 4). Dies ist insofern erstaunlich, da SPS-E8K(B) nicht mit dem TorA[F14D]-MalE-Reporter als „target“, sondern mit dem TorA[KQ]-MalE-Reporter selektiert wurde.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Experimente zur Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch die KQ-Suppressortranslokalen zeigen, dass der Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch Mutationen in der Tat-Translokase prinzipiell supprimiert werden kann. Die Experimente zeigen weiterhin, dass die mit dem TorA[KQ]-MalE-Reporter selektierten Suppressormutationen den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters in den meisten Fällen nicht sehr effektiv supprimieren. Alle Suppressortranslokalen, die auf einer Mutation im TatC N-Terminus beruhen [SPS-L9F(C), SPS-K18E(C) und SPS-N22I(C)] sind nur sehr schwache Suppressortranslokalen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters, einzig die Suppressortranslokase SPS-E8K(B), welcher auf einer Mutation im TatB N-Terminus beruht, ist eine starke Suppressortranslokase des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters. Im Folgenden sollten nun neue Suppressormutationen selektiert werden, die speziell den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters effektiv supprimieren können.

### **2.3 Selektion und Isolierung von Tat-gekoppelten Suppressormutanten des exportdefekten TorA[F14D]-MalE-Reporters**

Aufgrund des vollständigen Exportblocks ist der TorA[F14D]-MalE-Reporter ein idealer Ausgangspunkt um neue unbekannte Suppressormutationen zu selektieren, die speziell den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters effektiv supprimieren können. Weiterhin besteht nunmehr auch die Möglichkeit, ausgehend von einer bekannten Suppressormutation

### III. Ergebnisse

aus Kreutzenbeck *et al.* (2007), die den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters bereits schwach supprimiert, auf zusätzliche Suppressormutationen zu selektieren, die mit der bereits vorhandenen Suppressormutation bei der Suppression synergistisch zusammenarbeiten. Auf diese Weise können dann im Erfolgsfall Bereiche in der Tat-Translokase bestimmt werden, die bei der Bindung von Tat-Signalpeptiden kooperieren. Im Falle des TorA[F14D]-MalE-Reporters eignet sich hier als Ausgangsmutation besonders eine der Suppressormutationen aus dem TatC N-Terminus, da diese nur sehr schwache Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters sind (siehe auch Kapitel III 2.2).

Im Folgenden wurden zur Selektion von Plasmid-gekoppelten Suppressormutanten zwei verschiedene Ansätze verfolgt: Zum Einem wurde die pTatABCE-Mutantenbibliothek aus Kreutzenbeck *et al.* (2007) verwendet, bei der das *tatABCE*-Operon auf pTatABCE mittels „error-prone“-PCR ungerichtet mutagenisiert wurde. Zum Anderen wurde eine neue Mutantenbibliothek konstruiert, bei der bereits vor der ungerichteten Mutagenese eine ausgewählte KQ-Suppressormutation vorhanden war. Für diese Mutantenbibliothek wurde als Ausgangspunkt die Suppressormutation L9F aus TatC [SPS-L9F(C)] gewählt.

Zur Konstruktion dieser pTatABCE-SPS-L9F(C)-Mutantenbibliothek wurde das *tatABC<sup>L9F</sup>E*-Operon auf pTatABCE-SPS-L9F(C) mittels ungerichtet mutagenisierender „error-prone“ PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt, mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *Sall* gespalten und in den, mit denselben Restriktionsendonukleasen vorbereiteten, pTatABCE Vektor ligiert. Anschließend wurde *E. coli* GSJ101 mit den Ligationsansätzen mittels Elektroporation transformiert, auf LB-Agar-Platten mit den erforderlichen Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Alle auf den LB-Agar-Platten gewaschenen Klone wurde isoliert, für drei Stunden in flüssigem LB-Medium bei 37°C regeneriert, um anschließend die pTatABCE-SPS-L9F(C)-Plasmide mit dem ungerichtet mutagenisierten *tatABC<sup>L9F</sup>E*-Operon aus dieser Kultur zu isolieren.

Zur Selektion von Suppressormutanten des TorA[F14D]-MalE-Reporters wurde *E. coli* GSJ101, welcher bereits das Plasmid pTorA[F14D]-MalE enthielt, verwendet. Der Stamm wurde mit der pTatABCE- und pTatABCE-SPS-L9F(C)-Mutantenbibliothek mittels Elektroporation transformiert. Die Ansätze wurden auf Minimalmedium-Agarplatten mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle ausplattiert und für bis zu 72h bei 37°C inkubiert. Alle Kolonien, die bis zu diesem Zeitpunkt auf den Platten gewachsen waren, stellten potentielle Tat-gekoppelte Suppressormutanten dar, die aufgrund einer Mutation in den Tat-Proteinen einen Export des ursprünglich exportdefekten TorA[F14D]-MalE-Reporters nun vermitteln

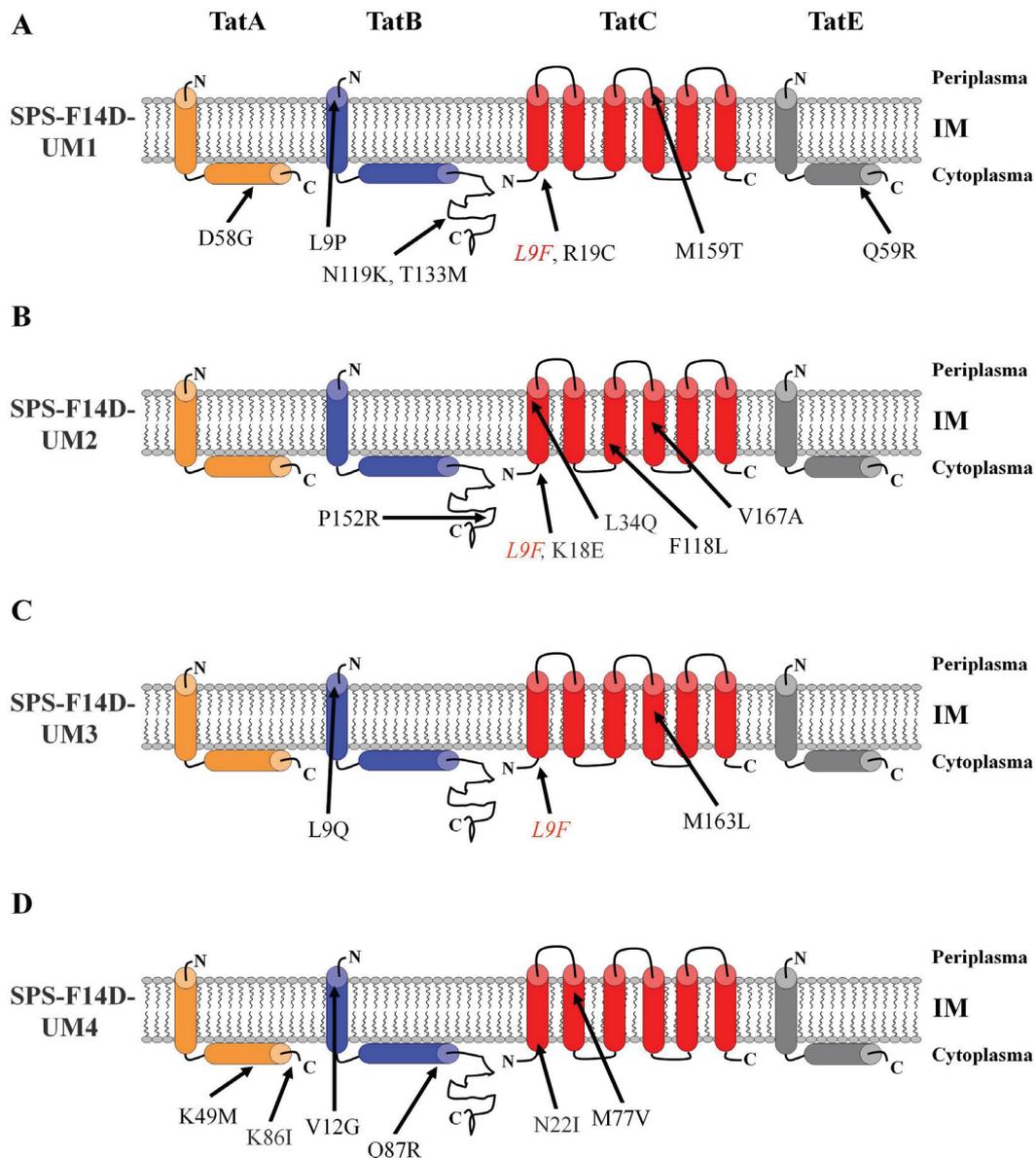
können. Wie bereits erwähnt, vermittelt die SPS-L9F(C)-Suppressorstranslokase ein sehr geringes Wachstum von *E. coli* GSJ101 durch den Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters auf Maltose-Minimalmedium. Aus diesem Grund wurden im Fall der Selektionsansätze, bei denen die pTatABCE-SPS-L9F(C)-Mutantenbibliothek verwendet wurde, jene Klone isoliert, die ein deutlich besseres Wachstum auf Maltose-Minimalmedium zeigten als die Klone aus einem Kontrollansatz. Als Kontrollansatz diente hierbei *E. coli* GSJ101, welcher das pTorA[F14]-MalE-Plasmid bereits beinhaltet, und welcher mit dem unmutagenisierten pTatABCE-SPS-L9F(C)-Plasmid transformiert wurde. Da es aber generell auch möglich ist, dass der Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters auf eine spontan auftretende Mutation im „Sec-avoidance“-Motiv in der c-Region des TorA-Signalpeptids zurückzuführen ist, die es dem TorA-MalE-Reporter ermöglicht auch den Sec-Weg zum Export zu nutzen (Blaudeck *et al.*, 2003), musste zunächst sichergestellt werden, dass das Wachstum (bzw. das verbesserte Wachstum) der selektierten Klone tatsächlich an die pTatABCE-Plasmide (bzw. die pTatABCE-SPS-L9F(C)-Plasmide) gekoppelt war. Hierzu wurden diese Plasmide aus vier auf den Selektionsplatten gewachsenen, ausgewählten Klonen isoliert und mittels Transformation wieder in den *E. coli* Stamm GSJ101 gebracht, welcher bereits das Plasmid pTorA[F14D]-MalE beinhaltet. Auf diese Weise wurden vier Plasmid-gekoppelte Suppressorvarianten isoliert, die reproduzierbar einen deutlichen Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters in den Plattentests zeigten. Drei dieser Klone stammten aus der pTatABCE-SPS-L9F(C)-Mutantenbibliothek, einer stammte aus der pTatABCE-Mutantenbibliothek. Diese Plasmid-kodierten Suppressoren des exportdefekten TorA[F14D]-MalE-Reporters wurden der Reihe nach mit SPS-F14D-UM1, SPS-F14D-UM2, SPS-F14D-UM3 (alle aus der pTatABCE-SPS-L9F(C)-Mutantenbibliothek) und SPS-F14D-UM4 (aus der pTatABCE-Mutantenbibliothek) benannt.

#### **2.4 Identifizierung der Mutationsorte in den F14D-Suppressormutanten SPS-F14D-UM1 , SPS-F14D-UM2, SPS-F14D-UM3 und SPS-F14D-UM4**

Zur Identifizierung der Aminosäureaustausche in den F14D-Suppressorstranslokalen SPS-F14D-UM1, SPS-F14D-UM2, SPS-F14D-UM3 und SPS-F14D-UM4 wurden die *tat*-Gene auf den Plasmiden pTatABCE-SPS-F14D-UM1, pTatABCE-SPS-F14D-UM2, pTatABCE-SPS-F14D-UM3 und pTatABCE-SPS-F14D-UM4 sequenziert. In Abbildung 14 sind die einzelnen Aminosäureaustausche der vier verschiedenen Suppressorstranslokalen, eingeordnet

### III. Ergebnisse

in das Topologie-Modell der Tat-Proteine, dargestellt. Bei SPS-F14D-UM1, SPS-F14D-UM2, SPS-F14D-UM3 ist zu sehen, dass neben der bewusst platzierten Mutation L9F im TatC N-Terminus sieben, fünf und zwei Aminosäureaustausche in den Tat-Proteinen durch die ungerichtete Mutagenese entstanden sind (Abbildung 14 A-C). Bei SPS-F14D-UM4 ist zu sehen (Abbildung 14 D), dass insgesamt sechs Aminosäureaustausche in den Tat-Proteinen identifiziert wurden.



**Abbildung 14: Topologische Darstellung der Tat-Proteine mit eingezeichneten Aminosäureaustauschen in den Suppressortranslokasen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters. A) Die SPS-F14D-UM1, B) SPS-F14D-UM2, C) SPS-F14D-UM3, D) SPS-F14D-UM4.**

Da nicht davon auszugehen ist, dass alle Aminosäureaustausche in den Tat-Proteinen von SPS-F14D-UM1, SPS-F14D-UM2, SPS-F14D-UM3 und SPS-F14D-UM4 an der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters beteiligt sind, musste im Folgenden bestimmt werden, welche der Austausche tatsächlich für die Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch die Ursprungssuppressortranslokasen verantwortlich sind. Beziehungsweise es musste im Fall von SPS-F14D-UM1, SPS-F14D-UM2 und SPS-F14D-UM3 bestimmt werden, welche Austausche außer/neben der Mutation L9F (TatC) für die Suppression verantwortlich sind.

Im Falle der KQ-Suppressortranslokasen aus Kreutzenbeck *et al.*, 2007 befanden sich die meisten Suppressormutationen im extremen N-Terminus des TatC-Proteins (siehe auch III 1.2), nur eine KQ-Suppressormutation befand sich nicht in diesem Bereich. Dies war die Mutation E8K [SPS-E8K(B)] im N-Terminus des TatB-Proteins. Für die Mutation E8K konnte in Kapitel III 2.2 gezeigt werden, dass sie eine erstaunlich starke Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters bewirkt, obwohl sie nicht mit diesem Reporter selektiert wurde.

Wie in Abbildung 14 A, C und D zu sehen ist, wurde in den isolierten Ursprungssuppressortranslokasen SPS-F14D-UM1, SPS-F14D-UM3 und SPS-F14D-UM4 jeweils eine Mutation im TatB N-Terminus, in der Nähe des besagten Glutamats an Position acht, gefunden. Bei SPS-F14D-UM1 und SPS-F14D-UM3 wurde mit dem Leucin an Position neun sogar exakt die gleiche Position verändert. Bei SPS-F14D-UM1 ist dieses gegen Prolin und bei SPS-F14D-UM3 gegen Glutamin ausgetauscht. Im Fall von SPS-F14D-UM4 ist drei Aminosäuren C-Terminus von diesem Leucin das Valin an Position zwölf zu Glycin getauscht. Aufgrund der sehr auffälligen Lage dieser Mutationen in der unmittelbaren Nachbarschaft der KQ-Suppressormutation E8K, wurde getestet, ob es sich bei diesen einzelnen Austauschen tatsächlich auch um Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters handelt. Hierfür wurden die für die Aminosäureaustausche L9P (TatB), L9Q (TatB) und V12G (TatB) kodierenden Basenaustausche gerichtet in pTatABCE eingefügt. In Experimenten zum Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters in *E. coli* GSJ101 durch die Plasmid-kodierten Tat-Translokasen mit den Mutationen L9P, L9Q oder V12G im TatB N-Terminus wurde in den Plattentests beobachtet, dass diese den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters mit unterschiedlicher Effektivität supprimieren können (die experimentellen Daten hierzu sind in III 2.5.2.1 gezeigt).

Neben den Suppressormutation im TatB N-Terminus weisen die Ursprungssuppressoren SPS-F14D-UM1 und SPS-F14D-UM3, wie bereits erwähnt, die schwache Suppressormutation

### III. Ergebnisse

L9F in TatC auf, die hier bewusst platziert wurde. In SPS-F14D-UM4 fand sich zusätzlich die ebenfalls als KQ-Suppressormutation beschriebene N22I Mutation [SPS-N22I(C)], welche sich ebenfalls im N-Terminus des TatC Proteins befindet (siehe Kapitel III 1.2). Auch für N22I konnte bereits in Kapitel III 2.2 gezeigt werden, dass dieser Austausch den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters schwach supprimiert. Im Folgenden wurden sowohl die Tat-Translokasen mit den TatB-Austauschen L9P, L9Q und V12G, die Tat-Translokasen mit den einzelnen TatC Austauschen L9F und N22I und die Tat-Translokasen mit jeweils beiden Mutationen aus der jeweiligen Ursprungssuppressortranslokase [L9P(B)/L9F(C), L9Q(B)/L9F(C) und V12G(B)/N22I(C)] zur Charakterisierung herangezogen.

Die verbleibende Ursprungssuppressortranslokase SPS-F14D-UM2 war die Einzige, bei der keine Mutation im extremen N-Terminus des TatB-Proteins gefunden wurde. Interessanterweise wurde in SPS-F14D-UM2 aber ebenfalls ein bereits als KQ-Suppressormutation beschriebener Austausch erneut selektiert. Hierbei handelt es sich um die Mutation K18E, die zusätzlich zur bewusst platzierten Mutation L9F, im TatC N-Terminus gefunden wurde. Für beide Mutationen konnte bereits in Kapitel III 2.2 gezeigt werden, dass sie nur sehr schwache Suppressoren des exportdefekten TorA[F14D]-MalE-Reporters sind. Da keine der beiden Mutationen alleine für den deutlichen Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch die Ursprungssuppressortranslokase SPS-F14D-UM2 verantwortlich sein kann, wurden im Folgenden sowohl die Tat-Translokasen mit den einzelnen Mutationen L9F (TatC) bzw. K18E (TatC) aber auch eine Suppressortranslokase, in der beide Mutationen kombiniert vorlagen [L9F(C)/K18E(C)] zur weiteren Charakterisierung herangezogen.

#### **2.5 Charakterisierung ausgewählter Tat-Mutantentranslokasen**

Die in Kapitel III 2.4 für die weitere Charakterisierung ausgewählten Tat-Mutantentranslokasen sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die aufgelisteten Tat-Mutantentranslokasen mit den zwei, in Kombination vorliegenden Suppressormutationen wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese konstruiert.

**Tabelle 5: Zusammenstellung der zur Charakterisierung ausgewählten Tat-Mutantentranslokasen**

Tat-Mutantentranslokase	Plasmid	Aminosäureaustausch(e)	
		TatB	TatC
SPS-L9P(B)	pTatABCE-SPS-L9P(B)	L9P	/
SPS-L9F(C)	pTatABCE-SPS-L9F(C)	/	L9F
SPS-L9P(B)/L9FC)	pTatABCE-SPS-L9P(B)/L9FC)	L9P	L9F
SPS-K18E(C)	pTatABCE-SPS-K18E(C)	/	K18E
SPS-L9F(C)/K18E(C)	pTatABCE-SPS-L9F(C)/K18E(C)	/	L9F; K18E
SPS-L9Q(B)	pTatABCE-SPS-L9Q(B)	L9Q	/
SPS-L9Q(B)/L9F(C)	pTatABCE-SPS-L9Q(B)/L9F(C)	L9Q	L9F
SPS-V12G(B)	pTatABCE-SPS-V12G(B)	V12G	/
SPS-N22I(C)	pTatABCE-SPS-N22I(C)	/	N22I
SPS-V12G(B)/N22I(C)	pTatABCE-SPS-V12G(B)/N22I(C)	V12G	N22I

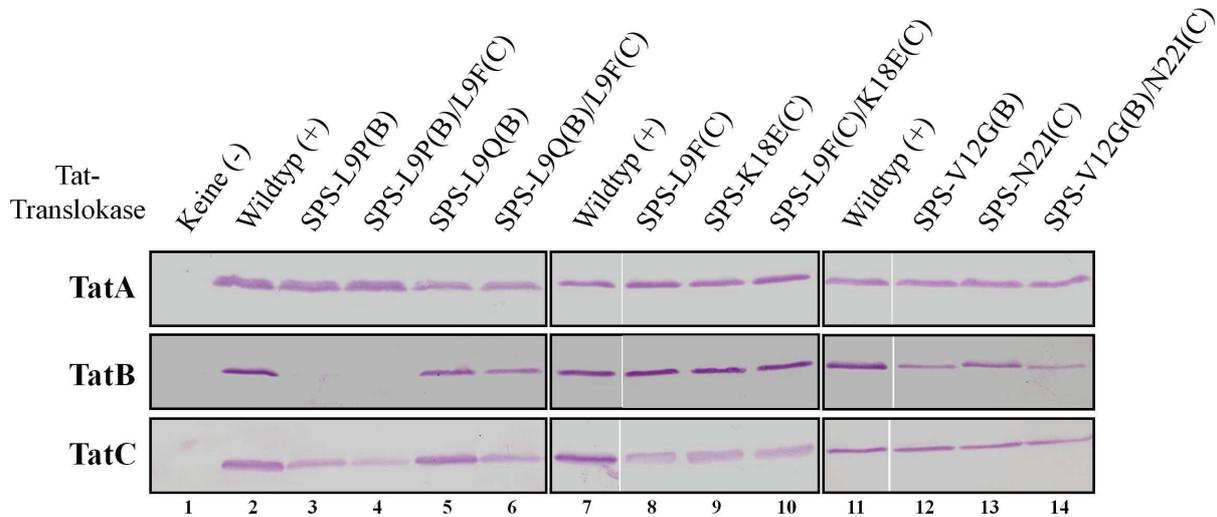
Alle Tat-Mutantentranslokasen wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit den TorA[F14D]-MalE-Reporter, den TorA[KQ]-MalE-Reporter und den unveränderten TorA-MalE-Reporter zu exportieren untersucht. Hierfür wurden sowohl die Phänotypen der entsprechenden Stämme auf MacConkey-Agar mit Maltose und auf Maltose-Minimalmedium betrachtet. Zudem wurde der Export der drei TorA-MalE Reporter in den Stämmen mit den ausgewählten Tat-Mutantentranslokasen auch direkt auf Proteinebene betrachtet. Zunächst aber wurde bei den in Tabelle 5 aufgelisteten Tat-Mutantentranslokasen überprüft, ob die Menge der Plasmid-kodierten Tat-Proteine TatA, TatB und TatC in der Cytoplasmamembran der entsprechenden Stämme durch die eingefügten Mutationen beeinflusst wird.

### 2.5.1 Vergleich der Tat-Proteinmengen in der Cytoplasmamembran der Stämme mit den mutierten Tat-Translokasen

Im ersten Schritt der Charakterisierung der ausgewählten Tat-Mutantentranslokasen wurde überprüft, ob durch die einzeln und paarweise eingefügten Aminosäureaustausche die Menge der Tat-Proteine in der *E. coli* Cytoplasmamembran beeinflusst wird. Hierdurch wurde überprüft, ob eine Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters eventuell auch auf veränderte Tat-Proteinmengen zurückzuführen sein kann, oder ob die Suppression ausschließlich auf einen direkten Effekt der jeweiligen Mutation zurückzuführen ist. Hierzu wurden die Tat-Proteinmengen in der Cytoplasmamembran von *E. coli* GSJ101 mit den verschiedenen mutierten Tat-Translokasen mittels spezifischer Antikörper gegen TatA, TatB und TatC überprüft.. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit der unveränderten Tat-

### III. Ergebnisse

Translokase, die verschiedenen Tat-Translokasen lagen hierbei Plasmid-kodiert vor. Als Negativkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit dem pHSG575-Leervektor, alle Stämme exprimierten zusätzlich den Plasmid-kodierten TorA[F14D]-MalE-Reporter.



**Abbildung 15: Vergleich der Tat-Proteinmengen in *E. coli* GSJ101 mit unveränderter und unterschiedlichen mutierten Tat-Translokasen.** Zum Vergleich der Tat-Proteinmengen wurden Membranpräparationen der einzelnen Stämme, wie in Kapitel II 5.3 beschrieben, durchgeführt. Der Proteingehalt der Membranfraktion wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Es wurden jeweils 10 µg Protein über SDS-Page aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran via „Western“-Blot übertragen. Die Tat-Proteine wurden mit spezifischen Peptid-Antisera gegen TatA, TatB und TatC nachgewiesen. Da es sich um Proben aus drei unterschiedlichen unabhängigen Experimenten handelt (Spur 1-6, Spur 7-10 und Spur 11-14), sind die Positivkontrollen aller drei Experimente in Spur 1, Spur 7 bzw. Spur 11 gezeigt. Alle Stämme exprimierten den TorA[F14D]-MalE-Reporter von pTorA[F14D]-MalE. Zusätzlich enthielten die Stämme entweder den Leervektor [pLV; Negativkontrolle; (-)] oder pTatABCE [Positivkontrolle; (+)] bzw. die Plasmide welche für die Tat-Mutantentranslokasen kodieren. Spur 1: pLV; Spur 2: pTatABCE; Spur 3: pTatABCE-SPS-L9P(B); Spur 4: pTatABCE-SPS-L9P(B)/L9F(C); Spur 5: pTatABCE-SPS-L9Q(B); Spur 6: pTatABCE-SPS-L9Q(B)/L9F(C); Spur 7: pTatABCE; Spur 8: pTatABCE-SPS-L9F(C); Spur 9: pTatABCE-SPS-K18E(C); Spur 10: pTatABCE-SPS-L9F(C)/K18E(C); Spur 11: pTatABCE; Spur 12: pTatABCE-SPS-V12G(B); Spur 13: pTatABCE-SPS-N22I(C); Spur 14: pTatABCE-SPS-V12G(B)/N22I(C).

Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, ist bei keiner der untersuchten Tat-Translokasen im Vergleich zur Positivkontrolle eine erhöhte Menge an TatA in der Cytoplasmamembran zu beobachten. In den Fällen in denen die Mutation L9Q in TatB in der Translokase vorliegt [SPS-L9Q(B) und SPS-L9P(B)/L9F(C)], war eine etwas niedrigere TatA-Menge zu beobachten (Abb. 15, vergleiche Spur 2 mit Spur 5 und 6). Deutliche Unterschiede sind bei den TatB-Mengen in der Cytoplasmamembran der einzelnen Stämme zu beobachten. Die Mutation L9P in TatB der SPS-L9P(B)- und der SPS-L9P(B)/L9F(C)-Translokase hat einen derart drastisch negativen Effekt auf die TatB-Menge in der *E. coli* Cytoplasmamembran,

dass hier kein TatB mehr detektierbar ist (Abb. 15 Spur 3 und 4). Auch in den Fällen, in denen die L9Q- oder die V12G-Mutation im TatB-Protein in der Tat-Translokase vorliegt, war eine reduzierte Menge an TatB in der Cytoplasmamembran, im Vergleich zur Positivkontrolle, zu beobachten (Abb. 15, vergleiche Spur 2 mit 5, 6 bzw. Spur 11 mit 12 und 14). Bei den Suppressortranslokasen, welche die Mutationen L9F und/oder K18E im TatC-Protein beinhalten, war zu beobachten, dass die TatC-Menge in der Cytoplasmamembran reduziert ist, wenn man diese mit der TatC-Menge der Positivkontrolle vergleicht (Abb. 15, vergleiche Spur 2 mit 4 und 6 bzw. Spur 7 mit 8, 9 und 10). In den Fällen, in denen die Mutation N22I in TatC vorlag, war sowohl die TatC- als auch die TatB-Menge geringfügig reduziert (Abb. 15, vergleiche Spur 11 mit 13 und 14). Eine verringerte TatC-Menge war auch in dem Stamm zu beobachten, der nur die L9P-Mutation [SPS-L9P(B)] im TatB-Protein beinhaltet, aber keine Mutation im TatC-Protein selber aufweist (Abb. 15, vergleiche Spur 2 und Spur 3).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass keiner der untersuchten Einzel- oder Doppel-Aminosäureaustausche zu einer erhöhten Menge an Tat-Proteinen in den jeweiligen Stämmen führt. Eine Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch eine gesteigerte Tat-Proteinmenge ist somit auszuschließen.

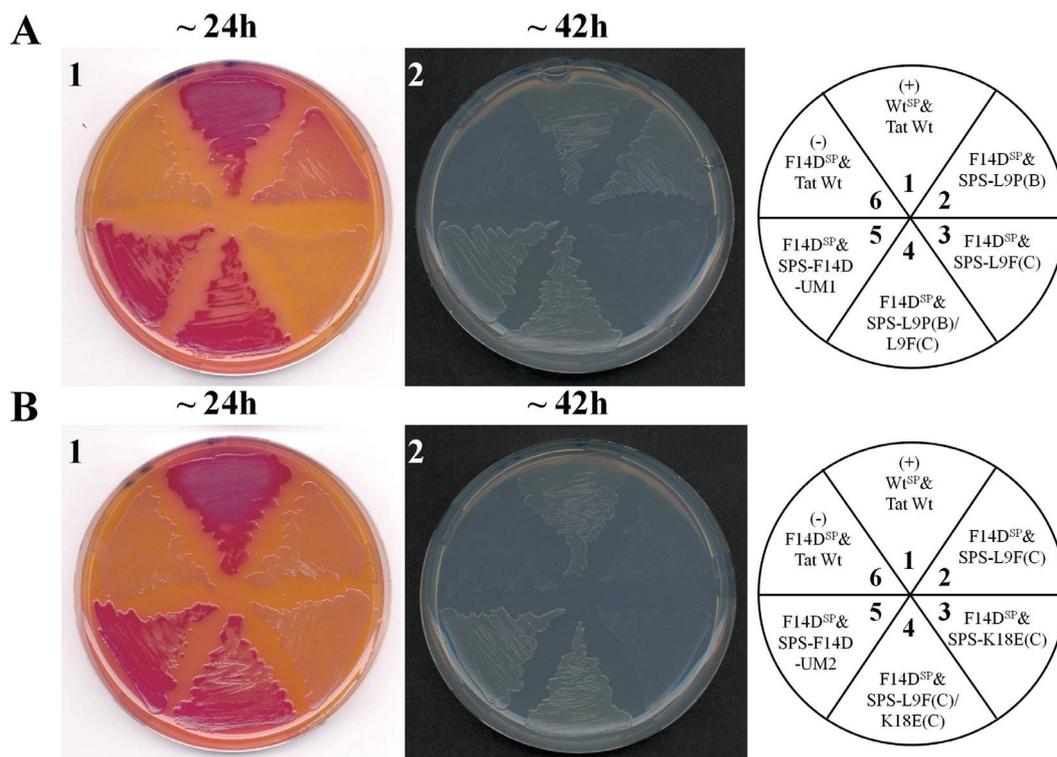
### **2.5.2 Genetische Hinweise auf eine Kooperation des TatB N-Terminus und des TatC N-Terminus bei der Erkennung/Bindung des Signalpeptids des TorA[F14D]-MalE-Reporters**

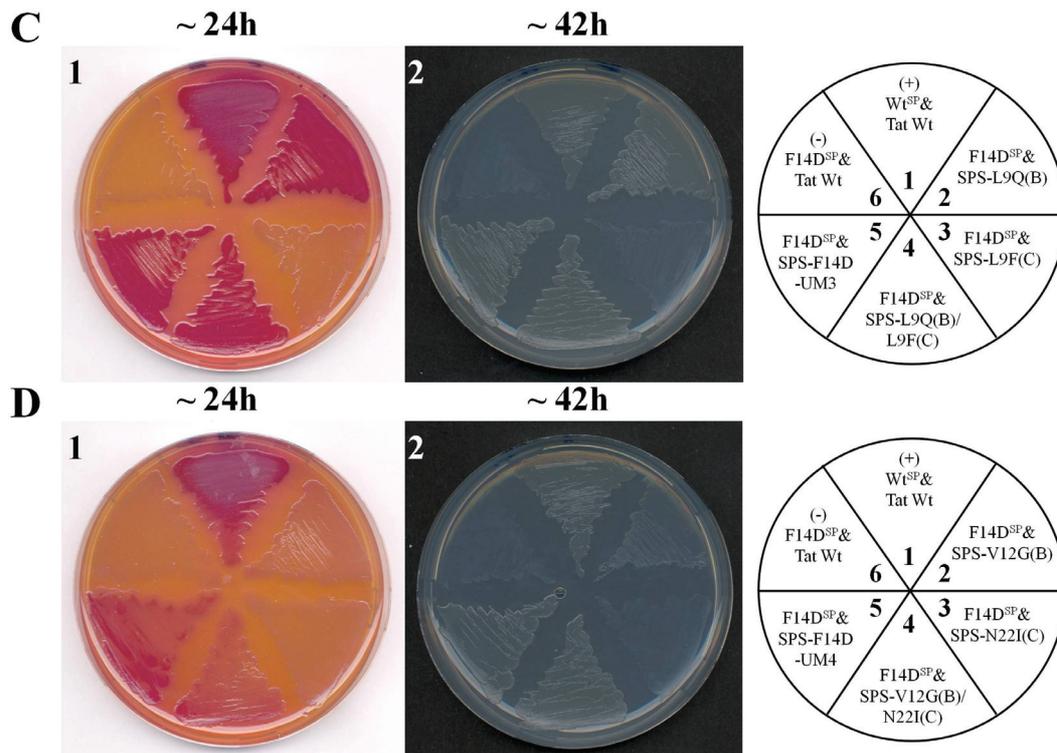
Nach der Überprüfung der Tat-Proteinmengen in der Cytoplasmamembran der Stämme mit den Tat-Mutantentranslokasen, wurde im Folgenden der Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch diese Tat-Mutantentranslokasen mit den einzeln und paarweise eingefügten Suppressormutationen aus den TorA[F14D]-MalE Ursprungssuppressortranslokasen SPS-F14D-UM1, SPS-F14D-UM2, SPS-F14D-UM3 und SPS-F14D-UM4 untersucht. Hierfür wurden die Phänotypen der Stämme mit den ausgewählten Tat-Mutantentranslokasen und dem TorA[F14D]-MalE-Reporters auf MacConkey-Agar mit Maltose und auf Maltose-Minimalmedium betrachtet, zudem wurde der MalE-Export in diesen Stämmen direkt auf Proteinebene untersucht.

### III. Ergebnisse

#### 2.5.2.1 Die Phänotypen der Stämme mit den mutierten Tat-Translokasen zeigen eine Steigerung des TorA[F14D]-MalE Exports durch die Kombination von Suppressormutationen

Zunächst wurde der Tat-abhängige Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch die ausgewählten Tat-Mutantentranslokasen *in situ* anhand der Phänotypen der entsprechenden Stämme auf MacConkey-Agar mit Maltose und auf Maltose-Minimalmedium untersucht. Zudem wurde hierbei vergleichend der Export des TorA[F14D]-MalE-Reporter durch die jeweiligen Ursprungssuppressormutanten betrachtet. Die jeweiligen Tat-Translokasen und die TorA-MalE-Reporter lagen hierbei Plasmid-kodiert in *E. coli* GSJ101 vor. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit dem unveränderten TorA-MalE Reporter und der unveränderten Tat-Translokase. Als Negativkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit dem TorA[F14D]-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase.





**Abbildung 16: Phänotypen von *E. coli* GSJ101 mit dem TorA[F14D]-MalE-Reporter und den verschiedenen mutierten Tat-Translokasen auf MacConkey-Agar mit Maltose und Minimalmedium-Agarplatten mit Maltose.** Gezeigt ist der Phänotyp von *E. coli* GSJ101 mit den verschiedenen mutierten Tat-Translokasen auf MacConkey-Agar mit Maltose (A1, B1, C1, D1) nach ca. 24h, und auf Maltose-Minimalmedium (A2, B2, C2, D2) nach ca. 42h. Der TorA[F14D]-MalE-Reporter wie auch die verschiedenen mutierten Tat-Translokasen lagen Plasmid-kodiert vor. **A1 und 2:** pTatABCE-SPS-L9P(B) (Sektor 2); pTatABCE-SPS-L9F(C) (Sektor 3); pTatABCE-SPS-L9P(B)/L9F(C) (Sektor 4); pTatABCE-SPS-F14D-UM1 (Sektor 5). **B1 und 2:** pTatABCE-SPS-L9F(C) (Sektor 2); pTatABCE-SPS-K18E(C) (Sektor 3); pTatABCE-SPS-L9F(C)/K18E(C) (Sektor 4); pTatABCE-SPS-F14D-UM2 (Sektor 5). **C1 und 2:** pTatABCE-SPS-L9Q(B) (Sektor 2); pTatABCE-SPS-L9F(C) (Sektor 3); pTatABCE-SPS-L9Q(B)/L9F(C) (Sektor 4); pTatABCE-SPS-F14D-UM3 (Sektor 5). **D1 und 2:** pTatABCE-SPS-V12G(B) (Sektor 2); pTatABCE-SPS-N22I(C) (Sektor 3); pTatABCE-SPS-V12G(B)/N22I(C) (Sektor 4); pTatABCE-SPS-F14D-UM4 (Sektor 5). Als Positivkontrolle (+) diente *E. coli* GSJ101 mit dem unveränderten TorA-Male-Reporters und der unveränderten Tat-Translokase [pTorA-Male/pTatABCE] in Sektor 1 jeder einzelnen Platte. Als Negativkontrolle (-) diente *E. coli* GSJ101 mit dem TorA[F14D]-Male-Reporter und er unveränderten Tat-Translokase [pTorA[F14D]-Male/pTatABCE in Sektor 6 jeder einzelnen Platte.

Der Übersichtlichkeit halber sind die Bilderpaare auf der rechten Seite vereinfacht beschriftet. Der jeweilige TorA-Male-Reporter ist im entsprechenden Plattenabschnitt abgekürzt dargestellt (Wt<sup>SP</sup>= TorA-Male unverändert; F14D<sup>SP</sup>= TorA[F14D]-Male).

Wie in Abbildung 16A zu sehen ist, supprimiert die in SPS-F14D-UM1 vorkommende Mutation L9P in TatB bereits alleine den Exportdefekt des TorA[F14D]-Male-Reporters, was deutlich an der Rotfärbung des Stammes mit der SPS-L9P(B)-Suppressortranslokase auf MacConkey-Agar mit Maltose (Abb. 16 A1.-2) und am Wachstum auf Maltose-

### III. Ergebnisse

Minimalmedium (Abb. 16 A2.-2) zu sehen ist. Jedoch ist ebenfalls deutlich zu erkennen, dass weder die Rotfärbung des Stammes auf MacConkey-Agar noch das Wachstum auf Maltose-Minimalmedium den entsprechenden Phänotypen des Stammes mit der SPS-F14D-UM1-Suppressortranslokase entspricht (Abb. 16 A1.-5 bzw. A2.-5). Für die Mutation L9F (TatC), welches die zweite ausgewählte Mutation aus der SPS-F14D-UM1-Ursprungssuppressortranslokase ist, wurde bereits in Kapitel III 2.2 berichtet, dass sie nur zu einer sehr schwachen Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters führt, wobei die Suppressionsstärke bzw. der Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters nicht ausreicht um eine Rotfärbung des Stammes auf MacConkey-Agar zu bewirken (Abb. 16 A1.-3). Kombiniert man aber die Suppressormutation L9P vom TatB N-Terminus mit der sehr schwachen Suppressormutation L9F vom TatC N-Terminus in einer Tat-Translokase, wird die Suppression stark gesteigert und erreicht in etwa die Suppressionsstärke der SPS-F14D-UM1-Ursprungssuppressortranslokase. (Vergleiche Abb. 16 A1.-4 und A2.-4 mit A1.-5 und A2.-5). In dieser TatB/TatC-Doppelmutante [SPS-L9P(B)/L9F(C)] wirken die beiden einzelnen Suppressormutationen offensichtlich in einer synergistischen Weise bei der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters zusammen und bewirken so zusammen einen weitaus stärkeren Export des Reporters als die entsprechenden Einzelmutanten. Besonders interessant hierbei ist, dass eine synergistische Kooperation zwischen zwei Mutationen aus unterschiedlichen Untereinheiten des TatBC-Rezeptorkomplexes zu beobachten ist. Dieser Befund ist ein starker genetischer Hinweis darauf, dass der TatB N-Terminus und der TatC N-Terminus bei der Bindung von Tat-Signalpeptiden zusammenarbeiten. Der gleiche Effekt ist beim Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch die Tat-Translokasen mit den ausgewählten Mutationen aus der SPS-F14D-UM4-Ursprungssuppressortranslokase zu beobachten (Abb. 16 D), auch hier ist anhand der Phänotypen der entsprechenden Stämme in den Plattentests zu sehen, dass erst die Kombination der Mutation aus dem TatB N-Terminus (V12G) mit der Mutation aus dem TatC N-Terminus (N22I) beim Stamm mit der der SPS-V12G(B)/N22I(C)-Suppressortranslokase zu einem Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters führt, der an den Export des Stammes mit der SPS-F14D-UM4-Ursprungssuppressortranslokase heranreicht (Abb. 16, vergleiche D1.-4 mit D1.-5 und D2.-4 mit D2.-5). Beide Einzelmutationen hingegen führen nur zu einer sehr schwachen Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters. Bei dem Stamm mit der SPS-V12G(B)-Suppressortranslokase ist bei 42h nur ein geringes Wachstum auf Maltose-Minimalmedium zu erkennen (Abb. 16 D2.-2). Bei dem Stamm mit der SPS-N22I(C)-Suppressortranslokase ist ein Wachstum zu diesem Zeitpunkt

noch nicht zu erkennen (Abb. 16 D2.-3), wird aber zu einem Späteren Zeitpunkt (ca. 48 h) sichtbar (Daten nicht gezeigt).

Bei der dritten Suppressortranslokase [SPS-L9Q(B)/L9F(C)], bei der eine Mutation in TatB (L9Q) und eine Mutation in TatC (L9F) kombiniert vorliegen, ist ein gesteigerter TorA[F14D]-MalE-Export im Vergleich zu dem Export durch die Suppressortranslokase, die nur die Mutation L9Q in TatB enthält [SPS-L9Q(B)], anhand der Phänotypen der entsprechenden Stämme im MacConkey-Agar Plattentest nicht zu erkennen (vergleiche Abb. 16 C1.-4 mit C1.-5). Hier war zu beobachten, dass alleine die Mutation L9Q im TatB N-Terminus in der SPS-L9Q(B)-Suppressortranslokase bereits zu einer sehr starken Suppression des exportdefekten TorA[F14D]-MalE-Reporters führt, die eine kräftige Rotfärbung des Stammes auf MacConkey-Agar bewirkt (Abb. 16 C1.-2). Auf Maltose-Minimalmedium wächst der Stamm mit der SPS-L9Q(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase durch den Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters allerdings geringfügig schneller als der Stamm mit der SPS-L9Q(B)-Suppressortranslokase. Im Fall der ausgewählten Mutationen aus der SPS-F14D-UM3-Ursprungssuppressortranslokase kann somit aus den Plattentests nicht eindeutig, wie bei den ausgewählten Mutationen aus SPS-F14D-UM1 und SPS-F14D-UM4, geschlossen werden, dass hier die Mutation aus dem TatB N-Terminus (L9Q) und die Mutation aus dem TatC N-Terminus (L9F) bei der Erkennung/Bindung des TorA[F14D]-Signalpeptides zusammen arbeiten.

Im Fall der ausgewählten Mutationen aus der SPS-F14D-UM2-Ursprungssuppressortranslokase (Abbildung 16 B) ist ebenfalls zu beobachten, dass die beiden Mutationen L9F und K18E in Kombination [SPS-L9F(C)/K18E(C)] einen weitaus effizienteren TorA[F14D]-MalE Export vermitteln, als die Suppressortranslokasen mit jeweils nur einer der Suppressormutationen. Sowohl für die Mutation L9F als auch für die Mutation K18E wurde bereits in Kapitel III 2.2 gezeigt, dass sie alleine nur ganz schwache Suppressormutationen des exportdefekten TorA[F14D]-MalE-Reporters sind, die erst nach ca. 48h zu einem sichtbaren Wachstum von *E. coli* GSJ101 auf Maltose-Minimalmedium führen. Dieser minimale TorA[F14D]-MalE Export ist aber nicht ausreichend, um eine Rotfärbung der entsprechenden Stämme auf MacConkey-Agar zu bewirken (Abb. 16 B1.-2 und B1.-3). Bei dem Stamm mit der SPS-L9F(C)/K18E(C)-Suppressortranslokase, in der beide Mutationen aus dem TatC N-Terminus kombiniert vorliegen, ist hingegen deutlich zu erkennen, dass hier eine stark pink bis rote Färbung durch den TorA[F14D]-MalE Export hervorgerufen wird (Abb. 16 B1.-4). Zudem ist bei diesem Stamm auch ein deutliches Wachstum auf Maltose-Minimalmedium zu beobachten (Abb. 16 B2.-4). Im Fall von SPS-

### III. Ergebnisse

F14D-UM2 wird daher die Suppression durch die Kombination von zwei schwachen Suppressormutationen im TatC N-Terminus bewirkt, die synergistisch bei der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters zusammenwirken und so gemeinsam einen effizienteren Export dieses Reporters bewirken.

Anhand der Phänotypen der *E. coli* Stämme mit dem TorA[F14D]-MalE-Reporter und den ausgewählten mutierten Tat-Translokasen konnte gezeigt werden, dass der Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch die SPS-L9P(B)/L9F(C)-, die SPS-L9F(C)/K18E(C)- und die SPS-V12G(B)/N22I(C)-Suppressortranslokasen, mit den paarweise eingefügten Suppressormutationen, effizienter vollzogen wird als durch die Suppressortranslokasen mit den jeweiligen einzelnen Suppressormutationen. Für einen direkten Nachweis dieses effizienteren Exports des TorA[F14D]-MalE-Reporters wurde im Folgenden die MalE-Menge im Periplasma der Stämme mit den ausgewählten mutierten Tat-Translokasen auf Proteinebene betrachtet.

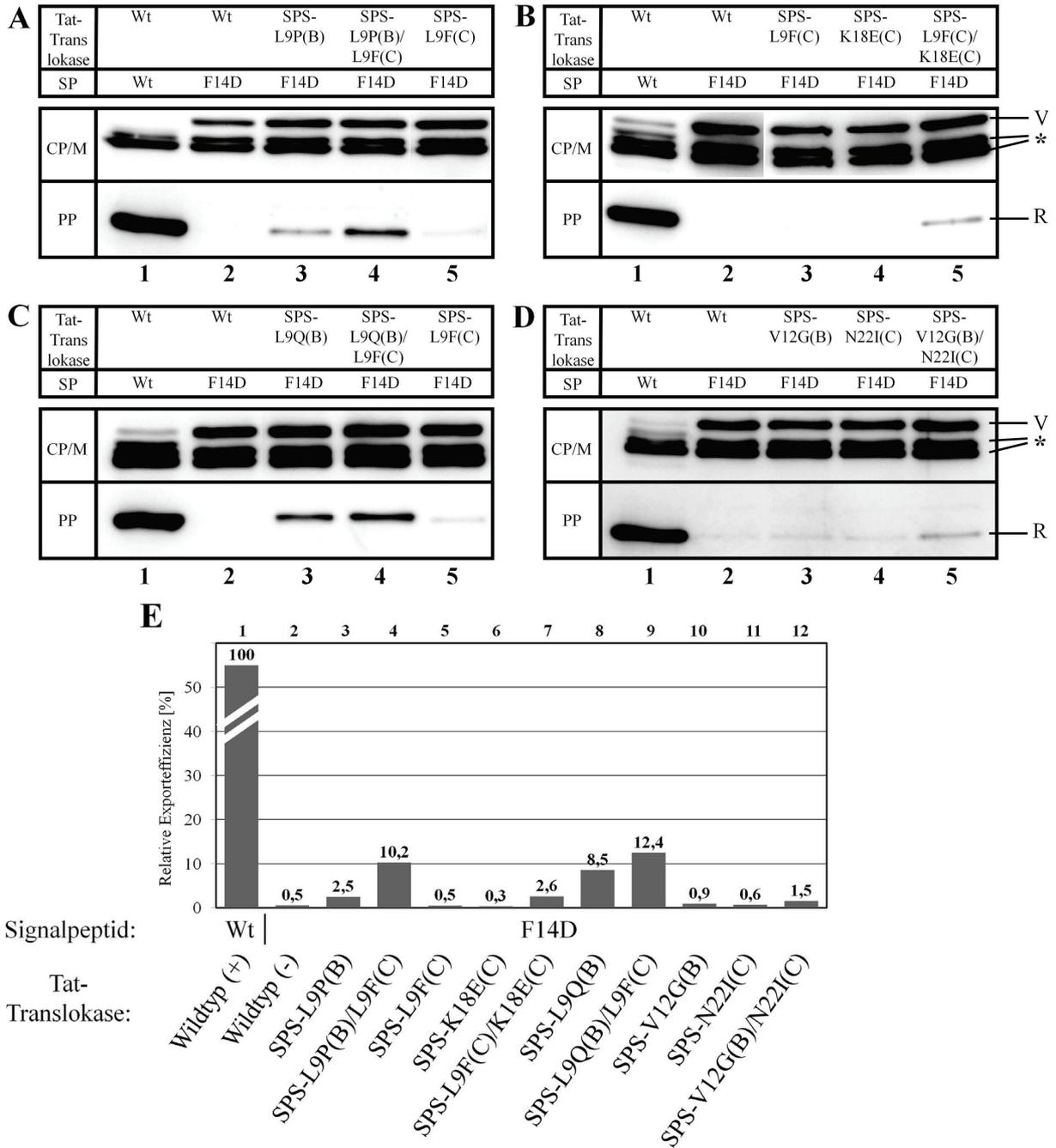
Es ist jedoch noch zu erwähnen, dass in den Plattentests leichte Unterschiede bei der Rotfärbung auf MacConkey-Agar und beim Wachstum auf Maltose-Minimalmedium zwischen den Stämmen mit den Ursprungssuppressortranslokasen und den Stämmen mit den jeweiligen zweifach mutierten Suppressortranslokasen zu beobachten waren. Es ist somit nicht auszuschließen, dass noch weitere Mutationen in den Ursprungssuppressortranslokasen mit den multiplen Aminosäureaustauschen einen positiven oder auch negativen Effekt auf den TorA[F14D]-MalE Export haben könnten. Allerdings zeigen die obigen Experimente, dass in allen vier Ursprungssuppressortranslokasen wohl die Mutationen identifiziert wurden, die hauptsächlich für die Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters verantwortlich sind.

### **2.5.2.2 Der gesteigerte TorA[F14D]-MalE Export in den Stämmen mit den Tat-Suppressortranslokasen mit den paarweise eingefügten Suppressormutationen wird auf Proteinebene bestätigt**

Die Untersuchung des TorA-MalE Exports in *E. coli* mit Hilfe des Maltose-MacConkey-Agar und des Maltose-Minimalmedium Plattentests ist ein einfaches und effizientes Mittel für die Betrachtung des TorA-MalE Exports *in situ*. Diese Methoden spiegeln jedoch den TorA-MalE Export nur indirekt wieder und erlauben deshalb auch nur eine grobe und semiquantitative Einschätzung der Exporteffizienz. Für eine direkte und quantitative Betrachtung der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch die ausgewählten Tat-Mutantentranslokasen, wurden im Folgenden die MalE-Mengen im Periplasma der entsprechenden Stämme mit den ausgewählten Suppressortranslokasen direkt auf Proteinebene überprüft. Da in Punkt III 2.5.2.1 in den Plattentests die Mutationen in den Ursprungssuppressortranslokasen SPS-F14D-UM1, SPS-F14D-UM2 SPS-F14D-UM3 und SPS-F14D-UM4 bestimmt wurden, welche hauptsächlich für die Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters verantwortlich sind, wurden die Ursprungssuppressortranslokasen in der weiteren Charakterisierung nicht mehr mit einbezogen.

Als Positivkontrolle diente der Export des unveränderten TorA-MalE-Reporters durch die unveränderte Tat-Translokase. Als Negativkontrolle diente der Stamm mit der unveränderten Tat-Translokase und dem TorA[F14D]-MalE-Reporter. Sowohl die TorA-MalE-Reporter als auch die verschiedenen Tat-Translokasen lagen Plasmid-kodiert in *E. coli* GSJ101 vor. Die Stämme wurden wie in Kapitel II 5.4 beschrieben mittels osmotischen Schocks in eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion (CP/M) und in eine Periplasma-Fraktion (PP) getrennt. Die Qualität der Zellfraktionierung wurde durch den Nachweis des strikt cytoplasmatisch lokalisierten TalB-Proteins mit TalB-spezifischen Antikörpern im Western-Blot überprüft. Es zeigte sich, dass TalB ausschließlich in der CP/M-Fraktion zu detektieren war (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis der *malE*-Genprodukte erfolgte mit MalE-spezifischen Antikörpern im Western-Blot. Die Visualisierung der MalE-Polypeptide erfolgte über die Erzeugung von Chemolumineszenz mit Hilfe des ECL-Systems. Die Dokumentation der Chemolumineszenz-Signale erfolgte mit Hilfe einer CCD-Kamera.

### III. Ergebnisse



**Abbildung 17: Zellfraktionierung von *E. coli* GSJ101 zur Untersuchung des Exports des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch ausgewählte Tat-Mutantentranslokasen.** Zu sehen sind ausnahmslos Proben vom *E. coli* Stamm GSJ101 mit Plasmid-kodierter Tat-Translokase und Plasmid-kodierten TorA-MalE-Reportern. Die Zellen wurden in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma- und Membranfraktion (CP/M) getrennt. Für die CP/M-Fraktion wurden 3µg Protein aufgetragen. Die Menge der PP-Fraktion wurde so berechnet, dass hier jeweils die fünffache Zellzahl wie in der CP/M-Fraktion zu Grunde lag. Im Periplasma ist die reife Form des MalE zu sehen (R), in der Cytoplasma/Membranfraktion repräsentiert die oberste Bande den unprozessierten TorA-MalE-Vorläufer (V). Bei den darunter liegenden Banden handelt es sich um cytoplasmatische Abbauprodukte (\*). In allen Abbildungen diente der Stamm mit dem unveränderten TorA-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase als Positivkontrolle [pTorA-MalE/pTatABCE] (A, B, C und D jeweils Spur 1). Als Negativkontrolle diente der Stamm mit dem TorA[F14D]-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase [pTorA[F14D]-MalE/pTatABCE] (A, B, C und D, jeweils Spur 2). Alle weiteren Stämme exprimierten den TorA[F14D]-MalE-Reporter ausgehend von pTorA[F14D]-MalE und eine Suppressortranslokase, kodiert durch die entsprechende pTatABCE-Variante. **A:** pTatABCE-SPS-L9P(B) (Spur 3); pTatABCE-SPS-L9P(B)/L9F(C) (Spur 4); pTatABCE-SPS-L9F(C) (Spur 5). **B:** pTatABCE-SPS-L9F(C) (Spur 3); pTatABCE-SPS-K18E(C) (Spur 4); pTatABCE-SPS-L9F(C)/K18E(C) (Spur 5). **C:** pTatABCE-SPS-L9Q(B) (Spur 3); pTatABCE-SPS-L9Q(B)/L9F(C) (Spur 4); pTatABCE-SPS-L9F (Spur C) (5) **D:** pTatABCE-SPS-V12G(B) (Spur 3); pTatABCE-SPS-N22I(C) (Spur 4); pTatABCE-SPS-V12G(B)/N22I(C) (Spur 5). Im oberen Feld sind der Übersichtlichkeit halber die TatABCE und die TorA-MalE Varianten (abgekürzt) aufgelistet (SP=Signalpeptid; Wt= Wildtyp-Tat-Translokase bzw. unveränderter TorA-MalE-Reporter; F14D= TorA[F14D]-MalE-Reporter).

**E:** Graphische Darstellung der relativen Exporteffizienz des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch die ausgewählten Tat-Mutantentranslokasen aus Abbildung 17 A, B, C und D. Die Chemolumineszenzsignale wurden mit der Software AIDA 4.15 quantifiziert. Die Menge des exportierten MalE der Positivkontrolle wurde dabei als 100% definiert. Aufgetragen sind Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Bei der Fraktionierung der *E. coli* Stämme mit den Suppressortranslokasen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters und dem anschließenden Nachweis des exportierten MalE in der PP-Fraktion konnten die Ergebnisse aus den Plattentests zum Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch die ausgewählten Tat-Mutantentranslokasen aus Kapitel III 2.5.2.1 prinzipiell bestätigt werden.

Bei allen Stämmen, bei denen die zwei Suppressormutationen aus den jeweiligen Ursprungssuppressortranslokasen kombiniert in der Tat-Translokase vorliegen, sieht man deutlich reifes MalE in der PP-Fraktion. Hierbei zeigt der Stamm mit der SPS-L9Q(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase (Abbildung 17 C, Spur 4) mit 12,43 % relativer Exporteffizienz (bezogen auf die Exporteffizienz der Positivkontrolle) die stärkste Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters, wie in der graphischen Auftragung in Abbildung 17 E zu sehen ist. Auch der Stamm mit der SPS-L9P(B)/L9F(C)-Translokase (Abbildung 17 A Spur 4) zeigt mit 10,22% eine relativ starke Suppression,

### III. Ergebnisse

während der Stamm mit der SPS-L9F(C)/K18E(C)-Translokase (Abbildung 17 B, Spur 5) mit 2,56% und der Stamm mit der SPS-V12G(B)/N22I(C)-Translokase (Abbildung 17 D, Spur 5) mit 1,5% eine weniger starke Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters zeigen. In allen vier Fällen ist deutlich zu sehen, dass der TorA[F14D]-MalE-Export durch die Tat-Translokasen mit den paarweise eingefügten Suppressormutationen stärker ist als der Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch die Suppressortranslokasen mit den jeweiligen einzeln vorliegenden Suppressormutationen. Lediglich für den Stamm mit der SPS-L9Q(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase war diese Steigerung der Suppression im Vergleich zu dem Stamm mit der SPS-L9Q(B)-Suppressortranslokase anhand der Phänotypen in den Plattentests in Kapitel III.2.5.2.1 nicht so deutlich zu erkennen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die SPS-L9Q(B)-Suppressortranslokase bereits eine starke Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters zeigt, wie auch anhand der relativen Exporteffizienz von 8,15% zu sehen ist. In den Fraktionierungen ist aber reproduzierbar mehr reifes MalE in der Periplasmafraktion des Stammes mit der SPS-L9Q(B)/L9F(C)-Translokase (12,43% relative Exporteffizienz) zu detektieren (vergleiche Abbildung 17 C, Spur 3 und 4; siehe auch Abbildung 17 E). Von allen anderen Stämmen, deren Suppressortranslokase nur eine einzelne Suppressormutation enthält, zeigt lediglich noch der Stamm mit der SPS-L9P(B)-Translokase (Abbildung 17 A, Spur 3) signifikante Mengen an reifem MalE in der PP-Fraktion. Mit 2,45% relativer Exporteffizienz zeigt der Stamm mit der SPS-L9P(B)-Translokase aber einen wesentlich schwächeren Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters als der Stamm mit der SPS-L9Q(B)-Suppressortranslokase (8,51%). Bei allen anderen Stämmen, bei denen die entsprechende Suppressortranslokase nur eine einzelne Suppressormutation beinhaltet [SPS-L9F(C), SPS-K18E(C), SPS-N22I(C) und SPS-V12G(B)], konnte kein Unterschied in der Menge an reifem MalE im Periplasma im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um die Stämme, bei denen schon in Punkt III 2.5.2.1 nur ein sehr schwacher Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters anhand der Phänotypen der Stämme in den Plattentests beobachtet wurde. Die Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch diese Suppressortranslokasen ist so schwach, dass sie auf Proteinebene nicht klar erkenntlich ist.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es gelungen ist, Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters in der Tat-Translokase zu identifizieren. In allen vier ursprünglich isolierten Plasmid-kodierten Suppressortranslokasen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters konnten Paare von Suppressormutationen

identifiziert werden, die gemeinsam eingefügt in eine Tat-Translokase, zu einer stärkeren Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters führen als die jeweiligen einzelnen Suppressormutationen. Bei den Mutationen aus der SPS-F14D-UM1-, der SPS-F14D-UM4- und der SPS-F14D-UM3-Suppressortranslokase konnte gezeigt werden, dass jeweils eine bisher nicht beschriebene Suppressormutation aus dem TatB N-Terminus und eine bekannte KQ-Suppressormutation aus dem TatC N-Terminus bei der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters synergistisch zusammenarbeiten. Anhand der neu isolierten Suppressormutationen L9P, L9Q und V12G im TatB N-Terminus wird die wichtige Rolle von TatB im TatBC-Rezeptorkomplex bei der Bindung von Tat-Signalpeptiden untermauert. Die Steigerung der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch die Kombination von einer Suppressormutation im TatB N-Terminus und einer Suppressormutation im TatC N-Terminus liefert zudem den ersten genetische Hinweis darauf, dass der TatB N-Terminus und der TatC N-Terminus in der Tat-Translokase bei der Bindung von Tat-Signalpeptiden kooperieren. Weiterhin konnte anhand der Suppressormutationen L9F (TatC) und K18E (TatC) aus der SPS-F14D-UM2-Translokase gezeigt werden, dass auch zwei Suppressormutationen aus dem TatC N-Terminus, wenn sie kombiniert in einer Tat-Translokase vorliegen, bei der Suppression des TorA[F14D]-Signalpeptides synergistisch zusammen arbeiten. Auch in diesem Fall war der Export des ursprünglich exportdefekten TorA[F14D]-MalE-Reporters, im Vergleich zum Export durch die mutierten Tat-Translokasen mit nur einem dieser Austausche, gesteigert.

### **2.5.3 Auch der Export des TorA[KQ]-MalE-Reporters wird durch die Kombination von Suppressormutationen aus dem TatB N-Terminus und dem TatC N-Terminus gesteigert**

Wie bereits in Kapitel III 2.2 beschrieben, konnte für die untersuchten Suppressortranslokasen des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters aus Kreutzenbeck *et al.* (2007) gezeigt werden, dass sie ebenfalls, wenn auch teilweise nur sehr schwache Suppressoren des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters sind. Bei der Selektion von Suppressortranslokasen (siehe Kapitel III 2.3 und III 2.4) des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters wurden zudem zwei Suppressormutationen [K18E (TatC) und N22I(TatC)] erneut selektiert, die bereits als TorA[KQ]-MalE-Suppressormutationen in Kreutzenbeck *et al.* (2007) beschrieben sind.

### III. Ergebnisse

Im Folgenden wurde deshalb zunächst überprüft, ob die mit dem TorA[F14D]-MalE-Reporter neu selektierten Suppressormutationen L9P, L9Q und V12G aus dem TatB N-Terminus ebenfalls Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters sind. Darüber hinaus wurde der Export des TorA[KQ]-MalE-Reporters durch die Suppressortranslokasen SPS-L9P(B)/L9F(C), SPS-L9F(C)/K18E(C), SPS-L9Q(B)/L9F(C) und SPS-V12G(B)/N22I(C) mit dem Export durch die Suppressortranslokasen mit den jeweiligen einzeln vorliegenden Suppressormutationen verglichen. Hierfür wurde sowohl der Phänotyp der Stämme mit den ausgewählten Suppressortranslokasen und dem TorA[KQ]-MalE-Reporter auf MacConkey-Agar mit Maltose und auch auf Maltose-Minimalmedium untersucht, zudem wurde der Export des TorA[KQ]-MalE-Reporters in diesen Stämmen auch direkt auf Proteinebene betrachtet.

#### **2.5.3.1 Die Suppressortranslokasen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters vermitteln auch den Export des TorA[KQ]-MalE-Reporters**

Zunächst wurden die Phänotypen der Stämme mit den verschiedenen ausgewählten Suppressortranslokasen und dem TorA[KQ]-MalE-Reporter auf MacConkey-Agar mit Maltose und auf Maltose-Minimalmedium betrachtet. Die verschiedenen Tat-Translokasen und die TorA-MalE-Reporter lagen hierbei Plasmid-kodiert in *E. coli* GSJ101 vor. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit dem unveränderten TorA-MalE Reporter und der unveränderten Tat-Translokase. Als Negativkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit dem TorA[KQ]-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase. Die beobachteten Phänotypen sind in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 6: Phänotypen von *E. coli* GSJ101 mit dem TorA[KQ]-MalE-Reporter und ausgewählten Suppressortranslokasen auf MacConkey-Agar mit Maltose und auf Minimalmedium-Agarplatten mit Maltose**

<i>E. coli</i> GSJ101			
pTatABCE-Variante	pTorA-MalE-Variante	MC-M	MM-M
pTatABCE (Positivkontrolle)	pTorA-MalE	rot	+++
pTatABCE (Negativkontrolle)	pTorA[KQ]-MalE	weiß	-
pTatABCE-SPS-L9P(B)	pTorA[KQ]-MalE	weiß	(+)
pTatABCE-SPS-L9F(C)	pTorA[KQ]-MalE	rot	++
pTatABCE-SPS-L9P(B)/L9F(C)	pTorA[KQ]-MalE	rot	+++
pTatABCE-SPS-K18E(C)	pTorA[KQ]-MalE	pink	+
pTatABCE-SPS-L9F(C)/K18E(C)	pTorA[KQ]-MalE	rot	++
pTatABCE-SPS-L9Q(B)	pTorA[KQ]-MalE	pink	+
pTatABCE-SPS-L9Q(B)/L9F(C)	pTorA[KQ]-MalE	Rot	+++
pTatABCE-SPS-V12G(B)	pTorA[KQ]-MalE	weiß	(+)
pTatABCE-SPS-N22I(C)	pTorA[KQ]-MalE	weiß	+
pTatABCE-SPS-V12G(B)/N22I(C)	pTorA[KQ]-MalE	pink	+(+)

Beschrieben sind die beobachteten Phänotypen von *E. coli* GSJ101 mit den angegebenen Plasmiden nach ca. 24h auf MacConkey-Agarplatten mit Maltose (MC-M) und auf Minimalmedium-Agarplatten mit Maltose (MM-M) über 48h. Phänotypen auf MM-M: +++ normales Wachstum; ++ reduziertes Wachstum; + langsames Wachstum; (+) sehr langsames Wachstum (sichtbar nach 48h und mehr); - kein Wachstum.

Wie Tabelle 6 zu entnehmen ist wurde beobachtet, dass die drei Suppressortranslokasen SPS-L9P(B), SPS-L9Q(B) und SPS-V12G(B), die alle auf einer einzelnen Mutation im TatB N-Terminus beruhen, auch den Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters supprimieren. Die SPS-L9P(B)- und die SPS-V12G(B)-Suppressortranslokase sind relativ schwache Suppressoren des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters. Bei den Stämmen mit diesen mutierten Tat-Translokasen und dem TorA[KQ]-MalE-Reporter ist nach 24h keine Rotfärbung der Zellen durch den Export des TorA[KQ]-MalE-Reporters auf MacConkey-Agar mit Maltose zu beobachten. Jedoch zeigen diese Stämme ein sehr langsames Wachstum auf Maltose-Minimalmedium. Der Stamm mit der SPS-L9Q(B)-Suppressortranslokase hingegen zeigt eine etwas stärkere Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters. Durch den MalE-Export erscheinen die Zellen dieses Stammes bereits nach 24h pink auf MacConkey-Agar mit Maltose und zeigen ein langsames, aber deutlich sichtbares Wachstum auf Maltose-Minimalmedium. Die Effektivität der Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters durch diese drei Suppressormutationen unterscheidet sich somit zumindest im Fall der SPS-L9Q(B)- und der SPS-L9P(B)-Suppressortranslokase von der Effektivität ihrer Suppression des TorA[F14D]-MalE-Reporters. Hier war in Kapitel III 2.5.2.1 bei der SPS-L9Q(B)- und auch bei der SPS-L9P(B)-Suppressortranslokase eine relativ starke Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters zu beobachten.

### III. Ergebnisse

Bei den Suppressortranslokasen SPS-L9P(B)/L9F(C), SPS-L9F(C)/K18E(C), SPS-L9Q(B)/L9F(C) und SPS-V12G(B)/N22I(C), in denen jeweils zwei Suppressormutationen kombiniert vorliegen, zeigt sich auch bei der Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters eine Steigerung der Suppression im Vergleich zur Suppression durch die Suppressortranslokasen mit den jeweiligen einzeln vorliegenden Suppressormutationen. Deutlich war dies anhand der Phänotypen des Stammes mit der SPS-V12G(B)/N22I(C)-Suppressortranslokase zu erkennen. Die Suppressortranslokasen SPS-V12G(B) und SPS-N22I(C), die jeweils nur eine der beiden Suppressormutationen aus SPS-V12G(B)/N22I(C) beinhalten, zeigen beide nur eine schwache Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters. Die Stämme mit diesen Suppressortranslokasen zeigen nach 24h noch keine Rotfärbung auf MacConkey-Agar mit Maltose und nur ein langsames [SPS-N22I(C)] bzw. sehr langsames [SPS-V12G(B)] Wachstum auf Maltose-Minimalmedium. Der Stamm mit der SPS-V12G(B)/N22I(C)-Suppressortranslokase hingegen zeigt nach 24h auf MacConkey-Agar mit Maltose bereits einen pinken Phänotyp und ein deutliches, wenn auch verlangsamtes Wachstum auf Maltose-Minimalmedium über 48h. Im Fall der Stämme mit der SPS-L9P(B)/L9F(C)-, der SPS-L9F(C)/K18E(C)- oder der SPS-L9Q(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase war anhand der Phänotypen eine sehr starke Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters zu erkennen. Die Suppressortranslokasen SPS-L9P(B)/L9F(C), SPS-L9F(C)/K18E(C) und SPS-L9Q(B)/L9F(C) beinhalten alle die Mutation L9F in TatC N-Terminus. Die Mutation L9F in TatC [SPS-L9F(C)] supprimiert den Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters bereits stark, der entsprechende Stamm zeigt nach 24h auf MacConkey-Agar mit Maltose bereits eine rote Färbung. Phänotypisch drückt sich eine Steigerung der Suppression bei den Stämmen mit der SPS-L9P(B)/L9F(C)-, SPS-L9F(C)/K18E(C)- oder SPS-L9Q(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase, im Vergleich zum Stamm mit der SPS-L9F(C)-Suppressortranslokase, in einer kräftigeren und schneller eintretenden Rotfärbung der Zellen auf MacConkey-Agar mit Maltose und in einem schnelleren Wachstum auf Maltose-Minimalmedium aus. Die einzige Ausnahme bildet hierbei der Stamm mit der SPS-L9F(C)/K18E(C)-Suppressortranslokase. Hier war zwar deutlich eine tiefere Rotfärbung auf MacConkey-Agar mit Maltose zu beobachten, bei der Wachstumsgeschwindigkeit auf Maltose-Minimalmedium hingegen konnte keine Steigerung im Vergleich zum Wachstum des Stammes mit der SPS-L9F(C)-Suppressortranslokase und dem TorA[KQ]-MalE-Reporter beobachtet werden.

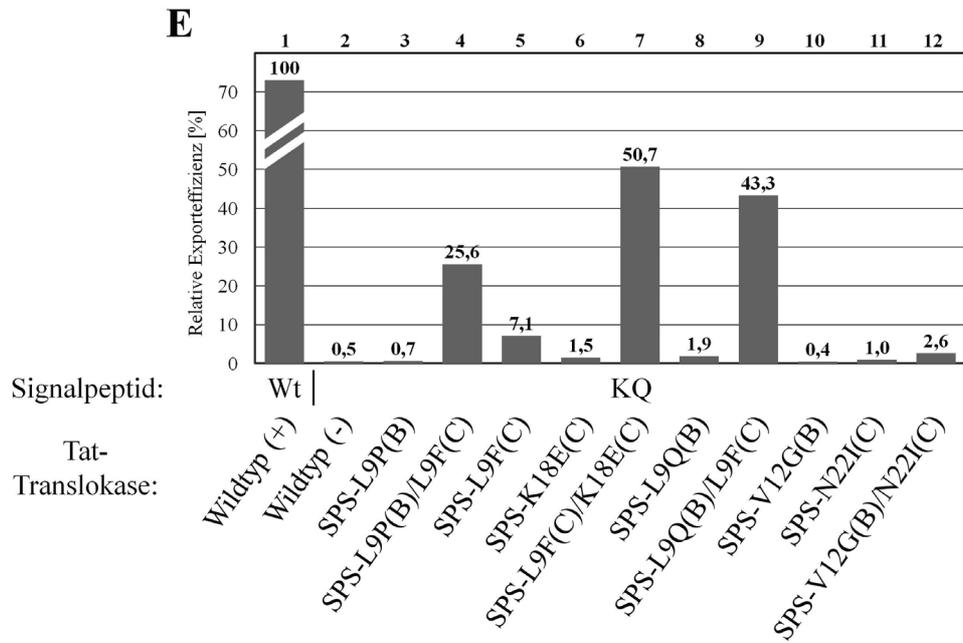
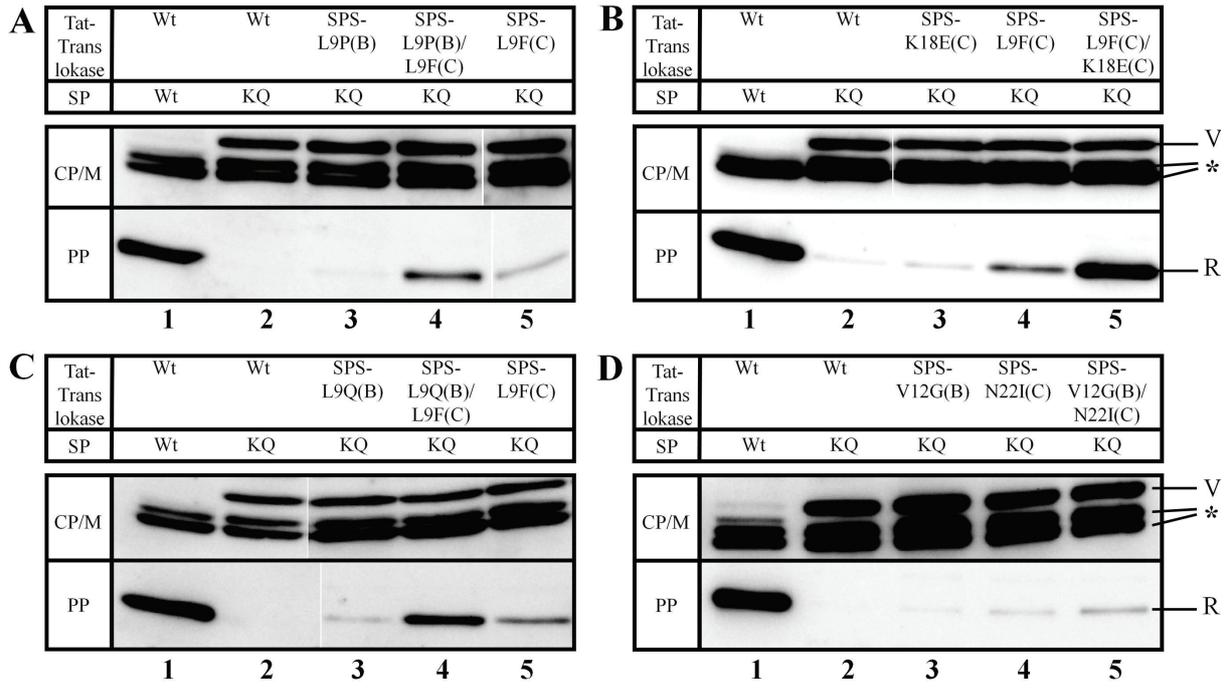
Für eine direkte Betrachtung des Exports des TorA[KQ]-MalE-Reporters durch die SPS-L9P(B)/L9F(C)-, SPS-L9F(C)/K18E(C)-, SPS-L9Q(B)/L9F(C)- und SPS-V12G(B)/N22I(C)-

Suppressortranslokase, im Vergleich zum Export durch die Suppressortranslokasen mit den jeweiligen einzeln vorliegenden Suppressor Mutationen, wurden im Folgenden Zellfraktionierungs-Experimente durchgeführt um die MalE-Menge im Periplasma der einzelnen Stämme direkt auf Proteinebene vergleichen zu können.

### **2.5.3.2 Die Tat-Translokasen mit den paarweise eingefügten Suppressor Mutationen zeigen einen stark gesteigerten Export des TorA[KQ]-MalE-Reporters**

Für eine direkte und quantitativere Betrachtung des TorA[KQ]-MalE Exports durch die Stämme mit den verschiedenen ausgewählten Suppressortranslokasen wurde dieser im Folgenden direkt auf Proteinebene betrachtet. Als Positivkontrolle diente der Export des TorA-MalE-Reporters durch die unveränderte Tat-Translokase. Als Negativkontrolle diente der Stamm mit der unveränderten Tat-Translokase und dem exportdefekten TorA[KQ]-MalE-Reporter. Sowohl die TorA-MalE-Reporter als auch die verschiedenen Tat-Translokasen lagen Plasmid-kodiert in *E. coli* GSJ101 vor. Die Stämme wurden wie in Kapitel II 5.4 beschrieben mittels osmotischen Schocks in eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion (CP/M) und in eine Periplasma-Fraktion (PP) getrennt. Die Qualität der Zellfraktionierung wurde durch den Nachweis des strikt cytoplasmatisch lokalisierten TalB-Proteins mit TalB-spezifischen Antikörpern im Western-Blot überprüft, hierbei wurde TalB auch ausschließlich in der CP/M-Fraktion detektiert (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis der *malE*-Genprodukte erfolgte mit MalE-spezifischen Antikörpern im Western-Blot. Die Visualisierung der MalE-Polypeptide erfolgte über die Erzeugung von Chemolumineszenz mittels des ECL-Systems. Die Dokumentation der Chemolumineszenz-Signale erfolgte mit einer CCD-Kamera.

### III. Ergebnisse



**Abbildung 18: Zellfraktionierung von *E. coli* GSJ101 zur Untersuchung des Exports des TorA[KQ]-MalE-Reporters durch die verschiedenen Suppressortranslokasen.** Zu sehen sind ausnahmslos Proben von *E. coli* GSJ101 mit Plasmid-kodierter Tat-Translokase und Plasmid-kodierten TorA-MalE-Reportern. Die Zellen wurden in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion (CP/M) getrennt. Für die CP/M Fraktion wurden 3µg Protein aufgetragen. Die Menge der Periplasmafraktion wurde so berechnet, dass hier jeweils die fünffache Zellzahl wie in der CP/M Fraktion zu Grunde lag. Im Periplasma ist die reife Form des MalE zu sehen (R), in der Cytoplasma/Membranfraktion repräsentiert die oberste Bande den unprozessierten TorA-MalE-Vorläufer (V). Bei den darunter liegenden Banden handelt es sich um cytoplasmatische Abbauprodukte (\*). In allen Abbildungen diente der Stamm mit dem unveränderten TorA-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase als Positivkontrolle [pTorA-MalE/pTatABCE] (A, B, C und D jeweils Spur 1). Als Negativkontrolle diente der Stamm mit dem TorA[KQ]-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase [pTorA[KQ]-MalE/pTatABCE] A, B, C und D jeweils Spur 2). Alle weiteren Stämme exprimierten den TorA[KQ]-MalE-Reporter von pTorA[KQ]-MalE und eine Suppressortranslokase kodiert durch die entsprechende pTatABCE-Variante. **A:** pTatABCE-SPS-L9P(B) (Spur 3); pTatABCE-SPS-L9P(B)/L9F(C) (Spur 4); pTatABCE-SPS-L9F(C) (Spur 5). **B:** pTatABCE-SPS-K18E(C) (Spur 3); pTatABCE-SPS-L9F(C) (Spur 4); pTatABCE-SPS-L9F(C)/K18E(C) (Spur 5). **C:** pTatABCE-SPS-L9Q(B) (Spur 3); pTatABCE-SPS-L9Q(B)/L9F(C) (Spur 4); pTatABCE-SPS-L9F(C) (Spur 5). **D:** pTatABCE-SPS-V12G(B) (Spur 3); pTatABCE-SPS-N22I(C) (Spur 4); pTatABCE-SPS-V12G(B)/N22I(C) (Spur 5). Im oberen Feld sind der Übersichtlichkeit halber die TatABCE und die TorA-MalE Varianten (abgekürzt) aufgelistet (SP=Signalpeptid; Wt= Wildtyp-Tat-Translokase bzw. unveränderter TorA-MalE-Reporter; KQ= TorA[KQ]-MalE-Reporter). **E:** Graphische Darstellung der relativen Exporteffizienz des TorA[KQ]-MalE-Reporters durch die ausgewählten Tat-Mutantentranslokasen aus Abbildung 18 A, B, C und D. Die Chemolumineszenzsignale wurden mit dem Programm AIDA 4.15 quantifiziert. Die Menge des exportierten MalE der Positivkontrolle wurde dabei als 100% definiert. Aufgetragen sind Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Analog zum Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters in den Stämmen mit den ausgewählten Tat-Suppressortranslokasen, kann auch in den Fraktionierungsexperimenten der Stämme mit dem TorA[KQ]-MalE-Reporter und den Suppressortranslokasen SPS-L9P(B)/L9F(C) (Abbildung 18 A), SPS-L9F(C)/K18E(C) (Abbildung 18 B), SPS-L9Q(B)/L9F(C) (Abbildung 18 C) und SPS-V12G(B)/N22I(C) (Abbildung 18 D) beobachtet werden, dass hier die Menge an reifem MalE in der PP-Fraktion größer ist, als bei den jeweiligen Stämmen mit nur einem dieser Austausch in der Suppressortranslokase. Somit können auch hier die Ergebnisse aus den Plattentests zur Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters in den Stämmen mit den ausgewählten Tat-Mutantentranslokasen aus Kapitel 2.5.3.1 bestätigt werden. Bei der Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters ist die Steigerung der Suppression durch die Kombination der Suppressormutationen in einer Tat-Translokase sogar noch wesentlich deutlicher sichtbar als bei den Experimenten zum Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch diese Suppressortranslokasen (siehe Kapitel III

### III. Ergebnisse

2.5.2.1 und III 2.5.2.2). In Abbildung 18 E ist zu sehen, dass die SPS-L9F(C)/K18E(C)-Suppressortranslokase, mit den zwei Austauschungen im TatC N-Terminus mit 50,69% relativer Exporteffizienz die stärkste Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters zeigt. Auch der Stamm mit der SPS-L9Q(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase (43,27%) und der Stamm mit der SPS-L9P(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase (25,56%) exportieren den TorA[KQ]-MalE-Reporter mit einer sehr hohen Effizienz. Die schwächste Suppression bei den Stämmen mit den Suppressortranslokasen, die auf der Kombination von zwei Suppressor Mutationen beruhen, ist bei dem Stamm mit der SPS-V12G(B)/N22I(C)-Suppressortranslokase (2,62%) zu beobachten. Für die drei Suppressortranslokasen SPS-L9P(B), SPS-L9Q(B) und SPS-V12G(B), die im Zusammenhang mit dem TorA[KQ]-MalE-Reporter auf Proteinebene noch nicht charakterisiert waren, konnten durch die Fraktionierungsexperimente der entsprechenden Stämme und dem Nachweis des exportierten MalE in der PP-Fraktion die Ergebnisse aus den Plattentests zur Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters nur bedingt bestätigt werden. Der Einzige dieser Stämme, der in den Plattentest einen etwas stärkeren Export des TorA[KQ]-MalE-Reporters zeigte, war der Stamm mit der SPS-L9Q(B)-Suppressortranslokase. Bei der Fraktionierung dieses Stammes ist hier in Abbildung 18 C (Spur 3) auch eine dünne MalE-Bande in der PP-Fraktion sichtbar. Beim Export des TorA[KQ]-MalE-Reporters in den Stämmen mit der SPS-L9P(B)- (Abbildung 18 A Spur 3) oder der SPS-V12G(B)-Suppressortranslokase (Abbildung 18 D Spur 3) war ein Unterschied zur Negativkontrolle nicht feststellbar. Dies ist darauf zurückzuführen, dass diese Suppressortranslokasen den Exportdefekt des TorA[KQ]-MalE-Reporters nur sehr schwach supprimieren. In den sehr sensitiven Plattentests in Kapitel III 2.5.3.1 kann hier anhand der Phänotypen der entsprechenden Stämme zwar ein geringerer Export des TorA[KQ]-MalE-Reporters gezeigt werden, dieser ist aber so schwach, dass er auf Proteinebene nicht klar erkenntlich ist.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass anhand der Phänotypen der entsprechenden Stämme mit dem TorA[KQ]-MalE-Reporter und der SPS-L9P(B)-, der SPS-L9Q(B)- oder der SPS-V12G(B)-Suppressortranslokase in den Plattentests gezeigt werden konnte, dass die mit dem TorA[F14D]-Mal-Reporter als „target“ selektierten Suppressor Mutationen L9P, V12G und L9Q in TatB den Exportdefekt des TorA[KQ]-MalE-Reporters schwach supprimieren können. Im Fall der SPS-L9Q(B)-Suppressortranslokase konnte dies auch auf Proteinebene belegt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch im Fall des TorA[KQ]-MalE-Reporters, die Kombination von zwei Suppressor Mutationen in einer Tat-Translokase einen

synergistischen Effekt auf die Effektivität der Suppression des Exportdefektes hat. Auch im Fall des TorA[KQ]-MalE-Reporter konnte, wie bei der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters, beobachtet werden, dass bei der SPS-L9P(B)/L9F(C)-, der SPS-L9Q(B)/L9F(C)- und der SPS-V12G(B)/N22I(C)-Suppressortranslokase eine Mutation im TatB N-Terminus und eine Mutation im TatC N-Terminus gemeinsam eine bessere Erkennung/Bindung des Signalpeptides des TorA[KQ]-MalE-Reporter an der Tat-Translokase bewirken. Zudem führt auch im Fall des TorA[KQ]-MalE-Reporters die Kombination von zwei Suppressor Mutationen im TatC N-Terminus, in der L9F(C)/K18E(C)-Suppressortranslokase, zu einer starken Steigerung der Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters im Vergleich zu den Tat-Translokasen mit den einzeln vorliegenden Suppressor Mutationen.

#### **2.5.4 Untersuchung zum Export des unveränderten TorA-MalE-Reporters durch die Suppressortranslokasen**

Analog zur Untersuchung des Exports des TorA[F14D]-MalE-Reporters und des TorA[KQ]-MalE-Reporters durch die verschiedenen Suppressortranslokasen, wurde im Folgenden der Export des unveränderten TorA-MalE-Reporters durch diese mutierten Tat-Translokasen untersucht. Im Fall der KQ-Suppressortranslokasen aus Kreutzenbeck *et al.* (2007) konnte gezeigt werden, dass diese alle den unveränderten TorA-MalE-Reporter noch als Exportsubstrat akzeptierten und der Export mit hoher Effektivität stattfand. Im Folgenden wurden deshalb auch die neu selektierten Mutantentranslokasen hinsichtlich ihrer Fähigkeit den TorA-MalE-Reporter zu exportieren untersucht.

##### **2.5.4.1 Die Suppressortranslokasen vermitteln auch den Export des unveränderten TorA-MalE-Reporters**

Zunächst wurden die Phänotypen der Stämme mit den verschiedenen Suppressortranslokasen und dem TorA-MalE-Reporter auf MacConkey-Agar mit Maltose und auf Maltose-Minimalmedium betrachtet. Die verschiedenen Tat-Translokasen und die TorA-MalE-Reporter lagen hierbei Plasmid-kodiert in *E. coli* GSJ101 vor. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit dem unveränderten TorA-MalE Reporter und der unveränderten Tat-

### III. Ergebnisse

Translokase. Als Negativkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit dem TorA[F14D]-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase. Die beobachteten Phänotypen sind in Tabelle 7 aufgelistet:

**Tabelle 7: Phänotypen von *E. coli* GSJ101 mit dem TorA-MalE-Reporter und den verschiedenen Suppressortranslokasen auf MacConkey-Agar mit Maltose und Minimalmedium- Agarplatten mit Maltose**

<i>E. coli</i> GSJ101			
Tat-Plasmid	Reporter-Plasmid	MC-M	MM-M
pTatABCE (Positivkontrolle)	pTorA-MalE	rot	+++
pTatABCE (Negativkontrolle)	pTorA[F14D]-MalE	weiß	-
pTatABCE-SPS-L9P(B)	pTorA-MalE	pink	+
pTatABCE-SPS-L9F(C)	pTorA-MalE	rot	+++
pTatABCE-SPS-L9P(B)/L9F(C)	pTorA-MalE	pink/rot	++
pTatABCE-SPS-K18E(C)	pTorA-MalE	rot	+++
pTatABCE-SPS-L9F(C)/K18E(C)	pTorA-MalE	rot	+++
pTatABCE-SPS-L9Q(B)	pTorA-MalE	rot	+++
pTatABCE-SPS-L9Q(B)/L9F(C)	pTorA-MalE	rot	+++
pTatABCE-SPS-V12G(B)	pTorA-MalE	rot	+++
pTatABCE-SPS-N22I(C)	pTorA-MalE	rot	+++
pTatABCE-SPS-V12G(B)/N22I(C)	pTorA-MalE	rot	+++

Beschrieben sind die beobachteten Phänotypen von *E. coli* GSJ101 mit den angegebenen Plasmiden nach ca. 24h auf MacConkey-Agarplatten mit Maltose (MC-M) und auf Minimalmedium-Agarplatten mit Maltose (MM-M) über 48h. Phänotypen auf MM-M: +++ normales Wachstum; ++ reduziertes Wachstum; + langsames Wachstum; (+) sehr langsames Wachstum (sichtbar nach 48h und mehr), - kein Wachstum.

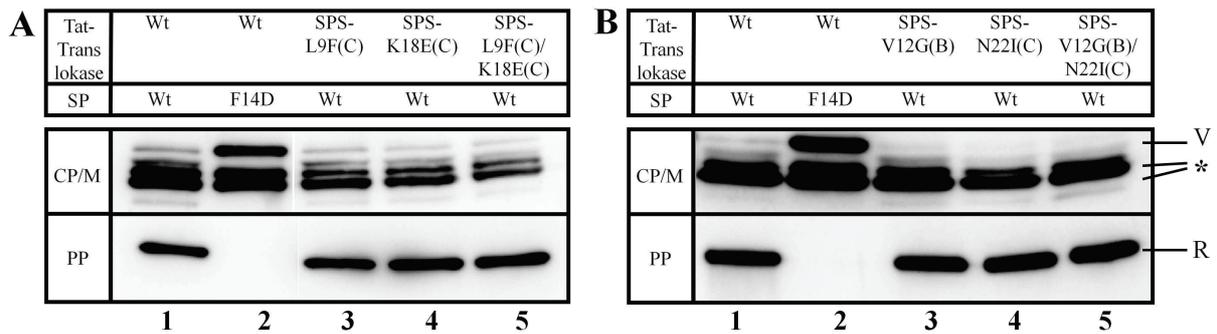
Wie Tabelle 7 zu entnehmen ist wurde beobachtet, dass alle Suppressortranslokasen in den Plattentests einen Export des TorA-MalE-Reporters zeigten. Bis auf zwei Ausnahmen zeigten sowohl die Suppressortranslokasen mit den einzelnen als auch mit den paarweise eingefügten Suppressormutationen eine starke Rotfärbung auf MacConkey-Agar mit Maltose sowie ein schnelles Wachstum auf Maltose-Minimalmedium. Die beiden Ausnahmen bilden die Stämme, die in der Tat-Translokase die Mutation L9P im TatB N-Terminus beinhalten [SPS-L9P(B) und SPS-L9P(B)/L9F(C)]. Diese Stämme zeigen ebenfalls eine pinke- bzw. pink/rote-Färbung auf MacConkey-Agar mit Maltose und ein Wachstum auf Maltose-Minimalmedium, sie unterscheiden sich in ihren Phänotypen aber auf den beiden Medien von der Positivkontrolle. Ein schwacher Export des TorA-MalE-Reporters zeigt sich anhand der Phänotypen des Stammes mit der SPS-L9P(B)-Suppressortranslokase in den Plattentests. Auf MacConkey-Agar mit Maltose erscheint dieser Stamm pink. Auch das Wachstum auf Maltose-Minimalmedium ist bei diesem Stamm deutlich verlangsamt. Besonders auffallend bei dem Stamm mit der SPS-L9P(B)-Suppressortranslokase und dem TorA-MalE-Reporter

war, dass dieser ebenfalls auf MacConkey-Agar mit Maltose ein langsames Wachstum zeigte, wobei er auch unterschiedlich große Kolonien bildete. Auch auf Maltose-Minimalmedium zeigte dieser Stamm ein langsames Wachstum, wobei er auch hier unterschiedlich große Kolonien bildete. Bei dem Stamm mit dem TorA-MalE-Reporter und der SPS-L9P(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase, die neben der Mutation L9P in TatB noch die Mutation L9F in TatC beinhaltet, war solch ein stark verlangsamtes Wachstum auf MacConkey-Agar mit Maltose nicht zu beobachten. Dieser Stamm zeigte jedoch nur eine pink/rote-Färbung auf MacConkey-Agar mit Maltose und auch eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit auf Maltose-Minimalmedium, im Vergleich zur Positivkontrolle. Es ist noch einmal zu erwähnen, dass die Phänotypen der einzelnen Stämme auf MacConkey-Agar mit Maltose und auf Maltose-Minimalmedium nur indirekt einen MalE Export widerspiegeln. Diese Phänotypen können auch z.B. auch durch generelle Wachstumsdefekte beeinflusst werden. Um direkt den Export des TorA-MalE-Reporters durch die Suppressortranslokasen zu untersuchen, wurden im Folgenden Zellfraktionierungs-Experimente durchgeführt um das Ausmaß des Mal-Exports direkt auf Proteinebene betrachten zu können.

#### **2.5.4.2 Die Suppressortranslokasen mit der Mutation L9Q in TatB zeigen einen verringerten Export des TorA-MalE-Reporters**

Zur Untersuchung des TorA-MalE-Exports durch die Suppressortranslokasen auf Proteinebene wurden die entsprechenden Stämme mit den verschiedenen Suppressortranslokasen und dem TorA-MalE-Reporter wie in Kapitel II 5.4 beschrieben in eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion (CP/M) und eine Periplasma-Fraktion (PP) getrennt. Die Qualität der Zellfraktionierung wurde durch den Nachweis des strikt cytoplasmatisch lokalisierten TalB-Proteins mit TalB-spezifischen Antikörpern im Western-Blot überprüft. Es zeigte sich, dass TalB ausschließlich in der CP/M-Fraktion zu detektieren war (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis der *malE*-Genprodukte erfolgte mit MalE-spezifischen Antikörpern im Western-Blot. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit dem unveränderten TorA-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase. Als Negativkontrolle diente der Stamm mit der unveränderten Tat-Translokase und dem TorA[F14D]-MalE-Reporter. Sowohl die TorA-MalE-Reporter als auch die verschiedenen Tat-Translokasen lagen Plasmid-kodiert in *E. coli* GSJ101 vor.

### III. Ergebnisse

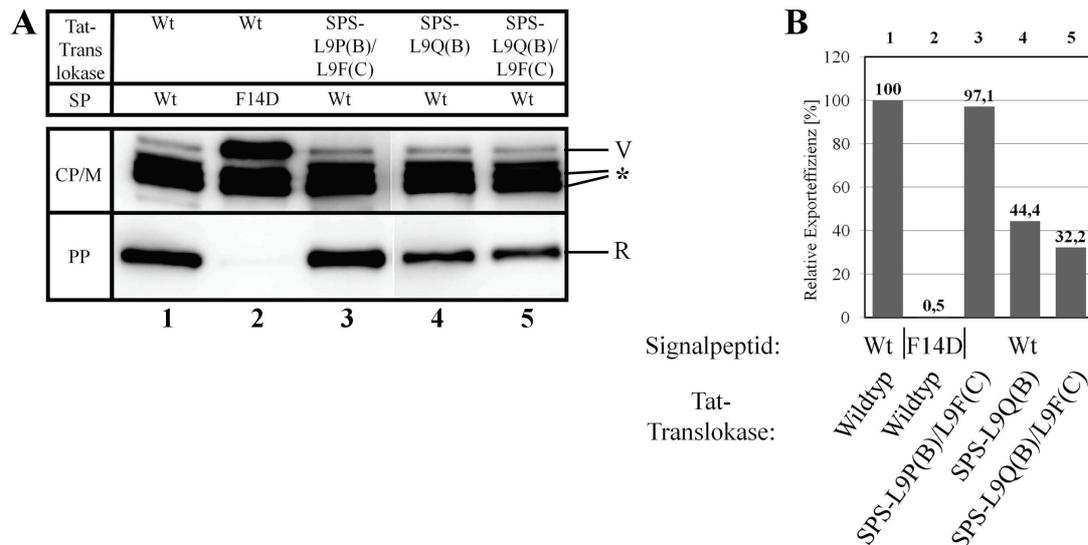


**Abbildung 19: Zellfraktionierung von *E. coli* GSJ101 zur Untersuchung des Exports des TorA-MalE-Reporters durch die Suppressortranslokasen.** Zu sehen sind Proben vom *E. coli* Stamm GSJ101 mit Plasmid-kodierter Tat-Translokase und Plasmid-kodierten TorA-MalE-Reportern. Die Zellen wurden in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma- und Membranfraktion (CP/M) getrennt. Für die CP/M-Fraktion wurden je 3µg Protein aufgetragen. Die Menge der PP-Fraktion wurde so berechnet, dass hier jeweils die identische Zellzahl wie in der CP/M-Fraktion zu Grunde lag. Im Periplasma ist die reife Form des MalE zu sehen (R), in der Cytoplasma/Membranfraktion repräsentiert die oberste Bande den unprozessierten TorA-MalE-Vorläufer (V). Bei den darunter liegenden Banden handelt es sich um cytoplasmatische Abbauprodukte (\*). In beiden Abbildungen diente der Stamm mit dem unveränderten TorA-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase als Positivkontrolle [pTorA-MalE/pTatABCE] (A und B jeweils Spur 1). Als Negativkontrolle diente der Stamm mit dem TorA[F14D]-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase [pTorA[F14D]-MalE/pTatABCE] (A und B jeweils Spur 2). Alle weiteren Stämme exprimierten den TorA-MalE-Reporter von pTorA-MalE und eine Suppressortranslokase, kodiert durch die entsprechende pTatABCE-Variante. **A:** pTatABCE-SPS-L9F(C) (Spur 3); pTatABCE-SPS-K18E(C) (Spur 4); pTatABCE-SPS-L9F(C)/K18E(C) (Spur 5). **B:** pTatABCE-SPS-V12G(B) (Spur 3); pTatABCE-SPS-N22I(C) (Spur 4); pTatABCE-SPS-V12G(B)/N22I(C) (Spur 5). Im oberen Feld sind der Übersichtlichkeit halber die TatABCE und die TorA-MalE Varianten (abgekürzt) aufgelistet (SP=Signalpeptid; Wt= Wildtyp-Tat-Translokase bzw. unveränderter TorA-MalE-Reporter; F14D= TorA[F14D]-MalE-Reporter).

Für die Suppressortranslokasen SPS-L9F(C), SPS-K18E(C) und SPS-N22I(C) konnten Kreutzenbeck *et al.* (2007) bereits zeigen, dass diese den Export des unveränderten TorA-MalE-Reporters in *E. coli* GSJ101 effizient vermitteln. Auch hier ist in Abbildung 19 A (Spur 3 und 4) und B (Spur 4) zu sehen, dass die Stämme mit diesen Suppressortranslokasen einen effizienten Export des unveränderten TorA-MalE-Reporters zeigen. Auch die Suppressortranslokasen SPS-L9F(C)/K18E(C), SPS-V12G(B) und SPS-V12G(B)/N22I(C), die im Zusammenhang mit dem unveränderten TorA-MalE Reporter noch nicht beschrieben sind, zeigen wie die Positivkontrolle einen effizienten Export des TorA-MalE Reporters (siehe Abb. 19 A, Spur 5 und B, Spur 3 und 5). In allen Fällen ist deutlich reifes MalE in der PP-Fraktion zu sehen. Auf eine genaue quantitative Charakterisierung dieser Stämme hinsichtlich des TorA-MalE Exports wurde im Folgenden verzichtet.

Im Fall der Suppressortranslokasen SPS-L9P(B), SPS-L9P(B)/L9F(C), SPS-L9Q(B) und SPS-L9Q(B)/L9F(C) zeigten sich Auffälligkeiten bei den Experimenten zur Untersuchung des Exports des TorA-MalE-Reporters. Im Fall der SPS-L9P(B)-Suppressortranslokase war eine Untersuchung des Exports des TorA-MalE-Reporters auf Proteinebene nicht möglich. Die Kombination von SPS-L9P(B)-Suppressortranslokase und dem unveränderten TorA-MalE-Reporter hatte offensichtlich einen toxischen Effekt auf *E. coli* GSJ101. Dieser Stamm zeigte ein stark verlangsamtes Wachstum in flüssigem LB-Medium, so dass die für den osmotischen Schock erforderliche Zellzahl während der vierstündigen Wachstumsphase bei weitem nicht erreicht wurde. Interessanterweise ist dieses reduzierte Wachstum von *E. coli* GSJ101 und der SPS-L9P(B)-Suppressortranslokase nur im Zusammenhang mit dem unveränderten TorA-MalE-Reporter zu beobachten, nicht aber in den Experimenten zum Export des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters in Kapitel III 2.5.2 bzw. III 2.5.3.

### III. Ergebnisse



**Abbildung 20: Zellfraktionierung von *E. coli* GSJ101 zur Untersuchung des Exports des TorA-MalE-Reporters durch SPS-L9P(B)/L9F(C)-, die SPS-L9Q(B)- und die SPS-L9Q(B)/L9F(C)-Suppressortranslokasen.** Zu sehen sind Proben von *E. coli* GSJ101 mit Plasmid-kodierter Tat-Translokase und Plasmid-kodierten TorA-MalE-Reportern. Die Zellen wurden in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma- und Membranfraktion (CP/M) getrennt. Für die CP/M-Fraktion wurden je 3 µg Protein aufgetragen. Die Menge der PP-Fraktion wurde so berechnet, dass hier jeweils die fünffache Zellzahl wie in der CP/M-Fraktion zu Grunde lag. Im Periplasma ist die reife Form von MalE zu sehen (R), in der Cytoplasma/Membranfraktion repräsentiert die oberste Bande den unprozessierten TorA-MalE-Vorläufer (V). Bei den darunter liegenden Banden handelt es sich um cytoplasmatische Abbauprodukte (\*). **A:** Der Stamm mit dem unveränderten TorA-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase diente als Positivkontrolle [pTorA-MalE/pTatABCE] (Spur 1). Als Negativkontrolle diente der Stamm mit dem TorA[F14D]-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase [pTorA[F14D]-MalE/pTatABCE] (Spur 2). Alle weiteren Stämme exprimierten den TorA-MalE-Reporter von pTorA-MalE und eine Suppressortranslokase, kodiert durch die entsprechende pTatABCE-Variante: pTatABCE-SPS-L9P(B)/L9F(C) (Spur 3); pTatABCE-SPS-L9Q(B) (Spur 4); pTatABCE-SPS-L9Q(B)/L9F(C) (Spur 5). Im oberen Feld sind der Übersichtlichkeit halber die TatABCE und die TorA-MalE Varianten (abgekürzt) aufgelistet (SP=Signalpeptid; Wt= Wildtyp-Tat-Translokase bzw. unveränderter TorA-MalE-Reporter; F14D= TorA[F14D]-MalE-Reporter). **B:** Graphische Darstellung der relativen Exporteffizienz des TorA-MalE-Reporters durch die ausgewählten Tat-Mutantentranslokasen aus Abbildung 20 A. Die Chemolumineszenzsignale wurden mit dem Programm AIDA 4.15 quantifiziert. Die Menge des exportierten MalE der Positivkontrolle wurde dabei als 100% definiert. Aufgetragen sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Im Fall des Stammes mit der SPS-L9P(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase, die auch die Mutation L9P in TatB enthält, war ein derartiger Wachstumsdefekt wie bei dem Stamm mit der SPS-L9P(B)-Suppressortranslokase nicht zu beobachten. Auch anhand der Menge des reifen MalE in der PP-Fraktion dieses Stammes konnte kein Unterschied im Export des TorA-MalE-Reporters im Vergleich zum Export im Stamm mit der unveränderten Tat-Translokase festgestellt werden. Dieses drückt sich auch in einer relativen Exporteffizienz von 97,1 % im

Vergleich zur Positivkontrolle aus (Abb. 20 B). Ein anderes Bild zeigte sich sowohl beim Stamm mit der SPS-L9Q(B)- als auch im Fall des Stammes mit der SPS-L9Q(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase und dem TorA-MalE-Reporter. Hier war in beiden Fällen eine deutlich reduzierte Menge an reifem Mal in der PP-Fraktion im Vergleich zur Positivkontrolle detektierbar. Im Vergleich zur Positivkontrolle waren bei dem Stamm mit der SPS-L9Q(B)-Suppressortranslokase nur 44,4% und im Fall des Stammes mit der SPS-L9Q(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase nur 32,2% der Menge an reifem MalE in der PP-Fraktion detektierbar (siehe Abb. 20 B). Diese reduzierte Menge an reifem MalE ist in beiden Fällen offensichtlich auf die Gegenwart der Mutation L9Q in TatB zurückzuführen, da die Mutation L9F alleine keine Reduzierung der Exporteffizienz des unveränderten TorA-MalE-Reporters bewirkt (siehe Abb. 19 und Kreutzenbeck *et al.*, 2007).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass für fast alle Suppressortranslokasen gezeigt werden konnte, dass sie auch den unveränderten TorA-MalE Reporter effizient exportieren können. Lediglich für die SPS-L9P(B)-Suppressortranslokase konnte dieser Beweis nicht direkt erbracht werden, da die SPS-L9P(B)-Suppressortranslokase in Kombination mit dem unveränderten TorA-MalE-Reporter einen toxischen Effekt auf *E. coli* GSJ101 hat. Zudem konnte im Fall der Suppressortranslokasen SPS-L9Q(B) und SPS-L9Q(B)/L9F(C) gezeigt werden, dass sie den Export des TorA-MalE-Reporters vermitteln, dieser aber mit einer deutlich niedrigeren Effizienz als bei der unveränderten Tat-Translokase stattfindet. Diese verringerte Exporteffizienz ist auf die Gegenwart der Mutation L9Q in TatB der beiden Mutantentranslokasen zurückzuführen.

## **2.6 Die Effekte von einzelnen Suppressormutationen auf den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters summieren sich auch bei Kombination von drei Suppressormutationen in einer Tat-Translokase**

In Kapitel III 2.5.2 und III 2.5.3 konnte anhand der SPS-L9P(B)/L9F(C)-, der SPS-L9F(C)/K18E(C)-, der SPS-L9Q(B)/L9F(C)- und der SPS-V12G(B)/N22I(C)-Suppressortranslokase gezeigt werden, dass die Kombination von zwei Suppressormutationen in einer Tat-Translokase einen synergistischen Effekt auf die Effizienz der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters und des TorA[KQ]-MalE-Reporters hat,

### III. Ergebnisse

wenn man diese mit der Suppression durch die Tat-Translokasen mit den einzeln vorliegenden Suppressormutationen vergleicht. Hierbei wurde anhand von drei verschiedenen Beispielen [SPS-L9P(B)/L9F(C), SPS-L9Q(B)/L9F(C), SPS-V12G(B)/N22I(C)] gezeigt, dass die Kombination von einer Mutation aus dem TatB N-Terminus mit einer Mutation aus dem TatC N-Terminus zu dieser gesteigerten Suppression der beiden TorA-MalE-Reporter führt. Anhand eines Beispiels [SPS-L9F(C)/K18E(C)] wurde zudem gezeigt, dass auch eine Kombination von zwei Suppressormutationen im TatC N-Terminus zu einer gesteigerten Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters und des TorA[KQ]-MalE-Reporters führt.

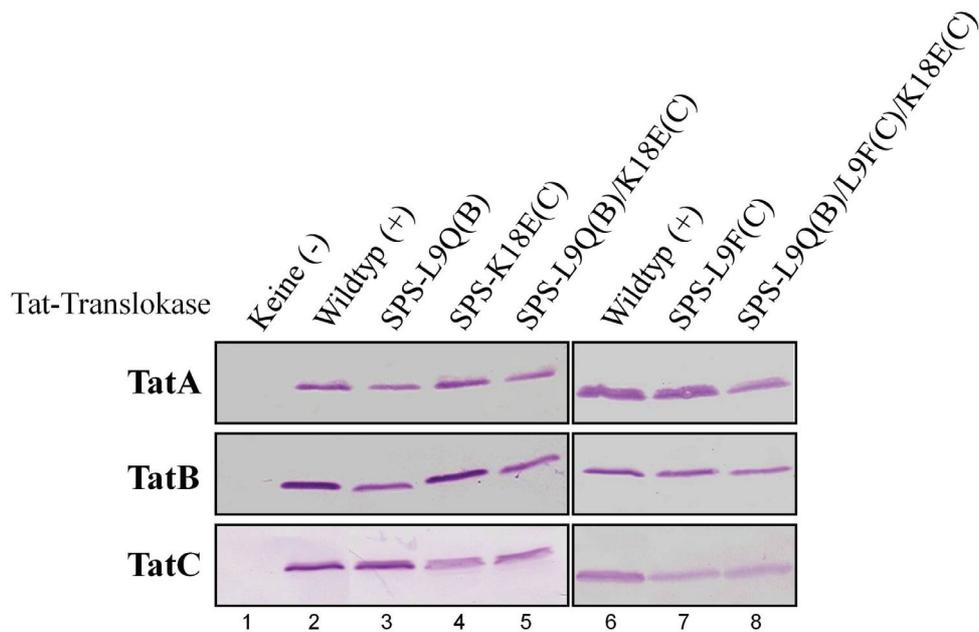
Im Folgenden wurde untersucht, ob es möglich ist, die Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters und auch des TorA[KQ]-MalE-Reporters durch die gezielte Kombination von drei Suppressormutationen in einer Tat-Translokase noch weiter zu verstärken. Hierzu wurden die Mutationen aus der effektivsten zweifach mutierten Suppressortranslokase, die auf einer Mutation in TatB und einer Mutation in TatC beruht [SPS-L9Q(B)/L9F(C)] (siehe Punkt III 2.5.2 und III 2.5.3), und der einzigen Suppressortranslokase, die auf zwei Mutationen in TatC beruht [SPS-L9Q(B)/L9F(C)], in einer Suppressortranslokase mit den Suppressormutationen L9Q (TatB), L9F (TatC) und K18E (TatC) vereint [SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)]. In dieser SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Mutantentranslokase liegen nunmehr die Mutationen L9Q (TatB) und K18E (TatC) zusammen vor. Diese beiden Mutationen wurden als Paar in einer Translokase noch nicht hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die verschiedenen TorA-MalE-Reporter zu exportieren, untersucht. Im Folgenden wurde deshalb auch eine Mutantentranslokase konstruiert, in der die Mutationen L9Q (TatB) und K18E (TatC) in Kombination vorliegen [SPS-L9Q(B)/K18E(C)]. Diese Mutantentranslokase dient als Kontrolle um einen Effekt der drei kombinierten Mutationen L9Q (TatB), L9F (TatC) und K18E (TatC) in der Tat-Translokase auf den Export der verschiedenen TorA-MalE-Reporter gegen den Effekt abgrenzen zu können, der nur durch die Anwesenheit der Mutationen L9Q (TatB) und K18E (TatC) in der Tat-Translokase entsteht. Sowohl die für die synthetische SPS-L9Q(B)/K18E(C)- als auch die für die synthetische SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Mutantentranslokase kodierenden pTatABCE-Varianten wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese hergestellt

Im Folgenden wurden die SPS-L9Q(B)/K18E(C)- und die SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Mutantentranslokasen hinsichtlich ihrer Fähigkeit den TorA[F14D]-MalE-Reporter, den TorA[KQ]-MalE-Reporter und den unveränderten TorA-MalE-Reporter zu exportieren

untersucht. Hierfür wurden einerseits die Phänotypen der entsprechenden Stämme auf MacConkey-Agar mit Maltose und auf Maltose-Minimalmedium betrachtet. Zudem wurde der Export der drei TorA-MalE Reporter in den entsprechenden Stämmen auch direkt auf Proteinebene untersucht.

### **2.6.1 Vergleich der Tat-Proteinmengen in der Cytoplasmamembran der *E. coli* Stämme mit den synthetischen Suppressortranslokasen**

Zunächst wurde vorab überprüft, ob die Menge der Tat-Proteine in der Cytoplasmamembran des *E. coli* Stammes mit der SPS-L9Q(B)/K18E(C)- bzw. der SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Mutantentranslokase im Vergleich zur Tat-Proteinmenge des Stammes mit der unveränderten Tat-Translokase beeinflusst ist. Hierdurch sollte überprüft werden, ob ein erhöhter Export der verschiedenen TorA-MalE-Reporter eventuell auf veränderte Tat-Proteinmengen zurückzuführen ist oder ob eine Suppression ausschließlich auf einem direkten Effekt der vorhandenen Mutationen beruht. Die Tat-Proteinmengen in der Cytoplasmamembran der *E. coli* Stämme mit der SPS-L9Q(B)/K18E(C)- bzw. der SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Mutantentranslokase wurden mittels spezifischer Antikörper gegen TatA, TatB und TatC überprüft. Als zusätzliche Kontrolle dienten die Stämme mit den Tat-Translokasen, die nur die einzelnen Mutationen L9Q (TatB), L9F (TatC) oder K18E (TatC) beinhalten. Die *tat*-Gene lagen hierbei auf Plasmiden kodiert in *E. coli* GSJ101 vor. Als Negativkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit dem pHSG575-Leervektor, alle Stämme exprimierten zusätzlich den Plasmid-kodierten TorA[F14D]-MalE-Reporter.



**Abbildung 21: Vergleich der Tat-Proteinmengen in *E. coli* Stämmen mit unveränderter und unterschiedlich mutierten Tat-Translokasen.** Zum Vergleich der Tat-Proteinmengen wurden Membranpräparationen der einzelnen Stämme, wie in Kapitel II 5.3 beschrieben, durchgeführt. Der Proteingehalt der Membranfraktion wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Es wurden jeweils 10 µg Protein über SDS-Page aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran mittels „Western“-Blot übertragen. Die Tat-Proteine wurden mit spezifischen Peptid-Antisera gegen TatA, TatB und TatC nachgewiesen. Da es sich um Proben aus zwei unterschiedlichen unabhängigen Experimenten handelt (Spur 1-5 und Spur 6-8), sind die Positivkontrollen beider Experimente in Spur 1 bzw. Spur 6 gezeigt. Alle Stämme exprimierten den TorA[F14D]-MalE-Reporter von pTorA[F14D]-MalE. Zusätzlich enthielten die Stämme entweder den Leervektor [pLV; Negativkontrolle; (-)] oder pTatABCE [Positivkontrolle; (+)] bzw. die Plasmide welche für die Tat-Mutantentranslokasen kodieren. Spur 1: pLV; Spur 2: pTatABCE; Spur 3: pTatABCE-SPS-L9Q(B); Spur 4: pTatABCE-SPS-K18E(C); Spur 5: pTatABCE-SPS-L9Q(B)/K18E(C); Spur 6: pTatABCE; Spur 7: pTatABCE-SPS-L9F(C); Spur 8: pTatABCE-SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C).

Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, ist in allen Fällen in denen die Mutation L9Q in TatB in der Tat-Translokase vorliegt (Abb. 21, Spur 3, 5 und 8) eine etwas niedrigere TatA-Menge im Vergleich zur Wildtyp Tat-Translokase zu beobachten. Auch die TatB-Menge ist in den Translokasen in denen die Mutation L9Q in TatB vorliegt, leicht verringert (Abb. 21, Spur 3, 5 und 8). In den Translokasen, in denen die Mutation L9F und/oder K18E in TatC vorliegen (Abb. 21, Spur 4, 5, 7 und 8), ist die Menge an TatC leicht verringert. In den Stämmen mit der L9Q(B)/K18E(C)- oder der SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Mutantentranslokase sind somit sowohl die TatA-, als auch die TatB- und die TatC-Menge im Vergleich zur jeweiligen Positivkontrolle leicht verringert (Abb. 21, vergleiche Spur 1 mit 5 und Spur 6 mit 8). Es kann somit festgehalten werden, dass sowohl im Stamm mit der SPS-L9Q(B)/K18E(C)- als auch im Stamm mit der SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Mutantentranslokase keine erhöhten Mengen der Tat-Proteine im Vergleich zum Stamm mit der unveränderten Tat-Translokase zu

beobachtet sind. Eine Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters oder des TorA[KQ]-MalE-Reporters durch eine gesteigerte Tat-Proteinmenge ist daher auszuschließen.

### 2.6.2 Die synthetischen Suppressortranslokasen SPS-L9Q(B)/K18E(C) und SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C) vermitteln einen Export des TorA[F14D]-MalE-, des TorA[KQ]-MalE- und des unveränderten TorA-MalE-Reporters

Im Folgenden wurde der Tat-abhängige Export des TorA[F14D]-MalE-, des TorA[KQ]-MalE- und des unveränderten TorA-MalE-Reporters durch die SPS-L9Q(B)/K18E(C)- und die SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Mutantentranslokase zunächst anhand der Phänotypen der entsprechenden Stämme auf MacConkey-Agar mit Maltose und auf Maltose-Minimalmedium untersucht.

Die jeweiligen Tat-Translokasen und die TorA-MalE-Reporter lagen hierbei Plasmid-kodiert in *E. coli* GSJ101 vor. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit dem unveränderten TorA-MalE Reporter und der unveränderten Tat-Translokase. Als Negativkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit dem TorA[F14D]-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase oder *E. coli* GSJ101 mit dem TorA[KQ]-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 aufgelistet.

**Tabelle 8: Phänotypen von *E. coli* GSJ101 mit den synthetischen Suppressortranslokasen und dem TorA[F14D]-MalE-, dem TorA[KQ]-MalE- oder dem TorA-MalE-Reporter auf MacConkey-Agar mit Maltose und auf Maltose-Minimalmedium**

<i>E. coli</i> GSJ101						
	pTorA[F14D]-MalE		pTorA[KQ]-MalE		pTorA-MalE	
	MC-M	MM-M	MC-M	MM-M	MC-M	MM-M
pTatABCE	weiß	-	weiß	-	rot	+++
pTatABCE-SPS-L9Q(B)/K18E(C)	rot	+++	rot	+++	rot	+++
pTatABCE-SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)	rot	+++	rot	+++	rot	+++

Beschrieben sind die beobachteten Phänotypen von *E. coli* GSJ101 mit den angegebenen Plasmiden nach ca. 24h auf MacConkey-Agarplatten mit Maltose (MC-M) und auf Minimalmedium-Agarplatten mit Maltose (MM-M) über 48h. Phänotypen auf MM-M: +++ normales Wachstum; ++ reduziertes Wachstum; + langsames Wachstum; (+) sehr langsames Wachstum (sichtbar nach 48h und mehr); - kein Wachstum.

### III. Ergebnisse

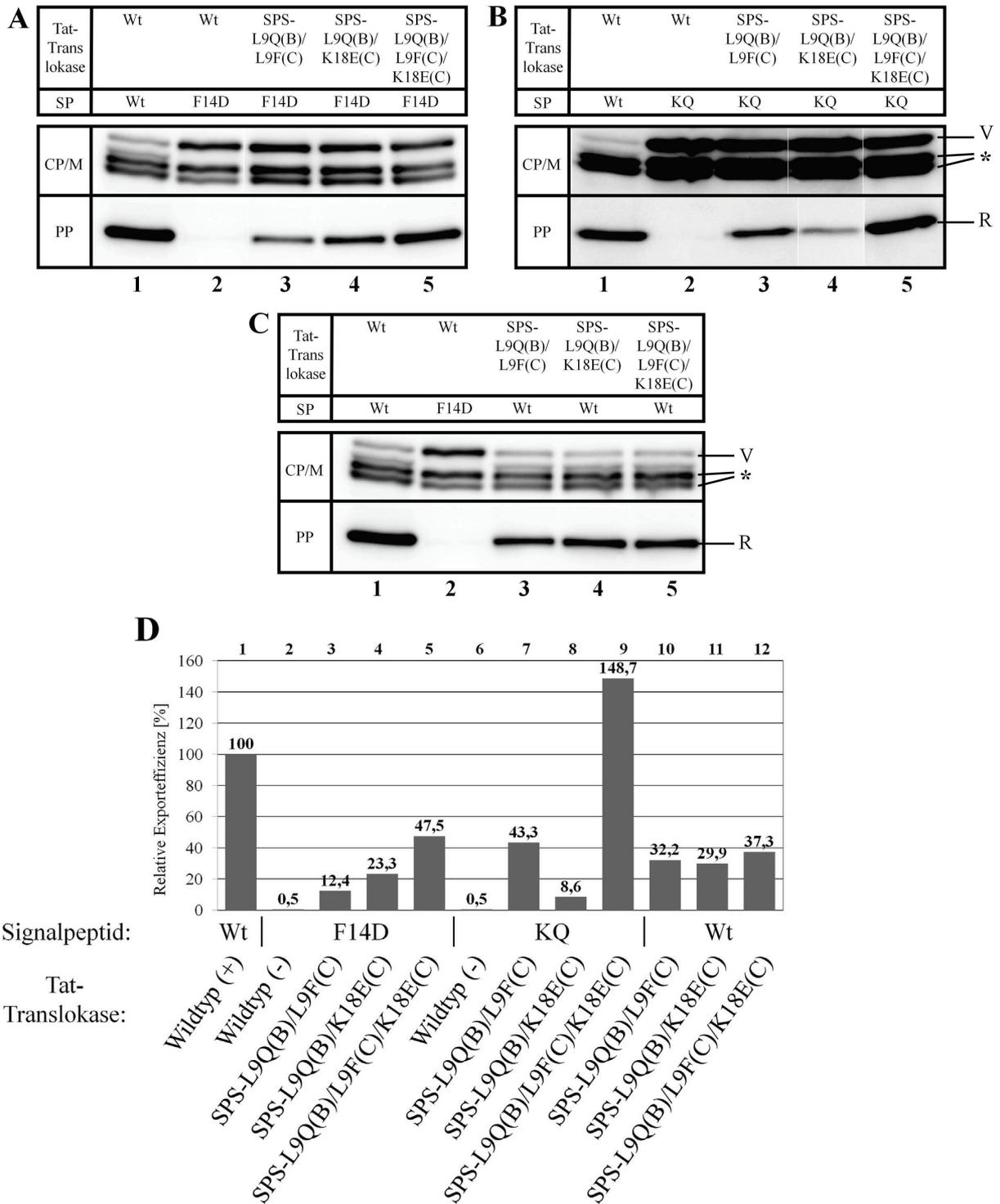
Wie in Tabelle 8 gezeigt, sind beim Export des TorA[F14D]-MalE-, des TorA[KQ]-MalE- und des unveränderten TorA-MalE-Reporters durch die SPS-L9Q(B)/K18E(C)- und die SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Mutantentranslokase keine Unterschiede in der Rotfärbung der entsprechenden Stämme auf MacConkey-Agar mit Maltose zu beobachten. Weiterhin sind keine Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit der entsprechenden Stämme auf Maltose-Minimalmedium im Vergleich zum Stamm mit dem unveränderten TorA-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase [Positivkontrolle; pTorA-MalE/pTatABCE] zu detektieren. Die Phänotypen der entsprechenden Stämme indizieren somit einen starken Export des TorA[F14D]-MalE-, des TorA[KQ]-MalE- wie auch des unveränderten TorA-MalE-Reporters durch die SPS-L9Q(B)/K18E(C)- und die SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Mutantentranslokase. Für eine direkte und quantitativere Untersuchung des Exports in den entsprechenden Stämmen wurde dieser im Folgenden auf Proteinebene untersucht.

#### **2.6.3 Die synthetischen Suppressortranslokasen zeigen einen zunehmend gesteigerten Export des TorA[F14D]-MalE und des TorA[KQ]-MalE-Reporters bei Erhöhung der Suppressormutationszahl aber einen reduzierten Export des unveränderten TorA-MalE-Reporters**

Zur Betrachtung des Exports des TorA[F14D]-MalE-, des TorA[KQ]-MalE- und des unveränderten TorA-MalE-Reporters durch die SPS-L9Q(B)/K18E(C)- und die SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Suppressortranslokase auf Proteinebene wurden die entsprechenden Stämme mittels osmotischen Schocks (II 5.4) in eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion und in eine Periplasma-Fraktion (PP) getrennt. Die Qualität der Fraktionierung wurde durch den Nachweis des strikt cytoplasmatisch lokalisierten TalB-Proteins mit TalB-spezifischen Antikörpern im Western-Blot überprüft. Es zeigte sich, dass TalB ausschließlich in der CP/M-Fraktion zu detektieren war (Daten nicht gezeigt). Die MalE-Polypeptide wurden im „Western“-Blot mit MalE-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit der unveränderten Tat-Translokase und dem unveränderten TorA-MalE-Reporter. Als Negativkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit dem TorA[F14D]-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase bzw. mit dem TorA[KQ]-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase (bei den Untersuchungen zum Export des TorA[KQ]-MalE-Reporters). Als interne Kontrolle wurde

der Export der drei Reporter ebenfalls in *E. coli* GSJ101 mit einer bereits in III 2.5.2.2, III 2.5.3.2 bzw. III 2.5.4.2 beschriebenen Suppressortranslokase untersucht. Hierfür wurde die SPS-L9Q(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase ausgewählt. SPS-L9Q(B)/L9F(C) war im Fall des TorA[F14D]-MalE-Reporters in Kapitel III 2.5.2.2 die effektivste Suppressortranslokase. Im Fall des TorA[KQ]-MalE-Reporters in Kapitel III 2.5.3.2 war sie die zweit effektivste Suppressortranslokase. Im Fall des unveränderten TorA-MalE-Reporters in Kapitel III 2.5.4.2 war bei dem Stamm mit dieser Suppressortranslokase eine reduzierte Exporteffizienz zu beobachten

### III. Ergebnisse



**Abbildung 22: Zellfraktionierung von *E. coli* GSJ101 zur Untersuchung des Exports des TorA[F14D]-MalE-, des TorA[KQ]-MalE-Reporters und des unveränderten TorA-MalE-Reporters durch die SPS-L9Q(B)/L9F(C)-, die SPS-L9Q(B)/K18E(C)- und die SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Suppressortranslokase.** Zu sehen sind Proben von *E. coli* GSJ101 mit Plasmid-kodierter Tat-Translokase und Plasmid-kodierten TorA-MalE-Reportern. Die Zellen wurden in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma- und Membranfraktion (CP/M) getrennt. Für die CP/M-Fraktion wurden je 3 µg Protein aufgetragen. Die Menge der PP-Fraktion wurde so berechnet, dass hier jeweils die fünffache Zellzahl wie in der CP/M-Fraktion zu Grunde lag. Im Periplasma ist die reife Form des MalE zu sehen (R), in der Cytoplasma/Membranfraktion repräsentiert die oberste Bande den unprozessierten TorA-MalE-Vorläufer (V). Bei den darunter liegenden Banden handelt es sich um cytoplasmatische Abbauprodukte (\*). In allen Abbildungen diente der Stamm mit dem unveränderten TorA-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase als Positivkontrolle [pTorA-MalE/pTatABCE] (A, B und C jeweils Spur 1). Als Negativkontrolle diente der Stamm mit dem TorA[F14D]-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase [pTorA[F14D]-MalE/pTatABCE] (A und C jeweils Spur 2) oder der Stamm mit dem TorA[KQ]-MalE-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase [pTorA[KQ]-MalE/pTatABCE] (B Spur 2). Alle weiteren Stämme exprimierten eine TorA-MalE-Reporter-Variante und eine Suppressortranslokase, kodiert durch die entsprechendem pTorA-MalE- bzw. pTatABCE-Plasmide. **A:** pTorA[F14D]-MalE und pTatABCE-SPS-L9Q(B)/(L9F(C) (Spur 3); pTatABCE-SPS-L9Q(B)/K18E(C) (Spur 4); pTatABCE-SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C) (Spur 5). **B:** pTorA[KQ]-MalE und pTatABCE-SPS-L9Q(B)/(L9F(C) (Spur 3); pTatABCE-SPS-L9Q(B)/K18E(C) (Spur 4); pTatABCE-SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C) (Spur 5). **C:** pTorA-MalE und pTatABCE-SPS-L9Q(B)/L9F(C) (Spur 3); pTatABCE-SPS-L9Q(B)/K18E(C) (Spur 4); pTatABCE-SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C) (Spur 5). ). Im oberen Feld sind der Übersichtlichkeit halber die TatABCE und die TorA-MalE Varianten (abgekürzt) aufgelistet (SP=Signalpeptid; Wt= Wildtyp-Tat-Translokase bzw. unveränderter TorA-MalE-Reporter; F14D= TorA[F14D]-MalE-Reporter; KQ= TorA[KQ]-MalE-Reporter). **D:** Graphische Darstellung der relativen Exporteffizienz der verschiedenen TorA-MalE-Reporter durch die Suppressortranslokasen aus Abbildung 17 A, B, und C. Die Chemolumineszenzsignale wurde mit der Software AIDA 4.15 quantifiziert. Die Menge des exportierten MalE der Positivkontrolle wurde dabei als 100% definiert. Aufgetragen sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, führt die Kombination der drei Suppressor Mutationen L9Q (TatB), L9F (TatC) und K18E (TatC) in der SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Suppressortranslokase sowohl im Fall des TorA[F14D]-MalE-Reporters (Abb. 22 A) als auch im Falle des TorA[KQ]-MalE-Reporters (Abb.22 B) zu einer weiteren Steigerung der Suppression des Exportdefektes des jeweiligen Reporters, wenn man diese mit der Suppression durch die Suppressortranslokasen mit nur je zwei dieser Suppressor Mutationen vergleicht (siehe III 2.5.2.2 und III 2.5.3.2 für den Export der beiden Reporters durch die SPS-L9F(C)/K18E(C)-Suppressortranslokase).

In Abbildung 22 A ist zu beobachten, dass beim Stamm mit dem TorA[F14D]-MalE-Reporter und der SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Suppressortranslokase deutlich mehr reifes MalE in der PP-Fraktion zu detektieren ist als beim Stamm mit der SPS-L9Q(B)/L9F(C)-

### III. Ergebnisse

Suppressortranslokase (Vergleiche Abb. 22 A Spur 3 und 5), welche wie in Kapitel III 2.5.2 beschrieben, die stärkste Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporter zeigte. Mit einer relativen Exporteffizienz von 47,5 % ist die SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Suppressortranslokase ein wesentlich stärkerer Suppressor des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters als SPS-L9Q(B)/L9F(C) mit 12,4 % (siehe Abb. 22 D). Dass die verstärkte Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters tatsächlich auf die Kombination der drei Suppressor Mutationen [L9Q (TatB), L9F (TatC) und K18E (TatC)] beruht und nicht nur auf die Kombination von L9Q (TatB) und K18E (TatC) in einer Tat-Translokase zurückzuführen ist, sieht man am Export des TorA[F14D]-MalE-Reporters des Stammes mit der SPS-L9Q(B)/K18E(C)-Suppressortranslokase. Auch hier ist eine größere Menge an reifem MalE in der PP-Fraktion zu detektieren als bei dem Stamm mit der SPS-L9Q(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase (Vergleiche Abb 22 A Spur 3 und 4), was sich auch in einer relativen Exporteffizienz von 23,3 % ausdrückt. Die Menge an reifem MalE ist aber wesentlich geringer als im Fall des Stammes mit der SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Suppressortranslokase (47,5 %).

Bei der Untersuchung des Exports des TorA[KQ]-MalE-Reporters im Stamm mit der SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Suppressortranslokase ist die Steigerung der Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters noch wesentlich drastischer sichtbar. Der Stamm mit der SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Suppressortranslokase zeigt sogar mehr reifes MalE in der PP-Fraktion als die Positivkontrolle (Vergleiche Abb. 22 B Spur 1 und 5). Mit einer relativen Exporteffizienz von 148,7 % ist die Suppression durch die SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Suppressortranslokase somit wesentlich stärker als bei dem Stamm mit der SPS-L9Q(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase (43,3 %). Auch im Fall des Stammes mit der SPS-L9Q(B)/K18E(C)-Suppressortranslokase und dem TorA[KQ]-MalE-Reporter ist deutlich weniger reifes MalE in der PP-Fraktion zu detektieren (Abb. 22 B Spur 3; 8,6 %). Somit ist auch die starke Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters im Stamm mit der SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)-Suppressortranslokase auf die Kombination der drei Suppressor Mutationen [L9Q (TatB), L9F (TatC) und K18E (TatC)] zurückzuführen und nicht nur auf die Kombination von L9Q (TatB) und K18E (TatC) in einer Tat-Translokase.

Bei der Untersuchung des Exports des unveränderten TorA-MalE-Reporters in den Stämmen mit der SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)- oder der SPS-L9Q(B)/K18E(C)-Suppressortranslokase ist ein reduzierter Export im Vergleich zur Positivkontrolle zu beobachten (Vergleiche Abb. 22 C Spur 1 mit Spur 3 und 5). Die Stämme mit der SPS-

L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)- oder der SPS-L9Q(B)/K18E(C)-Suppressortranslokase zeigen eine relative Exporteffizienz von 37,3 % bzw. 29,9 % und liegen etwa in dem Bereich des Stammes mit der SPS-L9Q(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase (32,2 %). Für SPS-L9Q(B)/L9F(C) und auch für die SPS-L9Q(B)-Translokase mit der L9Q (TatB) Einzelmutation konnte bereits in Kapitel III 2.5.4.2 gezeigt werden, dass diese Suppressortranslokasen einen verringerten Export des unveränderten TorA-MalE-Reporters zeigen. Somit zeigen alle Suppressortranslokasen, welche die Mutation L9Q (TatB) beinhalten, einen verringerten Export des TorA-MalE-Reporters im Vergleich zur Positivkontrolle.

Zusammenfassend ist zu sagen dass gezeigt werden konnte, dass durch die Kombination von drei Suppressor Mutationen in einer synthetischen Suppressortranslokase eine weitere Steigerung der Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters und des TorA[F14D]-MalE-Reporters erreicht wird, wenn man diese mit den entsprechenden Suppressionsstärken der verschiedenen Doppelmutanten [SPS-L9Q(B)/K18E(C), SPS-L9Q(B)/L9F(C), SPS-L9F(C)/K18E(C)] vergleicht (siehe auch Kapitel III 2.5.2 und III 2.5.3). Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Effekte, welche die Einzelmutationen L9Q (TatB), L9F (TatC) und K18E (TatC) auf die Suppression der exportdefekten TorA-MalE-Reporter haben, bei der Kombination der Mutationen in zweifach und dreifach mutierten Suppressortranslokasen synergistisch verstärken und so letztendlich zu einem erheblichen Export des ursprünglich exportdefekten TorA[F14D]-MalE- bzw. TorA[KQ]-MalE-Reporters führen.

### **3. Genetische Untersuchungen zu Wechselwirkungen innerhalb der Tat-Translokase**

Im Gegensatz zur Substrat-Translokase-Interaktion ist über die Wechselwirkungen innerhalb der Tat-Translokase, die für eine funktionierende Tat-Maschinerie benötigt werden, nahezu nichts bekannt. Die einzigen Anhaltspunkte über funktionell wichtige Aminosäuren in den Tat-Proteinen liefern vor allem Mutationsstudien. Hier wurden durch einen gezielten Austausch von zumeist konservierten Aminosäuren, oder auch durch ungerichtete Mutagenesen, Reste in den Tat-Proteinen bestimmt, deren Austausch die Aktivität der Tat-Translokase beeinflussen (z.B. Allen *et al.*, 2002; Buchanan *et al.*, 2002; Barrett *et al.*, 2003; Hicks *et al.*, 2003; Barrett *et al.*, 2005; Barrett und Robinson, 2005; Hicks *et al.*, 2005; Lee *et*

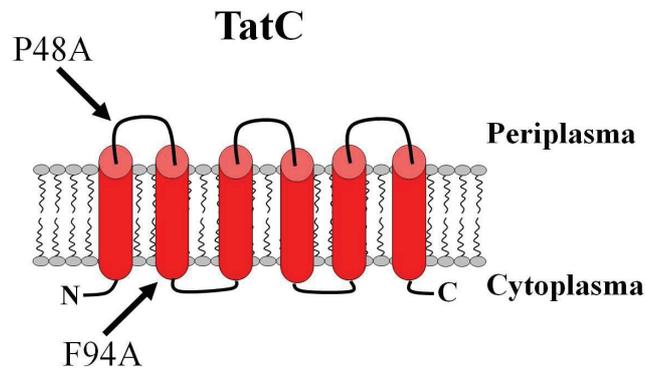
### III. Ergebnisse

*al.*, 2006a; Greene *et al.*, 2007; Punginelli *et al.*, 2007; Warren *et al.*, 2009). Allerdings liefern diese Studien in den meisten Fällen nur die Information, dass der entsprechende Rest kritisch für die Funktion der Tat-Translokase sein kann. Eine Information, welche intra- oder intermolekularen Wechselwirkungen in der Tat-Translokase durch einen Austausch der entsprechenden Aminosäure betroffen sind, liefern diese Studien häufig nicht. Ausnahmen hierbei bilden die Mutationen P48A und D211A in TatC, von denen gezeigt werden konnte, dass sie die Interaktion zwischen TatB und TatC im TatBC-Rezeptorkomplex beeinflussen (Buchanan *et al.*, 2005; Barrett *et al.*, 2005).

Zur Untersuchung von intra- oder intermolekularen Wechselwirkungen in der Tat-Translokase bietet sich, ebenso wie für die Untersuchung von Substrat-Translokase-Wechselwirkungen, ein genetischer Ansatz an. Hierbei kann ausgehend von einer Tat-Translokase, die eine Tat-inaktivierende Mutation beinhaltet, auf Suppressormutanten selektiert werden, bei denen der Tat-abhängige Proteinexport durch eine „second-site“ Mutation in der Tat-Translokase wieder instand gesetzt ist. Solche Untersuchungen können Aufschluss darüber geben, welche Bereiche der Tat-Translokase funktionell in einer Wechselwirkung zu dem Bereich der Tat-Translokase stehen, in dem sich die Defektmutation befindet.

Zur Untersuchung von Wechselwirkungen innerhalb der Tat-Translokase diente in dieser Arbeit die zentrale Komponente der Tat-Translokase, das TatC-Protein, als Ausgangspunkt. Das TatC-Protein ist der primäre Rezeptor für Tat-Signalpeptide, die in Abhängigkeit des Zwillingsarginins an TatC binden (Alami *et al.*, 2003), und bildet zusammen mit dem TatB-Protein den sogenannten TatBC-Rezeptorkomplex (Bolhuis *et al.*, 2001; Cline und Mori 2001; Alami *et al.*, 2003). Im TatC-Protein sind bislang zahlreiche Austausche bekannt, welche die Effizienz der Tat-abhängigen Proteintranslokation negativ beeinflussen (Allen *et al.*, 2002; Buchanan *et al.*, 2002; Barrett und Robinson, 2005; Holzapfel *et al.*, 2007; Punginelli *et al.*, 2007). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass teilweise für ein und denselben Austausch in unterschiedlichen Publikationen ein unterschiedlicher Effekt auf die Effizienz der Tat-abhängigen Proteintranslokation beschrieben ist. Insgesamt sind nur zwei Austausche in TatC mehrfach beschrieben, die bisher unwidersprüchlich einen nahezu vollständigen Block der Tat-abhängigen Proteintranslokation bewirken. Hierbei handelt es sich um die Mutation P48A, welche in der ersten periplasmatischen Schleife des TatC-Proteins lokalisiert ist, und um die Mutation F94A, welche sich im Grenzbereich zwischen dem zweiten Transmembrandurchgang und der ersten cytoplasmatischen Schleife befindet (Allen *et al.*, 2002; Buchanan *et al.*, 2002; Barrett *et al.*, 2005; Barrett und Robinson, 2005; Holzapfel *et*

*al.*, 2007). Die Lage der beiden Mutationen im Topologiemodell von TatC ist in Abbildung 23 dargestellt.

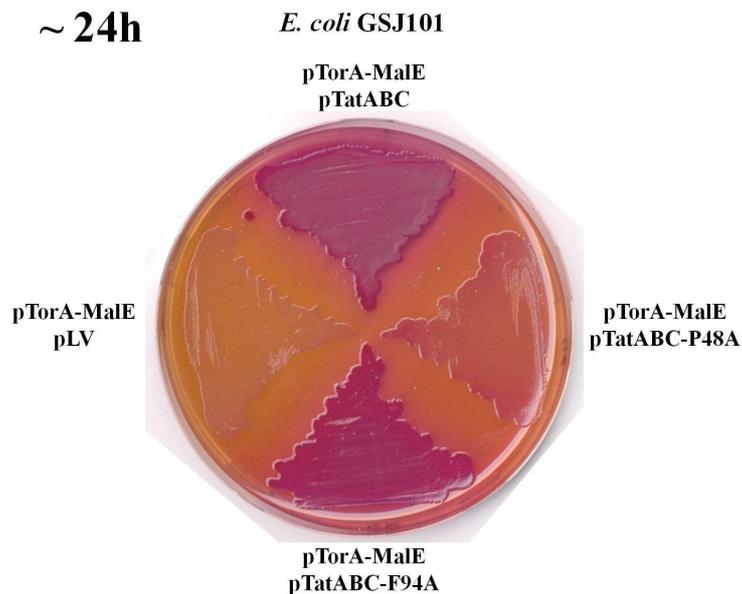


**Abbildung 23: Schematische Darstellung der Topologie des TatC Proteins und der Positionen der Tat-inaktivierenden Mutationen P48A und F94A.** Die Mutation P48A befindet sich in der ersten periplasmatischen Schleife, die Mutation F94A befindet sich am Ende des zweiten Transmembrandomängs.

Hier ist nochmals die Mutation P48A hervorzuheben: Normalerweise werden TatB und TatC in „blue-native-gel“-Experimenten in einem Komplex, dem TatBC-Rezeptorkomplex detektiert (Oates *et al.*, 2005; Barrett *et al.*, 2005). In Anwesenheit der Mutation P48A in TatC ist diese typische Komplexbildung von TatB und TatC nicht mehr zu detektieren (Barrett *et al.*, 2005). Diese Daten deuten darauf hin, dass durch die Mutation P48A in TatC Wechselwirkungen zwischen TatB und TatC beeinflusst sind, die für die Ausbildung des TatBC-Rezeptorkomplexes und somit für eine funktionierende Tat-abhängige Proteintranslokation benötigt werden. In Anwesenheit der Mutation F94A wurde hingegen keine Veränderung in der Komplexbildung der Tat-Proteine beobachtet (Barrett *et al.*, 2005). Im Folgenden wurde untersucht, welchen Effekt die beiden Mutationen P48A und F94A in TatC auf den Tat-abhängigen Export des TorA-MalE-Reporters haben. Wie bereits erwähnt ist der TorA-MalE-Reporter ein sehr sensibles Reporterprotein, mit dem auch ein sehr geringer Tat-abhängiger Export detektiert werden kann.

### 3.1 Untersuchungen zum Export des TorA-MalE Reporterproteins durch die TatABC-P48A und TatABC-F94A Translokasen

Zunächst wurden die für die Tat-Translokasen mit den Mutationen P48A oder F94A kodierenden pTatABC-Plasmide mittels ortsgerichteter Mutagenese hergestellt. Der Tat-abhängige Export des TorA-MalE Reporters durch die mutierten Tat-Translokasen mit den Mutationen P48A (TatABC-P48A) bzw. F94A in TatC (TatABC-F94A) wurde in *E. coli* GSJ101 im Vergleich zum Export des TorA-MalE Reporters durch die unveränderte Tat-Translokase untersucht (Positivkontrolle). Die Tat-Translokasen waren hierbei Plasmid-kodiert (pTatABC, pTatABC-P48A bzw. pTatABC-F94A). Als Negativkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit dem pHSG575 Leervektor (pLV).



**Abbildung 24: Phänotyp von *E. coli* GSJ101 mit dem TorA-MalE-Reporter und der TatABC-F94A- und der TatABC-P48A-Translokase auf MacConkey-Agarplatten mit Maltose nach 24h.** Der TorA-MalE-Reporter wie auch die verschiedenen Tat-Translokasen lagen Plasmid-kodiert vor. Die in den jeweiligen Stämmen enthaltenen Plasmide sind bei den entsprechenden Sektoren aufgeführt.

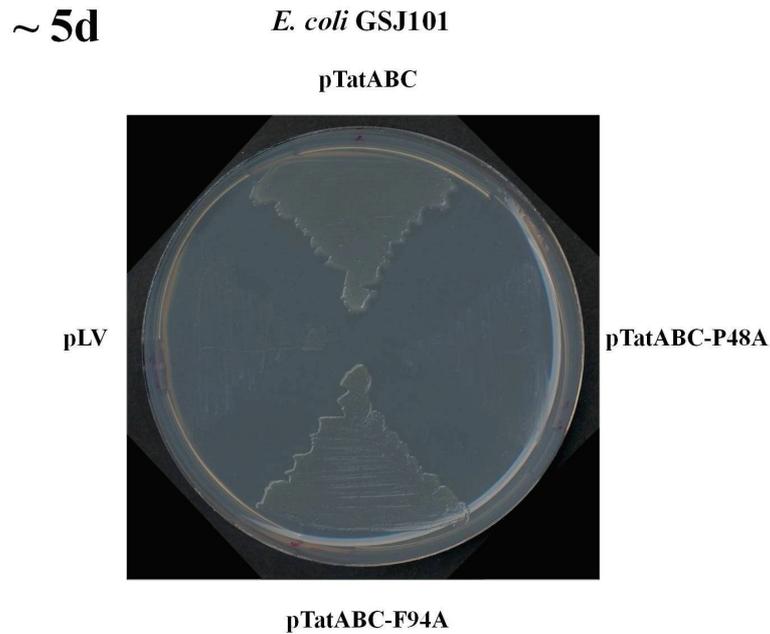
In Abbildung 24 ist deutlich zu sehen, dass sowohl der Stamm mit der TatABC-P48A-Translokase als auch der Stamm mit der TatABC-F94A-Translokase einen Export des TorA-MalE-Reporters auf MacConkey-Agar mit Maltose zeigen. Beide Stämme heben sich in ihrer Pink- bzw. Rotfärbung deutlich von der weiß gefärbten Negativkontrolle ab. Jedoch ist besonders im Fall des Stammes mit der TatABC-P48A-Translokase anhand der Pinkfärbung eine deutliche Verminderung der Effizienz des Tat-abhängigen Exports des TorA-MalE-

Reporters im Vergleich zum Export des TorA-MalE Reporters im Stamm mit der unveränderten Tat-Translokase zu erkennen. Auch beim Stamm mit der TatABC-F94A-Translokase ist anhand der Rotfärbung des Stammes ein etwas geringerer TorA-MalE-Export im Vergleich zur Positivkontrolle zu beobachten. Um tatsächlich „second site“ Suppressormutanten einer Tat-inaktivierenden Mutation isolieren zu können ist es notwendig Selektionsbedingungen zu haben, bei denen man auf einen deutlich verbesserten Export des verwendeten Reporterproteins selektionieren kann. Ideal wäre hierbei ein kompletter Block des Tat-abhängigen Exports oder zumindest ein stark reduzierter Export des verwendeten Reporterproteins. Der deutlich sichtbare Export des TorA-MalE-Reporters durch die TatABC-P48A- und vor allem durch die TatABC-F94A-Translokase ist somit ein schlechter Ausgangspunkt für die Selektion von „second site“ Suppressormutanten der beiden Tat-inaktivierenden Mutationen.

Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob bei der Verwendung eines anderen, weniger sensitiven Reporterproteins, die inaktivierenden Effekte der Mutation P48A und F94A in TatC auf die Tat-abhängige Translokation deutlicher zum Tragen kommen. Hierbei wurde als Reporterprotein die authentische *E. coli* Trimethylaminoxid- (TMAO) Reduktase (TorA) gewählt (chromosomal kodiert). Das TorA-Protein wird von *E. coli* benötigt um TMAO als terminalen Elektronen-Endakzeptor bei der anaeroben Atmung verwenden zu können. Unter Verwendung von Minimalmedium-Agarplatten mit TMAO als einzigem Elektronen-Endakzeptor kann der Export des TorA-Proteins einfach sichtbar gemacht werden, da *E. coli* nur anaerob auf dem TMAO-Minimalmedium wachsen kann, wenn TorA Tat-abhängig in das Periplasma exportiert wird.

### **3.2 Untersuchungen zum Export des authentischen TorA durch die TatABC-P48 und die TatABC-F94A Translokase**

Im Folgenden wurde der Tat-abhängige Export des TorA Proteins durch die TatABC-P48A- und die TatABC-F94A-Translokase in *E. coli* GSJ101 anhand des anaeroben Wachstums der entsprechenden Stämme auf TMAO-Minimalmedium untersucht. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit unveränderter Tat-Translokase. Die verschiedenen Tat-Translokasen lagen hierbei Plasmid-kodiert vor (pTatABC, pTatABC-P48A bzw. pTatABC-F94A), als Negativkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit dem pHSG575 Leervektor (pLV).



**Abbildung 25: Untersuchung des anaeroben Wachstums von *E. coli* GSJ101 mit der TatABC-F94A- und der TatABC-P48A-Translokase auf TMAO-Minimalmedium nach ca. 5 Tagen.** Die Tat-Translokasen lagen Plasmid-kodiert vor und sind der Abbildung neben den zugehörigen Sektoren der Platte zu entnehmen.

In Abbildung 25 ist zu sehen, dass der Stamm mit der TatABC-F94A-Translokase ein deutliches anaerobes Wachstum auf TMAO-Minimalmedium zeigt. Der verminderte Export des authentischen TorA durch die Tat-inaktivierende Mutation F94A in TatC der Tat-Translokase drückt sich lediglich in einem etwas langsameren Wachstum im Vergleich zur Positivkontrolle aus. Im Fall des Stammes mit der TatABC-P48A-Translokase sieht man hingegen auf TMAO-Minimalmedium unter anaeroben Bedingungen einen deutlichen Effekt der P48A Mutation in TatC auf den Export von TorA. Die TatABC-P48A-Translokase vermag es offensichtlich nicht, genügend TorA zu exportieren, um ein anaerobes Wachstum von *E. coli* GSJ101 auf TMAO-Minimalmedium zu erlauben. Diese komplette Inhibierung des anaeroben Wachstums von *E. coli* GSJ101 mit der TatABC-P48A-Translokase ist somit ein idealer Ausgangspunkt um auf Suppressoren zu selektieren, bei denen durch eine „second site“-Mutation der Tat-inaktivierende Effekt der P48A-Mutation in TatC der Tat-Translokase supprimiert wird und die dadurch ein wiederhergestelltes anaerobes Wachstum auf TMAO-Minimalmedium zeigen. Die TatABC-F94A-Translokase hingegen ist aufgrund des zu starken anaeroben Wachstums des entsprechenden Stammes durch den TorA Export für eine Selektion von „second site“ Suppressormutationen nicht geeignet.

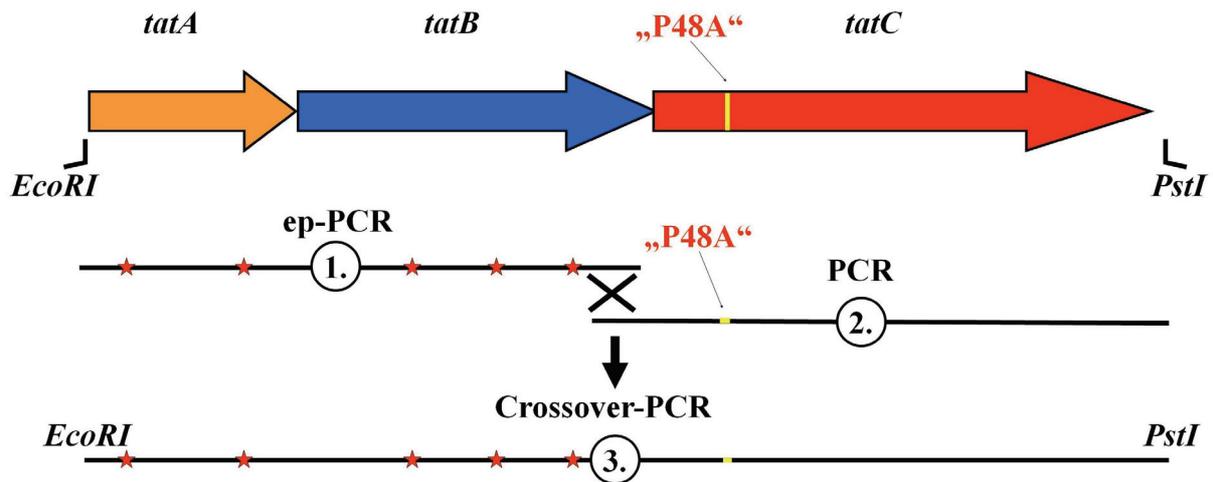
### 3.3 Selektion und Isolierung von Tat-gekoppelten Suppressormutanten der Tat-inaktivierenden Mutation P48A in TatC, bei denen der TorA Export durch „second site“ Suppressormutationen wiederhergestellt ist

Wie bereits in Kapitel III 3 erwähnt, legen die experimentellen Daten von Barrett *et al.* (2005) die Vermutung nahe, dass durch die Tat-inaktivierende Mutation P48A in TatC der Tat-Translokase die Interaktion von TatB und TatC gestört ist. Die TatABC-P48A-Translokase ist somit ein idealer Ausgangspunkt um auf genetischem Wege Hinweise darauf zu bekommen, welche Bereiche von TatB in Kontakt mit TatC stehen. Aus diesem Grund wurde im Folgenden hauptsächlich die Strategie verfolgt, „second site“ Suppressormutationen von P48A (TatC) im TatB-Protein zu isolieren. Hierzu wurden zwei verschiedene Mutagenesestrategien verfolgt, die beide hauptsächlich darauf abzielten, nur *tatA* und *tatB* des *tatABC*-Operons via „error-prone“-PCR zu mutagenisieren und *tatC* weitestgehend zu schützen.

Zum einen wurde das *tatABC*<sup>P48A</sup>-Operon von pTatABC-P48A mittels ungerichtet mutagenisierender „error-prone“ PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt, mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *SexAI* gespalten und in den, mit denselben Restriktionsendonukleasen vorbereiteten pTatABC-P48A Vektor ligiert. Die Präparation des pTatABC-P48A-Plasmides erfolgte hierbei aus dem Dcm-Methylase defizienten *E. coli* Stamm SCS110, da die DNA-Spaltung durch *SexAI* Dcm-methylierungssensitiv ist. *SexAI* spaltet einige Basen vor dem für die Mutation P48A kodierenden Alanin-Kodon, *EcoRI* spaltet vor dem *tatA*-Gen des *tatABC*-Operons in pTatABC-P48A. Auf diese Weise wurde ein mutagenisiertes Fragment, welches *tatA*, *tatB* und die ersten 128 Basen von *tatC* enthält, in den pTatABC-P48A Vektor (bei dem das entsprechende unmutagenisierte Fragment vorher entfernt wurde) ligiert. Durch die Lage der verwendeten Schnittstellen war somit sichergestellt, dass die Tat-Defektmutation P48A erhalten blieb.

In einem zweiten Ansatz wurden ausschließlich nur *tatA* und *tatB* mutagenisiert. Hierzu wurde ein neuer Ansatz gewählt, bei dem die Methode der „error-prone“-PCR (siehe II 4.2.11) mit der Methode der „crossover“-PCR (siehe auch II 4.2.10) kombiniert wurde. Das experimentelle Vorgehen ist in Abbildung 26 schematisch dargestellt.

### III. Ergebnisse



**Abbildung 26:** Schematische Darstellung des kombinierten „error-prone/Crossover“-PCR Ansatzes zur Mutagenese von *tatAB*. Die durch die „error-prone“-PCR entstandenen Basenaustausche sind schematisch durch rote Sterne dargestellt. Weitere Einzelheiten sind dem Text zu entnehmen (Die verwendeten Oligonukleotide sind Tabelle 3 zu entnehmen).

Als Ausgangspunkt wurden zwei verschiedene PCR Ansätze bereitet. In Ansatz 1 wurden *tatA* und *tatB* von pTatABC mittels ungerichtet mutagenisierender „error-prone“-PCR amplifiziert. In Ansatz 2 wurde *tatC* von pTatABC-P48A durch eine PCR amplifiziert, ohne hierbei ungerichtet Fehler einzufügen. Die Primer für beide PCR-Ansätze wurden hierbei so gewählt, dass beide PCR's einen überlappenden Bereich am Ende des *tatB*-Gens aufweisen, welcher dann für die Fusion der beiden Ausgangsfragmente in der „crossover“-PCR genutzt wurde (siehe Abbildung 26; 3). Um hierbei eine möglichst große Variabilität an unterschiedlich mutagenisierten Fragmenten zu erhalten, wurden in der „crossover“-PCR große Mengen beider Fragmente (ca. 1 µg pro Fragment und mehr) eingesetzt. Zudem wurde die PCR (15 Zyklen) zunächst ohne Zugabe von flankierenden Primern durchgeführt (mit 0,4 mM dNTP-Mix). Als Startpunkt für die DNA-Polymerase dienten somit lediglich die überlappenden Bereiche am Ende von *tatB* beider Ausgangsfragmente, die in der „crossover“-PCR „annealen“. Auf diese Weise wurde zunächst jeweils nur ein *tatAB* umfassendes mutagenisiertes Fragment mit einem *tatC* umfassenden unmutagenisierten Fragment fusioniert. Abschließend wurden noch für drei bis vier PCR-Zyklen flankierende Primer zugegeben, um die gebildeten *tatABC* umfassenden Fragmente in einer herkömmlichen PCR weiter zu amplifizieren. Die so erhaltenen *tatA*\**B*\**C*<sup>P48A</sup> Fragmente wurden anschließend aus einem Agarosegel isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *PstI* gespalten. Die Fragmente wurden daraufhin in den ebenfalls durch einen *EcoRI/PstI* Restriktionsverdau vorbereiteten pTatABC-P48A Ausgangsvektor ligiert.

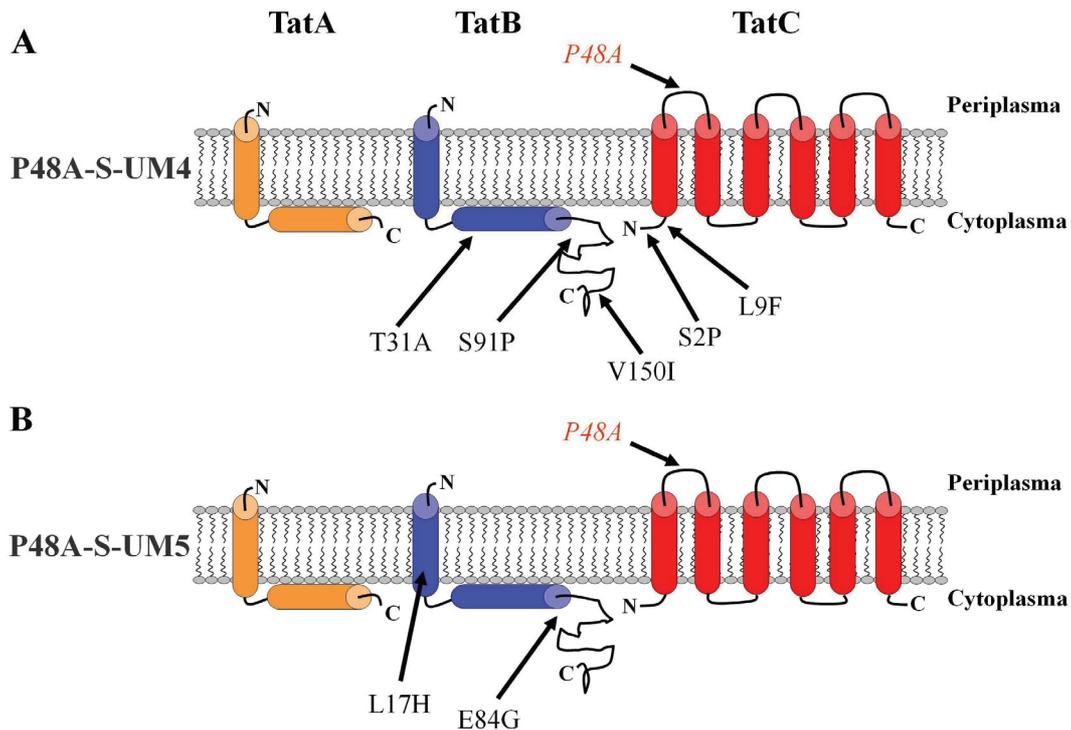
*E. coli* GSJ101 wurde mit den verschiedenen Ligationsansätzen mittels Elektroporation transformiert, auf Minimalmedium mit TMAO als terminalen Elektronenakzeptor ausplattiert und unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Da TorA seinen Molybdenum-Cofaktor im Cytoplasma aufnehmen muss um eine aktive Form anzunehmen, und somit nur vollständig gefaltet mit eingebautem Cofaktor über den Tat-Weg exportiert werden kann, handelt es sich bei allen Kolonien, die unter diesen Bedingungen gewachsen sind, um Klone die TorA Tat-abhängig wieder exportieren.

Nach ca. 5 bis 6 Tagen konnten insgesamt sieben unabhängige Klone isoliert werden, bei denen sich in nachfolgenden Experimenten herausstellte, dass das anaerobe Wachstum auf Minimalmedium mit TMAO als terminalen Elektronenakzeptor an die Gegenwart der mutierten pTatABC-Plasmide gekoppelt ist. Zwei dieser Ursprungsmutanten wurden im Folgenden ausgewählt und zur weiteren Charakterisierung herangezogen. Hierbei wurde je eine Ursprungsmutante aus den beiden unterschiedlichen Mutagenese-Ansätzen gewählt. Die beiden Ursprungssuppressoren wurden mit P48A-S-UM4 (erste Mutagenese, welche *tatA*, *tatB* und die ersten 128 Basen von *tatC* umfasste) und P48A-S-UM5 (zweite Mutagenese, welche nur *tatA* und *tatB* umfasste) benannt (P48A-S für P48A-Suppressortranslokase, UM für Ursprungsmutante).

### **3.4 Identifizierung der Mutationsorte in den P48A-Suppressortranslokalen P48A-S-UM4 und P48A-S-UM5, und Bestimmung der für die Suppression verantwortlichen Mutationen**

Zur Identifizierung der Aminosäureaustausche in den P48A-Suppressortranslokalen P48A-S-UM4 und P48A-S-UM5 wurden die *tat*-Gene auf den Plasmiden pTatABC- P48A-S-UM5, pTatABC-P48A-S-UM5 sequenziert. In Abbildung 27 sind die Aminosäureaustausche beider Suppressoren, eingeordnet in das Topologie-Model der Tat-Proteine, dargestellt. Bei P48A-S-UM4 ist zu sehen, dass neben der Mutation P48A in TatC fünf Aminosäureaustausche gefunden wurden, die in den Tat-Proteinen durch die ungerichtete Mutagenese entstanden sind (Abbildung 27 A), bei P48A-S-UM5 wurden zwei Austausche zusätzlich zu P48A (TatC) gefunden (Abbildung 27 B).

### III. Ergebnisse



**Abbildung 27: Topologische Darstellung der Tat-Proteine mit eingezeichneten Aminosäureaustauschen in den P48A-Ursprungssuppressortranslokasen. A) P48A-S-UM4, B) P48A-S-UM5.**

Zunächst wurde festgestellt, welche der durch die Mutagenese entstandenen Mutationen für die Suppression der Tat-inaktivierenden Wirkung der Mutation P48A (TatC) in der P48A-S-UM4- und in der P48A-S-UM5-Translokase verantwortlich sind. Für die P48A-S-UM4-Suppressortranslokase wurde hier zunächst die Mutationen V150I in TatB als Suppressormutation ausgeschlossen. V150I liegt weit im C-terminalen Bereich des TatB-Proteins, von dem durch Studien an verkürzten TatB-Varianten gezeigt werden konnte, dass selbst bei einer Verkürzung von TatB auf 141 Aminosäuren die Effizienz der Tat-abhängigen Proteintranslokation nahezu nicht beeinflusst ist (Lee *et al.*, 2002). Somit wurden die Austausche T31A und S91P in TatB sowie S2P und L9F in TatC einzeln, zusätzlich zur Mutation P48A, in die Tat-Translokase eingefügt. Die so konstruierten Plasmide pTatABC-P48A-S-T31A(B), pTatABC-P48A-S-S91P(B), pTatABC-P48A-S-S2P(C) und pTatABC-P48A-S-L9F(C) wurden verwendet um *E. coli* GSJ101, welcher bereits das pTorA-MalE-Plasmid enthielt, zu transformieren. Die Überprüfung der Phänotypen dieser Stämme auf MacConkey-Agar mit Maltose ergab, dass nur die Stämme, bei denen die Tat-Translokase neben der P48A (TatC) Mutation die Mutation S91P in TatB [P48A-S-S91P(B)] oder die Mutation L9F in TatC [P48A-S-L9F(C)] beinhalteten, eine Rotfärbung zeigten, die stärker war als die Rotfärbung des Stammes mit der TatABC-P48A-Translokase (Die

Experimentellen Daten für den Stamm mit der P48A-S-S91P(B) bzw. den Stamm mit der P48A-S-L9F(C)-Suppressortranslokase sind in Kapitel III 3.5.2.1 gezeigt; die Daten für den Stamm mit der P48A-S-T31A(B)- bzw. den Stamm mit der pTatABC-P48A-S-S2P(C)-Translokase sind nicht gezeigt). Im Folgenden wurden sowohl die P48A-S-S91P(B) als auch die P48A-S-L9F(C)-Suppressortranslokase zur weiteren Charakterisierung herangezogen. Zudem wurde eine Tat-Translokase konstruiert, die neben P48A (TatC) sowohl die Mutation S91P (TatB) als auch die Mutation L9F (TatC) enthielt [P48A-S-S91P(B)/L9F(C)].

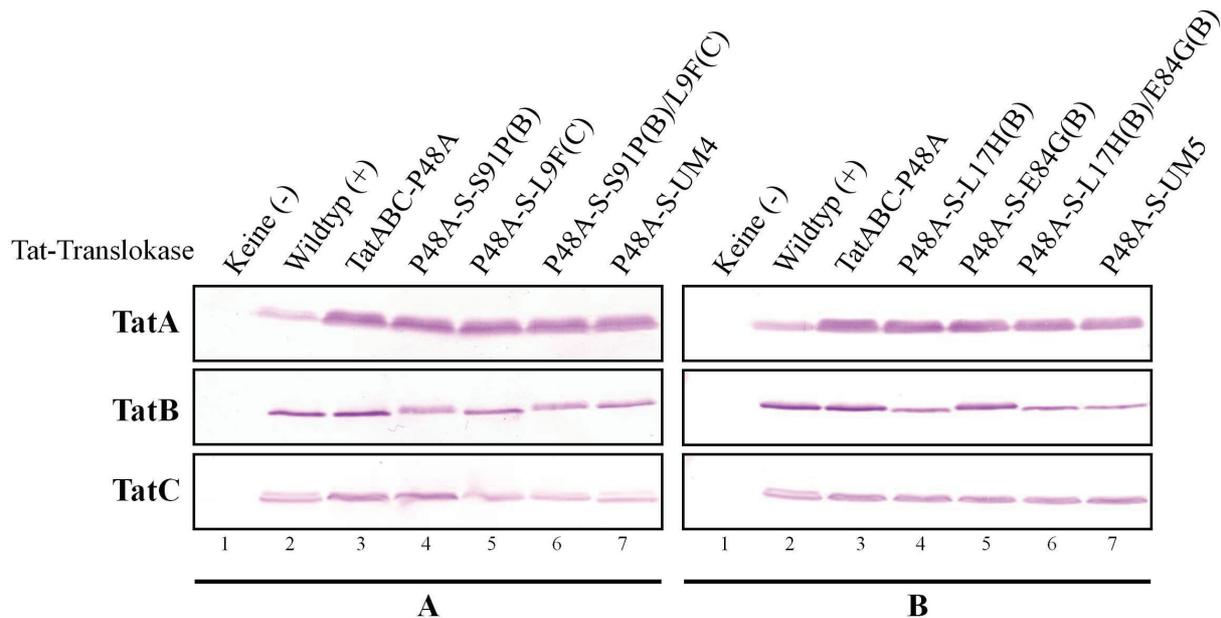
Im Fall der P48A-S-UM5 Ursprungssuppressortranslokase wurden zwei Aminosäureaustausche im TatB-Protein gefunden. Sowohl die Mutation L17H als auch die Mutation E84G wurden einzeln, zusätzlich zur Mutation P48A im TatC-Protein, in die Tat-Translokase eingefügt. *E. coli* GSJ101, welcher bereits das pTorA-MalE-Plasmid enthielt, wurde mit den durch die ortsgerichtete Mutagenese entstandenen Plasmiden pTatABC-P48A-S-L17H(B) und pTatABC-P48A-S-E84G(B) transformiert. Hier zeigte die Überprüfung der Phänotypen dieser Stämme auf MacConkey-Agar mit Maltose, dass sowohl der Stamm, der neben der Tat-inaktivierenden P48A Mutation (TatC) die Mutation L17H in TatB enthält [P48A-S-L17H(B)], als auch der Stamm der zusätzlich zur Mutation P48A (TatC) die Mutation E84G (TatB) in der Tat-Translokase enthält [P48A-S-E84G(B)], eine stärkere Rotfärbung zeigten, als der Stamm, der nur die P48A (TatC) Mutation in der Tat-Translokase enthält [TatABC-P48A] (Die Experimentellen Daten sind in Kapitel III 3.5.2.1 gezeigt). Im Folgenden wurden auch hier die P48A-S-L17H(B), die P48A-S-E84G(B)-Suppressortranslokase als auch eine Tat-Translokase, die neben P48A (TatC) sowohl die Mutation L17H (TatB) als auch die Mutation E84G (TatB) enthält [P48A-S-L17H(B)/E84G(B)], zusammen mit der P48A-S-UM5-Ursprungssuppressortranslokase zur weiteren Charakterisierung herangezogen. Hierbei ist zu erwähnen, dass die P48A-S-L17H(B)/E84G(B)-Suppressortranslokase und die P48A-S-UM5-Ursprungssuppressortranslokase exakt dieselben Aminosäureaustausche beinhalten, und somit auf Proteinebene identisch sind.

### **3.5 Charakterisierung der Suppressortranslokasen der Tat-inaktivierenden Mutation P48A in TatC**

Im Folgenden wurden die in III 3.4 ausgewählten, sogenannten P48A-Suppressortranslokasen eingehend charakterisiert. Alle Tat-Translokasen wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit den TorA-MalE-Reporter und das authentische TorA-Protein zu exportieren untersucht. Hierfür wurden sowohl die Phänotypen der entsprechenden Stämme auf MacConkey-Agar mit Maltose als auch das anaerobe Wachstum der Stämme auf TMAO-Minimalmedium betrachtet. Zudem wurde der Export des TorA-MalE Reporters in den Stämmen mit den P48A-Suppressortranslokasen auch direkt auf Proteinebene betrachtet. Zunächst wurde jedoch überprüft, ob die Menge der Plasmid-kodierten Tat-Proteine TatA, TatB und TatC in der Cytoplasmamembran der Stämme mit den P48A-Suppressortranslokasen durch die eingefügten Mutationen beeinflusst wird.

#### **3.5.1 Vergleich der Tat-Proteinmengen in der Cytoplasmamembran von *E. coli* GSJ101 mit der TatABC-Translokase, der TatABC-P48A-Translokase und den P48A-Suppressortranslokasen**

Zu Beginn der Charakterisierung der P48A-Suppressortranslokasen wurde überprüft, ob durch die vorhandenen Aminosäureaustausche in den P48A-Suppressortranslokasen die Menge der Tat-Proteine in der *E. coli* Cytoplasmamembran beeinflusst wird. Hierdurch sollte untersucht werden, ob die Suppression der Tat-inaktivierenden Mutation P48A (TatC) auf eine erhöhte Menge der Tat-Proteine zurückzuführen ist, oder ob die Suppression auf einem direkten Effekt der jeweiligen Mutation(en) zurückzuführen ist. Hierzu wurden die Tat-Proteinmengen in der Cytoplasmamembran von *E. coli* GSJ101 mit den verschiedenen P48A-Suppressortranslokasen mittels spezifischer Antikörper gegen TatA, TatB und TatC überprüft. Die verschiedenen Tat-Translokasen lagen hierbei Plasmid-kodiert vor. Als Negativkontrolle diente derselbe Stamm mit dem pHSG575-Leervektor. Alle Stämme exprimierten zusätzlich den Plasmid-kodierten TorA-MalE-Reporter.



**Abbildung 28: Vergleich der Tat-Proteinmengen der TatABC-Translokase, der TatABC-P48A-Translokase und der P48A-Suppressortranslokasen.** Zum Vergleich der Tat-Proteinmengen wurden eine Membranpräparationen der einzelnen Stämme, wie in Kapitel II 5.3 beschrieben, durchgeführt. Der Proteingehalt der Membranfraktion wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Es wurden jeweils 10 µg Protein über SDS-Page aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran via „Western“-Blot übertragen. Die Tat-Proteine wurden mit spezifischen Peptid-Antisera gegen TatA, TatB und TatC nachgewiesen. Alle Stämme exprimierten den Plasmid-kodierten TorA-Male-Reporter (pTorA-Male) und eine Plasmid-kodierte Tat-Translokase (pTatABC bzw. die Plasmide, welche für die Suppressortranslokasen kodieren) oder sie enthielten den Leervektor [pLV; Negativkontrolle; (-)]. **A:** Spur 1: pLV; Spur 2: pTatABC; Spur 3: pTatABC-P48A; Spur 4: pTatABC-P48A-S-S91P(B); Spur 5: pTatABC-P48A-S-L9F(C); Spur 6: pTatABC-P48A-S-S91P(B)/L9F(C); Spur 7: pTatABC-P48A-S-UM4; **B:** Spur 1: pLV; Spur 2: pTatABC; Spur 3: pTatABC-P48A; Spur 4: pTatABC-P48A-S-L17H(B); Spur 5: pTatABC-P48A-S-E84G(B); Spur 6: pTatABC-P48A-S-L17H(B)/E84G(B); Spur 7: pTatABC-P48A-S-UM5.

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, fällt generell auf, dass bei allen Tat-Translokasen, welche die Tat inaktivierende Mutation P48A in TatC beinhalten, die Menge an TatA deutlich erhöht ist, wenn man sie mit der Menge an TatA der jeweiligen Positivkontrolle vergleicht (Abb. 28 A und B, Vergleiche jeweils Spur 2 mit Spur 3 bis 7). Jedoch ist die Menge an TatA bei den Stämmen mit den P48A-Suppressortranslokasen im Vergleich zum Stamm, der nur die Tat-inaktivierende Mutation P48A in der Translokase beinhaltet (TatABC-P48A), nicht erhöht (Abb. 28 A und B, vergleiche jeweils Spur 3 mit Spur 4 bis 7). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Suppression der Tat-inaktivierenden Mutation P48A (TatC) in den P48A-Suppressortranslokasen durch die erhöhte TatA-Menge bedingt ist. Bei den Stämmen mit den P48A-Suppressortranslokasen, welche der Ursprungssuppressortranslokase P48A-S-UM4 entstammen, ist in Abb. 28 A zu sehen, dass bei den Stämmen welche die Mutation S91P in

### III. Ergebnisse

TatB der Tat-Translokase beinhalten, TatB mit einer etwas geringeren Mobilität im „Western“-Blot zu detektieren ist (Abb. 28 A Spur 4, 6 und 7), jedoch ist die Menge an TatB nicht signifikant verändert ist. Bei den Stämmen, welche die Mutation L9F in TatC in der Tat-Translokase beinhalten, ist die TatC Menge leicht reduziert (Abb. 28 A, Spur 5, 6 und 7). Der Stamm mit der P48A-S-UM4 Suppressortranslokase mit den multiplen Aminosäureaustauschen zeigt keinerlei Unterschied in den Tat-Proteinmengen im Vergleich zum Stamm mit der P48A-S-S91P(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase, welche die Mutationen S91P (TatB), L9F (TatC) und P48A (TatC) enthält, so dass davon ausgegangen werden kann, dass keiner der anderen Aminosäureaustausche in P48A-S-UM4 [T31A (TatB), V150I (TatB) und S2P (TatC)] die Tat-Proteinmengen in der P48A-S-UM4-Suppressortranslokase beeinflusst.

Bei den Stämmen mit den P48A-Suppressortranslokasen, welche der Ursprungssuppressortranslokase P48A-S-UM5 entstammen ist zu sehen, dass die Stämme, welche die Mutation L17H in TatB beinhalten, eine etwas verringerte TatB-Menge zeigen (Abb. 28 B, vergleiche Spur 2 mit Spur 4, 6 und 7). Die Mutation E84G (TatB) beeinflusst die TatB Menge hingegen nicht, da der Stamm, der neben der Mutation P48A (TatC) nur die Mutation E84G beinhaltet [P48A-S-E84G(B)], keine verringerte TatB-Menge zeigt, wenn man diese mit der Positivkontrolle oder dem Stamm mit der TatABC-P48A-Translokase vergleicht (Abb. 28 B, vergleiche Spur 2 und 3 mit Spur 5).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass keiner der Aminosäureaustausche in den Tat-Proteinen der P48A-Suppressortranslokasen zu einer erhöhten Menge der Tat-Proteine im Vergleich zu der Menge der Tat-Proteine des Stammes mit der TatABC-P48A-Translokase führt. Eine Suppression der Tat-inaktivierenden Wirkung der Mutation P48A (TatC) durch eine gesteigerte Tat-Proteinmenge ist somit auszuschließen.

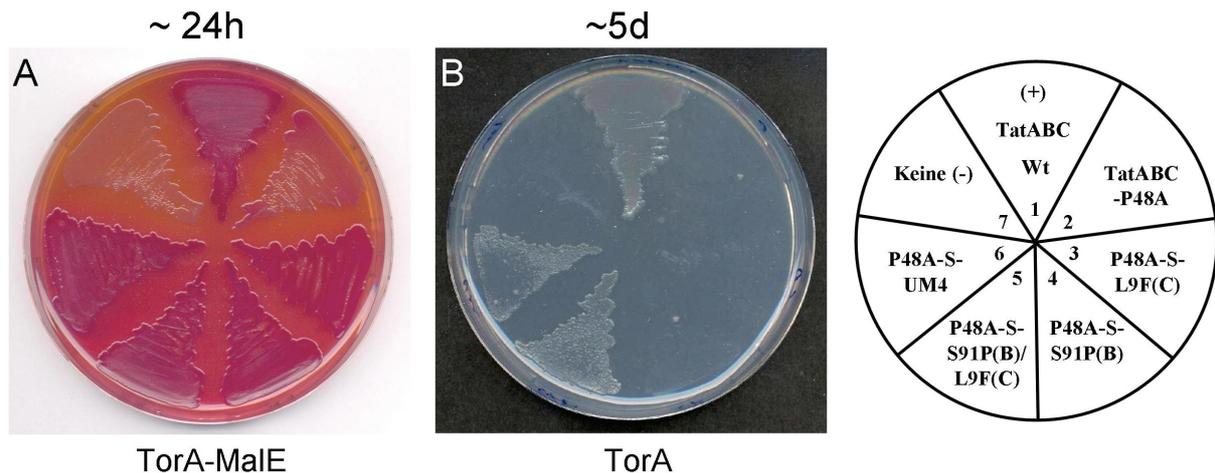
### **3.5.2 Genetische Hinweise auf Bereiche in TatB und in TatC die an der Interaktion von TatB und TatC im TatBC-Rezeptorkomplex beteiligt sind**

Nach Überprüfung der Tat-Proteinmengen in der Cytoplasmamembran der P48A-Suppressortranslokasen wurde im Folgenden die supprimierende Wirkung der einzeln und paarweise eingefügten P48A-Suppressormutationen in den P48A-Suppressortranslokasen auf die Tat-inaktivierende Wirkung der Mutation P48A (TatC) untersucht und mit der Suppression durch die P48A-Ursprungssuppressoren verglichen. Hierzu wurde zunächst der Export des TorA-MalE-Reporters und des authentischen TorA anhand der Phänotypen der entsprechenden Stämme auf MacConkey-Agar mit Maltose bzw. anhand des anaeroben Wachstums der entsprechenden Stämme auf TMAO-Minimalmedium betrachtet. Zudem wurde der Export des TorA-MalE-Reporters auch direkt auf Proteinebene untersucht.

#### **3.5.2.1 Sowohl in der P48A-S-UM4- als auch in der P48A-S-UM5-Ursprungssuppressortranslokase ist die volle Suppression jeweils durch die Kombination von zwei P48A-Suppressormutationen bedingt**

Im Folgenden wurde der Tat-abhängige Export des TorA-MalE Reporters und des authentischen TorA durch die P48A-Suppressortranslokasen in *E. coli* GSJ101 im Vergleich zum Export durch die P48A-Ursprungssuppressortranslokasen und die TatABC-P48A-Translokase untersucht. Die verschiedenen Tat-Translokasen lagen hierbei Plasmid-kodiert vor (pTatABC bzw. die Plasmide, die für mutierten Tat-Translokasen kodieren). Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit der unveränderten Tat-Translokase. Als Negativkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit dem pHSG575 Leervektor (pLV).

### III. Ergebnisse



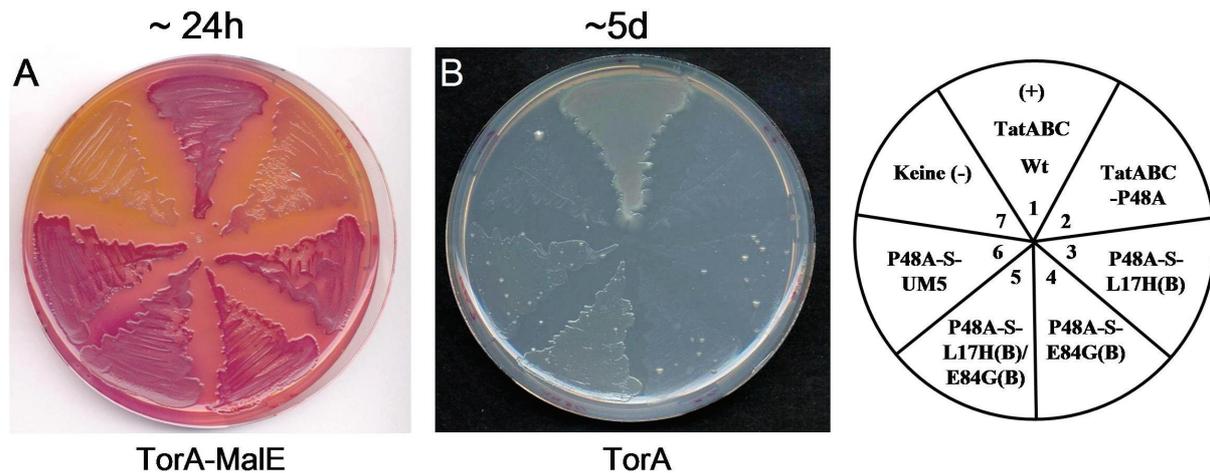
**Abbildung 29: Untersuchung des Tat-abhängigen Exports des TorA-Male-Reporters und des authentischen TorA durch die P48A-Suppressortranslokasen, welche der P48A-S-UM4-Ursprungssuppressortranslokase entstammen.** A: Phänotyp von *E. coli* GSJ101 mit verschiedenen P48A-Suppressortranslokasen und dem TorA-Male-Reporter auf MacConkey-Agar mit Maltose nach 24h. B: Phänotypen von *E. coli* GSJ101 mit den verschiedenen P48A-Suppressortranslokasen auf TMAO-Minimalmedium unter anaeroben Bedingungen nach 5 Tagen. Alle Stämme exprimierten eine Plasmid-kodierte Tat-Translokase (pTatABC bzw. die Plasmide, die für die mutierten Tat-Translokasen kodieren) oder den pHSG575 Leervektor (pLV). Sektor 1: pTatABC (Positivkontrolle); Sektor 2: pTatABC-P48A; Sektor 3: pTatABC-P48A-S-L9F(C); Sektor 4: pTatABC-P48A-S-S91P(B); Sektor 5: pTatABC-P48A-S-S91P(B)/L9F(C); Sektor 6: pTatABC-P48A-S-UM4; Sektor 7: pLV (Negativkontrolle). In A) exprimierten die Stämme zusätzlich den Plasmid-kodierten TorA-Male-Reporter (pTorA-Male).

Die Tat-Translokasen sind auf der rechten Seite aufgeführt. Das jeweils betrachtete Tat-abhängige Reporterprotein ist unterhalb des jeweiligen Bildes aufgeführt [(+) = Positivkontrolle; (-) = Negativkontrolle].

Bei der Untersuchung des TorA-Male-Exports in den Stämmen mit den P48A-Suppressortranslokasen, welche der P48A-S-UM4-Translokase entstammen, ist in Abb. 29 A zu sehen, dass sowohl der Stamm mit der P48A-S-S91P(B)- als auch der Stamm mit der P48A-S-L9F(C)-Suppressortranslokase eine deutliche Steigerung Exports anhand der Rotfärbung der Zellen auf MacConkey-Agar, im Vergleich zum Export des Stammes, welcher nur die Mutation P48A in TatC der Tat-Translokase beinhaltet (TatABC-P48A), zeigen (Abb. 29 A, vergleiche Sektor 2 mit 4 und 3). Auch beim Stamm mit der P48A-S-S91P(B)/L9F(C)-Translokase, in der die beiden Mutationen S91P (TatB) und L9F (TatC) gemeinsam mit P48A (TatC) vorliegen und beim Stamm mit der P48A-S-UM4-Ursprungssuppressortranslokase ist eine starke Rotfärbung durch den TorA-Male Export zu erkennen. Eine Steigerung des TorA-Male Exports in diesen Stämmen, im Vergleich zu den Stämmen mit der P48A-S-S91P(B)- bzw. der P48A-S-L9F(C)-Suppressortranslokase, ist aufgrund der bereits starken Rotfärbung dieser Stämme nach 24 h allerdings nicht klar zu erkennen (Abb. 29 A, vergleiche Sektor 4 und 3 mit 5 und 6). Das die Kombination der

Mutationen S91P (TatB) und L9F (TatC) in einer Tat-Translokase zusammen mit P48A (TatC), zu einer Steigerung der Suppression der Tat-inaktivierenden Wirkung von P48A (TatC) führt, ist aber deutlich an den Untersuchungen zum anaeroben Wachstum auf TMAO-Minimalmedium durch den Export des authentischen TorA zu sehen. Sowohl der Stamm mit der P48A-S-S91P(B)- als auch der Stamm mit der P48A-S-L9F(C)-Suppressorstranslokase zeigen kein Wachstum auf TMAO-Minimalmedium nach 5 Tagen (Abb. 29 B, Sektor 4 und 3) und gleichen somit dem Stamm mit der TatABC-P48A-Translokase und der Negativkontrolle (Abb. 29 B Sektor 2 und 7). Nur der Stamm mit der P48A-S-S91P(B)/L9F(C)-Suppressorstranslokase, in der sowohl die Mutationen S91P (TatB) als auch die Mutation L9F (TatC) gemeinsam mit der Tat-inaktivierenden Mutation P48A (TatC) vorliegen, zeigt ein anaerobes Wachstum auf TMAO-Minimalmedium (Abb. 29 B Sektor 5). Dieses Wachstum ist mit dem Wachstum des Stammes vergleichbar, der die P48A-S-UM4-Ursprungssuppressorstranslokase beinhaltet (Abb. 29 B, vergleiche Sektor 5 mit 6). Es kann somit festgehalten werden, dass in der P48A-S-UM4-Ursprungssuppressorstranslokase die Tat-inaktivierende Wirkung der Mutation P48A in TatC durch die Kombination der Mutation S91P in TatB und der Mutation L9F in TatC supprimiert wird. Wobei die Untersuchungen zum Export des TorA-MalE-Reporters zeigen, dass auch die beiden Mutationen S91P (TatB) und L9F (TatC) alleine bereits eine Suppression der Tat-inaktivierenden Wirkung von P48A (TatC) bewirken. Es ist noch zu erwähnen, dass am anaeroben Wachstum des Stammes mit der P48A-S-S91P(B)/L9F(C)-Suppressorstranslokase und dem des Stammes mit der P48A-S-UM4-Ursprungssuppressorstranslokase zu erkennen ist, dass die Tat-inaktivierende Wirkung der Mutation P48A in TatC durch die Suppressor Mutationen nicht vollständig supprimiert wird, da beide Stämme ein geringeres anaerobes Wachstum auf TMAO-Minimalmedium zeigen als die Positivkontrolle (Abb. 29 B, vergleiche Sektor 1 mit 5 und 6).

### III. Ergebnisse



**Abbildung 30: Untersuchung des Tat-abhängigen Exports des TorA-Male-Reporters und des authentischen TorA durch die P48A-Suppressortranslokasen, welche der P48A-S-UM5-Ursprungssuppressortranslokase entstammen.** **A:** Phänotyp von *E. coli* GSJ101 mit verschiedenen P48A-Suppressortranslokasen und dem TorA-Male-Reporter auf MacConkey-Agar mit Maltose nach 24h. **B:** Phänotypen von *E. coli* GSJ101 mit den verschiedenen P48A-Suppressortranslokasen auf TMAO-Minimalmedium unter anaeroben Bedingungen nach 5 Tagen. Alle Stämme exprimierten eine Plasmid-kodierte Tat-Translokase (pTatABC bzw. die Plasmide, die für die mutierten Tat-Translokasen kodieren) oder den pHSG575 Leervektor (pLV). Sektor 1: pTatABC (Positivkontrolle); Sektor 2: pTatABC-P48A; Sektor 3: pTatABC-P48A-S-L17H(B); Sektor 4: pTatABC-P48A-S-E84G(B); Sektor 5: pTatABC-P48A-S-L17H(B)/E84G(B); Sektor 6: pTatABC-P48A-S-UM5; Sektor 7: pLV (Negativkontrolle). In A) exprimierten die Stämme zusätzlich den Plasmid-kodierten TorA-Male-Reporter (pTorA-Male).

Die Tat-Translokasen sind auf der rechten Seite aufgeführt. Das jeweilige betrachtete Tat-abhängige Reporterprotein ist unterhalb des jeweiligen Bildes aufgeführt [(+) = Positivkontrolle; (-) = Negativkontrolle].

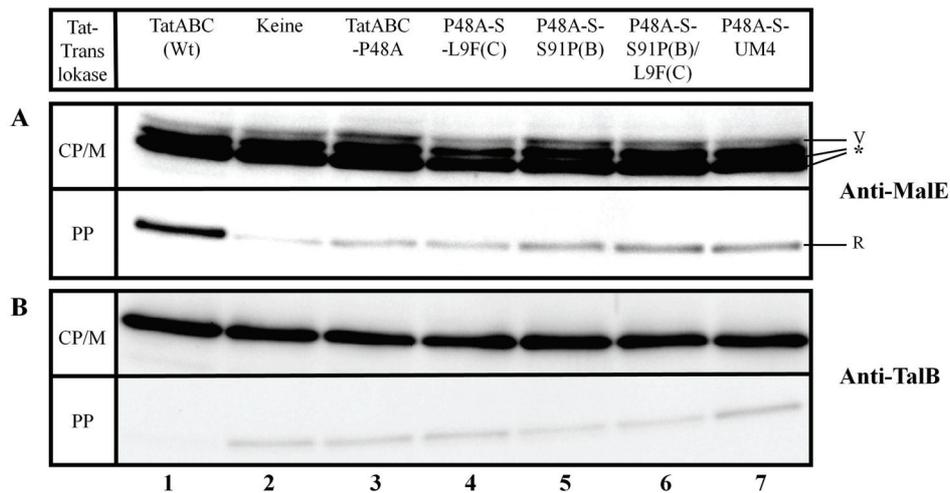
In Abbildung 30 ist anhand der Suppressortranslokasen, welche der P48A-S-UM5-Ursprungssuppressortranslokase entstammen ein ähnlicher Effekt wie bei den Suppressormutationen, welche der P48A-S-UM4-Ursprungssuppressortranslokase entstammen, zu beobachten. In Abb. 30 A ist sowohl bei dem Stamm mit der P48A-S-L17H(B)- als auch bei dem Stamm mit der P48A-S-E84G(B)-Suppressortranslokase eine deutliche Steigerung des TorA-Male Exports im Vergleich zum Stamm mit der TatABC-P48A-Translokase, anhand der starken Rotfärbung der Zellen auf MacConkey-Agar zu erkennen ist (Abb. 30 A, vergleiche Sektor 2 mit 3 und 4). Auch beim Stamm mit der P48A-S-L17H(B)/E84G(B)- und beim Stamm mit der P48A-S-UM5-Ursprungssuppressortranslokase, in denen jeweils sowohl die Mutation L17H (TatB) als auch die Mutation E84G (TatB) zusätzlich zu P48A (TatC) vorliegen, ist eine starke Rotfärbung zu erkennen. Eine Steigerung des TorA-Male Exports bei diesen Stämmen, im Vergleich zu den Stämmen in denen jeweils nur die Mutation L17H (TatB) [P48A-S-L17H(B)] oder E84G (TatB) [P48A-S-E84G(B)] zusätzlich zu P48A (TatC) in der Tat-Translokase vorliegen, ist

allerdings aufgrund der zu starken Rotfärbung der zuletzt genannten Stämme nicht klar zu erkennen (Abb. 30 A, vergleiche Sektor 3 und 4 mit 5 und 6). Dass die Kombination der Mutationen L17H (TatB) und E84G (TatB) zu einer Steigerung der Suppression der Tat-inaktivierenden Wirkung von P48A (TatC) in der P48A-S-L17H(B)/E84G(B)- und der P48A-S-UM5-Ursprungssuppressortranslokase, im Vergleich zur Suppression in der P48A-S-L17H(B)- oder der P48A-S-E84G(B)-Suppressortranslokase führt, zeigt aber das anaerobe Wachstum der entsprechenden Stämme auf TMAO-Minimalmedium. Sowohl bei dem Stamm mit der P48A-S-L17H(B)- als auch bei dem Stamm mit der P48A-S-E84G(B)-Suppressortranslokase reicht der Export des TorA nicht aus, um ein anaerobes Wachstum der Stämme nach 5 Tagen zu bewirken (Abb. 30 B, Sektor 3 und 4). Nur der Stamm mit der P48A-S-L17H(B)/E84G(B)-Suppressortranslokase, zeigt wie der Stamm mit der P48A-S-UM5-Ursprungssuppressortranslokase ein anaerobes Wachstum auf TMAO-Minimalmedium nach 5 Tagen (Abb. 30 B, Sektor 5 und 6). Anhand dieser beiden Stämme ist aber auch zu sehen, dass der Effekt der Tat-inaktivierenden Mutation P48A (TatC), durch die Mutationen L17H (TatB) und E84G (TatB) nicht komplett aufgehoben ist, da beide ein geringeres anaerobes Wachstum auf TMAO-Minimalmedium zeigen, als die Positivkontrolle (Abb. 30 B, vergleiche Sektor 1 mit 5 und 6).

Es bleibt festzuhalten, dass in der P48A-S-UM5-Ursprungssuppressortranslokase die Tat-inaktivierende Wirkung der Mutation P48A in TatC durch die Mutationen L17H (TatB) und E84G (TatB) gemeinsam supprimiert wird. Wobei die Untersuchungen zum Export des TorA-MalE-Reporters zeigen, dass auch beide Mutationen alleine bereits zu einer Suppression der Tat-inaktivierenden Wirkung von P48A (TatC) führen.

#### **3.5.2.2 Die Untersuchung zum Export des TorA-MalE-Reporters durch die P48A-Suppressortranslokasen auf Proteinebene bestätigt, dass in P48A-S-UM4 und in P48A-S-UM5 jeweils beide Suppressormutationen zusammen für die volle Suppression verantwortlich sind**

Im Folgenden wurde die Suppression der Tat-inaktivierenden Wirkung von P48A (TatC) in den P48A-Suppressortranslokasen anhand des Export des TorA-MalE-Reporters in *E. coli* GSJ101 auf Proteinebene untersucht. Es ist vorweg zu erwähnen, dass sich die Fraktionierungen der Stämme ohne Tat-Translokase oder mit einer defekten Tat-Translokase als sehr problematisch darstellten, da diese Stämme eine starke Tendenz zeigten, während des osmotischen Schocks zu lysieren. Ein solcher Effekt ist allerdings bekannt und liegt an einer erhöhten Sensitivität von *E. coli* Stämmen mit einem defekten Tat-abhängigen Proteinexport gegenüber einer EDTA/Lysozym-Behandlung (wie sie während des osmotischen Schocks angewendet wird), im Vergleich zu *E. coli* mit intakter Tat-Translokase (Stanley *et al.*, 2001). Untersucht wurde der Tat-abhängige Export des TorA-MalE-Reporters durch die verschiedenen P48A-Suppressortranslokasen im Vergleich zum Export durch die Tat-ABC-P48A-Translokase in *E. coli* GSJ101. Die entsprechenden Stämme mit den verschiedenen P48A-Suppressortranslokasen und dem TorA-MalE-Reporter wurden wie in Kapitel II 5.4 beschrieben in eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion (CP/M) und in eine Periplasma-Fraktion (PP) getrennt. Der Nachweis der *malE*-Genprodukte erfolgte mit MalE-spezifischen Antikörpern im Western-Blot. Die Qualität der Zellfraktionierung wurde durch den Nachweis des strikt cytoplasmatisch lokalisierten TalB-Proteins überprüft. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit dem TorA-Reporter und der unveränderten Tat-Translokase. Als Negativkontrolle diente *E. coli* GSJ101 mit dem TorA-MalE-Reporter und komplett ohne Tat-Translokase. Der TorA-MalE-Reporter und die verschiedenen Tat-Translokasen lagen hierbei Plasmid-kodiert vor.

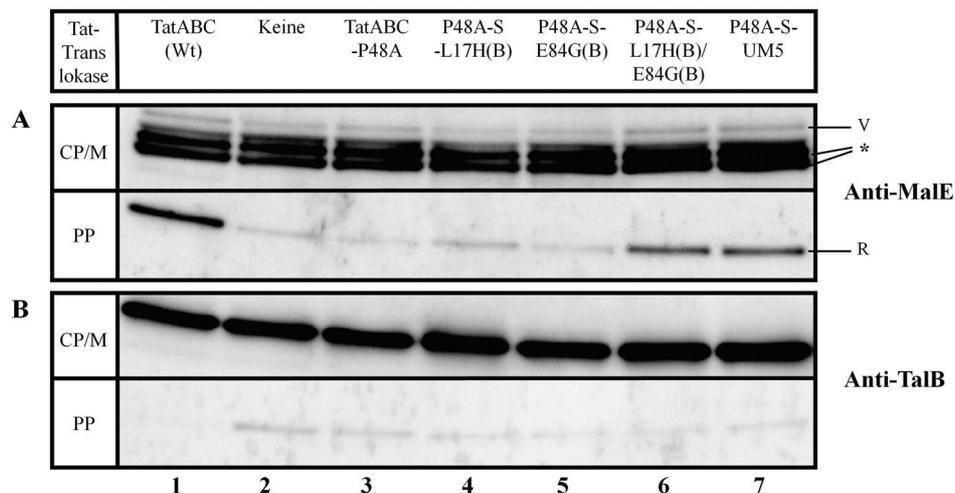


**Abbildung 31: Zellfraktionierung von *E. coli* GSJ101 zur Untersuchung des Exports des TorA-MalE-Reporters durch die P48A-Suppressortranslokasen, welche der P48A-S-UM4-Ursprungssuppressortranslokase entstammen.** Zu sehen sind Proben von *E. coli* GSJ101 mit Plasmid-kodiertem TorA-MalE-Reporter (pTorA-MalE) und den verschiedenen Plasmid-kodierten Tat-Translokasen oder dem pHSG575 Leervektor (pLV). Spur 1: pTatABC (Positivkontrolle); Spur 2: pLV (Negativkontrolle); Spur 3: pTatABC-P48A; Spur 4: pTatABC-P48A-S-L9F(C); Spur 5: pTatABC-P48A-S-S91P(B); Spur 6: pTatABC-P48A-S-S91P(B)/L9F(C); Spur 7: pTatABC-P48A-S-UM4. Die Zellen wurden in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma- und Membranfraktion (CP/M) getrennt. Für die CP/M-Fraktion wurden je 3 µg Protein aufgetragen. Die Menge der PP-Fraktion wurde so berechnet, dass hier jeweils die identische Zellzahl wie in der CP/M-Fraktion zu Grunde lag. **A)** Nachweis der MalE-Polypeptide durch MalE-spezifische Antikörper. Im Periplasma ist die reife Form des MalE zu sehen (R), in der Cytoplasma/Membranfraktion repräsentiert die oberste Bande den unprozessierten TorA-MalE-Vorläufer (V). Bei den beiden darunter liegenden Banden handelt es sich um cytoplasmatische Abbauprodukte (\*). **B)** Nachweis des strikt cytoplasmatisch lokalisierten TalB-Proteins durch TalB-spezifische Antikörper.

Aufgrund der bereits angesprochenen Probleme mit der Lyse der Stämme mit einer defekten Tat-Translokase bzw. ohne Tat-Translokase, war es nicht möglich, die supprimierenden Effekte der einzelnen P48A-Suppressormutationen aus P48A-S-UM4 auf die Tat-inaktivierende Wirkung der Mutation P48A (TatC) klar reproduzierbar auf Proteinebene zu zeigen. Jedoch kann gezeigt werden, dass im Stamm mit der Suppressortranslokase P48A-S-S91P(B)/L9F(C), in der jeweils beide P48A-Suppressormutationen [(S91P (TatB) und L9F (TatC)] aus P48A-S-UM4 in Kombination zusätzlich zu P48A (TatC) vorliegen, eine deutlich erhöhte Menge an reifem MalE im Periplasma zu detektieren ist, wenn man diese mit der MalE-Menge im Periplasma des Stammes mit der TatABC-P48A-Translokase vergleicht (Abb. 31 A, Vergleiche Spur 3 und 6). Auch bei dem Stamm mit der P48A-S-UM4-Ursprungssuppressortranslokase ist eine deutlich erhöhte MalE-Menge im Periplasma im Vergleich zum Stamm mit der TatABC-P48A-Translokase zu detektieren (Abb. 31 A, Vergleiche Spur 3 und 7). Die Menge gleicht auch in etwa der Menge des Stammes mit der

### III. Ergebnisse

P48A-S-S91P(B)/L9F(C)-Suppressorstranslokase, wobei beim Stamm mit P48A-S-UM4 etwas mehr Lyse anhand der TalB-Bande in der PP-Fraktion zu detektieren ist (Abb. 31 B, Spur 7). Sowohl bei der P48A-S-UM4-Ursprungssuppressorstranslokase als auch bei der P48A-S-S91P(B)/L9F(C)-Suppressorstranslokase ist allerdings deutlich weniger reifes MalE im Periplasma sichtbar als bei der Positivkontrolle (Abb. 31 A, vergleiche Spur 1 mit 6 und 7), was zeigt, dass die Tat-inaktivierende Wirkung der Mutation P48A (TatC) durch die beiden Mutationen S91P (TatB) und L9F (TatC) in beiden Tat-Translokasen nicht vollständig aufgehoben wird.



**Abbildung 32: Zellfraktionierung von *E. coli* GSJ101 zur Untersuchung des Exports des TorA-MalE-Reporters durch die P48A-Suppressorstranslokasen, welche der P48A-S-UM5-Ursprungssuppressorstranslokase entstammen.** Zu sehen sind Proben von *E. coli* GSJ101 mit Plasmid-kodiertem TorA-MalE-Reporter (pTorA-MalE) und den verschiedenen Plasmid-kodierten Tat-Translokasen oder dem pHSG575 Leervektor (pLV). Spur 1: pTatABC (Positivkontrolle); Spur 2: pLV (Negativkontrolle); Spur 3: pTatABC-P48A; Spur 4: pTatABC-P48A-S-L17H(B); Spur 5: pTatABC-P48A-S-E84G(B); Spur 6: pTatABC-P48A-S-L17H(B)/E84G(B); Spur 7: pTatABC-P48A-S-UM5. Die Zellen wurden in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma- und Membranfraktion (CP/M) getrennt. Für die CP/M-Fraktion wurden je 3µg Protein aufgetragen. Die Menge der PP-Fraktion wurde so berechnet, dass hier jeweils die identische Zellzahl wie in der CP/M-Fraktion zu Grunde lag. **A)** Nachweis der MalE-Polypeptide durch MalE-spezifische Antikörper. Im Periplasma ist die reife Form des MalE zu sehen (R), in der Cytoplasma/Membranfraktion repräsentiert die oberste Bande den unprozessierten TorA-MalE-Vorläufer (V). Bei den beiden darunter liegenden Banden handelt es sich um cytoplasmatische Abbauprodukte (\*). **B)** Nachweis des strikt cytoplasmatisch lokalisierten TalB-Proteins durch TalB-spezifische Antikörper.

Auch im Fall der P48A-Suppressorstranslokasen, welche der P48A-S-UM5-Ursprungssuppressorstranslokase entstammen, war es, aufgrund der partiellen Lyse der einzelnen Stämme, schwierig eine deutliche Steigerung des TorA-MalE-Exports durch die Suppressorstranslokasen mit den, zusätzlich zur Mutation P48A (TatC), einzeln vorliegenden

Suppressormutationen [L17H (TatB) oder E84G (TatB)] zu zeigen. Deutlich sichtbar ist aber, dass der Stamm mit der P48A-S-L17H(B)/E84G(B)-Suppressortranslokase, in der sowohl die Mutation L17H (TatB) als auch die Mutation E84G (TatB) zusätzlich zur Tat-inaktivierenden Mutation P48A (TatC) gemeinsam vorliegen, wesentlich mehr reifes MalE in der PP-Fraktion aufweist als der Stamm mit der TatABC-P48A-Translokase (Abb. 32 A, vergleiche Spur 3 und 6). Auch der Stamm mit der P48A-S-UM5-Ursprungssuppressortranslokase zeigt eine deutliche Bande an reifem MalE in der PP-Fraktion, die in ihrer Intensität der Bande des Stammes mit der P48A-S-L17H(B)/E84G(B)-Suppressortranslokase gleicht (Abb. 32 A, vergleiche Spur 6 und 7). Allerdings ist anhand der Menge des reifen MalE in der PP-Fraktion sowohl bei dem Stamm mit der P48A-S-L17H(B)/E84G(B)-Suppressortranslokase als auch bei dem Stamm mit der P48A-S-UM5-Ursprungssuppressortranslokase zu sehen, dass beide den TorA-MalE-Reporter nicht so effektiv exportieren wie der Stamm mit der unveränderten Tat-Translokase (Abb. 32 A, vergleiche Spur 1 mit 6 und 7). Somit kann auch hier festgehalten werden, dass die Mutationen L17H (TatB) und E84G (TatB) in der P48A-S-L17H(B)/E84G(B)-Suppressortranslokase die Tat-inaktivierende Wirkung supprimieren, aber den TorA-MalE-Export nicht vollständig wiederherstellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden dass es gelungen ist, Suppressormutationen, bzw. Paare von Suppressormutationen zu selektieren bei denen die Tat-inaktivierende Wirkung der Mutation P48A in TatC zumindest partiell aufgehoben ist. Im Fall von P48A-S-UM4 wird diese Tat-inaktivierende Wirkung durch die Kombination von einer Mutation in TatB (S91P) und einer Mutation in TatC (L9F) supprimiert. Im Fall von P48A-S-UM5 wird die Tat-inaktivierende Wirkung von P48A in TatC sogar ausschließlich, durch zwei Mutationen im TatB-Protein (L17H und E84G) supprimiert. Es ist somit anhand der Mutationen L17H, E84G und S91P gelungen Bereiche in TatB zu identifizieren, die direkt oder indirekt an einer Wechselwirkung mit TatC beteiligt sind. Zudem wurde mit der Mutation L9F eine Mutation in TatC selektiert, welche die Tat-inaktivierende Wirkung von P48A (TatC) supprimiert und somit wohl ebenfalls direkt oder indirekt die Interaktion von TatC und TatB im TatBC-Rezeptorkomplex beeinflusst, wenn man davon ausgeht das die Mutation P48A in TatC eine Störung der Wechselwirkungen zwischen TatB und TatC im TatBC-Rezeptorkomplex hervorruft.



## IV. Diskussion

### 1. Substrat-Translokase-Interaktion während der Tat-abhängigen Proteintranslokation

Zu Beginn dieser Arbeit war über die Substrat-Translokase-Interaktion während der Tat-abhängigen Proteintranslokation bekannt, dass der erste Kontakt des Substrats zur Tat-Translokase am TatBC-Rezeptorkomplex stattfindet (Cline und Mori, 2001; Alami *et al.*, 2003). Durch biochemische *in vitro* Untersuchungen konnte hier gezeigt werden, dass ein Tat-Signalpeptid im Bereich des Tat-Konsensus-Motivs in Abhängigkeit des Zwillingsarginins zuerst an TatC und später an TatB bindet (Alami *et al.*, 2003). Zudem kommt TatB auch in Kontakt zu der h-Region des Tat-Signalpeptides (Alami *et al.*, 2003). Über die genauen Bereiche in TatC und in TatB, die an der Erkennung/Bindung von Tat-Signalpeptiden beteiligt sind, gab es keine publizierten Daten. Hierzu standen aber die damals noch unpublizierten Daten unserer Arbeitsgruppe aus Kreutzenbeck *et al.* (2007) zur Verfügung. Hier war es gelungen Bereiche in der Tat-Translokase zu kartieren, welche an der Bindung von Tat-Signalpeptiden beteiligt sind. Hierbei wurden ausgehend von einem TorA-MalE-Reporter, der aufgrund des Austauschs des Zwillingsarginins zu Lysin-Glutamin (RR→KQ) im TorA-Signalpeptid exportdefekt ist, Tat-gekoppelte Suppressormutanten selektiert, die den ursprünglich exportdefekten TorA-MalE-Reporter aufgrund von Suppressormutationen in den Tat-Proteinen wieder exportieren. Das experimentelle Vorgehen ist in Kapitel III 1.2 detailliert aufgeführt. Die Daten von Kreutzenbeck *et al.* (2007) zeigten, dass vor allem der N-Terminus von TatC an der Bindung/Erkennung von Tat-Signalpeptiden beteiligt ist. Anhand einer Suppressormutation im TatB N-Terminus konnte ebenfalls gezeigt werden, dass auch TatB bei der Bindung/Erkennung von Tat-Signalpeptiden eine Rolle spielt. Das hauptsächliche Ziel der vorliegenden Arbeit war es, unter Verwendung desselben experimentellen Ansatzes wie er in Kreutzenbeck *et al.* (2007) angewandt wurde, die Bereiche in der Tat-Translokase, welche an der Bindung/Erkennung von Tat-Signalpeptiden beteiligt sind, weiter und eingehender zu kartieren. Hierbei sollten diese Bereiche der Tat-Translokase, ausgehend von einer anderen Position im Tat-Signalpeptid als dem Zwillingsarginin, untersucht werden. Da davon auszugehen war, dass sowohl auf Seiten des Tat-Signalpeptids als auch auf Seiten der Tat-Translokase mehrere Reste an der gegenseitigen Bindung beteiligt sind, sollte durch die Verwendung eines zweiten „targets“ im Tat-

## IV. Diskussion

Signalpeptid ein umfassenderes Wissen darüber gewonnen werden, welche Bereiche in den Tat-Proteinen an der Bindung von Tat-Signalpeptiden beteiligt sind.

### **1.1 Die Aminosäure an der Phenylalanin-Position im Tat-Konsensus-Motiv kann eine kritische Determinante für die Funktionalität des TorA-Signalpeptides darstellen**

Die wichtigste Voraussetzung für die Selektion von Tat-gekoppelten Suppressormutanten ist die Herstellung eines TorA-MalE-Reporters, der aufgrund eines Aminosäureaustauschs im Tat-Signalpeptid exportdefekt ist. Bei der Auswahl der Aminosäure, die zu diesem Zweck verändert werden sollte, wurde auf die Daten von Stanley *et al.* (2000) zurückgegriffen. In dieser Arbeit wurden alle Aminosäuren des Tat-Konsensus-Motivs im Tat-Signalpeptid des authentischen *E. coli* Tat-Substrates SufI mutagenisiert. Anschließend wurde die Exportkinetik jedes dieser SufI-Muteine betrachtet. Die einzige Tat-Konsensus-Aminosäure, bei der bei mehreren Austauschen größere negative Einflüsse auf die Exportkinetik von SufI zu beobachten waren, war das Phenylalanin, zwei Positionen C-terminal vom zweiten Arginin im Tat-Konsensus-Motiv. Dieses Phenylalanin ist nach den beiden Argininen auch die Aminosäure im Tat-Konsensus-Motiv, welche am höchsten konserviert ist (Stanley *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb das Phenylalanin im TorA-Signalpeptid des TorA-MalE-Reporters gewählt, um es gegen verschiedene Aminosäuren auszutauschen, um dann anschließend die Auswirkung der neu platzierten Aminosäure auf die Exporteffizienz des entsprechenden TorA-MalE-Reporters zu betrachten. In der Studie von Stanley *et al.* (2000) führte der Austausch des Phenylalanins im SufI Signalpeptid gegen weniger hydrophobe Aminosäuren wie Alanin oder Tyrosin bereits zu einer deutlichen Verringerung der Prozessierungskinetik von SufI, nur bei der Platzierung von einer ebenfalls sehr hydrophoben Aminosäure wie Leucin war nahezu keine Beeinflussung der Prozessierungskinetik dieser SufI-Variante zu beobachten. Die Autoren spekulieren hierbei, dass es wahrscheinlich die hohe Hydrophobizität ist, welche an dieser Konsensus-Position die wichtige Determinante in einem Tat-Signalpeptid ist.

Ausgehend von den Daten von Stanley *et al.* (2000) wurde das Phenylalanin im Tat-Konsensus-Motiv des TorA-Signalpeptids in der vorliegenden Arbeit gerichtet nur gegen hydrophile Aminosäuren ausgetauscht, zudem wurden verschiedene Ladungen an dieser Position platziert. Hierzu wurde das Konsensus-Phenylalanin gegen das neutrale Serin, das

positiv geladene Arginin und das negativ geladene Aspartat ausgetauscht. Der Austausch des Phenylalanins gegen Serin und gegen Arginin hatte nahezu keinen Einfluss auf die Exporteffizienz des TorA-MalE-Reporters, im Vergleich zum Tat-abhängigen Export des unveränderten TorA-MalE-Reporters (siehe III 2.1.1). Überraschenderweise führte der Austausch gegen das negativ geladene Aspartat aber zu einem kompletten Block der Tat-abhängigen Proteintranslokation des TorA-MalE-Reporters, wie anhand der sehr sensitiven MacConkey-Agar bzw. Maltose-Minimalmedium Plattentests sowie auch auf Proteinebene gezeigt werden konnte (siehe III 2.1.1). Die Daten zum Austausch des Konsensus-Phenylalanins im TorA-Signalpeptid aus der vorliegenden Arbeit zeigen, dass an der Phenylalanin-Position im Tat-Konsensus-Motiv des TorA-Signalpeptides sehr wohl auch verschiedene hydrophile Aminosäuren toleriert werden können, ohne dass diese einen größeren negativen Einfluss auf die Exporteffizienz des Substrates haben müssen. Daraus folgt, dass zumindest im TorA-Signalpeptid eine hydrophobe Aminosäure an dieser Tat-Konsensus-Position per se kein erforderliches Kriterium für eine hohe Exporteffizienz des TorA-MalE-Reporters ist. Das aber die Platzierung von Aspartat an dieser Tat-Konsensus-Position zu einem kompletten Block der Tat-abhängigen Proteintranslokation von TorA-MalE führt, zeigt aber auch, dass nicht jede Aminosäure an dieser Tat-Konsensus-Position im TorA-Signalpeptid toleriert wird. Die Aminosäure an der Position des Phenylalanins im Tat-Konsensus-Motiv des TorA-Signalpeptids kann somit eine kritische Determinante für den Tat-abhängigen Export des TorA-MalE-Reporters darstellen.

Zuletzt wurden diese Daten durch die Arbeit von Mendel *et al.* (2008) bestätigt. Hier wurde die Auswirkung von verschiedenen Aminosäuren an der Phenylalanin Konsensus-Position im TorA- und im DmsA- (Dimethylsulfoxid-Reduktase) Signalpeptid (im DmsA Signalpeptid befindet sich an der Phenylalanin-Konsensus-Position ein Leucin), welche an das grün fluoreszierende Protein (GFP) fusioniert waren, auf den Export der entsprechenden TorA-GFP- bzw. DmsA-GFP-Reporter in *E. coli* untersucht. Auch hier zeigte sich, dass das negativ geladene, hydrophile Aspartat an dieser Konsensus-Position in beiden Fällen nicht toleriert wird und die entsprechenden Reporter nicht exportiert werden.

Nimmt man die gesamten Literaturdaten, die sich mit den Auswirkungen von Aminosäuren an der Konsensus-Phenylalanin-Position auf die Exporteffizienz verschiedener Tat-Substrate beschäftigen zusammen, so zeigt sich, dass die Auswirkung der jeweiligen Aminosäuren an dieser Position nicht nur von der Aminosäure selber, sondern auch vom jeweiligen Tat-Signalpeptid abhängt. Beispielsweise hat die Platzierung von Serin an der Phenylalanin-Konsensus-Position in der vorliegenden Arbeit keinen großen Effekt auf die Exporteffizienz

#### IV. Diskussion

des TorA-MalE-Reporters. Platziert man aber Serin an der Phenylalanin-Konsensus-Position des Tat-Signalpeptids der Xylanase C aus *Streptomyces lividans*, so führt dies in *S. lividans* zu einer starken Reduzierung der Tat-abhängigen Sekretion der Xylanase C in den Kulturüberstand (Li *et al.*, 2006). Ein noch drastischeres Beispiel ist die Platzierung von Alanin an der Phenylalanin-Konsensus-Position im Tat-Signalpeptid von verschiedenen Tat-Substraten. Platziert man Alanin im TorA-Signalpeptid des TorA-GFP-Reporters, so hat dies nahezu keinen Einfluss auf die Exporteffizienz des TorA-GFP-Reporters in *E. coli* (Mendel *et al.*, 2008). Platziert man Alanin aber an der Phenylalanin-Konsensus-Position im Tat-Signalpeptid des authentischen SufI aus *E. coli*, so hat dies einen stark negativen Einfluss auf die Prozessierungskinetik von SufI, wenn man diese mit der Prozessierungskinetik des unveränderten SufI vergleicht (Stanley *et al.*, 2000). Noch schwerwiegender ist die Auswirkung von Alanin, welches an der Phenylalanin-Konsensus-Position im Tat-Signalpeptid des DmsA-GFP-Reporters platziert wurde. Hier führt dieser Austausch sogar zu einem kompletten Block der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *E. coli* (Mendel *et al.*, 2008)

Dieser Überblick verdeutlicht, dass neben der Aminosäure selber, auch die Komposition der anderen Aminosäuren in der Umgebung der Phenylalanin-Konsensus-Position bzw. des restlichen Signalpeptids einen Einfluss darauf hat, ob eine bestimmte Aminosäure an der Phenylalanin-Konsensus-Position einen Einfluss auf die Exporteffizienz des entsprechenden Tat-Substrates hat oder nicht.

Dass die Aminosäure an der Phenylalanin-Position eine wichtige Determinante für die Bindung von Tat-Signalpeptiden an den TatBC-Rezeptorkomplex darstellen kann, zeigt auch eine neuerer Arbeit zum chloroplastidären cpTat-Weg. In den Signalpeptiden der bekannten oder bioinformatisch vorhergesagten Substraten des cp-Tat-Wegs findet sich natürlicherweise äußerst selten ein Phenylalanin zwei Aminosäuren C-Terminal des zweiten Arginins im Tat-Konsensus-Motiv (Gérard und Cline, 2007). Gérard und Cline (2007) konnte zeigen, dass ein Phenylalanin, platziert an dieser Position eines chloroplastidären Tat-Substrats dazu führt, dass dieses Substrat auch in Abwesenheit eines Protonengradienten fest an seine Bindetasche im TatBC-Rezeptorkomplex bindet, während eine solch feste Bindung normalerweise nur in Anwesenheit des Protonengradienten stattfindet.

## 1.2 Die Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[KQ]-Reporters supprimieren auch den Exportdefekt des TorA[F14D]-Reporters

Mit dem TorA[F14D]-MalE-Reporter stand in dieser Arbeit ein idealer Ausgangspunkt zur Verfügung, um neue Suppressormutationen zu selektieren, die speziell den Exportdefekt dieses Reporters supprimieren können. Vor einer Selektion auf neue Suppressormutationen wurde allerdings zunächst untersucht, ob die Suppressormutationen aus Kreutzenbeck *et al.* 2007, die mit Hilfe des exportdefekten TorA[KQ]-MalE-Reporter selektiert wurden (siehe auch III 1.2), auch den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters supprimieren können. Für diese Suppressormutationen konnte bereits gezeigt werden, dass sie nicht dazu führen, dass jetzt Lysin-Glutamin (KQ) anstelle des Zwillingsarginins strikt nach einem Schlüssel-Schloss-Prinzip spezifisch erkannt wird, da alle Suppressortranslokasen immer noch den unveränderten TorA-MalE Reporter mit intaktem Zwillingsarginin als Substrat akzeptieren (Kreutzenbeck *et al.*, 2007). Die Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters durch die Suppressormutationen in den Tat-Proteinen entsteht demnach durch einen stärkeren oder neuen Kontakt der Tat-Translokase zum TorA-Signalpeptid an einer anderen Position des Tat-Signalpeptides als der des Zwillingsarginin. Auf diese Weise wird das Fehlen des Zwillingsarginins im TorA[KQ]-MalE-Reporter kompensiert, die mutierten Tat-Translokasen zeigen somit eine gelockerte Spezifität bei der Tat-Signalpeptid Bindung/Erkennung.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die KQ-Suppressortranslokasen mit den Suppressormutationen L9F (TatC), K18E (TatC), N22I (TatC) oder E8K (TatB) ebenfalls in pleiotroper Weise Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters sind. Hierbei zeigten die Suppressortranslokasen mit den Suppressormutationen L9F, K18E oder N22I im TatC N-Terminus nur eine sehr schwache Suppression, während die Suppressortranslokase mit der Suppressormutation E8K aus dem TatB N-Terminus eine starke Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters bewirkte, die sogar ein größeres Ausmaß hatte als die Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters, mit dem diese Suppressormutation ursprünglich selektiert wurde.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die neue oder verstärkte Bindung, welche die vier verschiedenen KQ-Suppressortranslokasen jeweils mit dem TorA-Signalpeptid eingehen, auf Seiten des Signalpeptids in keinem der Fälle an der Phenylalanin-Konsensus-Position lokalisiert sein kann. In diesem Fall wäre zu erwarten, dass die stärkere Bindung im

## IV. Diskussion

Fall des TorA[F14D]-MalE-Reporters wieder zerstört wird, da hier das Phenylalanin gegen ein Aspartat getauscht ist.

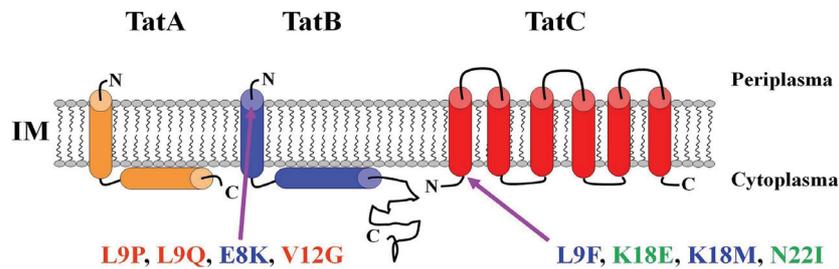
### **1.3 Isolierung und Charakterisierung von Suppressortranslokasen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters**

#### **1.3.1 Die Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters finden sich, wie die Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters, in den N-Termini von TatB und TatC**

In der vorliegenden Arbeit wurden mit dem unter III 2.3 beschriebenen experimentellen Ansatz vier Tat-gekoppelte Mutantentranslokasen, die einen Export des ursprünglich exportdefekten TorA[F14D]-MalE-Reporters wieder zulassen, isoliert und näher untersucht. Hierbei handelt es sich um die Ursprungssuppressortranslokasen SPS-F14D-UM1, SPS-F14D-UM2, SPS-F14D-UM3 und SPS-F14D-UM4, welche alle mehrere Mutationen in den Tat-Proteinen aufweisen.

Als erstes wurden in den Ursprungssuppressortranslokasen die Mutationen ermittelt, die hauptsächlich für die Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters verantwortlich sind. Hierbei ist noch einmal drauf hinzuweisen, dass in SPS-F14D-UM1, SPS-F14D-UM2 und SPS-F14D-UM3 die Mutation L9F (TatC), welche den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters bereits schwach supprimiert, bewusst platziert wurde. Allerdings wurden in SPS-F14D-UM2 und in SPS-F14D-UM4 mit K18E und N22I auch zwei neue, zusätzliche Mutationen im TatC N-Terminus mit dem TorA[F14D]-MalE-Reporter als „target“ selektiert. Beide Mutationen sind bereits als Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters beschrieben (Kreutzenbeck *et al.*, 2007) und für beide konnte in III 2.2 gezeigt werden, dass sie ebenfalls eine schwache Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters bewirken. Außer den Suppressormutationen im TatC N-Terminus fand sich auch in drei der Ursprungssuppressortranslokasen jeweils eine bisher nicht beschriebene Mutation im TatB N-Terminus [L9P (SPS-F14D-UM1), L9Q (SPS-F14D-UM2), V12G (SPS-F14D-UM4)], für die in nachfolgenden Experimenten gezeigt werden konnte, dass sie den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters supprimieren. In allen vier Ursprungssuppressortranslokasen lagen somit jeweils zwei Mutationen vor, die bereits alleine zu einer Suppression des Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters

führen: SPS-F14D-UM1 (TatB: L9P; TatC: L9F), SPS-F14D-UM2 (TatC: L9F, K18E), SPS-F14D-UM3 (TatB: L9Q; TatC: L9F) und SPS-F14D-UM4 (TatB: V12G; TatC: N22I).



**Abbildung 33: Schematische Darstellung der Topologie der Tat-Proteine TatA, TatB und TatC mit der Lage der Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters.** In grün sind die Suppressormutationen dargestellt, die sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in Kreutzenbeck *et al.* (2007) isoliert wurden. In rot sind die Suppressormutationen dargestellt, die ausschließlich in der vorliegenden Arbeit isoliert wurden und in blau die Suppressormutationen, die ausschließlich in Kreutzenbeck *et al.* (2007) isoliert wurden.

Bei Betrachtung der Lage der in der vorliegenden Arbeit isolierten Suppressormutationen (siehe Abb. 33), fällt sehr deutlich auf, dass diese ebenso wie die Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters aus Kreutzenbeck *et al.* (2007) in den N-Termini des TatC- und des TatB-Proteins zu finden sind. Zum einen wird hierdurch die wichtige Rolle des TatC N-Terminus bei der Erkennung/Bindung von Tat-Signalpeptiden bestätigt. Zum anderen wird durch die in der vorliegenden Arbeit gehäuft selektierten Suppressormutationen im TatB N-Terminus (L9P, L9Q und V12G) untermauert, dass auch TatB bei der Erkennung /Bindung von Tat-Signalpeptiden am TatBC-Rezeptorkomplex eine wichtige Rolle spielt.

### 1.3.2 Alle isolierten Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters vermitteln auch einen Export des jeweils anderen exportdefekten TorA-MalE-Reporters

Wie in Kapitel III 2.2 beschrieben, konnte für alle untersuchten Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters gezeigt werden, dass diese auch den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters supprimieren, wenn auch zumeist nur schwach. Umgekehrt konnte in Kapitel III 2.5.3.1 anhand der Suppressortranslokasen, die jeweils eine der neu selektierten Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters im TatB N-Terminus (L9P, L9Q und V12G) enthielten, gezeigt werden, dass

#### IV. Diskussion

diese auch einen geringen Export des ursprünglich exportdefekten TorA[KQ]-MalE-Reporters zulassen.

Zunächst kann hieraus geschlossen werden, dass keine der neu isolierten Suppressormutationen L9P, L9Q und V12G im TatB N-Terminus bewirkt, dass der Exportdefekt des Tor[F14D]-MalE-Reporters dadurch supprimiert wird, dass das Aspartat an der Phenylalanin-Konsensus-Position spezifisch durch die Tat-Translokase erkannt und gebunden wird. In diesem Fall wäre zu erwarten, dass der Exportdefekt des TorA[KQ]-MalE-Reporters nicht supprimiert würde, da hier das Aspartat im Tat-Konsensus nicht vorhanden ist. Somit müssen auch die neu isolierten Suppressormutationen L9P, L9Q und V12G im TatB N-Terminus bei der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters bewirken, dass eine bereits vorhandene Bindung der Tat-Translokase zum Tat-Signalpeptid gestärkt wird, oder dass eine komplett neue Bindung zwischen der Tat-Translokase und dem Tat-Signalpeptid entsteht. Auf diese Weise werden die beiden ursprünglich exportdefekten TorA-MalE-Reporter nun wieder von der Tat-Translokase gebunden/erkannt und somit Tat-abhängig exportiert.

Da sowohl der TorA[F14D]-MalE- als auch der TorA[KQ]-MalE-Reporter durch die mutierten Tat-Translokasen mit den Austauschen L9P, L9Q oder V12G im TatB N-Terminus exportiert werden, kann auf Seiten des TorA-Signalpeptids diese neue oder gestärkte Bindung weder an den Positionen der beiden Arginine noch an der Phenylalanin-Konsensus-Position lokalisiert sein.

Die Tat-Translokasen mit den neu isolierten Suppressormutationen L9P, L9Q und V12G im TatB N-Terminus zeigen somit, wie auch die untersuchten KQ-Suppressortranslokasen aus Kreutzenbeck *et al.* (2007), eine gelockerte Spezifität bei der Bindung/Erkennung von Tat-Signalpeptiden. Die mutierten Tat-Translokasen tolerieren sowohl den Austausch des Zwillingsarginins gegen Lysin-Glutamin als auch den Austausch des Konsensus-Phenylalanins gegen Aspartat, während die unveränderte Tat-Translokase die beiden TorA-MalE-Reporter nicht exportiert.

Zusammengefasst konnte somit gezeigt werden, dass die untersuchten KQ-Suppressortranslokasen aus Kreutzenbeck *et al.* (2007) auch Suppressormutationen des TorA[F14D]-MalE-Reporters sind. Zudem sind alle mit dem TorA[F14D]-MalE-Reporter selektierten Suppressormutationen ebenfalls Suppressormutationen des TorA[KQ]-MalE-Reporter. Da sowohl der Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters als auch der Exportdefekt des TorA[KQ]-MalE-Reporters durch dieselben Mutationen im TatC N-

Terminus und im TatB N-Terminus supprimiert wird, kann geschlossen werden, dass durch den Austausch des Zwillingsarginins gegen Lysin-Glutamin und durch den Austausch des Phenylalanins gegen Aspartat die Bindung/Erkennung vom Tat-Signalpeptid im selben Teilprozess, nämlich bei der Erkennung und Bindung von Tat-Signalpeptiden an der Translokase, der Tat-abhängigen Proteintranslokation unterbunden wird.

Die Vielzahl der in TatB und in TatC selektierten Mutationen, die den Exportdefekt des TorA[KQ]-MalE- und des TorA[F14D]-MalE-Reporters supprimieren, impliziert hierbei die Existenz einer durch TatB und TatC gebildeten Signalpeptidbindetasche, an der zum einen das eigentliche Tat-Konsensus-Motiv gebunden/erkannt wird, aber an der auch zahlreiche weitere Kontakte von der Tat-Translokase zum Tat-Signalpeptid stattfinden.

### **1.3.3 Ein Einfluss der reduzierten Tat-Proteinmengen in den mutierten Tat-Translokasen auf die Effizienz der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters ist nicht auszuschließen**

In allen vier, in der vorliegenden Arbeit isolierten Ursprungssuppressortranslokasen lagen je zwei Mutationen in der Tat-Translokase vor, die zu einer Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters führen (siehe IV 1.3.1). Zur Charakterisierung wurden sowohl die Suppressortranslokasen mit je einer dieser Suppressormutationen, aber auch die Suppressortranslokasen mit jeweils beiden Suppressormutationen aus den Ursprungssuppressortranslokasen verwendet. Später wurden zudem noch zwei synthetische Suppressortranslokasen verwendet, in denen einmal drei und einmal zwei Suppressormutationen in einer Tat-Translokase kombiniert wurden, verwendet [SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C) und SPS-L9Q(B)/K18E(C)].

Bei allen diesen Suppressortranslokasen wurde mittels spezifischer Antiseren untersucht, inwieweit sich die Mutationen in den Plasmid-kodierten Tat-Proteinen der Suppressortranslokasen auf die Menge der Tat-Proteine TatA, TatB und TatC in der Cytoplasmamembran der einzelnen Stämme auswirken (siehe III 2.5.1). Die Untersuchung der TatE Menge konnte nicht durchgeführt werden, da hierfür kein Antiserum zur Verfügung stand.

Generell wurde beobachtet, dass keine der Suppressormutationen dazu führte, dass eine erhöhte Menge an Tat-Proteinen in der Cytoplasmamembran detektiert wurde. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Suppression des exportdefekten TorA[F14D]-MalE- oder

#### IV. Diskussion

des TorA[KQ]-MalE-Reporters durch die untersuchten Suppressortranslokasen auf eine erhöhte Menge an Tat-Proteinen zurückzuführen ist. Tatsächlich wurde sogar beobachtet, dass die Mutationen in TatB (L9P, L9Q und V12G) oder in TatC (L9F, K18E und N22I) die Menge des jeweiligen Proteins negativ beeinflussen. Am drastischsten war dies bei Anwesenheit der Mutation L9P (TatB) zu beobachten, hier war TatB sogar nicht nachweisbar. Hierbei ist allerdings darauf hinzuweisen, dass obwohl TatB in den Stämmen mit der Mutation L9P in TatB nicht nachweisbar ist, dies nicht bedeutet dass *in situ* kein TatB vorhanden ist. Auch chromosomal-kodiertes TatB kann bei identischem experimentellem Vorgehen, nicht nachgewiesen werden (Kreutzenbeck, 2005). Weiterhin wurde beobachtet, dass bei Anwesenheit der Mutation N22I (TatC) eine geringfügig reduzierte TatB Menge, und bei Anwesenheit der Mutation L9P (TatB) eine deutlich verringerte TatC Menge zu beobachten war. Das TatB und TatC eng assoziiert in der Cytoplasmamembran vorliegen ist bekannt (z.B. Bolhuis *et al.*, 2001; Oates *et al.*, 2005; McDevitt *et al.*, 2006), und so ist auch eine gegenseitige Beeinflussung, bei einer Veränderung eines dieser Proteine, die zu einer Instabilität des jeweils anderen Proteins führt, durchaus denkbar. Die deutlich reduzierten TatC Mengen, in den Stämmen welche die Mutation L9P enthalten, sind möglicherweise auch auf die stark verringerte TatB Menge durch die Mutation L9P (TatB) zurückzuführen. Die Instabilität von TatC in Abwesenheit von TatB ist bekannt (Sargent *et al.*, 1999). Weiterhin war im Fall der Tat-Translokasen, in denen die Mutation L9Q in TatB vorlag, zu beobachten dass die Menge an TatA jeweils leicht reduziert war. Wie die Mutation L9Q in TatB dazu führen kann, dass die Menge an TatA in der Cytoplasmamembran beeinflusst ist, ist gegenwärtig unklar. Barrett und Robinson (2005) konnten zeigen, dass die Mutation V12P in TatB, welche in der Nähe der Position 9 liegt, einen Exportdefekt supprimiert, der durch ein defektes TatA-Protein hervorgerufen wird. In diesem TatA Protein liegt anstelle der Aminosäuren Ile-Ile-Ala an den Positionen 11-13 dreimal Glycin vor. Möglicherweise bewirkt die Mutation L9Q in TatB, neben der Funktion als Suppressormutation, sekundär auch noch eine Veränderung der Interaktion von TatB mit TatA, die so zu einer veränderten Stabilität von TatA in der Cytoplasmamembran führt. Interessant ist hierbei, dass die besagte Mutation V12P aus Barrett und Robinson (2005) exakt an der gleichen Position in TatB liegt wie die Suppressormutation V12G aus der vorliegenden Arbeit. Ob zwischen den beiden Effekten ein funktioneller Zusammenhang besteht, ist gegenwärtig unklar.

Es bleibt festzuhalten, dass letztendlich nicht auszuschließen ist, dass durch die herabgesetzte Menge der Tat-Proteine bei den verschiedenen mutierten Tat-Translokasen auch die Effizienz der Suppression beeinflusst wird.

### **1.3.4 Die Mutation L9Q im TatB N-Terminus bewirkt möglicherweise eine Veränderung in der Signalpeptidbindetasche, die zur Folge hat, dass das unveränderte TorA-Signalpeptid schlechter gebunden werden kann**

Neben der Untersuchung der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters wurden alle Suppressortranslokasen auch hinsichtlich ihrer Fähigkeit den unveränderten TorA-MalE-Reporter zu exportieren untersucht.

Normalerweise dient dieses der Untersuchung, ob eine der veränderten Aminosäuren im Tat-Signalpeptid durch eine der Suppressormutationen in den Suppressortranslokasen spezifisch erkannt/gebunden wird (Lysin-Glutamin bei TorA[KQ]-MalE bzw. Aspartat bei TorA[F14D]-MalE). In diesem Fall sollte kein Export des unveränderten TorA-MalE-Reporters stattfinden. Man hätte somit einen Rest in der Tat-Translokase identifiziert, der für die Bindung der entsprechenden veränderten Position im TorA-Signalpeptid verantwortlich ist. Im Umkehrschluss hätte man somit auch die Aminosäureposition(en) in der unveränderten Tat-Translokase identifiziert, die für die Bindung des Zwillingsarginin oder des Konsensus-Phenylalanins verantwortlich sind. Da aber bereits gezeigt werden konnte, dass alle untersuchten Suppressortranslokasen sowohl den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE- als auch den des TorA[KQ]-MalE-Reporters supprimieren (auch wenn die Suppression teilweise auf einem sehr niedrigen Niveau war), kann bereits gesagt werden, dass wohl keine der Suppressormutationen in der Tat-Translokase dadurch wirkt, dass Lysin-Glutamin (ist bei TorA[F14D]-MalE nicht vorhanden) oder Aspartat (ist bei TorA[KQ]-MalE nicht vorhanden) spezifisch durch die mutierte Tat-Translokase erkannt wird (siehe IV 1.2 und IV 1.3.2). In Folge dessen kann die Tatsache, dass einige Suppressortranslokasen einen herabgesetzten Export des unveränderten TorA-MalE-Reporters zeigten und eine Tat-Translokase in Zusammenhang mit dem unveränderten TorA-MalE-Reporter sogar toxisch auf *E. coli* wirkte, eigentlich nicht daran liegen, dass eine der beiden Tat-Konsensus-Motiv Positionen im Tat-Signalpeptid nun *per se* nicht mehr durch die veränderten Tat-Translokasen gebunden werden kann, und dies so zu einem verringerten TorA-MalE-Export führt. Die verminderte Exporteffizienz muss somit etwas mit dem gleichzeitigen Vorliegen des Zwillingsarginins und des Konsensus-Phenylalanins im TorA-Signalpeptid zu tun haben. Bei den Suppressortranslokasen, bei denen die verminderte Exporteffizienz des unveränderten TorA-MalE-Reporters zu beobachten war, handelt es sich um alle Tat-Translokasen, welche die Mutation L9Q im TatB N-Terminus enthalten [SPS-L9Q(B); SPS-L9Q(B)/L9F(C); SPS-L9Q(B)/K18E(C); SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)]. Bei den Stämmen mit diesen

#### IV. Diskussion

Suppressortranslokasen war der Export des TorA-MalE-Reporters auf Werte zwischen 44,4% bis 29,9 % der relativen Exporteffizienz im Vergleich zur Positivkontrolle (der identische Stamm mit unveränderter Tat-Translokase und mit unverändertem TorA-MalE-Reporter) herabgesetzt (siehe III 2.5.4.2 und III 2.6.3). Diese Daten deuten darauf hin, dass die postulierte Signalpeptidbindetasche in der Tat-Translokase durch L9Q (TatB) so verändert wird, dass das unveränderte TorA-Signalpeptid nicht mehr so effizient durch die Signalpeptidbindetasche gebunden werden kann, oder aus sterischen Gründen nicht mehr so gut in diese Signalpeptidbindetasche „passt“.

Wie bereits in IV 1.3.3 erwähnt, führt die Mutation L9Q (TatB) dazu, dass sowohl die TatB- als auch die TatA-Menge in der entsprechenden Tat-Translokase herabgesetzt ist (siehe III 2.5.1). Es kann somit auch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass die verringerte Exporteffizienz des unveränderten TorA-MalE-Reporters durch diese Tat-Translokasen auf eine verringerte Tat-Proteinmenge zurückzuführen ist. Dass die verringerte Translokationseffizienz hierbei auf die herabgesetzte TatB-Menge zurückzuführen ist, ist jedoch eher unwahrscheinlich, wenn man die Daten zum Export des unveränderten TorA-MalE-Reporters durch die SPS-L9P(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase zum Vergleich heranzieht. In dieser Translokase war TatB gar nicht zu detektieren und trotzdem war hier ein effizienter Export des TorA-MalE-Reporters zu beobachten. Somit bleibt nur die Möglichkeit, dass die verringerte Translokationseffizienz auf die leicht herabgesetzte TatA-Menge zurückzuführen ist.

Wie bereits oben erwähnt, gab es auch noch eine Suppressortranslokase, die im Zusammenhang mit dem unveränderten TorA-MalE-Reporter einen toxischen Effekt auf *E. coli* GSJ101 hatte. Hierbei handelte es sich um die SPS-L9P(B)-Suppressortranslokase, welche nur die Mutation L9P in TatB beinhaltet. Von einem ähnlichen Effekt wurde bereits in der Literatur berichtet. Richter und Brüser (2005) konnten zeigen, dass ein Fusionsprotein aus einem Tat-Signalpeptid und dem reifen Teil des *E. coli* PhoA-Proteins in Zusammenhang mit der unveränderten Tat-Translokase einen toxischen Effekt auf *E. coli* hat. PhoA ist ein authentisches *E. coli* Sec-Substrat und benötigt zur korrekten Faltung zwei Disulfidbrücken, welche aber im Cytoplasma von *E. coli* aufgrund der reduzierenden Bedingungen nicht gebildet werden können. Die Autoren konnten zeigen, dass das Fusionsprotein aus dem Tat-Signalpeptid und dem ungefalteten PhoA zusammen mit der Tat-Translokase zu einem deutlich erniedrigten Membranpotential führt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Translokation des Substrates eingeleitet wird, aber aufgrund des ungefalteten PhoA nicht vollzogen werden kann. Dieser Translokationsversuch hätte einen Protonenverlust zur Folge,

der sich toxisch auf *E. coli* auswirkt. Im Fall des unveränderten TorA-MalE-Reporters und der SPS-L9P(B)-Suppressortranslokase ist der toxische Effekt auf *E. coli* wohl nicht auf den Faltungszustand des TorA-MalE-Reporters zurückzuführen. Allerdings ist durchaus denkbar, dass die SPS-L9P(B)-Suppressortranslokase und der unveränderte TorA-MalE-Reporter gemeinsam einen Komplex in der Cytoplasmamembran bilden, der zu einem Protonenverlust der *E. coli* Zelle führt, der sich letztendlich toxisch auf die *E. coli* Zellen auswirkt. Bemerkenswert ist, dass im Fall der SPS-L9P(B)/L9F(C)-Suppressortranslokase, in der zusätzlich die Mutation L9F in TatC vorliegt, dieser toxische Effekt nicht so zu beobachten war und somit durch die Anwesenheit von L9F in TatC aufgehoben wird. Gleichwohl zeigte aber auch der Stamm mit dieser Tat-Translokase und dem TorA-MalE-Reporter anhand der Phänotypen in den MacConkey-Agar- und Maltose-Minimalmedium-Plattentests einen etwas geringeren TorA-MalE-Export (siehe III 2.5.4.1), während auf Proteinebene keine besonderen Veränderungen der Menge an reifen MalE im Periplasma zu beobachten waren, wenn man diese mit der Menge an reifen MalE im Periplasma der Positivkontrolle vergleicht (siehe III 2.5.4.2). Möglicherweise sind auch in diesem Fall die Phänotypen in den Plattentests auf einen leichten toxischen Effekt zurückzuführen.

Abschließend ist noch zu erwähnen, dass die Stämme mit den übrigen Suppressortranslokasen [SPS-V12G(B), SPS-N22I(C), SPS-V12G(B)/N22I(C), SPS-L9F(C), SPS-K18E(C), SPS-L9F(C)/K18E(C)] einen effizienten Export des unveränderten TorA-MalE-Reporters zeigten, was noch einmal untermauert, dass in keiner dieser Translokasen das Aspartat in TorA[F14D]-MalE oder Lysin-Glutamin in TorA[KQ]-MalE spezifisch erkannt/gebunden und auf diese Weise die Suppression der exportdefekten TorA-MalE-Reporter bewirkt. Diese Translokasen zeigen somit eine gelockerte Spezifität bei der Erkennung von Tat-Signalpeptiden, da sie sowohl den unveränderten TorA-MalE- als auch die eigentlich exportdefekten TorA[F14D]-MalE- und TorA[KQ]-MalE-Reporter als Tat-Substrat akzeptieren

### **1.3.5 Erklärungsmöglichkeiten zur Wirkungsweise der Suppressormutationen in den N-Termini von TatB und TatC und zur Kooperation beider Bereiche bei der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters**

Wie bereits erwähnt, lagen in den vier isolierten Ursprungssuppressortranslokalen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters jeweils zwei Suppressormutationen in den Tat-Proteinen vor, die bereits alleine zu einer Suppression des Exportdefektes führen. Hierbei wurde die Mutation L9F (TatC) in SPS-F14D-UM1, SPS-F14D-UM2 und SPS-F14D-UM3 vor der Mutagenese bewusst platziert, um ausgehend von dieser schwachen Suppressormutation des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters zusätzliche Suppressormutationen zu selektieren. Auf diese Weise sollten Bereiche in der Tat-Translokase aufgezeigt werden, die bei der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporter mit dem TatC N-Terminus, in dem sich die Mutation L9F befindet, kooperieren.

Es konnte auch tatsächlich gezeigt werden, dass im Fall der Suppressormutationen aus den Ursprungssuppressortranslokalen SPS-F14D-UM1, SPS-F14D-UM2 und SPS-F14D-UM3 jeweils die Kombination der Mutation L9F (TatC) mit der jeweils anderen Suppressormutation [L9P (TatB), K18E (TatC) oder L9Q (TatB)] in zweifach mutierten Tat-Translokalen zu einer Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters führt, die deutlich stärker ist als die Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch die Suppressortranslokalen mit nur einem dieser Austausche. Derselbe Effekt wurde auch bei den Suppressormutationen aus der SPS-F14D-UM4-Ursprungssuppressortranslokase beobachtet. Auch hier führten beide Suppressormutationen (TatB: V12G; TatC: N22I), welche aber in diesem Fall beide selektiert wurden, in Kombination in einer Tat-Translokase vorliegend [SPS-V12G(B)/N22I(C)], zu einer Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters, die deutlich stärker ist als die Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch die Suppressortranslokalen mit nur einem dieser Austausche.

In Kapitel III 2.5.3 konnte gezeigt werden, dass derselbe synergistische Effekt auf die Effektivität der Suppression durch die Kombination von je zwei Suppressormutationen in den SPS-L9P(B)/L9F(C)-, SPS-L9F(C)/K18E(C)-, SPS-L9Q(B)/L9F(C)- und SPS-V12G(B)/N22I(C)-Suppressortranslokalen auch bei der Suppression des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters zu beobachten war.

Bei Betrachtung der Lage der jeweils zwei Suppressormutationen in den Tat-Translokasen ergeben sich zwei verschiedene Situationen. Zum einem führt im Fall von SPS-L9F(C)/K18E(C) die Kombination von zwei Mutationen im TatC N-Terminus zu einem synergistischen Effekt auf die Suppression des Exportdefektes der beiden TorA-MalE-Reporter. Diese Ergebnisse zeigen, dass grundsätzlich zwei Suppressormutationen in einer Tat-Translokase kombiniert werden können, ohne dass sich die Effekte der beiden einzelnen Mutationen gegenseitig negativ beeinflussen, selbst wenn beide Mutationen im selben Bereich der Tat-Translokase liegen. Tatsächlich arbeiten beide Mutationen sogar bei der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters zusammen und führen offensichtlich zu einer noch besseren Erkennung/Bindung der ursprünglich exportdefekten TorA-MalE-Reporter. Dasselbe Ergebnis zeigte sich bei der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters durch die zweifach mutierten Suppressortranslokasen SPS-L9P(B)/L9F(C), SPS-L9Q(B)/L9F(C), SPS-V12G(B)/N22I(C), wobei in dieser Situation interessanterweise eine Mutation aus dem TatB N-Terminus und eine Mutation aus dem TatC N-Terminus und somit in zwei unterschiedlichen Untereinheiten der Translokase bei der Suppression des TorA-Signalpeptids in einer synergistischen Weise kooperieren.

Darüber hinaus konnte in Kapitel III 2.6.3 sogar gezeigt werden, dass die Kombination von drei Suppressormutationen in einer synthetischen Suppressortranslokase mit einer Suppressormutation im TatB N-Terminus (L9Q) und zwei Suppressormutationen im TatC N-Terminus (L9F, K18E) zu einer weiteren Steigerung der Suppression sowohl des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- als auch des TorA[KQ]-MalE-Reporters führte, wenn man diese mit der Suppression durch die Suppressortranslokasen mit nur je zwei dieser Austausche vergleicht.

### **1.3.5.1 Der TatC N-Terminus bildet wahrscheinlich einen Teil einer Signalpeptidbindetasche**

Alami *et al.*, (2003) konnten zeigen, dass ein Tat-Substrat mit seinem Tat-Signalpeptid im Bereich des Konsensus-Motivs in Abhängigkeit des Zwillingsarginins an TatC und auch an TatB bindet. Hierbei ist der Kontakt zu TatB strikt von der Anwesenheit von TatC abhängig, während der Kontakt zu TatC auch in Abwesenheit von TatB stattfindet. Diese Ergebnisse deuten auf einen hierarchischen Prozess bei der Bindung von Tat-Signalpeptiden an die Tat-

#### IV. Diskussion

Translokase hin, bei der der erste Kontakt an TatC stattfindet, und TatB erst später das Signalpeptid bindet.

Unter Berücksichtigung dieser biochemischen Daten und unter Berücksichtigung der Lage der von ihnen isolierten Suppressormutationen, welche hauptsächlich im TatC N-Terminus lagen (z.B. L9F, K18E und N22I), schlossen Kreutzenbeck *et al.* (2007), dass der TatC N-Terminus zumindest Teil einer Signalpeptidbindetasche in der Tat-Translokase ist, durch die Tat-Substrate in Abhängigkeit ihres Tat-Konsensus-Motivs gebunden werden. Anhand dieser Vorstellung kann nun auch erklärt werden, wie die in der vorliegenden Arbeit kombinierten Mutationen L9F und K18E im TatC N-Terminus bei der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters durch die SPS-L9F(C)/K18E(C)-Suppressortranslokase synergistisch zusammen arbeiten. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Mutationen L9F und K18E im TatC N-Terminus beide parallel auf die Bindung des Tat-Signalpeptids durch die Signalpeptidbindetasche einwirken und dies so zu einer noch besseren Bindung/Erkennung des TorA[F14D]- und des TorA[KQ]-Signalpeptids führt, wenn man diese mit der Bindung/Erkennung durch die Suppressortranslokasen vergleicht, welche nur eine dieser Suppressormutationen beinhalten.

Mittlerweile lieferte eine andere Studie auch Hinweise darauf, dass neben dem TatC N-Terminus auf der cytoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran wohl noch andere Bereiche in TatC an der Bindung von Tat-Signalpeptiden beteiligt sind. Strauch und Georgiou (2007) konnten ihrerseits Suppressormutationen in TatC identifizieren, die einen Export des ursprünglich exportdefekten TorA[KK]-GFP-SsrA-Reporters, bei dem das Zwillingsarginin gegen ein Zwillingslysin getauscht ist, zulassen. Die meisten dieser Mutationen finden sich im Topologiemodell von TatC in der Grenzregion des zweiten Transmembrandurchgangs und der ersten cytoplasmatischen Schleife. Zusammengenommen lassen diese Ergebnisse auf eine Signalpeptidbindetasche schließen, an deren Ausbildung neben den cytoplasmatisch exponierten N-Terminus auch der Bereich zwischen dem zweiten Transmembrandurchgang und der ersten cytoplasmatischen Schleife in TatC beteiligt sind.

### **1.3.5.2 Die Suppressormutationen im N-Terminus von TatB bewirken möglicherweise einen direkten Kontakt vom TatB N-Terminus zum Tat-Signalpeptid, der gleichzeitig mit dem Kontakt des Tat-Signalpeptids zu TatC stattfindet**

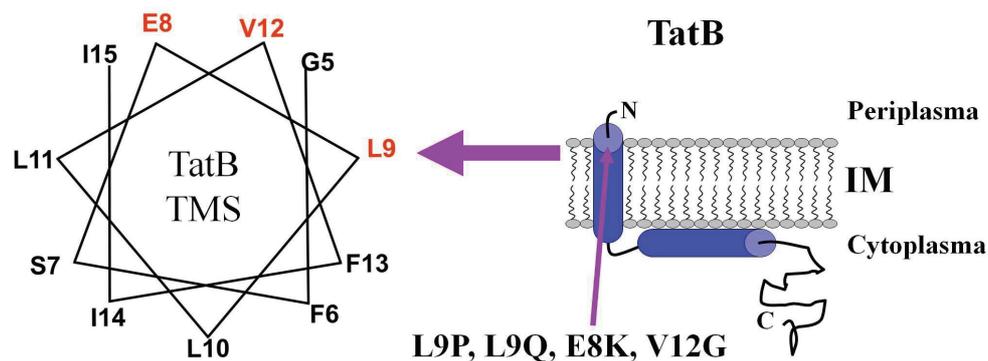
Im Fall der Suppressortranslokasen SPS-L9P(B)/L9F(C), SPS-L9Q(B)/L9F(C) und SPS-V12G(B)/N22I(C) und SPS-L9Q(B)/K18E(C) [und auch SPS-L9Q(B)/L9F(C)/K18E(C)] stellt sich die Frage, wie eine Mutation aus dem TatB N-Terminus mit einer Mutation aus dem TatC N-Terminus bei der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters in einer synergistischen Weise kooperieren kann. Wie bereits in IV 1.3.5.1 erwähnt ist es wahrscheinlich, dass die jeweilige Mutation im TatC N-Terminus lokal im Bereich der postulierten Signalpeptidbindetasche für eine bessere Bindung/Erkennung des jeweiligen Tat-Signalpeptids sorgt.

Die Mutationen (L9P, L9Q und V12G) im TatB N-Terminus hingegen liegen nach dem gegenwärtigen Topologiemodell von TatB auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran und somit in einem Bereich, von dem man zunächst nicht erwarten würde, dass er direkt an der Bindung von Tat-Signalpeptiden beteiligt ist. Auch die KQ-Suppressormutation E8K aus Kreutzenbeck *et al.* (2007), von der in III 2.2 gezeigt werden konnte, dass sie ebenfalls den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters effektiv supprimiert, liegt in diesem Bereich. Von ihr wurde bisher vermutet, dass sie über einen weitreichenden konformationellen Effekt im TatBC-Rezeptorkomplex die postulierte Signalpeptidbindetasche strukturell beeinflusst, und so die Suppression des Exportdefektes des TorA-MalE-Reporters bewirkt. Prinzipiell ist diese Erklärungsmöglichkeit für die Wirkweise von E8K und auch der neu isolierten Suppressormutationen im TatB N-Terminus aus der vorliegenden Arbeit (L9P, L9Q und V12G) weiterhin gegeben.

Allerdings lassen neuere Literaturdaten darauf schließen, dass der TatB N-Terminus und auch andere auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran gelegene Bereiche der Tat-Translokase in direkten Kontakt zum Tat-Signalpeptid kommen können. Die Daten von Gérard und Cline (2007), aus Untersuchungen des chloroplastidären cpTat-Wegs, deuten auf eine Bindung/Erkennung von Tat-Signalpeptiden tief innerhalb der geschützten proteinogenen Umgebung des TatBC-Rezeptorkomplexes (cpTatC-Hcf106-Rezeptorkomplex) hin. In diesem Fall könnte die Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters durch die Suppressormutationen im TatB N-Terminus auch direkt durch einen Kontakt vom TatB N-Terminus zum Signalpeptid bewirkt werden. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass die Positionen im TatB N-Terminus, an denen die

#### IV. Diskussion

Suppressormutationen aufgetreten sind (E8, L9 V12), laut der Vorhersage zur Sekundärstruktur von TatB alle in dem Bereich von TatB liegen, der Teil der vorhergesagten Transmembranhelix ist (Lee *et al.*, 2006a). Betrachtet man die Lage dieser Aminosäurepositionen in der Helix-Rad-Darstellung der TatB-Transmembranhelix (siehe Abb. 34) so zeigt sich, dass alle Reste auf einer Seite der Helix liegen, was ein Indiz dafür sein kann, dass diese Seite der Transmembranhelix an einer Interaktion mit dem Tat-Signalpeptid beteiligt ist.



**Abbildung 34: Schematische Darstellung der Topologie von TatB mit der Lage der Suppressormutationen und Helix-Rad-Darstellung eines Teils der TatB Transmembranhelix.** Die Positionen in der TatB Transmembranhelix, an denen die Suppressormutationen aufgetreten sind, sind in rot dargestellt [Helix-Rad-Darstellung verändert nach Lee *et al.*, 2006a)].

Im Fall einer direkten Bindung des Tat-Signalpeptids durch TatB ist die synergistische Wirkung auf die Effektivität der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters und des TorA[KQ]-MalE-Reporters durch die Kombination einer Suppressormutation aus dem TatB N-Terminus und einer Suppressormutation aus dem TatC N-Terminus nur dadurch zu erklären, dass beide Mutationen gleichzeitig auf die Bindung des Tat-Signalpeptids einwirken müssen. Es muss also in der Signalpeptidbindetasche eine gleichzeitige Bindung des Tat-Signalpeptids durch TatB und TatC erfolgen.

Diese Vorstellung steht zunächst in gewisser Weise in Widerspruch zu den biochemischen *in vitro* Daten von Alami *et al.* (2003), aus denen geschlossen wurde, dass ein Tat-Signalpeptid im Bereich des Tat-Konsensus-Motiv zuerst an TatC und dann an TatB bindet, da der Kontakt zu TatC auch ohne TatB stattfindet, während der Kontakt zu TatB von der Anwesenheit von TatC abhängt. Mittlerweile wurde aber gezeigt, dass der Zwillingsarginin-abhängigen Bindung von Tat-Substraten an TatC eine Bindung an den TatBC-Rezeptorkomplex vorausgeht, die unabhängig vom intakten Zwillingsarginin im Tat-Signalpeptid ist (McDevitt *et al.*, 2006; Panahandeh *et al.*, 2008). McDevitt *et al.* (2006) konnten hier zeigen, dass für

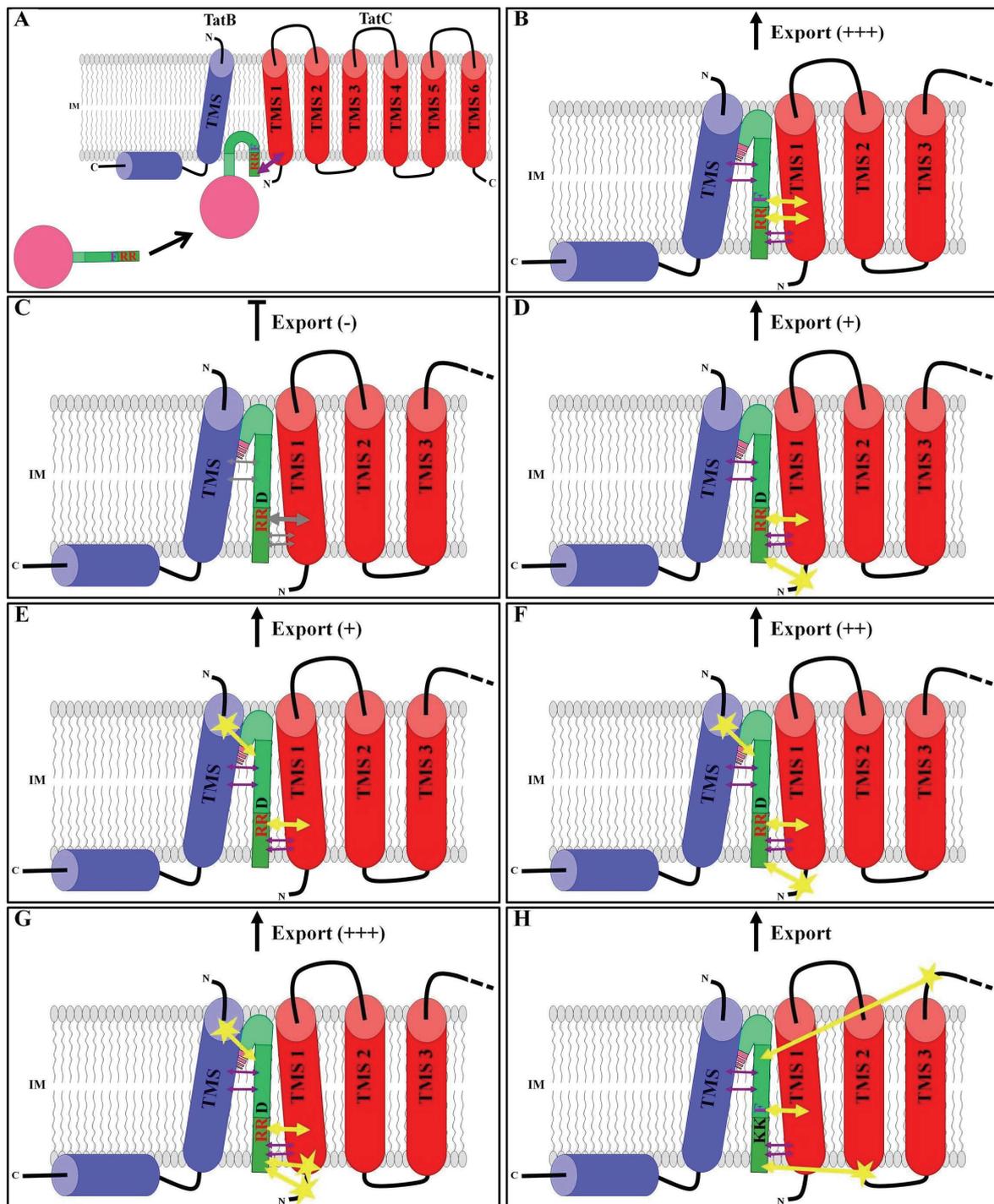
diese Bindung das Tat-Signalpeptid aber dennoch benötigt wird. Findet diese erste Zwillingsarginin-unabhängige Bindung an den TatBC-Rezeptorkomplex an TatC statt, würde dies auch erklären, warum in den Experimenten von Alami *et al.*, 2003 kein Kontakt im Bereich des Tat-Konsensus-Motiv zu TatB, in Abwesenheit von TatC gefunden wurde.

Wie auch ähnlich von Panahandeh *et al.* 2008 vorgeschlagen wären zwei unabhängige Bindungsschritte des Substrates denkbar. Hierbei wäre der erste Schritt nicht exklusiv vom Zwillingsarginin bzw. dem Tat-Konsensus-Motiv abhängig und fände möglicherweise an den cytoplasmatisch exponierten Bereichen des TatBC-Rezeptorkomplexes (wahrscheinlich an TatC) statt. Anschließend käme es zu einem Transfer des Tat-Signalpeptids in eine von TatB und TatC gemeinsam gebildete Signalpeptidbindetasche tiefer im TatBC-Rezeptorkomplex in der Cytoplasmamembran. Zur Bindung des Tat-Signalpeptids an diese Signalpeptidbindetasche würden auf Seiten des Tat-Signalpeptids dann das Zwillingsarginin und auch die anderen Reste des Tat-Konsensus-Motivs wie das Konsensus-Phenylalanin benötigt. Die Daten aus der vorliegenden Arbeit deuten hierbei deutlich darauf hin, dass an dieser Bindung des Tat-Signalpeptids sowohl der TatB N-Terminus TatB als auch TatC N-Terminus gleichzeitig beteiligt sind.

Der Vollständigkeit halber ist noch zu erwähnen, dass neben dem TatB N-Terminus wohl auch noch weitere, auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran gelegene Bereiche einen Einfluss auf die Bindung von Tat-Signalpeptiden nehmen. So lag eine Suppressormutationen des exportdefekten TorA[KK]-GFP-SsrA-Reporters in der zweiten periplasmatischen Schleife von TatC (Strauch und Georgiou, 2007).

#### **1.4 Modell zur Bindung/Erkennung von Tat-Signalpeptiden an der Tat-Translokase am Beispiel der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters**

Die experimentellen Daten aus der vorliegenden Arbeit geben neue Einsichten in die Prozesse der Substrat-Translokase Interaktion bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation. Im Folgenden werden diese Daten, ergänzt durch die bisherigen Literaturdaten, in einem Modell zusammengefasst, in welchem die ersten Schritte der Bindung von Tat-Signalpeptiden an die Translokase dargestellt werden. Die einzelnen Teilschritte sind in Abb. 35 schematisch dargestellt.



**Abbildung 35. Modell zur Substrat-Translokase Interaktion bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation.** Dargestellt ist der TatBC-Rezeptorkomplex (TatB in blau und TatC in rot). Das Tat-Signalpeptid ist in grün dargestellt, der reife Proteinteil in Pink. Die dünnen violetten Pfeile stellen Kontakte von TatB bzw. TatC zu verschiedenen Positionen im Tat-Signalpeptid dar. Der dicke violette Pfeil, stellt den ersten Zwillingsarginin unabhängigen Kontakt vom Tat-Substrat zum TatBC-Rezeptorkomplex dar. Die dicken gelben Pfeile zeigen die Kontakte des Zwillingsarginin und dem Konsensus-Phenylalanin zur Tat-Translokase (die restlichen Tat-Konsensus-Positionen sind der Einfachheit halber nicht aufgeführt). Die gelben Pfeile mit Stern stellen die Suppressormutationen von exportdefekten Tat-Substraten dar. Sind die Pfeile in grau dargestellt, reicht die Interaktion zwischen Tat-Signalpeptid und der Tat-Translokase nicht um eine Translokation des Substates einzuleiten. Weitere Informationen sind dem Text zu entnehmen.

Die genaue Art und Weise, wie ein Tat-Substrat aus dem Cytoplasma an die Tat-Translokase gelangt, ist nicht bekannt. Möglich wäre, dass das Substrat direkt vom Cytoplasma aus in Kontakt zum TatBC-Rezeptorkomplex tritt (nicht gezeigt). **A)** Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, dass ein vorgeschaltetes, unspezifisches „targeting“ an die Cytoplasmamembran stattfinden könnte, welches dazu dient, das Signalpeptid korrekt für eine nachfolgende Bindung durch die Translokase auszurichten (Schanmugham *et al.*, 2006; Hou *et al.*, 2006). Der erste Kontakt vom Tat-Substrat zum TatBC-Rezeptorkomplex, findet unabhängig vom Zwillingsarginin im Tat-Signalpeptid statt (dicker violetter Pfeil) (McDevitt *et al.*, 2006; Panahandeh *et al.*, 2008). **B)** Es erfolgt ein Transfer des Tat-Signalpeptids in eine Signalpeptidbindetasche im TatBC-Rezeptorkomplex. Hier kommt das Tat-Signalpeptid sowohl in Kontakt zu TatC als auch zu TatB (dünne violette Pfeile). TatC kontaktiert das Tat-Signalpeptid im Bereich der n-Region und im Bereich des Konsensus-Motivs, während TatB ebenfalls in Kontakt zu Bereichen des Tat-Konsensus-Motivs, zur ganzen h-Region und auch zum reifen Teil des Tat-Substrates kommt (Alami *et al.*, 2003; Gérard und Cline, 2006). Für eine Bindung/Erkennung durch den TatBC-Rezeptorkomplex werden auf Seiten des Tat-Signalpeptids neben dem Zwillingsarginin auch andere Aminosäuren des Tat-Konsensus-Motivs benötigt (dicke gelbe Pfeile) (Mendel *et al.*, 2008; diese Arbeit). Vor allem die Aminosäure an der Phenylalanin-Konsensus-Position kann hierbei, neben dem Zwillingsarginin, eine kritische Determinante auf Seiten des Tat-Signalpeptids darstellen, die entscheidet ob ein Substrat von der Tat-Translokase Tat-abhängig exportiert wird oder nicht (siehe auch IV 1.1). **C)** Im vorliegenden Fall ist beispielhaft der Austausch des Konsensus-Phenylalanins gegen Aspartat dargestellt, welcher zu einem kompletten Block der Tat-abhängigen Proteintranslokation dieses TorA[F14D]-MalE-Reporters führt (angedeutet durch die grauen Pfeile). Durch diesen Austausch wird die Bindung des Tat-Signalpeptids zur Translokase so verringert, dass ein kritisches Level an Interaktion zwischen Tat-Signalpeptid und Tat-Translokase unterschritten wird. Als Folge dessen kann die Translokation dieses TorA[F14D]-MalE-Reporter nicht eingeleitet werden. **D)** Durch Isolierung von Suppressormutationen (dicke gelbe Pfeile mit Stern) von einem solchen exportdefekten TorA-MalE-Reporter wie TorA[F14D]-MalE, konnten Bereiche der Tat-Translokase, die an der Bindung von Tat-Signalpeptiden beteiligt sind, genauer kartiert werden. Dabei wurden mehrere Suppressormutationen im TatC N-Terminus identifiziert. Dies zeigt, dass dieser Bereich an der Bindung/Erkennung von Tat-Signalpeptiden beteiligt ist. Wahrscheinlich ist der TatC N-Terminus Teil der postulierten Signalpeptidbindetasche, an welche das Tat-Signalpeptid unter anderem mit dem Tat-Konsensus-Motiv bindet (Kreutzenbeck *et al.*,

#### IV. Diskussion

2007). Solch eine Suppressormutation verursacht eine zusätzliche oder stärkere Bindung der Signalpeptidbindetasche zum Tat-Signalpeptid, zu einer Position im Tat-Signalpeptid, welche nicht dem Zwillingsarginin und nicht dem Konsensus-Phenylalanin entspricht (Kreutzenbeck *et al.*, 2007; diese Arbeit). Durch diese Bindung von der Signalpeptidbindetasche zum Tat-Signalpeptid wird die Interaktion zwischen beiden wieder über ein kritisches Level angehoben, und die Translokation des TorA[F14D]-MalE-Reporters wird mit einer niedrigen Effektivität vollzogen. **E)** Zudem ist auch der TatB N-Terminus im TatBC-Rezeptorkomplex an der Bindung/Erkennung von Tat-Signalpeptiden beteiligt, auch in diesem Bereich wurden Suppressormutationen gefunden die zu einer wiederhergestellten Bindung/Erkennung von TorA-MalE-Reportern führen, die aufgrund eines Austauschs im Tat-Konsensus-Motiv exportdefekt sind (Kreutzenbeck *et al.*, 2007; diese Arbeit). Auch diese Mutationen verursachen eine zusätzliche oder stärkere Bindung der Signalpeptidbindetasche zum Tat-Signalpeptid, welche auf Seiten des Signalpeptids wohl nicht an der Position des Zwillingsarginins und nicht am Konsensus-Phenylalanin lokalisiert ist (Kreutzenbeck *et al.*, 2007; diese Arbeit). Da gezeigt werden konnte, dass eine feste Bindung des Tat-Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex tief innerhalb der geschützten Umgebung des TatBC-Rezeptorkomplexes stattfindet (Gérard und Cline, 2007), ist hier ein direkter Kontakt von TatB zum Tat-Signalpeptid denkbar, der so bewirkt das die Interaktion zwischen dem TorA[F14D]-MalE-Reporter und der Tat-Translokase wieder ein kritisches Level überschreitet und so das Substrat wieder mit geringer Effektivität exportiert wird (siehe auch IV 1.3.3.2). **F)** Da die Suppressormutationen aus dem TatC N-Terminus und die Suppressormutationen aus dem TatB N-Terminus in Kombination innerhalb einer Tat-Translokase sogar eine weitere Steigerung des Exports der ursprünglich exportdefekten TorA[F14D]-MalE-Reporter, im Vergleich zum Export durch die Tat-Translokasen mit nur einem dieser Austausche, bewirken, ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass der TatB N-Terminus und der TatC N-Terminus bei der Bindung von Tat-Signalpeptiden kooperieren. Beide Suppressormutationen bewirken gleichzeitig zusammen eine festere Bindung des TorA[F14D]-Signalpeptids als die jeweiligen Mutationen alleine und der TorA[F14D]-MalE-Reporter wird mit einer höheren Effektivität exportiert. **G)** Bei der Platzierung einer dritten Suppressormutation, wird die Interaktion zwischen Tat-Signalpeptid und der Signalpeptidbindetasche sogar noch weiter gesteigert und der Export läuft noch effektiver ab. **H)** Neben dem TatB N-Terminus und dem TatC N-Terminus nehmen zudem auch noch andere Bereiche des TatBC-Rezeptorkomplexes einen Einfluss auf die Bindung/Erkennung von Tat-Signalpeptiden. Hierbei handelt es sich um den Grenzbereich zwischen dem zweiten

Transmembrandurchgang und der ersten cytoplasmatischen Schleife in TatC und um die zweite periplasmatischen Schleife in TatC (gelbe Pfeile mit Stern) (Strauch und Georgiou, 2007).

### **1.5 Die Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters erinnern an die Prl-Mutationen aus der Sec-abhängigen Proteintranslokation**

Neben dem Versuch die Wirkung der Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[F14D]-MalE-Reporters über eine Wiederherstellung der Bindung/Erkennung des Signalpeptids an die Tat-Translokase zu erklären, kann man auch einen vollkommen anderen Erklärungsansatz nicht außer Acht lassen. Prinzipiell erinnern die Tat-gekoppelten Suppressormutationen des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[F14D]-MalE-Reporters aus der vorliegenden Arbeit und aus Kreutzenbeck *et al.* (2007) in ihrem Verhalten an die sogenannten Prl-Mutationen in den Untereinheiten der Sec-Translokase. Sec-Translokasen mit Prl-Mutationen in SecY, SecE, SecG oder SecA erlauben einen Export von Sec-Substraten, die aufgrund einer Veränderung im Sec-Signalpeptid von der unveränderten Sec-Translokase nicht exportiert werden. Sie sind jedoch weiterhin in der Lage, auch unveränderte Sec-Substrate zu exportieren (Bieker und Silhavy, 1990; Schatz und Beckwith, 1990). Auch im Fall der Prl-Mutationen in der Sec-Translokase war man zunächst davon ausgegangen, dass diese eine verlorengegangene Interaktion zwischen Sec-Signalpeptid und der Sec-Translokase wiederherstellen (Emr *et al.*, 1981). Da Prl-Mutationen im Hinblick auf das zu exportierende Substrat zumeist keinerlei Allel-Spezifität zeigen und da sogar Sec-Substrate komplett ohne Signalpeptid exportiert werden können, war man später davon ausgegangen, dass die Prl-Mutationen eine postulierte Qualitätskontrolle der Sec-Translokase außer Kraft setzen, die normalerweise dafür sorgt, dass Sec-Substrate mit einem fehlerhaften Signalpeptid oder komplett ohne Signalpeptid vom Export ausgeschlossen werden (Ryan und Bassford, 1985; Derman *et al.*, 1993; Osborne und Silhavy, 1993; Flower *et al.*, 1994).

Nach Aufschlüsselung der Struktur des membranständigen Teils der Sec-Translokase von *M. jannaschii* durch van den Berg *et al.* (2005) ergab sich jedoch ein neuer Blick auf die Wirkungsweise der besagten Prl-Mutationen. Der membranständige Teil der Sec-Translokase (SecYEG bei *E. coli*) bildet einen heterotrimeren Komplex innerhalb der

## IV. Diskussion

Cytoplasmamembran. Die Translokation eines Sec-Substrates erfolgt im ungefalteten Zustand durch eine kleine Pore in der Mitte der SecY Untereinheit. Diese Pore ist eingegrenzt durch den sogenannten „pore-ring“, welcher aus sechs Isoleucinen gebildet wird (Cannon *et al.*, 2005; Driessen und Nouwen, 2007; van den Berg *et al.*, 2005). Die Pore wird auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran durch den sogenannten „plug“ (Transmembranhelix 2a) verschlossen. Unter Bedingungen der Proteintranslokation bewegt sich der „plug“ aus dem Zentrum dieses Kanals heraus und erlaubt so die Passage des Polypeptids (Tam *et al.*, 2005).

Eine Modellierung der Effekte von Prl-Mutationen in SecYEG auf die Struktur der Sec-Translokase ergab, dass die Prl-Mutationen dadurch wirken, dass sie den geöffneten Zustand der Sec-Translokase stabilisieren oder den geschlossenen Zustand destabilisieren (Smith *et al.*, 2005). Auf diese Weise kann eine Öffnung des Kanals bewirkt und eine Translokation vollzogen werden, ohne dass hierfür ein vorhergehender Stimulus durch ein voll funktionstüchtiges Sec-Signalpeptid benötigt wird, welcher im Normalfall eine Voraussetzung hierfür ist.

Es bleibt somit festzuhalten, dass die Möglichkeit besteht, dass die Suppressormutationen aus Kreutzenbeck *et al.* (2007) und aus der vorliegenden Arbeit, einen ähnlichen Effekt auf die Tat-Translokase haben, wie die Prl-Mutationen auf die Sec-Translokase. In diesem Fall würden die Suppressormutationen von Seiten der Tat-Translokase nicht eine vorher defekte Protein-Protein Interaktion mit dem Tat-Signalpeptid herstellen, so dass dieses wieder erkannt/gebunden und das Tat-Substrat exportiert wird. Die Mutationen würden auf vollkommen andere Art und Weise bewirken, dass die ursprünglich exportdefekten TorA[KQ]-MalE und Tor[F14D]-MalE-Reporter nun wieder exportiert werden.

## **2. Genetische Untersuchungen zu Wechselwirkungen innerhalb der Tat-Translokase**

Über die intra- oder intermolekularen Wechselwirkungen innerhalb der Tat-Translokase, die für dessen Funktion wichtig sind, ist nur wenig bekannt. Einige der Hinweise auf Aminosäurereste in der Tat-Translokase, die für deren Funktion wichtig sind, lieferten verschiedene Mutationsstudien. Hier wurden durch den Austausch von zumeist konservierten Aminosäuren oder auch durch ungerichtete Mutagenesen, Reste in den Tat-Proteinen bestimmt, deren Austausch die Aktivität der Tat-Translokase beeinflussen (z.B. Allen *et al.*,

2002; Buchanan *et al.*, 2002; Barrett *et al.*, 2003; Hicks *et al.*, 2003; Barrett *et al.*, 2005; Barrett und Robinson, 2005; Hicks *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006a; Greene *et al.*, 2007; Punginelli *et al.*, 2007; Warren *et al.*, 2009).

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ausgehend von einer solchen Tat-inaktivierenden Mutation auf Suppressormutationen zu selektieren, welche die Wirkung der Tat-inaktivierende Mutation supprimieren. Diese Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, welche Bereiche der Tat-Translokase funktionell in einer Wechselwirkung mit dem Bereich der Tat-Translokase stehen, in dem sich die Defektmutation befindet.

## **2.1 Die Tat-inaktivierende Mutation P48A in TatC als Ausgangspunkt zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen TatB und TatC in der Tat-Translokase**

Zur Untersuchung von Wechselwirkungen innerhalb der Tat-Translokase diente in dieser Arbeit die zentrale Komponente der Tat-Translokase, das TatC-Protein, als Ausgangspunkt. Das TatC-Protein ist Rezeptor für die Zwillingsarginin-abhängige Bindung von Tat-Signalpeptiden (Alami *et al.* 2003), und bildet zusammen mit TatB den sogenannten TatBC-Rezeptorkomplex in der Cytoplasmamembran von *E. coli* aus (Bolhuis *et al.*, 2001; Cline und Mori 2001; Alami *et al.*, 2003). Im TatC-Protein sind bislang zahlreiche Austausche bekannt, welche die Effizienz der Tat-abhängigen Proteintranslokation negativ beeinflussen (Allen *et al.*, 2002; Buchanan *et al.*, 2002; Barrett und Robinson, 2005; Holzapfel *et al.*, 2007; Punginelli *et al.*, 2007). Mit der Mutation P48A in der ersten periplasmatischen Schleife und der Mutation F94A im Grenzbereich zwischen dem zweiten Transmembrandurchgang und der ersten cytoplasmatischen Schleife, sind bisher aber nur zwei dieser Austausche in TatC mehrfach und ohne Widerspruch als nahezu vollständig Tat-inaktivierend beschrieben (Allen *et al.*, 2002; Buchanan *et al.*, 2002; Barrett *et al.*, 2005; Barrett und Robinson, 2005; Holzapfel *et al.*, 2007). Da zur Selektion von Suppressormutationen ein möglichst geringer oder besser sogar blockierter Tat-abhängiger Export benötigt wird, von dem aus man auf einen deutlich verbesserten Export selektieren kann, erschienen nur diese zwei Mutationen geeignet, um als Ausgangspunkt zur Selektion von „second-site“-Suppressormutationen zu dienen.

Anhand des sehr sensitiven TorA-MalE-Reporterproteins für die Tat-abhängige Proteintranslokation konnte gezeigt werden, dass weder die F94A-Mutation noch die P48A-

#### IV. Diskussion

Mutation in TatC der Tat-Translokase zu einem vollständigen Block der Tat-abhängigen Proteintranslokation führen. Besonders im Fall des Stammes mit der TatABC-F94A-Translokase war noch ein starker TorA Export anhand der Rotfärbung der Kolonien im MacConkey-Agar Plattentest zu beobachten, während der Stamm mit der TatABC-P48A-Translokase schon einen stark verminderten TorA-MalE Export anzeigte. Die Befunde aus der Untersuchung zum Export des TorA-MalE-Reporters durch die TatABC-P48A- und durch die TatABC-F94A-Translokase bestätigten sich prinzipiell auch bei der Untersuchung des TorA-Exports anhand des anaeroben Wachstums der Stämme mit der TatABC-P48A- und der TatABC-F94A-Translokase auf TMAO-Minimalmedium, welches im Vergleich zum TorA-MalE-Export eine weniger sensitive Nachweismethode des Tat-abhängigen Proteinexports ist. Auch hier zeigte der Stamm mit der TatABC-F94A-Translokase aufgrund des anaeroben Wachstums auf TMAO-Minimalmedium einen deutlichen TorA Export, während der Stamm mit der TatABC-P48A-Translokase hingegen kein anaerobes Wachstum zeigte.

Warum im vorliegenden Fall die F94A-Mutation in der Tat-Translokase nicht zu einem deutlicheren Block der Tat-abhängigen Proteintranslokation führt, obgleich dies in der Literatur mehrfach beschrieben ist (z.B. Buchanan *et al.*, 2002; Barrett und Robinson, 2005; Holzapfel *et al.*, 2007), ist nicht klar. Aufgrund des zu starken TorA Exports und dem damit verbundenen anaeroben Wachstum auf TMAO-Minimalmedium war die TatABC-F94A-Translokase nicht geeignet um als Ausgangspunkt zur Selektion von „second-site“-Suppressormutationen zu dienen. Die TatABC-P48A-Translokase war hingegen aufgrund des eindeutig ausbleibenden anaeroben Wachstums des entsprechenden Stammes der ideale Ausgangspunkt zur Selektion von „second-site“-Suppressormutationen der Tat-inaktivierenden Mutation P48A in TatC.

Ein sehr interessanter Aspekt an dieser Mutation ist, dass P48A (TatC) eine Tat-inaktivierende Mutation ist, von der man weiß, welche Wechselwirkungen in der Tat-Translokase durch sie beeinflusst werden. Für P48A (TatC) konnte gezeigt werden, dass sie die TatBC-Interaktion stört, da sie die typische Komplexbildung des TatBC-Rezeptorkomplex in „blue native gel“-Experimenten zerstört, und TatB und TatC nur noch separat zu detektieren sind (Barrett *et al.*, 2005). Die Tat-inaktivierende Mutation P48A in TatC bildete somit den idealen Ausgangspunkt, um auf genetischem Wege Hinweise zu bekommen, welche Bereiche im TatBC-Rezeptorkomplex an der Interaktion zwischen TatB und TatC beteiligt sind.

## **2.2 Genetische Hinweise für eine Beteiligung der TatB-Transmembranhelix, eines Bereichs in der cytoplasmatischen Domäne von TatB und des extremen N-Terminus von TatC, an der Interaktion von TatB und TatC im TatBC-Rezeptorkomplex**

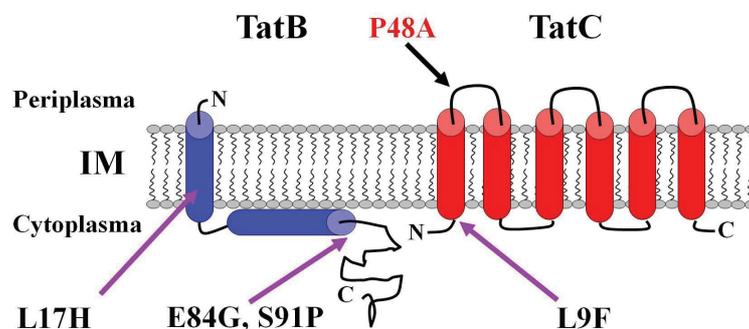
In der vorliegenden Arbeit wurden mit den unter III 3.3 beschriebenen experimentellen Ansätzen sieben Tat-gekoppelte P48A-Suppressortranslokasen isoliert, die ein wiederhergestelltes anaerobes Wachstum auf TMAO-Minimalmedium zeigten. Zwei dieser P48A-Suppressortranslokasen [P48A-S-UM4 und P48A-S-UM5] wurden im Folgenden ausgewählt und zur eingehenden Charakterisierung herangezogen. Beide Mutantentranslokasen enthielten neben der Tat-inaktivierenden Mutation P48A (TatC) mehrere weitere Mutationen. Zur Identifikation der P48A-Suppressormutationen aus den P48A-Ursprungssuppressortranslokasen wurden ausgewählte Mutationen einzeln und später paarweise zusätzlich zur Mutation P48A in eine Tat-Translokase eingefügt. Anhand des TorA-MalE Exports im MacConkey-Agar-Plattentest konnte gezeigt werden, dass sowohl die Mutationen S91P (TatB) und L9F (TatC) aus P48A-S-UM4 und die Mutationen L17H (TatB) und E84G (TatB) aus P48A-S-UM5 bereits alleine die Tat-inaktivierende Wirkung von P48A (TatC) partiell supprimieren. Anhand des anaeroben Wachstums auf TMAO-Minimalmedium durch den Export von TorA und anhand der Untersuchung des TorA-MalE Exports auf Proteinebene konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Suppressionsstärke, welche mit der der P48A-S-UM4- und P48A-S-UM5-Ursprungssuppressortranslokase vergleichbar ist nur erreicht wird, wenn jeweils beide Mutationen aus der jeweiligen Ursprungssuppressortranslokase, also S91P (TatB) und L9F (TatC) [aus P48A-S-UM4] bzw. L17H (TatB) und E84G (TatB) [aus P48A-S-UM5] zusätzlich zur Mutation P48A in einer Tat-Translokase vorliegen [P48A-S-S91P(B)/L9F(C) bzw. P48A-S-L17H(B)/E84G(B)]. Sowohl im Fall von P48A-S-UM4 [und auch P48A-S-S91P(B)/L9F(C)] als auch im Fall von P48A-S-UM5 [und auch P48A-S-L17H(B)/E84G(B)] wurde allerdings beobachtet, dass die Tat-inaktivierende Wirkung von P48A nur partiell supprimiert wird, da in beiden Fällen zum einen das anaerobe Wachstum auf TMAO-Minimalmedium und zum anderen auch die Menge des reifen MalE in der Periplasma-Fraktion, im Vergleich zur Positivkontrolle, deutlich verringert war.

Bei der Untersuchung der Tat-Proteinmengen der einzelnen P48A-Suppressortranslokasen zeigte sich interessanterweise bei allen Stämmen, welche die P48A-Mutation in der Tat-

#### IV. Diskussion

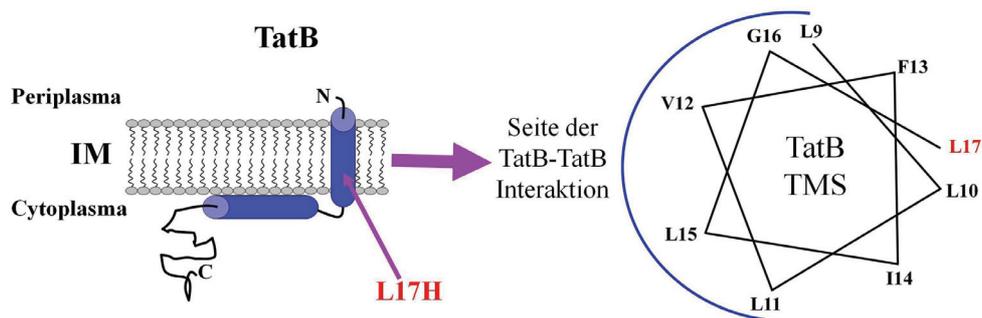
Translokase enthielten, eine stark erhöhte TatA-Menge in der Cytoplasmamembran im Vergleich zum Stamm mit der unveränderten Tat-Translokase. Da aber auch der Stamm, welcher alleine die P48A-Mutation in der Tat-Translokase enthält, diese erhöhte TatA-Menge zeigte, kann die Suppression in den P48A-Suppressortranslokasen nicht auf diese erhöhte TatA-Menge zurückzuführen sein. Hierbei ist noch zu erwähnen, dass diese erhöhte TatA Menge nicht nur bei Anwesenheit der P48A Mutation in der Tat-Translokase aufgetreten ist, auch bei dem Stamm mit der Tat-inaktivierenden F94A Mutation in der Tat-Translokase wurde eine solch erhöhte TatA-Menge in der Cytoplasmamembran beobachtet (F. Lausberg und R. Freudl, unveröffentlichte Ergebnisse). Eine Erhöhung der Menge an TatB oder an TatC durch eine der eingefügten P48A-Suppressormutationen war nicht zu beobachten, eine Suppression aufgrund erhöhter TatB- oder TatC-Mengen ist somit auszuschließen. Tatsächlich war zu beobachten, dass in den Fällen in denen die Mutationen L17H in TatB oder L9F in TatC in der Tat-Translokase vorlagen, die Menge des jeweiligen Tat-Proteins verringert war. Es ist somit nicht auszuschließen, dass in diesen Fällen eine herabgesetzte Tat-Proteinmenge die Effektivität der Suppression der Tat-inaktivierenden Mutation P48A in TatC beeinflusst.

Zur Art und Weise, wie die P48A-Suppressormutationen eine Interaktion zwischen TatB und TatC wiederherstellen, sind prinzipiell zwei Möglichkeiten denkbar. Zum einen ist es möglich, dass eine Interaktion zwischen TatB und TatC, die durch P48A in TatC verloren gegangen ist, nach einem Schlüssel-Schloss-Prinzip wiederhergestellt wird. Zum anderen ist es möglich, dass die Interaktion zwischen TatB und TatC, durch eine stärkere Wechselwirkung zwischen TatB und TatC an einem anderen oder sogar neuem Interaktionspunkt zwischen TatB und TatC kompensiert wird.



**Abbildung 36: Schematische Darstellung der Topologie von TatB und TatC mit der Lage der Tat-inaktivierenden Mutation P48A (TatC) und der Lage der P48A-Suppressormutationen.**

Bei der Betrachtung der Lage der einzelnen P48A-Suppressormutationen fällt auf (siehe Abb. 36), das sowohl in P48A-S-UM5 mit der Mutation E84G als auch in P48A-S-UM4 mit der Mutation S91P zwei P48A-Suppressor Mutationen relativ nahe beieinander, innerhalb von acht Aminosäuren, in der langen cytoplasmatischen Domäne von TatB gefunden wurden. Experimente mit Tat-Translokasen mit verkürzten TatB-Varianten haben gezeigt, dass die entsprechenden Stämme mit einer auf 91 Aminosäuren bzw. auf 81 Aminosäuren verkürzten TatB-Variante zwar einen stark reduzierten TorA Export aufweisen, jedoch zeigen diese Stämme immer noch eine signifikant höhere Aktivität als der Stamm ohne TatB (Lee *et al.*, 2002). Somit liegen beide Mutationen zwar nicht in einem Bereich, der absolut essentiell für die Funktion von TatB in der Tat-abhängigen Proteintranslokation ist, jedoch zeigen die Daten von Lee *et al.* (2002), dass diesem Bereich des TatB-Proteins sehr wohl eine Funktion in der Tat-abhängigen Proteintranslokation zukommt, die für die Effektivität der Translokation wichtig ist. Die Daten aus der vorliegenden Arbeit geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass diesem Bereich in der cytoplasmatischen Domäne von TatB eine direkte oder indirekte Funktion bei der TatB-TatC Interaktion zukommt, da beide Mutationen den Defekt, der durch P48A in TatC verursacht wird, ausgehend von TatB supprimieren. Die dritte Mutation, welche die Tat-inaktivierende Wirkung von P48A in TatC, ausgehend von TatB supprimiert, ist die Mutation L17H aus P48A-S-UM5. Diese Mutation liegt nach dem gegenwärtigen Topologiemodell innerhalb der Transmembranhelix des TatB-Proteins. Durch eine „cysteine scanning“-Mutagenese von TatB konnten Lee *et al.* (2006a) Reste der TatB-Transmembranhelix aufzeigen, die an einer TatB-TatB Interaktion beteiligt sind.



**Abbildung 37: Schematische Darstellung der Topologie von TatB mit der Lage der P48A-Suppressormutation L17H und Helix-Rad-Darstellung eines Teils der TatB Transmembranhelix.** In der Helix-Rad-Darstellung, ist Leucin an Aminosäureposition 17 in rot markiert. Der Bereich der TatB Transmembranhelix, dem Lee *et al.* (2006a) eine Aufgabe bei der TatB-TatB Interaktion zugeordnet haben, ist durch einen blauen Halbkreis markiert [Helix-Rad-Darstellung verändert nach Lee *et al.* (2006a)].

#### IV. Diskussion

Betrachtet man die Lage dieser Reste in der Helix-Rad-Darstellung der TatB Transmembranhelix so zeigt sich (siehe Abb. 37), dass die Reste, welche am stärksten an der TatB-TatB Interaktion beteiligt sind, alle auf einer Seite der Transmembranhelix liegen. Interessanterweise liegt Leucin an Position 17 genau auf der anderen Seite der Transmembranhelix und ist auch einer der Reste, die eine relativ niedrige „crosslinking“-Reaktivität bei der TatB-TatB-Interaktion zeigten. Es bleibt somit die Möglichkeit, dass diese Seite der Transmembranhelix an einer Interaktion von TatB mit TatC im TatBC-Rezeptorkomplex beteiligt ist.

Interessanterweise wurde in der Mutantentranslokase P48A-S-UM4 die Mutation L9F im extremen N-Terminus von TatC ebenfalls als eine der Mutationen identifiziert, die eine Suppression der Tat-inaktivierenden Mutation P48A in TatC bewirken. Für L9F in TatC konnte bereits in Kreutzenbeck *et al.* (2007) und auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sie eine Suppressormutation des Exportdefektes des TorA[KQ]-MalE-Reporters und des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE-Reporters ist (siehe z.B. III 2.2). Wie bereits in IV 1.3.5.1 beschrieben, gibt es deutliche Hinweise darauf, dass der TatC N-Terminus in dem sich die Mutation befindet, Teil einer Signalpeptidbindetasche in der Tat-Translokase ist, an deren Bildung auch der TatB N-Terminus beteiligt ist. Für die Wirkungsweise der Mutation L9F in TatC bei der Suppression der Tat-inaktivierenden Wirkung der P48A-Mutation gibt es nun mehrere Möglichkeiten.

Zum einem ist es denkbar, dass durch die Mutation L9F in TatC eine Verbesserung der Interaktion von TatB und TatC im Bereich der postulierten Signalpeptidbindetasche bewirkt wird. Diese Verbesserung könnte dazu führen, dass die Signalpeptidbindetasche so verändert ist, dass es zu einer neuen oder stärkeren Bindung von der Signalpeptidbindetasche zum TorA[KQ]- bzw. zum TorA[F14D]-Signalpeptid käme. Im Fall der Tat-inaktivierenden Wirkung von P48A in TatC würde diese verbesserte Interaktion zwischen TatB und TatC durch die Mutation L9F in TatC der negativen Auswirkung von P48A auf die Interaktion von TatB und TatC entgegenwirken und so das Ausmaß der Tat-inaktivierenden Wirkung vermindern.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der Austausch L9F in TatC dazu führt, dass die Tat-Signalpeptide von Tat-Substraten fester in der Signalpeptidbindetasche zwischen TatB und TatC gebunden werden und auf diese Weise durch das Substrat als Bindeglied eine TatB-TatC-Interaktion stabilisiert wird. Auf diese Weise würde es so zu einer produktiveren Interaktion zwischen TatB und TatC kommen, die eine effektivere Translokation des Substrates zur Folge hat.

Wie bereits in Kapitel IV 1.5, bei dem Vergleich der Suppressormutationen der Exportdefekten TorA-MalE-Reporter mit den PrI-Mutationen aus dem Bereich der Sec-abhängigen Proteintranslokation beschrieben, ist auch im Fall von L9F (TatC) und auch der anderen P48A-Suppressormutationen ein vollkommen anderer Erklärungsansatz zur Wirkweise bei der Suppression der Tat-inaktivierenden Wirkung von P48A (TatC) nicht auszuschließen. Auch hier wäre es möglich, dass die Mutationen nicht eine verlorene oder gestörte Protein-Protein-Interaktion zwischen TatB und TatC wiederherstellen, sondern die Suppression der Tat-inaktivierenden Wirkung von P48A (TatC) auf in eine vollkommen andere Art und Weise bewirken.

Welche der oben genannten Möglichkeiten zur Wirkungsweise der Mutation L9F und auch der anderen P48A-Suppressormutationen bei der Suppression der Tat-inaktivierenden Wirkung von P48A in TatC schließlich auch zutreffen, die Daten aus der vorliegenden Arbeit stellen die ersten erfolgreichen „gain of function“-Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen TatB und TatC in der Tat-Translokase dar und sind ein Einstieg in die Untersuchung der molekularen Wechselwirkungen zwischen TatB und TatC im TatBC-Rezeptorkomplex.



## V. Zusammenfassung

Der bakterielle Tat-Weg ist ein alternativer Weg für Proteine über die Cytoplasmamembran. Die Signalpeptide von Tat-Substraten besitzen ein konserviertes Sequenzmotiv mit dem Konsensus SRRxFLK. Das Zwillingsarginin (RR) ist hierbei beinahe invariabel und essentiell für eine effiziente Erkennung/Bindung des Tat-Signalpeptids an der Tat-Translokase.

Durch eine genetische Selektion konnten Kreuzenbeck *et al.* (2007) mit den N-Termini von TatC und TatB zwei Bereiche in der Tat-Translokase identifizieren, die an der Bindung/Erkennung von Tat-Signalpeptiden beteiligt sind. Hierzu verwendeten sie eine Variante des hoch sensitiven TorA-MalE-Reporterproteins, die aufgrund des Austausches des Zwillingsarginins zu Lysin-Glutamin (KQ) im Tat-Konsensus-Motiv des TorA-Signalpeptids exportdefekt ist. Alle Suppressormutationen dieses TorA[KQ]-MalE-Reporters, sogenannte KQ-Suppressormutationen, lagen in den erwähnten Bereichen der Tat-Translokase.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Substrat-Translokase-Interaktion bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *Escherichia coli* ausgehend von der Phenylalanin-Position untersucht, da diese neben den beiden Argininen die am höchsten konservierte Aminosäure im Tat-Konsensus-Motiv ist. Es konnte gezeigt werden, dass im TorA-Signalpeptid ein Serin und ein Arginin an der Phenylalanin-Position platziert werden können, ohne dass dies einen größeren negativen Einfluss auf die Effizienz des Tat-abhängigen Exports hat. Dennoch konnte gezeigt werden, dass nicht jede beliebige Aminosäure an der Phenylalanin-Position toleriert wird und dass diese Position eine kritische Determinante für die Erkennung/Bindung des TorA-Signalpeptids an der Tat-Translokase darstellen kann. Der Austausch des Phenylalanins gegen das negativ geladene, hydrophile Aspartat wurde nicht toleriert und führte zu einem kompletten Exportblock dieses TorA[F14D]-MalE-Reporters. Im Folgenden konnte gezeigt werden, dass der Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE-Reporters durch ausgewählte KQ-Suppressormutationen, wenn zumeist auch nur schwach, supprimiert wird. Zudem konnten vier neue Suppressortranslokasen isoliert werden, in denen sich die selektierten Suppressormutationen ebenfalls, wie alle KQ-Suppressormutationen, in den N-Termini von TatB und TatC befanden. Für diese Suppressormutationen konnte gezeigt werden, dass sie auch den Exportdefekt des TorA[KQ]-MalE-Reporters schwach supprimieren. Da alle untersuchten Suppressormutationen sowohl den Exportdefekt des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters supprimieren, bedeutet dies, dass keine dieser Suppressormutationen eine spezifische Bindung des Aspartats im TorA[F14D]-MalE- oder des Lysin-Glutamin im TorA[KQ]-MalE-Reporter durch die Tat-Translokase verursacht, sondern eine neue oder stärkere Bindung der Translokase zu einer anderen Position im Tat-Signalpeptid. Anhand von verschiedenen Suppressortranslokasen, in denen zwei und in einem Fall sogar drei Suppressormutationen kombiniert vorlagen, konnte gezeigt werden, dass die Kombination von Suppressormutationen in einer Tat-Translokase einen synergistischen Effekt auf die Effizienz der Suppression des Exportdefektes des TorA[F14D]-MalE- und des TorA[KQ]-MalE-Reporters hat. Dieser Effekt wurde sowohl bei der Kombination von zwei Suppressormutationen aus dem TatC N-Terminus, aber interessanterweise auch bei der Kombination von Suppressormutationen aus dem TatB N-Terminus mit Suppressormutationen aus dem TatC N-Terminus beobachtet, was ein starker genetischer Hinweis darauf ist, dass der TatB N-Terminus und der TatC N-Terminus bei der Bindung/Erkennung von Tat-Signalpeptiden kooperieren. Die Lage der Suppressormutationen in den N-Termini von TatB und TatC lässt hierbei auf eine durch TatB und TatC gemeinsam gebildete Signalpeptidbindetasche schließen, an der ein Tat-Signalpeptid über mehrere Kontakte gebunden wird. Schließlich konnte gezeigt werden, dass alle einfach, zweifach und auch dreifach mutierten Suppressortranslokasen immer noch in der Lage waren, den unveränderten TorA-MalE-Reporter zu exportieren. Allerdings wurde bei allen Suppressortranslokasen, die eine bestimmte Suppressormutation im TatB N-Terminus beinhalten, eine reduzierte Exporteffizienz des unveränderten TorA-MalE-Reporters beobachtet. Dieses lässt auf eine Veränderung der postulierten Signalpeptidbindetasche durch diese Mutation schließen, die dazu führt, dass das unveränderte TorA-Signalpeptid durch diese mutierten Tat-Translokasen nun schlechter erkannt wird oder aus sterischen Gründen nun schlechter an die Signalpeptidbindetasche binden kann.

Ein weiterer Bestandteil der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Komponenten der Tat-Translokase. Es wurde eine Tat-inaktivierende Mutation in TatC, von der bekannt ist, dass sie die Interaktion von TatB und TatC im TatBC-Rezeptorkomplex stört, verwendet um Tat-gekoppelte Suppressormutationen zu isolieren. Es wurden zwei Suppressortranslokasen identifiziert, die jeweils zwei Mutationen beinhalten, die für die Suppression der Tat-inaktivierenden Mutation in TatC verantwortlich sind. Die Lage der Suppressormutationen deutet darauf hin, dass die TatB Transmembranhelix, ein bestimmter Bereich in der cytoplasmatischen Domäne von TatB, und der extreme N-Terminus von TatC offensichtlich an den Wechselwirkungen zwischen TatB und TatC im TatBC-Rezeptorkomplex beteiligt sind.



## VI. Summary

The bacterial Tat pathway (twin arginine translocation) is an alternative pathway for proteins across the cytoplasmic membrane. The signal peptides of Tat substrates carry a conserved sequence motif with the consensus SRRxFLK. Here the twin arginine (RR) is almost invariable and is essential for an efficient recognition/binding of the Tat signal peptide to the Tat translocase.

Using a genetic selection, Kreutzenbeck *et al.* (2007) identified the N-terminal domains of TatB and TatC as regions in the Tat translocase that are involved in the recognition/binding of Tat signal peptides. For this purpose, they used a variant of the highly sensitive TorA-MalE reporter protein that is export-defective due to the replacement of the twin arginine by a lysine-glutamine (KQ) pair. All suppressor mutations of this TorA[KQ]-MalE reporter (so-called KQ-suppressor mutations) were located in these regions of the Tat translocase.

In the present work, substrate-translocase interaction during Tat-dependent protein translocation in *Escherichia coli* was investigated starting from the consensus phenylalanine residue, because the latter is the most highly conserved residue in the Tat consensus motif apart from the twin arginine. It was shown that it was possible to place a serine or arginine at the consensus phenylalanine position without causing any serious negative impact on the efficiency of the Tat-dependent translocation. However, it was also shown that not every amino acid is tolerated at the consensus phenylalanine position and that this position can be a critical determinant for the recognition/binding of the TorA signal peptide to the Tat translocase. The replacement of the consensus phenylalanine by the negatively charged and hydrophilic aspartate was not tolerated and led to a complete export defect of this TorA[F14D]-MalE reporter.

It was demonstrated that the TorA[F14D]-MalE export defect can be suppressed by chosen KQ-suppressor mutations, albeit only weakly. Additionally, four new Tat-coupled suppressor translocases were isolated, in which all the selected suppressor mutations were found, in the same way as all the KQ-suppressor mutations in the extreme N-terminal domains of TatB and TatC. For these newly identified suppressor mutations it was shown that they also weakly suppress the export defect of the TorA[KQ]-MalE reporter. Due to the fact that all investigated suppressor mutations suppress the export defect of both the TorA[F14D]-MalE and the TorA[KQ]-MalE reporter, it is apparent that none of the suppressor mutations causes a specific recognition of the aspartate in the TorA[F14D]-MalE or the lysine-glutamine in the TorA[KQ]-MalE reporter by the Tat translocase, but rather that they cause a new or a stronger binding from the Tat translocase to the signal peptide at a non-consensus phenylalanine and a non-twin arginine position. By means of different suppressor translocases that carry two or, in one case, three suppressor mutations in combination, it was shown that the combination of suppressor mutations in one Tat translocase have a synergistic effect on the efficiency of the suppression of the export defect of the TorA[F14D]-MalE and the TorA[KQ]-MalE reporter. This effect was observed when two suppressor mutations from the TatC N-terminal domain were combined and, interestingly, also when suppressor mutations from the TatB N-terminal domain were combined with suppressor mutations from the TatC N-terminal domain, which is strong genetic evidence that the TatB N-terminal domain and the TatC N-terminal domain cooperate in the process of Tat signal peptide binding/recognition. The localization of the suppressor mutations at the N-terminal domains of TatB and TatC strongly suggests the presence of a signal peptide binding pocket formed by TatB and TatC where a signal peptide is bound over several contacts. Finally, it was shown that all single-, double- and threefold-mutated Tat translocases were still able to export the unaltered TorA-MalE reporter. However, all suppressor translocases that carried a certain suppressor mutation in the N-terminal domain of TatB displayed a reduced export efficiency of the unaltered TorA-MalE reporter. This implies an alteration in the postulated signal peptide binding pocket due to the mutation, which then leads to an impaired recognition of the unaltered TorA signal peptide or to a hindered binding of the unaltered TorA signal peptide to the signal peptide binding pocket for steric reasons.

Another concern of this work was the investigation of the interactions between the components of the Tat translocase. A Tat-inactivating mutation in TatC, which is known to disrupt the interactions between TatB and TatC, was used to isolate Tat-coupled suppressor mutations. Two different suppressor translocases were identified that both carry two mutations responsible for the suppression of the Tat-inactivating mutation in TatC. The location of the mutations indicates that the TatB transmembrane helix, a distinct region in the cytoplasmic domain of TatB, and the extreme N-terminal domain of TatC are involved in the interactions between TatB and TatC in the TatBC receptor complex.



## VII. Literatur

- 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.
- 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.
- Andersson, H.,** von Heijne, G. (1991) A 30-residue-long "export initiation domain" adjacent to the signal sequence is critical for protein translocation across the inner membrane of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88: 9751-9754.
- Bageshwar, U.K.,** and Musser, S.M. (2007): Two electrical potential-dependent steps are required for transport by the *Escherichia coli* Tat machinery. *J Cell Biol* 179: 87-99.
- 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.,** 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
- Barrett, C.M.,** Freudl, R., and Robinson, C. (2007): Twin arginine translocation (Tat)-dependent export in the apparent absence of TatABC or TatA complexes using modified *Escherichia coli* TatA subunits that substitute for TatB. *J Biol Chem* 282: 36206-36213.
- 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.
- Berks, B.C.,** Sargent, F., De Leeuw, E., Hinsley, A.P., Stanley, N.R., Jack, R.L., Buchanan, G., Palmer, T. (2000a) A novel protein transport system involved in the biogenesis of bacterial electron transfer chains. *Biochim Biophys Acta* 1459: 325-330.
- Berks, B.C.,** Sargent, F., Palmer, T. (2000b) The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol.* 35: 260-274.
- Berks, B.C.,** Palmer, T. and Sargent, F. (2003) The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology, *Advances in Microbial Physiology* 47, 187-254
- Berks, B.C.,** Palmer, T., and Sargent, F. (2005) Protein targeting by the bacterial twinarginine translocation (Tat) pathway. *Curr Opin Microbiol* 8: 174-181.

## VII. Literatur

**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.**, Mehner, D., Richter, S., Lindenstrauss, U., Lünsdorf, H., Hause, G., Brüser, T. (2008) Recombinant expression of tatABC and tatAC results in the formation of interacting cytoplasmic TatA tubes in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 283: 25281-25289.

**Bieker, K.L.**, Phillips, G.J., Silhavy, T.J. (1990) The sec and prl genes of *Escherichia coli*. *J Bioenerg Biomembr* 22 :291-310.

**Bieker, K. L.**, Silhavy T. J. (1990) The genetics of protein secretion in *E. coli*. *Trends Genet* 6: 329–334.

**Birnboim, H.C.** und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 24:1513-1523.

**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  $\Delta$ 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: 18003-1

**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

**Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye-binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

**Braun, N.A.**, Davis, A.W., and Theg, S.M. (2007): The chloroplast Tat pathway utilizes the transmembrane electric potential as an energy source. *Biophys J* 93: 1993-1998.

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

- Brüser, T.,** and Sanders, C. (2003) An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiol Res* 158: 7-17.
- 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.
- Cannon, K.S.,** Or, E., Clemons, W.M. Jr., Shibata, Y., Rapoport, T.A. (2005) Disulfide bridge formation between SecY and a translocating polypeptide localizes the translocation pore to the center of SecY. *J Cell Biol* 169: 219-225.
- Chan, C.S.,** Zlomislic, M.R., Tieleman, D.P., and Turner, R.J. (2007): The TatA Subunit of *Escherichia coli* Twin-Arginine Translocase Has an N-in Topology. *Biochemistry* 46: 7396-7404
- Cline, K.,** Ettinger, W.F., Theg, S.M. (1992) Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two luminal proteins are transported in the absence of ATP. *J Biol Chem* 267: 2688-2696.
- Cline, K.,** and Mori, H. (2001) Thylakoid  $\Delta$ pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatCHcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J Cell Biol* 154: 719-729.
- Cline, K.,** and McCaffery, M. (2007): Evidence for a dynamic and transient pathway through the TAT protein transport machinery. *EMBO J* 26: 3039-3049.
- Cohen, S.N.,** Chang, A.C., Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69: 2110-2114
- Cristóbal, S.,** de Gier, J.W., Nielsen, H., von Heijne, G. (1999) Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *EMBO J* 18: 2982-90.
- 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 twinarginine 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.
- DeLisa, M.P.,** Samuelson, P., Palmer, T. and Georgiou, G. (2002) Genetic analysis of the twin arginine translocator secretion pathway in bacteria. *J Biol Chem* 277: 29825-29831.
- 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.

## VII. Literatur

**Denning, D. P.,** Patel, S. S., Uversky, V., Fink, A. L., and Rexach, M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 2450–2455.

**Derman, A.I.,** Puziss, J.W., Bassford, P.J. Jr. Beckwith J. (1993) A signal sequence is not required for protein export in *prlA* mutants of *Escherichia coli*. *EMBO J* 12: 879-888.

**Dower, W.J.,** Miller, J.F. and Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127-6145.

**Driessen, A.J.,** Nouwen, N. (2007) Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem* 77: 643-667.

**Dubini, A.,** and Sargent, F. (2003): Assembly of Tat-dependent [NiFe] hydrogenases: identification of precursor-binding accessory proteins. *FEBS Lett* 549: 141-146.

**Emr, S.D.,** Hanley-Way, S., Silhavy, T.J.(1981) Suppressor mutations that restore export of a protein with a defective signal sequence. *Cell* 23: 79-88.

**Fikes, J.D.,** Bassford, P.J. Jr. (1989) Novel *secA* alleles improve export of maltose-binding protein synthesized with a defective signal peptide. *J Bacteriol* 171: 40240-9.

**Fekkes, P.,** Driessen, A.J. (1999) Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 161-173.

**Flower, A.M.,** Doebele, R.C., Silhavy, T.J. (1994). *PrlA* and *PrlG* suppressors reduce the requirement for signal sequence recognition. *J. Bacteriol* 176:5607–5614.

**Francetić, O.,** Hanson, M.P., Kumamoto, C.A. (1993) *prlA* suppression of defective export of maltose-binding protein in *secB* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175: 4036-4044.

**Genest, O.,** Ilbert, M., Méjean, V., Iobbi-Nivol, C. (2005) TorD, an essential chaperone for TorA molybdoenzyme maturation at high temperature. *J Biol Chem* 280: 15644-15648.

**Genest, O.,** Seduk, F., Théraulaz, L., Méjean, V., Iobbi-Nivol, C. (2006) Chaperone protection of immature molybdoenzyme during molybdenum cofactor limitation. *FEMS Microbiol Lett* 265: 51-55.

**Geller, B.,** Zhu, H.Y., Cheng, S., Kuhn, A. and Dalbey, R.E. (1993) Charged residues render pro-OmpA potential dependent for initiation of membrane translocation. *J Biol Chem* 268: 9442-9447.

**Gérard, 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

**Gerard, F.,** and Cline, K. (2007). The thylakoid proton gradient promotes an advanced stage of signal peptide binding deep within the Tat pathway receptor complex. *J Biol Chem* 282: 5263-5272.

- 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.
- 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.
- Graubner, W.,** Schierhorn, A., Brüser, T. (2007) DnaK plays a pivotal role in Tat targeting of CueO and functions beside SlyD as a general Tat signal binding chaperone. *J Biol Chem* 282: 7116-7124.
- Greene, N.P.,** Porcelli, I., Buchanan, G., Hicks, M.G., Schermann, S.M., Palmer, T., and Berks, B.C. (2007): Cysteine scanning mutagenesis and disulfide mapping studies of the TatA component of the bacterial twin-arginine translocase. *J Biol Chem* 282: 23937-23945.
- Halbig, D.,** Wiegert, T., Blaudeck, N., Freudl, R., and Sprenger, G.A. (1999) 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.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on the transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-580.
- Hatzixanthis, K.,** Clarke, T.A., Oubrie, A., Richardson, D.J., Turner, R.J., Sargent, F. (2005) Signal peptide chaperone interactions on the twin-arginine protein transport pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 8460-8465.
- 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.
- Holzapfel, E.,** Eisner, G., Alami, M., Barrett, C.M., Buchanan, G., Luke, I., Betton, J.M., Robinson, C., Palmer, T., Moser, M., et al. (2007): The entire N-terminal half of TatC is involved in twin-arginine precursor binding. *Biochemistry* 46: 2892-2898.
- Hou, B.,** Frielingsdorf, S., and Klösgen, R.B. (2006) Unassisted membrane insertion as the initial step in delta pH/Tat-dependent protein transport. *J Mol Biol* 355: 957-967.
- 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.

## VII. Literatur

- 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.
- Ignatova, Z.,** Hornle, C., Nurk, A. & Kasche, V. (2002) Unusual signal peptide directs penicillin amidase from *Escherichia coli* to the Tat translocation machinery. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 146-149.
- Ilbert, M.,** Méjean, V., Giudici-Orticoni, M.T., Samama, J.P., Iobbi-Nivol, C. (2003) Involvement of a mate chaperone (TorD) in the maturation pathway of molybdoenzyme TorA. *J Biol Chem* 278: 28787-28792.
- Ilbert, M.,** Méjean, V., Iobbi-Nivol, C. (2004) Functional and structural analysis of members of the TorD family, a large chaperone family dedicated to molybdoproteins. *Microbiology* 150: 935-943.
- Ize, B.,** Gerard, F., Zhang, M., Chanal, A., Voulhoux, R., Palmer, T., Filloux, A. & Wu, L. F. (2002) In vivo dissection of the Tat translocation pathway in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 317: 327-335.
- Jaeger, K.E.,** Eggert, T., Eipper, A. & Reetz, M.T. (2001) Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 55: 519-530.
- Jongbloed, J.D.H.,** 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.
- Kajava, A.V.,** Zolov, S.N., Kalinin, A.E., Nesmeyanova, M.A. (2000) The net charge of the first 18 residues of the mature sequence affects protein translocation across the cytoplasmic membrane of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 182: 2163-2169.
- 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.
- Kovach, M.E.,** Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M. and Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176.
- Kreutzenbeck, P.** (2004) Export von Proteinen mit Zwillingsarginin-Signalsequenzen über den Tat-Weg in *Escherichia coli*. Dissertation.
- Kreutzenbeck, P.,** Kröger, C., Lausberg, F., Blaudeck, N., Sprenger, G.A., Freudl, R. (2007) *Escherichia coli* twin-arginine (Tat) mutant translocases processing relaxed signal peptide recognition specificities. *J Biol Chem* 282: 7903-11.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leake, M.C.,** Greene, N.P., Godun, R.M., Granjon, T., Buchanan, G., Chen, S., Berry, R.M., Palmer, T., Berks, B.C. (2008) Variable stoichiometry of the TatA component of the twin-arginine protein transport system observed by in vivo single-molecule imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 15376-15381.

- 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
- Lee, P.A.,** Orriss, G.L., Buchanan, G., Greene, N.P., Bond, P.J., Punginelli, C., Jack, R.L., Sansom, M.S., Berks, B.C., Palmer, T. (2006a) Cysteine-scanning mutagenesis and disulfide mapping studies of the conserved domain of the twin-arginine translocase TatB component. *J Biol Chem* 281: 34072-34085.
- Lee, P.A.,** Tullman-Ercek, D., Georgiou, G. (2006b) The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu Rev Microbiol* 60: 373-395.
- Li, P.,** Beckwith, J., Inouye, H. (1988) Alteration of the amino terminus of the mature sequence of a periplasmic protein can severely affect protein export in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85: 7685-7689.
- Li, H.,** Faury, D., Morosoli R. (2006) Impact of amino acid changes in the signal peptide on the secretion of the Tat-dependent xylanase C from *Streptomyces lividans*. *FEMS Microbiol Lett* 255: 268-74.
- Ma, X.,** and Cline, K. (2000): Precursors bind to specific sites on thylakoid membranes prior to transport on the delta pH protein translocation system. *J Biol Chem* 275: 10016-10022.
- Matos, C.F.,** Robinson, C., Di Cola, A. (2008) The Tat system proofreads FeS protein substrates and directly initiates the disposal of rejected molecules. *EMBO J* 27: 2055-2063.
- Matos C.F.,** Di Cola, A., Robinson, C. (2009) TatD is a central component of a Tat translocon-initiated quality control system for exported FeS proteins in *Escherichia coli*. *EMBO Rep* 10: 474-479.
- McDevitt, C.A.,** Buchanan, G., Sargent, F., Palmer, T., and Berks, B.C. (2006): Subunit composition and in vivo substrate-binding characteristics of *Escherichia coli* Tat protein complexes expressed at native levels. *FEBS J* 273: 5656-5668.
- Mendel, S,** McCarthy, A, Barnett, J.P., Eijlander, R.T., Nenninger A, Kuipers O.P., Robinson C. (2008) The *Escherichia coli* TatABC System and a *Bacillus subtilis* TatAC-type System Recognise Three Distinct Targeting Determinants in Twin-arginine Signal Peptides. *J Mol Biol* 375: 661-72.
- Miller, J.H.** (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 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.,** Summer, E.J., Ma, X., and Cline, K. (1999): Component specificity for the thylakoidal Sec and Delta pH-dependent protein transport pathways. *J Biol Chem* 146: 45-56.
- Mori, H.,** Summer, E.J., and Cline, K. (2001): Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid (Delta)pHdependent protein transport. *FEBS Lett* 501: 65-68.

## VII. Literatur

**Mori, H.,** and Cline, K. (2002) A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid  $\Delta$ pH/Tat translocase. *J Cell Biol* 157: 205-210.

**Mould, R.M.,** and Robinson, C. (1991): A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* 266: 12189-12193.

**Müller, S.D.,** De Angelis, A.A., Walther, T.H., Grage, S.L., Lange, C., Opella, S.J., Ulrich, A.S. (2007) Structural characterization of the pore forming protein TatAd of the twin-arginine translocase in membranes by solid-state  $^{15}\text{N}$ -NMR. *Biochim Biophys Acta* 1768: 3071-3079.

**Natale, P.,** Brüser, T., Driessen, A.J. (2007) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1778: 1735-1756.

**Nurizzo, D.,** Halbig, D., Sprenger, G.A., Baker, E.N. (2001) Crystal structures of the precursor form of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* and its complexes with bound ligands. *Biochemistry* 40: 13857-13867.

**Palmer, T.,** Sargent, F., Berks, B.C. (2005) Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends in Microbiology* 13: 175-180.

**Pérez-Rodríguez, R.,** Fisher, A.C., Perlmutter, J.D., Hicks, M.G., Chanal, A., Santini, C.L., Wu, L.F., Palmer, T., DeLisa, M.P. (2007) An essential role for the DnaK molecular chaperone in stabilizing over-expressed substrate proteins of the bacterial twin-arginine translocation pathway. *J Mol Biol* 367:715-730.

**Pommier, J.,** Méjean, V., Giordano, G., Iobbi-Nivol, C. (1998) TorD, a cytoplasmic chaperone that interacts with the unfolded trimethylamine N-oxide reductase enzyme (TorA) in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 273: 16615-16620.

**Puziss, J.W.,** Fikes, J.D., Bassford, P.J. Jr. (1989) Analysis of mutational alterations in the hydrophilic segment of the maltose-binding protein signal peptide. *J Bacteriol* 171: 2303-2311.

**Puziss, J.W.,** Strobel, S.M., Bassford, P.J. Jr. (1992) Export of maltose-binding protein species with altered charge distribution surrounding the signal peptide hydrophobic core in *Escherichia coli* cells harboring prl suppressor mutations. *J Bacteriol* 174: 92-101.

**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 leaderbinding protein. *Mol Microbiol* 40: 323-331.

**Osborne, R. S.,** Silhavy, T.J. (1993). PrlA suppressor mutations cluster in regions corresponding to three distinct topological domains. *EMBO J* 12: 3391–3398.

- Panahandeh, S.,** Maurer, C., Moser, M., DeLisa, M.P., Müller, M. (2008) Following the path of a twin-arginine precursor along the TatABC translocase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 283: 33267-33275.
- Papanikou, E.,** Karamanou, S., Economou, A. (2007) Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol* 5: 839-851.
- 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
- Punginelli, C.,** Maldonado, B., Grahl, S., Jack, R., Alami, M., Schroder, J., Berks, B.C., and Palmer, T. (2007): Cysteine-scanning mutagenesis and topological mapping of the *Escherichia coli* twin-arginine translocase TatC component. *J Bacteriol* 189: 5482-5494.
- Richter, S.,** and Brüser, T. (2005) Targeting of unfolded PhoA to the TAT translocon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 280: 42723-42730
- Richter, S.,** Lindenstrauss, U., Lucke, C., Bayliss, R., and Brüser, T. (2007): Functional Tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins. *J Biol Chem* 282: 33257-33264.
- 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.
- Ryan, J.P.,** Bassford, P.J. Jr. (1985) Post-translational export of maltose-binding protein in *Escherichia coli* strains harboring malE signal sequence mutations and either prl<sup>+</sup> or prl suppressor alleles. *J Biol Chem* 260: 14832-14837
- Saiki, R.K.,** Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 29: 487-491
- Sanger, F.,** Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 5463-5467.
- Sambrook, J.,** Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 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 secindependent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J* 17: 101-112.
- 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.

## VII. Literatur

**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.** (2007) The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes. *Biochem Soc Trans* 35: 835-847.

**Schatz, P. J,** Beckwith, J. 1990. Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 24:215–248.

**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.

**Settles, A.M.,** Yonetani, A., Baron, A., Bush, D.R., Cline, K., and Martienssen, R. (1997) Secindependent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science* 278: 1467- 1470.

**Smith, M.A.,** Clemons, W.M. Jr., DeMars, C.J., Flower, A.M. (2005) Modeling the effects of prl mutations on the *Escherichia coli* SecY complex. *J Bacteriol* 187: 6454-6465

**Snyder, W.B.,** Silhavy, T.J. (1995) Beta-galactosidase is inactivated by intermolecular disulfide bonds and is toxic when secreted to the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177: 953-963.

**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.

**Stanley, N.R.,** Findlay, K., Berks, B.C., Palmer, T.(2001) *Escherichia coli* strains blocked in Tat-dependent protein export exhibit pleiotropic defects in the cell envelope. *J Bacteriol* 183: 139-144.

**Stevenson, L.G.,** Strisovsky, K., Clemmer, K.M., Bhatt, S., Freeman, M., Rather, P.N. (2007) Rhomboid protease AarA mediates quorum-sensing in *Providencia stuartii* by activating Tata of the twin-arginine translocase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:1003-1008.

**Strauch, E.M.,** and Georgiou, G. (2007): *Escherichia coli* tatC mutations that suppress defective twinarginine transporter signal peptides. *J Mol Biol* 374: 283-291.

**Takeshita, S.,** Sato, M., Toba, M., Masahashi, W. and Hashimoto-Gotoh, T. (1987) High copynumber and low-copy-number plasmid vectors for *lacZα*-complementation and chloramphenicol- or kanamycin-resistance selection. *Gene* 61: 63-74.

- Tam, P.C.,** Maillard, A.P., Chan KK, Duong F.(2005) Investigating the SecY plug movement at the SecYEG translocation channel. *EMBO J* 24: 3380-3388.
- Tanaka, H.,** Lerner, S.A. and Lin, E.C. (1967) Replacement of a phosphoenolpyruvatedependent phosphotransferase by a nicotinamide adenine dinucleotide linked dehydrogenase for the utilization of mannitol. *J Bacteriol* 93: 642-648.
- Tarry, M.,** Arends, S.J., Roversi, P., Piette, E., Sargent, F., Berks, B.C., Weiss, D.S., Lea, S.M. (2009) The *Escherichia coli* cell division protein and model Tat substrate SufI (FtsP) localizes to the septal ring and has a multicopper oxidase-like structure. *J Mol Biol* 386: 504-519.
- Towbin, H.T.,** Staelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76: 4350-4354.
- Tullman-Ercek, D.,** DeLisa, M.P., Kawarasaki, Y., Iranpour, P., Ribnicky, B., Palmer, T., Georgiou, G. (2007) Export pathway selectivity of *Escherichia coli* twin arginine translocation signal peptides. *J Biol Chem* 282: 8309-8316.
- Turner, R.J.,** Papish, A.L., and Sargent, F. (2004) Sequence analysis of bacterial redox enzyme maturation proteins (REMPs). *Can J Microbiol* 50: 225-238.
- Valent, Q.A.,** Scotti, P.A., High, S., de Gier, J.W., von Heijne, G., Lentzen, G., Wintermeyer, W., Oudega, B., and Luirink, J. (1998): The *Escherichia coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon. *EMBO J* 17: 2504-2512.
- Van den Berg, B.,** Clemons, W.M. Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., Rapoport, T.A. (2004) X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427: 36-44.
- Von Heijne, G.** (1986) Net N-C charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria. *J Mol Biol* 192: 287-290.
- von Heijne, G.** (1990) Protein targeting signals. *Curr Opin Cell Biol* 2: 604-608
- Walker, M.B.,** Roy, L.M., Coleman, E., Voelker R., Barkan A. (1999) The maize *tha4* gene functions in sec-independent protein transport in chloroplasts and is related to *hcf106*, *tatA*, and *tatB*. *J Cell Biol* 147: 267-276.
- Wang, Y.,** Zhang, Y., Ha, Y. (2006) Crystal structure of a rhomboid family intramembrane protease. *Nature* 444: 179-180.
- Warren, G.,** Oates J., Robinson C., Dixon A.M. (2009) Contributions of the transmembrane domain and a key acidic motif to assembly and function of the TatA complex. *J Mol Biol* 388: 122-132.
- 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

## VII. Literatur

- Weiss, J.B.,** Bassford, P.J. Jr. (1990) The folding properties of the *Escherichia coli* maltose-binding protein influence its interaction with SecB in vitro. *J Bacteriol* 172: 3023-3029.
- 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.
- 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.
- Wu, Z.,** Yan, N., Feng, L., Oberstein, A., Yan, H., Baker, R.P., Gu, L., Jeffrey, P.D., Urban, S., Shi, Y. (2006) Structural analysis of a rhomboid family intramembrane protease reveals a gating mechanism for substrate entry. *Nat Struct Mol Biol* 13: 1084-1091.
- Yahr, T.L.,** and Wickner, W.T. (2001): Functional reconstitution of bacterial Tat translocation in vitro. *EMBO J* 20: 2472-2479.
- Yamada, K.,** Sanzen I., Ohkura T., Okamoto A., Torii K., Hasegawa T., Ohta M. (2007) Analysis of twin-arginine translocation pathway homologue in *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* 55: 14-19.
- Yamane, K.,** Mizushima, S. (1988) Introduction of basic amino acid residues after the signal peptide inhibits protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Relation to the orientation of membrane proteins. *J Biol Chem* 263: 19690-19696.
- Yen, M.R.,** Tseng, Y.H., Nguyen, E.H., Wu, L.F., and Saier, M.H., Jr. (2002) Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. *Arch Microbiol* 177: 441-450.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie I des Forschungszentrums Jülich GmbH angefertigt.

## **Danksagung**

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Roland Freudl für die Überlassung des interessanten und überaus spannenden Themas, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen und konstruktiven Ratschläge, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. J.F. Ernst danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. em. H. Sahm und Prof. Dr. M. Bott danke ich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Institut für Biotechnologie I.

Weiterhin möchte ich mich bei den ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Proteinsekretion“ Astrid Bida, Michael Caspers, Gabi Decker, Peter Kreutzenbeck, Carsten Kröger, Daniel Meißner, Henrike Brundiek, Anna-Lena Weiss, Sandra Scheele, Sonja Müller, Liuyang Diao, Ava Chattopadhyay, Bertan Bopp und Stefan Fleckenstein für das sehr angenehme Arbeitsklima und für ihre ständige Hilfsbereitschaft bedanken. Ein besonderer Dank gilt hierbei Astrid Bida und Sandra Scheele für die problemlose und gute Zusammenarbeit bei den täglichen Pflichten, und die schöne Zeit im Labor 225/226.

Allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie I danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und für das allgemein sehr angenehme Arbeitsklima im Haus.

Den Mitgliedern des „Tat-machine“-Projekts danke ich für die sehr angenehme Atmosphäre bei den halbjährigen Treffen und auch für die anregenden Diskussionen rund um das Thema der Tat-abhängigen Proteintranslokation.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, und hier besonders bei meinen Eltern, die mir während des gesamten Studiums alle mögliche Hilfe haben zukommen lassen.

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig ausgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Jülich, im August 2009