

Determinanten für die Membranpassage von
Tat-abhängig transportierten Proteinen
in *Escherichia coli*

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Claudia Rathmann

geboren am 23.12.1982 in Hannover

2016

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brüser
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Axel Schippers
Tag der Promotion: 29.07.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	3
1. Einleitung.....	5
1.1 Kompartimentierung von Zellen und Proteinsekretionssysteme.....	5
1.1.1 Der Sec-Transport.....	6
1.1.2 Der Tat-Transport.....	7
1.2 Phospholipide in Membranen von <i>E. coli</i>	11
1.3 TatA-Selbstinteraktionen.....	16
1.4 Inhibitoren des Tat-Systems.....	17
2. Material und Methoden.....	19
2.1 Verwendete Stämme und Plasmide.....	19
2.2 Kultivierungsbedingungen.....	23
2.2.1 Medien und erforderliche Zusätze.....	23
2.2.2 Anzuchtbedingungen und Ernte.....	25
2.2.3 Stammerhaltung.....	26
2.3 Molekularbiologische Arbeiten.....	26
2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	26
2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
2.3.2.1 Standard-PCR.....	26
2.3.2.2 <i>QuikChange-Site-Directed</i> -Mutagenese.....	27
2.3.2.3 Kolonie-PCR/Kontroll-PCR.....	29
2.3.3 Restriktionsverdau und Ligation von DNA-Fragmenten.....	31
2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	31
2.3.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	32
2.3.5.1 Aufreinigung über das <i>NucleoSpin Extract II</i> Kit.....	32
2.3.5.2 Entsalzung von DNA.....	32
2.3.6 Herstellung kompetenter Zellen.....	32
2.3.6.1 Ultra-kompetente Zellen nach Sambrook und Russel (2001).....	33
2.3.6.2 Elektrokompetente Zellen.....	33
2.3.7 Transformation von <i>E.-coli</i> -Stämmen.....	33
2.3.7.1 Fast Transformation.....	33
2.3.7.2 Transformation mit ultra-kompetenten Zellen (Hitzeschock).....	34
2.3.7.3 Transformation mit elektrokompetenten Zellen (Elektroporation).....	34
2.3.8 <i>Single-copy</i> -Integration von DNA in die λ <i>attachment site</i>	34
2.3.9 Geninaktivierung nach Datsenko und Wanner.....	35

2.3.10	Geninaktivierung durch Phagentransduktion mit P1 _{vir}	36
2.3.11	Entfernung der Antibiotikaresistenzkassette nach Geninaktivierung.....	40
2.3.12	Entfernung des temperatursensitiven Plasmids pMS5 zur Erzeugung des PE-defizienten Stammes GN10 (<i>curing</i>).....	40
2.3.13	Synthese eines cysteinfreien TatCs.....	41
2.3.14	DNA-Sequenzierung.....	41
2.4	Proteinbiochemische Arbeiten.....	42
2.4.1	Disulfidquervernetzung von TatA-Variaten.....	42
2.4.2	Carbonatwaschung von Membranen.....	43
2.4.3	Solubilisierung von Membranproteinen.....	43
2.4.4	TCA-Fällung von Proteinen.....	44
2.4.5	Analytische Proteinseparation.....	44
2.4.5.1	SDS-PAGE.....	44
2.4.5.2	Blue-native-PAGE.....	46
2.4.5.3	Coomassie-Färbung von Proteinen.....	47
2.4.5.4	Western-Blot und Proteindetektion.....	48
2.4.6	<i>In-vivo</i> -Analysen des Tat-Transports.....	50
2.4.6.1	HiPIP-Transport.....	50
2.4.6.2	TMAO-Atmung.....	51
2.4.6.3	TorA-Aktivitätsassay.....	55
2.4.6.4	SDS-Phänotyp.....	57
2.4.6.5	Kettenphänotyp.....	57
2.5	Lipidbiochemische Methoden.....	58
2.5.1	Lipidextraktion nach Ames.....	58
2.5.2	Dünnschichtchromatographische Analysen von Phospholipiden.....	59
2.6	³¹ P-NMR-Spektroskopie.....	61
2.7	Mikroskopische Methoden.....	61
2.7.1	Herstellung von Agar-Slides.....	62
2.7.2	Durchlichtmikroskopie.....	62
2.8	Zentrifugen und Rotoren.....	62
3.	Ergebnisse.....	63
3.1	Einfluss der Phospholipidzusammensetzung der Cytoplasmamembran auf den Tat-Transport.....	63
3.1.1	Das anionische Phospholipid Cardiolipin wird für den Tat-Transport nicht benötigt.....	63
3.1.1.1	Cardiolipin ist nicht notwendig für den Transport von HiPIP.....	63
3.1.1.2	Wachstum auf Glycerol/TMAO verlief bei BKT12 und W3110 gleich.....	64
3.1.1.3	BKT12 zeigte keine erhöhte SDS-Sensitivität.....	65
3.1.1.4	Zellen von BKT12 bildeten keinen Kettenphänotyp aus.....	66
3.1.2	Das anionische Phospholipid Phosphatidylglycerol wird für den Tat-Transport nicht benötigt.....	66
3.1.2.1	Wachstum von UE54 und UE53 verlief auf Glycerol/TMAO gleich.....	67
3.1.2.2	Ungewöhnliche Bildung von PG und CL in der <i>pgsA</i> -Nullmutante.....	68
3.1.2.3	Knockouts der <i>pgsA</i> -Paralogen <i>ynbA</i> und <i>ynjF</i> haben keinen Einfluss auf die PG und CL-Bildung bei UE54.....	70
3.1.2.4	C-Quelle hat Einfluss auf die Ausbildung der anionischen Phospholipide im Δ <i>psgA</i> -Stamm.....	71
3.1.2.5	Zellen von UE54 und UE54 <i>tatAE</i> bilden keinen Kettenphänotyp aus.....	72
3.1.2.6	UE53 und UE54 zeigen erhöhte SDS-Sensitivität.....	73

3.1.3	Das zwitterionische Phospholipid Phosphatidylethanolamin ist für den Tat-Transport notwendig.....	74
3.1.3.1	Zellen von GN10 bildeten keinen Kettenphänotyp aus.....	75
3.1.3.2	GN10 zeigte kein Wachstum auf Glycerol/TMAO.....	76
3.2	Auswirkungen der Quervernetzung des TatA-N-Terminus und der APH auf die Tat-Transporteffizienz in Cysteinvarianten von TatA.....	78
3.2.1	Cysteingelabelte N-Termini von TatA neigten stark zur Ausbildung von Disulfiden.....	78
3.2.2	Die Doppelcysteinvariante G2C;G3C bildete homooligomere TatA-Assoziationen.....	80
3.2.3	Zunehmende Quervernetzung von TatA verhinderte den Transport von HiPIP und der Amidasen.....	82
3.2.4	TatA der Doppelcysteinvariante G2C;G3C integrierte vollständig in die Cytoplasmamembran.....	85
3.2.5	TatA der Cytoplasmafraktion zeigte vergleichbare Disulfidbildung wie das membranständige TatA.....	86
3.2.6	Für den Abfluss der Elektronen bei der Disulfidbildung ist nicht das Dsb-System (DsbB) und keine Komponenten der Atmungskette verantwortlich.....	86
3.3	Inhibitoren des Tat-Systems bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> haben keinen Einfluss auf den Tat-Transport in <i>Escherichia coli</i>	88
3.3.1	Wachstumseffekte von Bay11 und NPM.....	88
3.3.2	Stabilität des BC-Komplexes bleibt unbeeinflusst (BN-PAGE).....	89
3.3.3	Der Transport von HiPIP bleibt unbeeinflusst von Bay11 und NPM.....	90
3.3.4	Cysteine von TatC sind kein transportbeeinflussender Angriffspunkt für NPM.....	90
3.3.5	Die periplasmatische TorA-Aktivität ist unbeeinflusst von Bay11 und NPM....	91
4.	Diskussion.....	93
4.1	Einfluss der Phospholipidzusammensetzung der Cytoplasmamembran auf den Tat-Transport.....	93
4.1.1	Cardiolipin und Phosphatidylglycerol sind nicht spezifisch notwendig für den Tat-Transport.....	93
4.1.2	Negativ geladene Biosynthesestufen der Phospholipide ersetzen bestimmte Funktionen von PG und CL.....	94
4.1.3	Es existiert ein PgsA-unabhängiger, alternativer Biosyntheseweg für PG und CL.....	95
4.1.4	Membran- und Zellwandeigenschaften der <i>pgsA</i> -Mutante UE54.....	97
4.1.5	Das zwitterionische PE ist notwendig für den Tat-Transport.....	100
4.2	Quervernetzung von TatA.....	101
4.2.1	Dimeres TatA ist funktionsfähig.....	103
4.2.2	Weitere Quervernetzung des N-Terminus verhindert den Transport, nicht aber die Integration von TatA in die Membran.....	104
4.2.3	TatA der Cytoplasmafraktion stammt aus der Membran.....	106
4.2.4	Abfluss der Elektronen bei der Disulfidbildung wird weder durch das Dsb-System bewerkstelligt, noch ist ein bestehender Elektronenfluss über Komponenten der Atmungskette notwendig.....	107
4.3	<i>In-vivo</i> -Tat-Transport ist unbeeinflusst durch Bay11 und NPM.....	108

Literaturverzeichnis.....109

Lebenslauf.....116

Zusammenfassung

Das *twin-arginine-translocation* (Tat)-System von *Escherichia coli* (*E. coli*) transportiert vor allem bereits gefaltete Proteine die im Cytoplasma synthetisiert werden über die Innere Membran. Dabei werden sie entweder ins Periplasma entlassen oder verbleiben als Membranprotein in der Cytoplasmamembran. Der Transportprozess erfolgt nach einem komplex konzentrierten Ablauf, der durch viele Einzelkomponenten beeinflusst wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte zur Interaktion der Tat-Komponenten mit sich selbst und mit Komponenten in der direkten Umgebung des Tat-Systems untersucht. Zum einen wurde mittels *in-vivo*-Transportstudien untersucht, ob die membranbildenden Phospholipide PE, PG und CL spezifisch notwendig für die Funktionalität des Tat-Systems sind. Die Experimente wurden in völliger Abwesenheit des jeweils zu untersuchenden Phospholipids durchgeführt, da Null-Mutationen genutzt wurden. Es stellte sich heraus, dass weder CL noch PG, jedoch PE spezifisch nötig war, um die volle Funktion des Tat-Systems aufrecht zu erhalten.

Desweiteren wurde in einer Selbstinteraktionsstudie die Komponente TatA untersucht. Dabei wurden Einzel- und Doppelcysteinaustausche in TatA eingeführt. TatA bildet vor allem bei Einzelaustauschen im N-Terminus, aber auch bei Austausch tiefer in der TMH Dimere. Auch Cysteine in der APH zeigen eine leichte Tendenz zur Disulfidbildung. Alle untersuchten Konstrukte ermöglichten als Dimer die volle Funktion des Tat-Transport. Die Stärke der Disulfidbildung und damit die Assemblierung von TatA waren unabhängig von der Ausbildung eines funktionalen BC-Komplexes. Wurde eine weitere Quervernetzung von TatA-Protomeren am N-Terminus bis mindestens zum Decamer durchgeführt, kam der Transport zum Erliegen, was darauf deutet, dass eine gewisse Flexibilität des N-terminalen Bereiches der TatA-Protomere für den Transport entscheidend wichtig ist.

Als weitere Determinanten für das Tat-System wurden in dieser Arbeit zwei potentielle Inhibitoren des Tat-Systems untersucht, die möglicherweise durch eine Interaktion mit der Tat-Translokase inhibitorisch wirken konnten. Diese wurden bereits als Hemmstoffe des Tat-Systems in *P. aeruginosa* identifiziert, jedoch zeigte sich in der vorliegenden Arbeit in sämtlichen Transportassays, dass sie für das *E.-coli*-Tat-System unwirksam sind.

Schlagwörter: *twin arginine translocation*, Phospholipide, TatA-Selbst-Interaktion

Abstract

The twin arginine translocation (Tat) system of *Escherichia coli* (*E. coli*) translocates mainly folded proteins across the inner membrane after synthesis in the cytoplasm. They might be released into the periplasm or stuck to the cytoplasmic membrane as a membrane protein. The process of translocation happens in a complex concerted manner influenced by a variety of components. In this study different aspects as to interactions of Tat components with themselves and with components of the direct environment of the Tat system were examined. On the one hand, *in vivo* studies on the specific requirement of the membrane-forming phospholipids PE, PG and CL for the Tat functionality were conducted. The experiments were accomplished in the complete absence of the respective phospholipid, as null mutants were used. It became clear that neither PG nor CL but PE was specifically required for full Tat functionality.

On the other hand, the TatA component was examined in a self interaction study with single and double cysteine substitutions. A strong dimer formation could be observed especially with cysteines at the N terminus and in the rest of the transmembrane helix. Cysteines in the amphipathic helix tend to a light dimer formation as well. The dimer was able to support Tat transport in every variant. The intensity of dimer formation and the resulting assembly of TatA was independent of a functional BC complex. When TatA was further crosslinked –at least to decamers- by the insertion of two cysteines at the N terminus, the transport ceased, which points to the necessity for flexible N termini of the TatA protomers for transport.

As further determinants for the Tat system two potential inhibitors of the tat system were examined in this study, which might inhibit the translocase by direct interaction. These substances had been proven in all assays of this study to be inhibitory for the *Pseudomonas aeruginosa* Tat system, but in the actual study they were shown to be ineffective on the *E. coli* Tat system.

Key words: twin arginine translocation, phospholipids, TatA self-interaction

Abkürzungsverzeichnis

Amp/amp ^R	=	Ampicillin/ ampicillinresistent
APS	=	Ammoniumpersulfat
APH	=	amphipathische Helix
Bay	=	Bay11-7082
BCCP	=	Biotincarboxylcarrierprotein
BN	=	blau-nativ; <i>blue native</i>
Cam/cam ^R	=	Chloramphenicol/chloramphenicolresistent
CDP-DAG	=	Cytidindiphosphat-Diacetyllycerol
CL	=	Cardiolipin
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
DTT	=	Dithiothreitol
ECL	=	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	=	Ethylendiamintetraessigsäure
HiPIP	=	<i>high potential iron-sulfur protein</i>
IAA	=	Iodacetamid
Kan/kan ^R /kan ^S	=	Kanamycin/kanamycinresistent/kanamycinsensitiv
LB	=	<i>lysogeny broth</i>
LDS	=	Lipiddoppelschicht
NEM	=	N-Ethylmaleimid
NPM	=	N-Phenylmaleimid
PA	=	<i>phosphatidic acid</i> , Phosphatidsäure
PAGE	=	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	=	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Saline
Pfu	=	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PE	=	Phosphatidylethanolamin
PEG	=	Polyethylenglycol
PG	=	Phosphatidylglycerol
PL	=	Phospholipid
PMSF	=	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	=	Phosphatidylserin
SDS	=	<i>sodium dodecal sulfat</i> , Natriumlaurylsulfat
Tat	=	<i>twin arginine translocation</i>

TEMED	=	Tetramethylethyldiamin
TMAO	=	Trimethyl-N-oxid
TMH	=	Transmembranhelix
Tris	=	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜNK	=	Übernachtskultur
WT	=	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Kompartimentierung von Zellen und Proteinsekretionssysteme

Ein kompartimentierter Aufbau von Zellen ist allen lebenden Organismen gleich. Durch die Abgrenzung von Biomembranen werden so einzelne Reaktionsräume geschaffen, in denen unterschiedliche Bedingungen herrschen und Reaktionen ablaufen können, die für die Aufrechterhaltung der Lebensprozesse und Energiekonservierung notwendig sind. Zellen gramnegativer Bakterien -wie der in dieser Arbeit untersuchte Modellorganismus *Escherichia coli* (*E. coli*)- haben zwei Kompartimente. Das reduktive Cytoplasma (CP) ist der Raum in dem sich die DNA und alle notwendigen Enzyme für die Replikation und Proteinbiosynthese befinden. Es wird nach außen von der Cytoplasmamembran (M) abgegrenzt. Auf der anderen Seite der Cytoplasmamembran ist das Periplasma (PP). In diesem oxidativen Kompartiment befindet sich die Zellwand: eine dünne durchlässige Peptidoglycanschicht, welche über Lipoproteine mit der Äußeren Membran (OM) verbunden ist. Im periplasmatischen Raum befinden sich viele Proteine, die für den Nährstoffmetabolismus, den Transport, Chemotaxis, Antibiotikaresistenz und Energienutzung wichtig sind. Da die Proteinbiosynthese aller Proteine im Cytoplasma erfolgt, muss ein geregelter, gezielter Transport der periplasmatischen Proteine über die Cytoplasmamembran nach außen stattfinden. Die zu transportierenden Proteine besitzen spezifische Transporterkennungssequenzen, sogenannte Signalpeptide, an Hand derer die in die Cytoplasmamembran integrierten Transportsysteme diese Vorläuferproteine (*precursor*) erkennen und sie über die Membran translozieren. Dabei werden sie entweder in den periplasmatischen Raum entlassen oder je nach Funktion in der Membran belassen.

In *E. coli* sind zwei Transportsysteme bekannt, die Proteine aus dem Cytoplasma ins Periplasma translozieren, das Sec und das Tat-System (Natale et al. 2008). Die meisten Proteine können in ungefaltetem Zustand durch das Sec-System (*general secretion pathway*) transportiert werden. Oft ist eine Faltung bereits im Cytoplasma nötig, wenn entweder redoxempfindliche Cofaktoren eingebaut werden müssen, eine Assemblierung von Untereinheiten nötig ist oder wenn eine zu schnelle Faltung des Proteins nach der Synthese im Cytoplasma erfolgt (Berks 1996). Diese Proteine werden über das Tat-System (*twin arginine translocation pathway*) transloziert.

Generell sind bislang 8 Sekretionssysteme in gramnegativen Bakterien gekannt, die Proteine aus dem Cytoplasma in die Äußere Membran oder in das umgebende Medium oder eine benachbarte Wirtszelle translozieren (Saier 2006). Nicht jeder gramnegative Organismus besitzt alle Sekretionssysteme, und einige Systeme sind bekannt für den Transport einzelner spezifischer Proteine. TypI-, TypIII-, TypIV und TypVI-Sekretionssysteme transportieren die

Proteine direkt in einem Schritt vom Cytoplasma nach außen. Erfolgt der Transport in zwei Schritten, erfolgt zunächst der Transport über das Sec- oder Tat-System, der zweite Schritt dann vom Periplasma über die OM (TypII, TypV, TypIV, TypVII (*chaperone usher pathway*) und TypVII (*extracellular nucleation-precipitation pathway*)). Substrate des TypIV-Sekretionssystems werden zum Teil Sec-abhängig transportiert, zum Teil Sec-unabhängig.

1.1.1 Der Sec-Transport

Das Sec-System ist ubiquitär sowohl in Cytoplasmamembranen von Bacteria und Archaea als auch in den eukaryotischen Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und der Chloroplasten zu finden (Saier 2006). Es transportiert ausschließlich ungefaltete Proteine über einen mehrstufigen Prozess. Das Sec-System in *E. coli* ist aus verschiedenen Komponenten aufgebaut: einem heterotrimerem Proteinkomplex (SecYEG), der membranintegral in der Cytoplasmamembran verankert ist und einer peripher assoziierten ATPase SecA. SecA ist ein homodimeres ATP-abhängiges Motorprotein, das durch ATP-Verbrauch im Zusammenspiel mit dem SecYEG-Komplex die Translokation ermöglicht. SecY besitzt zehn Transmembransegmente und bildet den Translokationskanal mit den kleineren Komponenten SecE und SecG (Ito 1992). Die membranintergralen Proteine SecD und SecF bilden einen Komplex mit YajC. Dieser ist für die Sekretion nicht erforderlich, kann aber durch die Stabilisierung von SecA den Transport um das 10fache steigern (Duong und Wickner 1997); (Nouwen et al. 2001). Die Sec-Translokase vermittelt den Export von Proteinen im ungefalteten Zustand. ATP und die protonenmotorische Kraft stellen die Energie bereit, die für diesen Prozess erforderlich ist.

Sekretorische Proteine mit einem N-terminalen Signalpeptid können co-translational oder post-translational zur Sec-Translokase gelangen. Im post-translationalen Weg werden Proteine nach abgeschlossener Synthese durch das Sekretion-spezifische cytoplasmatische Chaperon SecB zur Translokase geleitet (Randall et al. 1997) oder assoziieren direkt mit SecA (Vrontou et al. 2004). Nach der Bindung an SecA wird die Translokation durch eine ATP-verbrauchende Konformationsänderung von SecA initiiert und SecB entlassen (Economou und Wickner, 1994). Das Substrat wird unter weiterer ATP-Hydrolyse weiter in den SecY-Kanal inseriert. Beim co-translationalen Weg wird das Signalpeptid bereits während der Translation am Ribosom vom *signal recognition particle* (SRP) erkannt und gebunden. Der gesamte ternäre Komplex aus SRP, Ribosom und entstehender Proteinkette wird zum SecA-SecYEG-Komplex geleitet, durch den SRP-Rezeptor FtsY gebunden und unter GTP-Verbrauch auf SecA

übertragen. Dabei wird das SRP wieder freigesetzt. Der co-translationale Weg wird gewöhnlich für die Integration von Proteinen in die Cytoplasmamembran genutzt, nur wenige Proteine werden über diesen Weg ins Periplasma entlassen (Natale et al. 2008).

1.1.2 Der Tat-Transport

Wie das Sec-System ist auch das Tat-System in allen drei Domänen des Lebens zu finden. Sowohl in der Cytoplasmamembran von Eubacteria und Archaea als auch in den eukaryotischen Thylakoiden von Chloroplasten kommt es vor. Tat steht für *twin arginine translocation*. Namensgebend ist das Doppelarginin-Motiv im Signalpeptid aller Tat-Substrate. Im Gegensatz zum Sec-System ist das Tat-System in der Lage gefaltete Proteine oder sogar ganze Proteinkomplexe von einem Kompartiment ins andere zu translozieren. Diese Faltung kann aus drei Gründen notwendig sein (Berks 1996; Rodrigue et al. 1999): Eine schnelle Faltungskinetik des Proteins nach der Translation macht die Translokation im ungefalteten Zustand nicht möglich. Ein weiterer Grund kann eine Faltung in der reduzierenden Umgebung des Cytoplasmas notwendig machen, um den korrekten Einbau eines Cofaktors in das Protein zu gewährleisten. Der dritte Grund ist eine Komplexbildung von Proteinuntereinheiten zu oligomeren Assoziationen im Cytoplasma. Dabei trägt nur eine der Untereinheiten ein N-terminales Signalpeptid und nimmt die anderen Untereinheiten „Huckepack-artig“ mit.

Tat-Substrate

Hauptsächlich sind die periplasmatischen Tat-Substrate an Prozessen der anaeroben Atmung (z.B. NapD, eine Nitrat-Reduktase-Untereinheit) und der Photosynthese beteiligt. Auch periplasmatische Proteine die für die Zellteilung (AmiA und AmiC) und für die Kupferresistenz (CueO) von Bedeutung sind, können Tat-Substrate sein. Einige Substrate sind auch für die Pathogenität bestimmter Organismen von Bedeutung. In *Pseudomonas aeruginosa* wurden zwei Virulenzfaktoren (Phospholipasen) gefunden, die Tat-abhängig transportiert werden. (Voulhoux et al. 2001). In *E. coli* sind bislang 27 Tat-Substrate beschrieben. Erkannt werden die Substrate durch das N-Terminale Signalpeptid, dessen Struktur sich in allen Substraten ähnelt: sie besitzen eine positiv geladene n-Region, eine hydrophobe h-Region und -bei spaltbaren Signalpeptiden- eine kurze polare c-Region (Cristóbal et al. 1999; Abb. 1).

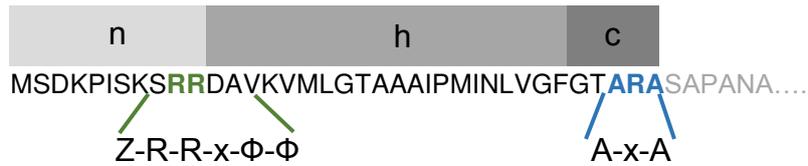


Abb. 1: Signalpeptid des Modellsubstrates HiPIP (*high potential iron sulfur protein*) aus *Allochromatium vinosum*. Das Signalpeptid ist N-terminal am Substrat gebunden und ist in eine positiv geladene n-Region, eine hydrophobe h-Region und eine polare c-Region unterteilt. Das *twin-arginine*-Motiv ist grün eingezeichnet mit den zwei namensgebenden Argininresten (RR). Die Erkennungsstelle der Signalpeptidase am Ende der c-Region ist blau markiert.

Die c-Region beinhaltet die Schnittstelle für die Signalpeptidase I (LepB). Am Übergang von der n- zur h-Region liegt die für das Translokationssystem namensgebende Sequenz, das *twin-arginine*-Motiv. Es hat die grundsätzliche Sequenzabfolge mit Z-R-R-x-Φ-Φ, wobei Z für einen beliebigen polaren Rest steht und Φ für einen hydrophoben Rest (Natale et al. 2008). Dieses Motiv ist mit wenigen Abweichungen allgemeingültig in Bakterien, Archaeen und Pflanzen. Die Signalpeptide ähneln den Sec-Signalpeptiden haben aber auch Unterschiede. So enthält die c-Region oft einen positiv geladenen Rest der als „*Sec-avoidance signal*“ (Bogsch et al. 1997) bezeichnet wird und die Erkennung vom Sec-System vermeiden soll. Weitere Unterschiede zum Sec-Signalpeptid sind die durchschnittlich längere dafür, weniger hydrophobe h-Region. Damit die Substrate in ihrer richtigen Konformation transportiert werden, gewährleisten eine Reihe von Chaperonen die korrekte Faltung. Dabei kommen zum einen allgemeine Chaperone zum Einsatz die nicht Substrat-spezifisch sind (SlyD, DnaK und GroEL), zum anderen haben bestimmte Substrate wie TorA und DmsA ihre „eigenen“ spezifischen Chaperone, (TorD und DmsD), die sogar teilweise im gleichen Operon codiert sind wie das Substrat selbst.

Die Tat-Translokase

Die eigentliche Tat-Translokase besteht in *E. coli* aus Proteinen, die im *tatABCD*-Operon codiert sind. TatD ist ein lösliches Protein mit einer Nucleaseaktivität und ist nicht von Bedeutung für den Tat-Transport (Wexler et al. 2000). Getrennt vom eigentlichen Tat-Operon liegt *tatE*, das vermutlich aus einer Genduplikation von *tatA* entstanden ist und TatA funktionell ersetzen kann (Yen et al. 2002). TatB kann als spezialisiertes TatA angesehen werden, das eine stärkere Interaktion zu TatC zeigt (Natale et al. 2008).

Proteine der TatA/B-Familie (also auch TatE) haben eine N-terminale hydrophobe Region, mit der sie in der Membran verankert sind, die Transmembranhelix (TMH, Abb. 2). Darauf folgt eine kurze flexible Scharnier-Sequenz (*hinge*) und anschließend die amphipathische Helix (APH), gefolgt von einer stark geladenen unstrukturierten C-terminalen Region mit

unterschiedlicher Länge (Porcelli et al. 2002). Bakteriellies TatA bildet homo-oligomere Komplexe (1.3). TatC ist ein polytopes Membranprotein mit sechs Transmembrandomänen. Es bildet mit TatB und wahrscheinlich geringen Mengen TatA einen stabilen Tat(A)BC-Komplex in der Membran. In diesem liegen TatB und TatC in einem Verhältnis von 1:1 vor (Bolhuis et al. 2001).

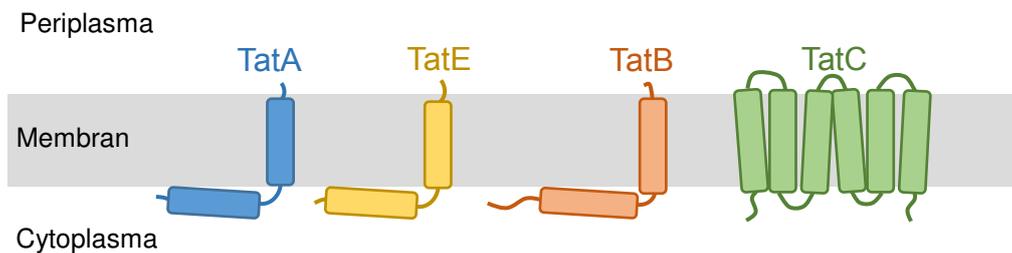


Abb. 2: Schema über die Anordnung der Tat-Komponenten in der Cytoplasmamembran von *E. coli*.

Die Bindung der Substrate erfolgt durch den Tat(A)BC-Komplex, dabei bindet TatC direkt am Signalpeptid (Alami et al. 2003; Behrendt und Brüser 2014). Nach der Substratbindung an den Tat(A)BC-Komplex wird zusätzliches TatA an den Substrat-BC-Komplex rekrutiert und die TatA-Untereinheiten wahrscheinlich umgeordnet (Alami et al. 2003). TatA ermöglicht nun in einem bislang nicht ganz geklärten Mechanismus den Übertritt des Substrates über die Membran. Möglicherweise wird das Substrat in einem *hand-over*-Mechanismus vom (A)BC-Komplex zu einer wassergefüllten TatA-Pore übergeben. Der Durchmesser der Pore ist je nach Substrat variabel (Gohlke et al. 2005). Eine andere Möglichkeit ist ein sogenannter *pulling*-Mechanismus, bei dem das Substrat am Komplex gebunden bleibt und TatC durch eine Konformationsänderung das Substrat in die Membran zieht. Die oligomer-assoziierten TatA-Protomere schwächen dabei lokal die Membran (*membrane weakening*) und ermöglichen somit den Durchtritt des Substrates (Brüser und Sanders 2003). Anschließend wird das Signalpeptid an der konservierten A-x-A-Region im Signalpeptid durch die Signalpeptidase I (LepB) abgespalten und ins Periplasma entlassen. Bei einigen Tat-Substraten bleibt die Abspaltung aus und das Substrat bleibt als Membranprotein in der Membran verankert (Bachmann et al. 2006; Hinsley et al. 2001).

Der Tat-Weg erfordert im Gegensatz zum Sec-System kein ATP. Energetisch gesehen ist nur das elektrische Potential an der Cytoplasmamembran ($\Delta\psi$) notwendig (Bageshwar und Musser 2007). Ein vereinfachtes Schema zum generellen Ablauf des Tat-Transports ist in Abb. 3 dargestellt.

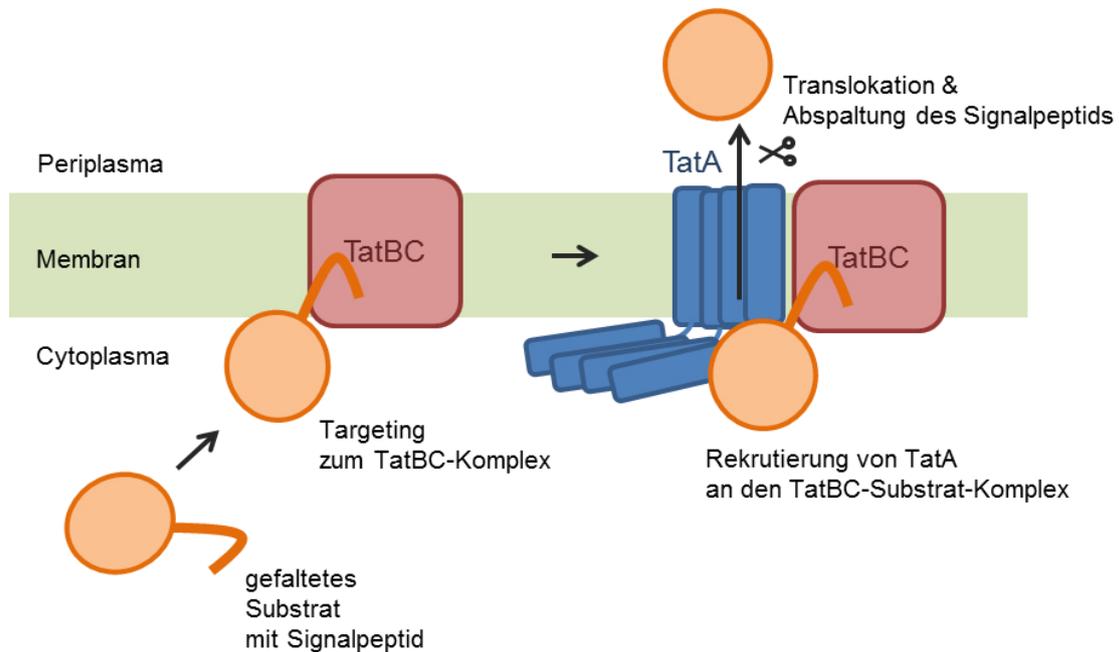


Abb. 3: Prinzip des Tat-Transports in *E. coli*. Ein gefaltetes Substrat bindet samt seinem Signalpeptid am TatBC-Komplex. Daraufhin wird TatA an den TatBC-Substrat-Komplex rekrutiert. TatA ermöglicht lokal den Übertritt über die Membran. Das Signalpeptid wird durch die Signalpeptidase LepB abgespalten und das mature Substrat ins Periplasma entlassen. Bei manchen Substraten unterbleibt die Abspaltung und das Protein bleibt in der Membran verankert.

1.2 Phospholipide in Membranen von *E. coli*

Biomembranen bestehen generell aus einer Phospholipidschicht, in die eine Vielzahl an Proteinen integriert ist. Diese können unter anderem enzymatische Aufgaben erfüllen oder Transportfunktionen übernehmen. Zum einen können es integrale Proteine sein, die zum Teil in die Membran eintauchen oder sie komplett durchspannen, zum anderen können dies periphere Proteine sein, die nicht mit dem hydrophoben Inneren der Doppelschicht interagieren. Je nach Membrantyp können weitere Komponenten Bestandteile der Membran sein, wie die Lipopolysaccharide der Äußeren Membran bei gramnegativen Bakterien.

Phospholipide sind amphipathische Moleküle, sie bestehen aus einem Glycerol-Molekül, das mit zwei Fettsäureresten verestert (Bacteria) oder mit Isoprenoiden veretherter (Archaea) ist. Die Fettsäurereste können in der Länge variieren und enthalten meist 14-26 Atome. Meist enthält ein Fettsäurerest ein bis mehrere *cis*-Doppelbindungen (ungesättigte Fettsäuren) wohingegen der andere Fettsäurerest gesättigt ist und keine C-Doppeldoppelbindungen besitzt. Diese Fettsäuren stellen den hydrophoben Teil der Phospholipide dar. Am dritten C-Atom des Glycerols ist eine negative geladene Phosphatgruppe gebunden, sie stellt die sogenannte Kopfgruppe des Phospholipids dar. Je nach Phospholipid können an diesem Phosphat weitere Gruppen gebunden sein und als Bestandteil der hydrophilen Kopfgruppe dem Lipid weitere Eigenschaften verleihen (Alberts et al. 2002; Cronan 2003). In den Membranen von *E. coli* sind drei Phospholipide vorherrschend: Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin (CL; Abb. 4). Aufgrund der unterschiedlichen Reste an den Kopfgruppen erhalten diese Phospholipide verschiedene Ladungen, wonach sie eingeteilt werden: PE trägt neben der negativ geladenen Phosphatgruppe ein Ethanolamin mit einer positiv geladenen Aminogruppe. Da die Kopfgruppe entsprechend einen negativ und einen positiv geladenen Rest trägt, wird PE als zwitterionisches Phospholipid bezeichnet. PG trägt als weitere Gruppe ein ungeladenes Glycerol. Somit ist die Ladung der Kopfgruppe nur durch das negativ geladene Phosphat gegeben. PG wird als anionisches PL bezeichnet. CL ist ebenfalls ein anionisches Phospholipid, und besteht aus zwei Molekülen PG, die sich in der Kopfgruppe ein Glycerol „teilen“. Somit ist durch die Phosphatgruppen die Kopfgruppe dieses Moleküls mit zwei negativen Ladungen versehen.

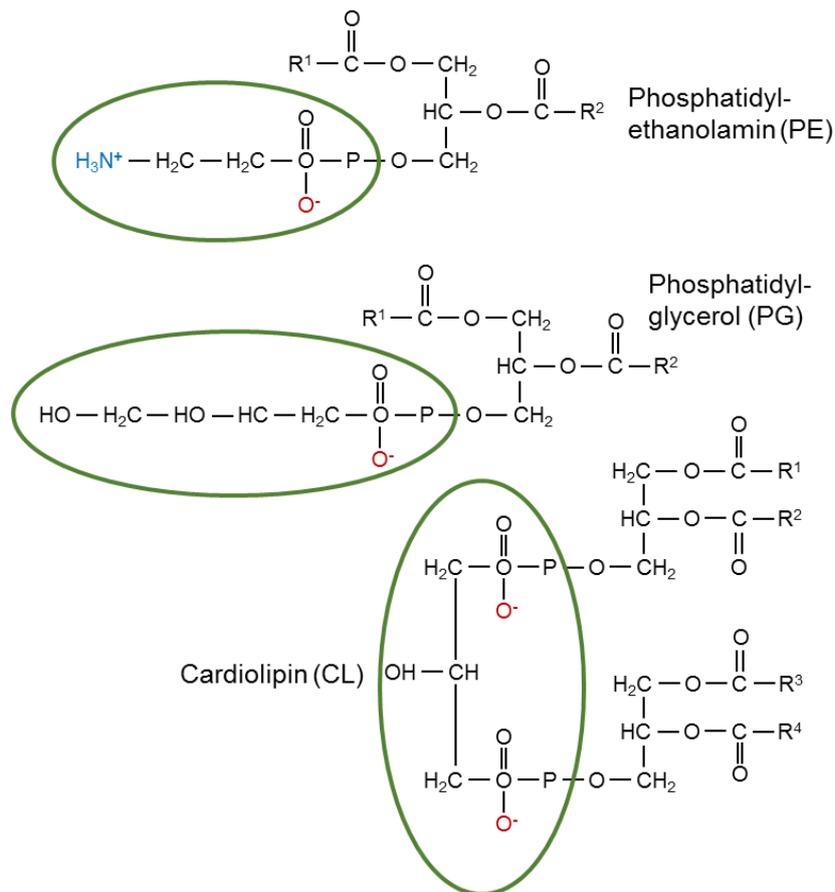


Abb. 4: Strukturformeln der Phospholipide in *E. coli*. Die hydrophilen Kopfgruppen sind grün umrandet. R steht für Reste der Fettsäureseitenketten. PE ist aufgrund der positiv geladenen Aminofunktion und der negativ geladenen Phosphatgruppe zwitterionisch. PG und CL sind anionische Lipide durch die rein negative Ladung der Phosphatgruppe(n).

Die Phospholipide in *E. coli* werden ausgehend von dem Verzweigungspunkt am gemeinsamen Phospholipid-Vorläufer CDP-Diacylglycerol gebildet (Abb. 5). Auf dem einen Weg substituiert die Phosphatidylserin-Synthase (PssA) CDP durch Serin. Anschließend wird das gebildete Phosphatidylserin (PS) decarboxyliert und PE entsteht. Auf dem anderen Weg wird CDP durch Glycerol-3-P ersetzt, was durch die Phosphatidylglycerol-Synthase katalysiert wird. Dabei entsteht Phosphatidylglycerol-3-P was wiederum zu PG dephosphoryliert wird. CL kann durch drei verschiedene Cardiolipin-Synthasen synthetisiert werden: ClsA; ClsB und ClsC. Dabei ist PG immer eins der Substrate; das zweite ist entweder PE, PG oder im Falle von ClsB ein noch unbekanntes Substrat. Der Phospholipidanteil von *E.-coli*-Membranen ist folgendermaßen zusammengesetzt: Etwa 75 % PE, 15-20 % PG und CL 5-10 %, kann aber je nach Wachstumsphase und weiteren Mediumsbedingungen abweichen (Cronan 1968; Saha et al. 1996).

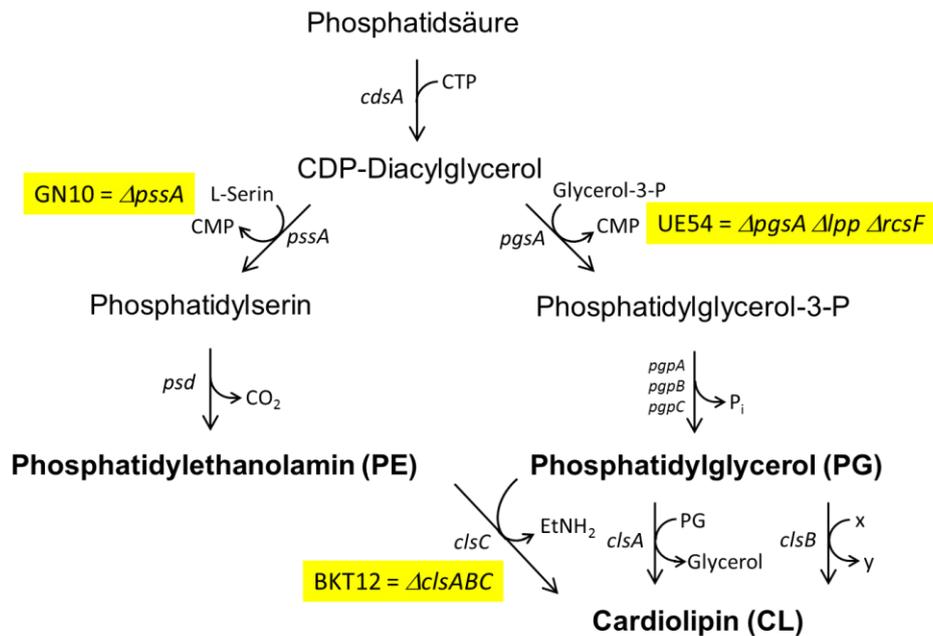


Abb. 5: Biosynthesewege der Phospholipide in *E. coli*. Deletionen von *pssA*; *pgsA* oder *clsABC* resultieren in PE-, PG/CL bzw. CL-defizienten-Stämmen. X und y stehen für ein unbekanntes Substrat bzw. Produkt bei der Katalyse durch ClsB

Eine Membran von *E. coli* besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht, in der jeweils die hydrophoben Fettsäureketten nach innen zeigen und der hydrophile Kopf nach außen hin zur wässrigen Umgebung. Um viele Funktionen in der Zelle aufrecht zu erhalten ist nicht jede beliebige PL-Zusammensetzung möglich, sondern vor allem für viele Membranproteine ist ein bestimmtes Verhältnis von verschiedenen Phospholipiden wichtig (Cronan 2003). Die Struktur der einzelnen Phospholipidmoleküle ist zum einen abhängig von der Kopfgruppe (z. B. Ethanolamin, Glycerol) und zum anderen von der Länge der Fettsäurekette und Anzahl der ungesättigten Fettsäuren darin. Die Form eines Phospholipids legt fest, ob es lamellare Phasen also LDS-Strukturen (=Lipiddoppelschicht oder *bilayer*) oder nicht-lamellare Phasen ausbilden kann (Kruijff 1997). Prinzipiell kann die Phase, die ein Phospholipid in wässriger Umgebung einnehmen kann in drei verschiedene Formen unterteilt werden (Abb. 6).

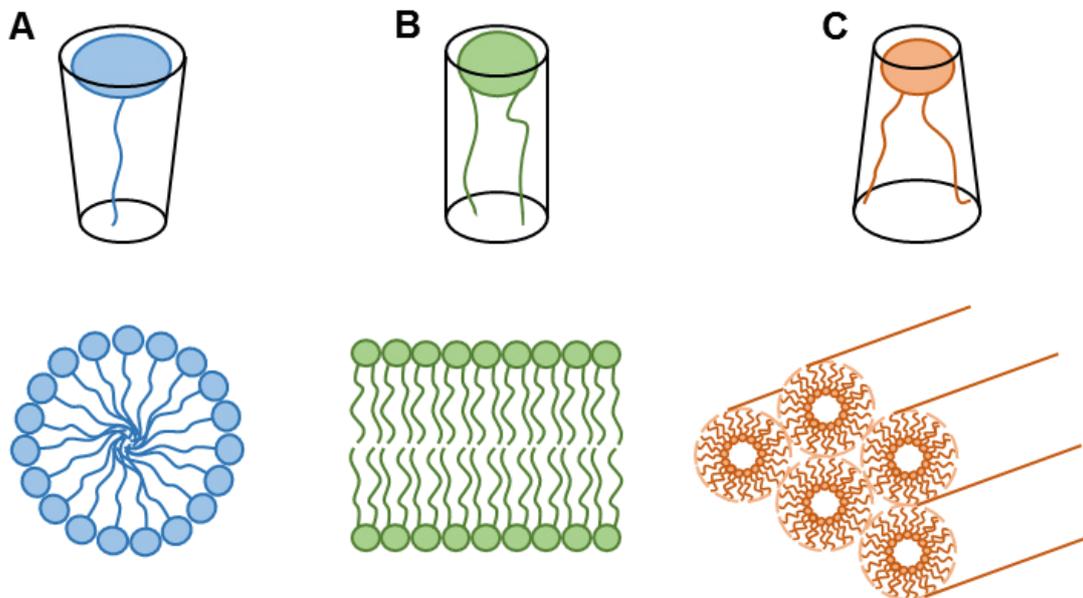


Abb. 6: Einteilung von Lipiden nach ihrer übergeordneten Form. Als Einzelmolekül (oben) und als aggregierte Strukturen (unten). A: Ist die Kopfgruppe im Verhältnis zu den Acylketten größer, nimmt das Lipid eine invers konische Form ein. Beispiele sind Mizellen oder Lysophospholipide. B: Zylinderartig geformte Lipidmoleküle bilden Doppelschichten (LDS) aus; PG und CL sind Beispiele. C: Konische Formen werden eingenommen, wenn die Kopfgruppe im Verhältnis zu den Fettsäureresten kleiner ist, wie die invers-hexagonale Phase (Zeichnung nach: (van den Brink-van der Laan, E. et al. 2004)).

Phospholipide bilden eine zylindrische Form, wenn die Kopfgruppe den gleichen Raum in der Breite einnimmt wie die Fettsäurereste. Diese können sich in flüssiger Phase zu einer lamellaren Lipiddoppelschicht assemblieren. PG und CL sind solche LDS-bildende Lipide. Wenn Kopf- und Fettsäuregruppen unterschiedliche Breiten einnehmen, bilden sich andere, nicht-LDS-bildende Strukturen aus (Cullis und Kruijff 1979): Ist die Kopfgruppe größer als der hydrophobe Teil des PL, können sich Lipide zu positiv gekrümmten Aggregaten zusammenlagern, wie z. B. Mizellen. Nimmt die Kopfgruppe weniger Raum als der hydrophobe Rest ein, bilden die Lipide eine konische Struktur. Aggregate dieses Typs nehmen eine negative Krümmung ein, wie die invers-hexagonale Phase. PE ist ein Phospholipid mit dieser Eigenschaft. Die Form der Phospholipide wird nicht alleinig durch die chemischen Struktur der Kopfgruppe und der Fettsäureketten bestimmt, sondern auch durch Umgebungsparameter wie pH, Salzkonzentration, Temperatur und die Anwesenheit divalenter Kationen (Cullis und Kruijff 1979; Tate et al. 1991). So zeigen geladene Kopfgruppen eine gewisse Abstoßung untereinander und somit nehmen sie einen großen Raum ein. Die Abstoßung kann durch hohe Salzkonzentrationen verringert werden, das Salz kann die Ladung zu einem gewissen Anteil ausgleichen. Dadurch nehmen die Kopfgruppen nun weniger Raum ein. Ein gutes Beispiel ist auch Cardiolipin, das normalerweise eine lamellare LDS-Form

einnimmt. Durch die Anwesenheit erhöhter Konzentrationen an divalenten Kationen nimmt CL bevorzugt eine nicht-LDS-Struktur ein (Vasilenko et al. 1982). Wofür die nicht-LDS-Struktur in der Membran notwendig ist, wurde durch Studien geklärt, die eine Beeinflussung vieler Membranproteine durch diese Lipidphasen zeigen. Der „Zwang“ der nicht-LDS-Lipide, eine organisierte Doppelschicht zu bilden, kostet Energie, denn die Phospholipide drängen in ihre nicht-LDS-Struktur. Dies wird Krümmungsstress (*curvature stress*) oder „frustrierte Membranen“ genannt (Hui und Sen 1989). Dieser Stress kann zum Beispiel durch die partielle Insertion peripherer Membranproteine lokal aufgehoben werden (Attard et al. 2000). Der erhöhte Krümmungsstress kann wiederum die Struktur und die Aktivität von Membranproteinen beeinflussen. Die freiwerdende Energie bei der Insertion von Membranproteinen durch die Aufhebung des Krümmungsstress wird beispielsweise genutzt, um eine Konformationsänderung des Proteins zu ermöglichen (Botelho et al. 2002; Lewis und Cafiso 1999).

Für eine Reihe von peripheren und integralen Membranproteinen wurde gezeigt, dass ihre Faltung oder Aktivität von der Anwesenheit von nicht-LDS-Phospholipiden (meist PE) beeinflusst wurde. Dazu gehören die Phospholipase C (Senisterra und Epanand 1993; Stubbs und Slater 1996), Bacteriorhodopsin (Curran et al. 1999) und auch der SecYEG-Komplex (van der Does et al. 2000). Die Beeinflussung des SecYEG-Komplexes steht in Einklang mit den *in-vivo*-Transportstudien von Mikhaleva et al. (Mikhaleva et al. 1999; Mikhaleva et al. 2001), die eine Beeinträchtigung des Sec-Transportes in PE-defizienten Stämmen zeigen konnten.

Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte mittels *in-vivo*-Funktionalitätsassays die Fragestellung geklärt werden, ob die Phospholipide PE, PG und CL für den Tat-Transport spezifisch notwendig sind. Wie oben erläutert, wurde bereits gezeigt, dass bestimmte Eigenschaften von Phospholipiden auch von einem anderen übernommen werden kann, wie im Falle von PE und CL. Doch reicht diese Eigenschaft über die Phaseneigenschaft (lamellar/nicht-lamellar) aus, oder sind doch spezifischere Eigenschaften bestimmter Phospholipide für die Funktionalität eines komplexen Transportsystems notwendig? Für das Sec-System konnte gezeigt werden, dass der Transport von OmpA und PhoE in Stämmen mit reduzierten Leveln PG und CL geschwächt ist (Vrije et al. 1988). Mikhaleva et al. (1999) konnten dies nicht bestätigen, hier hatten reduzierte Level PG und CL keinen Einfluss auf den Transport von Nika.

Für das Tat-System konnte nachgewiesen werden, dass PE für einen uneingeschränkten Transport nötig ist (Mikhaleva et al. 1999). In der gleichen Studie wird darüber hinaus eine

Notwendigkeit von PG und CL für den Tat-Transport gezeigt. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine *pgsA*-Nullmutante existierte, die weitere Deletionen voraussetzt (Δlpp und $\Delta rcsF$), konnten die Arbeiten nur in Stämmen mit reduzierten Leveln an PG und CL vorgenommen werden. Für diese Arbeit lagen für alle Phospholipide Nullmutanten vor (Abb. 5).

1.3 TatA-Selbstinteraktionen

TatA ist die am häufigsten in der Zelle vorkommende Tat-Komponente. Sie liegt mit den anderen membranintegralen Komponenten TatB und TatC in einem Verhältnis von etwa 40:2:1 (TatA:TatB:TatC) vor (Jack et al. 2001; Sargent et al. 2001). Der strukturelle Aufbau und die Funktion von TatA in der Tat-Maschinerie wurden in 2.1.2 beschrieben. TatA von *E. coli* bildet multiple homooligomere Komplexe mit variabler Größe aus. Die Größe dieser Komplexe reicht von 50 bis >600 kDa (Sargent et al. 2001; Porcelli et al. 2002; Oates et al. 2005). Bei leichter Überproduktion von TatA bildet dieses große cytoplasmatische Röhrenstrukturen, die sich bei Anwesenheit von TatC zu Clustern zusammenlagern (Berthelmann et al. 2008).

In einer Hochauflösungs-NMR wurde die Struktur von TatA von *Bacillus subtilis* (TatA_d) analysiert (Walther et al. 2013). Hier wurde die Ausbildung der TMH, des *hinges* und der APH bestätigt. Die TMH ist kurz und durchspannt nicht die komplette Membran. Etwa die ersten 5 Aminosäuren am N-Terminus besitzen eine niedrigere Hydrophobizität, sind offensichtlich nicht Teil der TMH und haben keine spezifische Struktur. Die verkürzte TMH und die Bedeutung des N-Terminus von TatA für die Membranpassage von Substraten wurde schon zuvor beschrieben (Müller et al. 2007; Rodriguez et al. 2013). In dem Zusammenhang wurde auch die Strukturauflösung dimeren TatAs gezeigt. Diese liegen hierbei Seite-an-Seite in einer L-Konformation vor. Die flexiblen N-Termini von TatA wurden als entscheidend für eine lokale Schwächung der Membran und damit den Durchtritt der Substrate angesehen.

Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollten TatA-Selbstinteraktionen genauer untersucht werden und dabei die Studie von Greene et al. (2007) erweitert werden. Dabei lag der besondere Fokus auf dem N-Terminus von TatA, der mit seiner flexiblen Struktur möglicherweise die Membran schwächt und damit den Transport der Substrate ermöglicht (Rodriguez et al. 2013). Gute TatA-Selbstinteraktionen am N-Terminus und in der TMH konnten durch das lückenlose Cysteinscanning von Greene et al. (2007) bereits gezeigt werden. Im Rahmen dieser Promotion wurde untersucht, ob eine Inaktivierung des Tat-Translokons eine veränderte Konformation der

TatA-Protomere zueinander zur Folge hat, da möglicherweise die TatA-Untereinheiten eine Reassemblierung durchlaufen sobald sie an den BC-Komplex rekrutiert werden. Hier wurde diese Fragestellung angegangen, indem ein Vergleich der Disulfidbildung von TatA mit einem aktiven Translokon und einem inaktiven Translokon (P48A-Austausch in TatC) gezogen wurde. Der P48A-Austausch verhindert wahrscheinlich die Ausbildung des BC-Komplexes und somit die Rekrutierung von TatA. Desweiteren wurden Doppelcysteinvarianten von TatA erstellt und die Cysteine in verschiedene Bereiche von TatA eingeführt. Hiermit sollte die weitere Quervernetzung von TatA über das Dimer hinaus ermöglicht und Funktionalitätsassays mit dem quervernetzen TatA durchgeführt werden.

1.4 Inhibitoren des Tat-Systems

In einigen Organismen werden Virulenzfaktoren Tat-abhängig transportiert. Dies konnte beispielsweise für zwei Phospholipasen in *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) nachgewiesen werden (Voulhoux et al. 2001). Diese Phospholipasen sind wichtige extrazelluläre Virulenzfaktoren, weil sie das Phospholipid Phosphatidylcholin in der Lungenoberfläche hydrolysieren können. Die Virulenz von *Agrobacterium tumefaciens* ist ebenfalls von der Funktionalität des Tat-Systems abhängig (Ding und Christie 2003). Darüberhinaus werden die β -Lactamase und die Phospholipase C in *Mycobacterium tuberculosis* Tat-abhängig transportiert (McDonough et al. 2005; Posey et al. 2006). Das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein, welches eine Komponente des Cytochrom-bc1 und -b6f-Komplexes ist, ist essentieller Bestandteil der Atmungskette vieler Bakterien und wird ebenfalls vom Tat-System transportiert (Meloni et al. 2003; Bachmann et al. 2006; Buck et al. 2008; Buck et al. 2007). Wegen der Tat-Abhängigkeit dieser Faktoren ist es von besonderem Interesse, Hemmstoffe zu finden, die spezifisch auf das Tat-System wirken. Aufgrund des Fehlens des Tat-Systems im menschlichen Organismus, besteht die Hoffnung, dass Nebenwirkungen, wie sie häufig bei Antibiotika auftreten können, ausbleiben.

In einem Hochdurchsatz-Screening wurden fast 84.000 Substanzen auf den Tat-Transport in *P. aeruginosa* getestet, wovon sich zwei als Inhibitor des Transportes der Phospholipase C (PlcH) darstellten (Vasil et al. 2012), Bay11-7082 (Bay) und N-Phenylmaleimid (NPM; Abb. 7). Beide Substanzen sind cysteinreaktiv. Für Bay wurde bereits gezeigt, dass es das NLP3-Inflammasom in Makrophagen inhibiert (Juliana et al. 2010), welches eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen im Körper spielt. Der genaue Wirkmechanismus wurde nicht

beschrieben. NPM gehört zur Gruppe der Maleimide, die thiolreaktiv sind und damit Cysteine modifizieren können. In einer neueren Studie wurden etwa 380.000 Substanzen in *in-vivo*- und *in-vitro*-Untersuchungen auf eine mögliche Inhibitorfunktion auf das Tat-System von *E. coli* untersucht (Bageshwar et al. 2016). Dabei wurden zwar Substanzen identifiziert, die das elektrische Membranpotential $\Delta\psi$ zerstörten, die jedoch keine direkte Wirkung auf das Tat-System hatten. Da das Tat-System zwingend an ein bestehendes Membranpotential gebunden ist, sind diese Substanzen zwar indirekt Inhibitoren des Tat-Systems, jedoch wirken sie nicht spezifisch auf eine Komponente. Durch die Zerstörung des Membranpotentials wären sie generell zelltoxisch, vermutlich auch in eukaryotischen Systemen wirkend und somit für mögliche Therapieziecke ungeeignet.

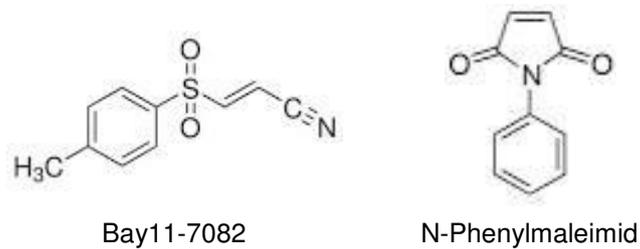


Abb. 7: Inhibitorsubstanzen des Tat-Systems in *P. aeruginosa*.

Zielsetzung der Arbeit

Die in *P. aeruginosa* auf den Transport des Tat-Substrates PlcH wirkenden Hemmstoffe Bay und NPM aus der Studie von Vasil et al. (2012) sollen auf ihre inhibitorische Wirkung am *E.-coli*-Tat-System untersucht werden. Dabei kommen *in-vivo*-Transportanalysen zum Einsatz. Darüber hinaus wird untersucht, ob die Hemmstoffe einen Einfluss auf die Stabilität des BC-Komplexes haben, da aufgrund der Cysteinreaktivität der potentiellen Inhibitoren ein Angriff bzw. Modifikation (eins) der vier Cysteine von TatC als am Wahrscheinlichsten angesehen wird.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Stämme und Plasmide

Im Folgenden sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *E.-coli*-Stämme (Tab. 1) und Plasmide (Tab. 2) tabellarisch aufgelistet.

Tab. 1: Verwendete *E.-coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
W3110	F ⁻ lambda ⁻ IN(<i>rrnD-rrnE</i>)1 <i>rph</i> -1	Bachmann 1972
W3110 Δ <i>tatAE</i>	F ⁻ lambda ⁻ IN(<i>rrnD-rrnE</i>)1 <i>rph</i> -1 <i>ara</i> ^R Δ <i>tatAE</i>	Mehner, unveröffentlicht
BKT12	W3110 Δ <i>clsA</i> Δ <i>clsB</i> Δ <i>clsC</i>	Tan et al. 2012
UE53	MG1655 <i>lpp</i> -2 Δ <i>ara714</i> <i>rcsF</i> ::mini-Tn10 <i>cam</i> ^R	Mileykovskaya et al. 2009
UE53 Δ <i>tatAE</i>	MG1655 <i>lpp</i> -2 Δ <i>ara714</i> <i>rcsF</i> ::mini-Tn10 <i>cam</i> ^R Δ <i>tatAE</i>	Mehner, unveröffentlicht
UE54	MG1655 <i>lpp</i> -2 Δ <i>ara714</i> <i>rcsF</i> ::mini-Tn10 <i>cam</i> ^R Δ <i>pgsA</i> ::FRT- <i>kan</i> ^R -FRT	Shiba et al. 2004
UE54 <i>kan</i> ^S	MG1655 <i>lpp</i> -2 Δ <i>ara714</i> <i>rcsF</i> ::mini-Tn10 <i>cam</i> ^R Δ <i>pgsA</i>	Mehner, unveröffentlicht
UE54 Δ <i>ynbA</i>	MG1655 <i>lpp</i> -2 Δ <i>ara714</i> <i>rcsF</i> ::mini-Tn10 <i>cam</i> ^R Δ <i>pgsA</i> Δ <i>ynbA</i> ::FRT- <i>kan</i> ^R -FRT	diese Arbeit
UE54 Δ <i>ynjF</i>	MG1655 <i>lpp</i> -2 Δ <i>ara714</i> <i>rcsF</i> ::mini-Tn10 <i>cam</i> ^R Δ <i>pgsA</i> Δ <i>ynjF</i> ::FRT- <i>kan</i> ^R -FRT	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Quelle
UE54 $\Delta ynbA$ kan^S	MG1655 <i>lpp-2</i> $\Delta ara714$ <i>rcsF::mini-Tn10 cam^R</i> $\Delta pgsA \Delta ynbA$	diese Arbeit
UE54 $\Delta ynbA \Delta ynjF$	MG1655 <i>lpp-2</i> $\Delta ara714$ <i>rcsF::mini-Tn10 cam^R</i> $\Delta pgsA \Delta ynbA \Delta ynjF::FRT-kan^R-FRT$	diese Arbeit
GN10	W3110 $\Delta pssA10::cam^R$	Saha et al. 1996
DADE	MC4100 $\Delta tatABCD\Delta tatE$	Wexler et al. 2000
BW23473	$\Delta(lacIZYA argF)U169 rph-1$ <i>rpoS396(Am) robA1 creC510 hsdR514</i> $\Delta endA9 uidA(MluI)::pir(wt) recA1$	Haldimann und Wanner 2001
DADE <i>tatA-strepBC</i>	MC4100 $\Delta tatABCD\Delta tatE$ <i>attB::tatA-strep-tatBC</i>	Taubert et al. 2015
DADE <i>tatA(G2C)</i> <i>-strep-tatBC</i>	MC4100 $\Delta tatABCD\Delta tatE$ <i>attB::tatA(G2)-strep-tatBC</i>	diese Arbeit
DADE <i>tatA(S27C)</i> <i>-strep-tatBC</i>	MC4100 $\Delta tatABCD\Delta tatE$ <i>attB::tatA(S27C)-strep-tatBC</i>	diese Arbeit
DADE <i>tatA(A42C)</i> <i>-strep-tatBC</i>	MC4100 $\Delta tatABCD\Delta tatE$ <i>attB::tatA(A42C)-strep-tatBC</i>	diese Arbeit
DADE <i>tatA-strep</i> <i>-tatBC(P48A)</i>	MC4100 $\Delta tatABCD\Delta tatE$ <i>attB::tatA-strep-tatBC(P48A)</i>	diese Arbeit
DADE <i>tatA(G2C)-strep</i> <i>-tatBC(P48A)</i>	MC4100 $\Delta tatABCD\Delta tatE$ <i>attB::tatA(G2C)-strep-tatBC(P48A)</i>	diese Arbeit
DADE <i>tatA(S27C)-strep</i> <i>tatBC(P48A)</i>	MC4100 $\Delta tatABCD\Delta tatE$ <i>attB::tatA(S27C)-strep-tatBC(P48A)</i>	diese Arbeit
DADE <i>tatA(A42C)-strep</i> <i>tatBC(P48A)</i>	MC4100 $\Delta tatABCD\Delta tatE$ <i>attB::tatA(A42C)-strep-tatBC(P48A)</i>	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Quelle
DADE <i>tatA-strep</i> <i>tatBC ΔdsbB</i>	MC4100 Δ <i>tatABCDΔtatE ΔdsbB</i> <i>attB::tatA-strep-tatBC</i>	diese Arbeit
DADE <i>tatA(G2C)-strep</i> <i>tatBC ΔdsbB</i>	MC4100 Δ <i>tatABCDΔtatE ΔdsbB</i> <i>attB::tatA(G2C)-strep-tatBC</i>	diese Arbeit

Tab. 2: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Charakteristika	Quelle
pMS5	<i>amp^R pssA⁺</i> , pMAN035-Derivat	Saha et al. 1996
pEXH5- <i>tac</i>	pTB-DG derivative with XbaI/HindIII	Richter und Brüser, 2005
pINT-ts	<i>pir⁺</i> , <i>amp^R</i> , <i>int₁</i> , Integrations-Plasmid	Hasan et al. 1994
pKD3	<i>pir⁺</i> , <i>cam^R</i> , <i>amp^R</i>	Datsenko und Wanner 2000
pMK-RQ- <i>tatC</i> -4C	Cloning Vector, Life Technologies, <i>kan^R</i> cysteinfreies <i>tatC</i> ; C23A, C33A, C179A, C224A	diese Arbeit
pABS- <i>tatAB</i> (B1pI) <i>tatC</i>	pABS- <i>tatABC</i> -Derivat mit <i>Silent-mutagenesis</i> -Schnittstelle in <i>tatB</i> (B1pI)	diese Arbeit
pABS- <i>tatAB</i> (B1pI) <i>tatC</i> -4C	<i>cam^R</i> , Derivat von pACYC184, cysteinfreies <i>tatC</i> , C23A, C33A, C179A, C224A	diese Arbeit
pAH120- <i>tatA-strep</i> <i>SD-ATG-tatBC</i>	Derivat von pAH120 (Haldimann und Wanner, 2001), <i>ptat</i> , <i>kan^R</i> , <i>tatA-strepBC</i> mit Shine-Dalgarno-Sequenz hinter <i>tatA-strep</i>	Taubert et al. 2015
pAH120- <i>tatA(G2C)</i> <i>-strep-tatBC</i>	Derivat von pAH120- <i>tatA-strep SD-ATG-tatBC</i> <i>ptat</i> , <i>kan^R</i>	diese Arbeit

Plasmid	Charakteristika	Quelle
pAH120- <i>tatA</i> (S27C) - <i>strep-tatBC</i>	Derivat von pAH120- <i>tatA-strep</i> SD-ATG- <i>tatBC</i> <i>ptat</i> , <i>kan^R</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>tatA</i> (A42C) - <i>strep-tatBC</i>	Derivat von pAH120- <i>tatA-strep</i> SD-ATG- <i>tatBC</i> <i>ptat</i> , <i>kan^R</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>tatA-strep</i> <i>tatBC</i> (P48A)	Derivat von pAH120- <i>tatA-strep</i> SD-ATG- <i>tatBC</i> <i>ptat</i> , <i>kan^R</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>tatA</i> (G2C) - <i>strep-tatBC</i> (P48A)	Derivat von pAH120- <i>tatA-strep</i> SD-ATG- <i>tatBC</i> <i>ptat</i> , <i>kan^R</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>tatA</i> (S27C) - <i>strep-tatBC</i> (P48A)	Derivat von pAH120- <i>tatA-strep</i> SD-ATG- <i>tatBC</i> <i>ptat</i> , <i>kan^R</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>tatA</i> (A42C) - <i>strep-tatBC</i> (P48A)	Derivat von pAH120- <i>tatA-strep</i> SD-ATG- <i>tatBC</i> <i>ptat</i> , <i>kan^R</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>tatABC-strep</i>	pAH120- <i>tatA-strep</i> -Derivat, <i>ptat</i> , <i>kan^R</i> Austausch <i>tatA</i> mit NdeI/BamHI gegen <i>tatABC</i>	Heidrich 2011
pAH120- <i>tatA</i> (G2C) <i>tatBC-strep</i>	pAH120- <i>tatA-strep</i> -Derivat, <i>ptat</i> , <i>kan^R</i> mit dem Austausch G2C in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>tatA</i> (S27C) <i>tatBC-strep</i>	pAH120- <i>tatA-strep</i> -Derivat, <i>ptat</i> , <i>kan^R</i> mit dem Austausch S27C in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>tatA</i> (A42C) <i>tatBC-strep</i>	pAH120- <i>tatA-strep</i> -Derivat, <i>ptat</i> , <i>kan^R</i> mit dem Austausch A42C in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>tatABC</i> (P48A)- <i>strep</i>	pAH120- <i>tatA-strep</i> -Derivat, <i>ptat</i> , <i>kan^R</i> (P48A)- <i>strep</i> mit dem Austausch P48A in <i>tatC</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>tatA</i> (G2C) <i>tatBC</i> (P48A)- <i>strep</i>	pAH120- <i>tatA-strep</i> -Derivat, <i>ptat</i> , <i>kan^R</i> mit den Austauschen G2C in <i>tatA</i> und P48A in <i>tatC</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>tatA</i> (S27C) <i>tatBC</i> (P48A)- <i>strep</i>	pAH120- <i>tatA-strep</i> -Derivat, <i>ptat</i> , <i>kan^R</i> mit den Austauschen S27C in <i>tatA</i> und P48A in <i>tatC</i>	diese Arbeit

Plasmid	Charakteristika	Quelle
pAH120- <i>tatA</i> (A42C) <i>tatBC</i> (P48A)- <i>strep</i>	pAH120- <i>tatA-strep</i> -Derivat, <i>ptat</i> , <i>kan^R</i> mit den Austauschen A42C in <i>tatA</i> und P48A in <i>tatC</i>	diese Arbeit
pABS- <i>tatABC</i>	<i>cam^R</i> , Derivat von pACYC184, <i>tatABC</i> Expressionsvektor, <i>tat</i> -Promotor, p15A- <i>origin</i>	Berthelmann und Brüser 2004
pABS- <i>tatA</i> (G2C) <i>tatBC</i>	<i>cam^R</i> , Derivat von pACYC184, <i>tatABC</i> mit dem Austausch G2C in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pABS- <i>tatA</i> (G3C) <i>tatBC</i>	<i>cam^R</i> , Derivat von pACYC184, <i>tatABC</i> mit dem Austausch G3C in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pABS- <i>tatA</i> (G2C;G3C) <i>tatBC</i>	<i>cam^R</i> , Derivat von pACYC184, <i>tatABC</i> mit den Austauschen G2C und G3C in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pABS- <i>tatA</i> (A42C) <i>tatBC</i>	<i>cam^R</i> , Derivat von pACYC184, <i>tatABC</i> mit dem Austausch G3C in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pABS- <i>tatA</i> (G2C;A42C) <i>tatBC</i>	<i>cam^R</i> , Derivat von pACYC184, <i>tatABC</i> mit den Austauschen G2C und A42C in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pABS- <i>tatA</i> (G3C;A42C) <i>tatBC</i>	<i>cam^R</i> , Derivat von pACYC184, <i>tatABC</i> mit den Austauschen G3C und A42C in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pCP20	<i>amp^R</i> , <i>oriR_γ</i> , Entfernung der Kanamycin- Kassette	Cherepanov und Wackernagel 1995
pKD46	Derivat von pINT-ts, <i>amp^R</i> , <i>araC-P_{araB}</i> , <i>γ β exo tL3</i> , red recombination expression plasmid	Datsenko und Wanner 2000

2.2 Kultivierungsbedingungen

2.2.1 Medien und erforderliche Zusätze

Alle eingesetzten Nährmedien wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Substanzen wie Antibiotika, Zucker und weitere Zusätze wurden mit einem 0,2 µm Spritzenfilter sterilfiltriert und nach dem Abkühlen der Medien zugefügt.

Die aerobe und zum Teil auch anaerobe Anzucht der *E.-coli*-Stämme erfolgte -wenn nicht anders vermerkt- in Luria-Bertani-(LB)-Medium (Tab. 3). Für die Kultivierung auf festem Nährmedium wurde diesem zusätzlich vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Bactoagar zugesetzt. Die anaerobe Nitratatmung erfolgte mit dem Zusatz von 0,5 % Glycerol (w/v) und 0,4 % Natriumnitrat (w/v). Die Gärung fand auf reinem LB ohne Zusatz einer weiteren C-Quelle statt. Für einige Analysen war die Kultivierung auf Minimalmedium mit definierten Bestandteilen erforderlich. Hier wurde M9-Medium oder MOPS-gepuffertes Medium verwendet (2.4.6.2). SOC-Medium wurde für Elektroporation verwendet (Tab. 4).

Für den PE-defizienten Stamm wurden allen Medien zusätzlich 50 mM MgCl₂ aus einer 2,5 M sterilfiltrierten Lösung zugesetzt.

Die Phagentransduktion wurde ebenfalls mit Hilfe spezieller Medien durchgeführt (2.3.10).

Tab. 3: Luria-Bertani-(LB)-Medium (Sambrook et al. 1989).

Masse	Substanz
10 g	tryptisch verdautes Pepton
10 g	NaCl
5 g	Hefeextrakt

ad 1 L mit H₂O_{dest.}

Tab. 4: SOC-Medium.

Masse	Substanz
20 g	tryptisch verdautes Pepton
0,5 g	NaCl
5 g	Hefeextrakt

pH 7,0, ad 1 L mit H₂O_{dest.}; nach dem Autoklavieren steril 100 mM MgCl₂ und 20 mM Glucose hinzugefügt

Je nach Bedarf wurden dem Kultivierungsmedium Antibiotika zugegeben. Die Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert. Wasser-gelöste Antibiotika wurden in kleineren Aliquots von 50-100 µL aufbewahrt, Ethanol-gelöste in 50 mL-Reagiergefäßen.

Tab. 5: Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Resistenz	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	amp ^R	100 mg/mL in H ₂ O _{dest.}	100 µg/mL
Kanamycin	kan ^R	50 mg/mL in H ₂ O _{dest.}	50 µg/mL bzw. 15 µg/mL bei <i>single-copy</i> - Integration der Resistenz
Chloramphenicol	cam ^R	25 mg/mL in 70 %Ethanol	25 µg/mL

2.2.2 Anzuchtbedingungen und Ernte

Die in der Arbeit verwendeten Stämme wurden in Flüssig- und Festmedium mit den entsprechenden Zusätzen bei 37 °C inkubiert. Eine Ausnahme bildeten die Stämme GN10 und GN10/pMS5, die wegen des thermosensitiven *ori* von pMS5 bei 30 °C angezogen wurden. Vorkulturen wurden als 5-mL-Übernachtulturen in sterilen Glasreagenzgefäßen mit Metallkappen oxisch unter starkem seitlichen Schütteln kultiviert. Die Beimpfung der 5-mL-Kulturen erfolgte aus Glycerinkulturen oder einer Einzelkolonie von der Platte. Für die Anzucht von Hauptkulturen wurde ein größeres Volumen des entsprechenden Mediums 1-4 % mit der Vorkultur beimpft. Für die oxische Anzucht wurden Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet, für die anoxische Anzucht 50-mL-Reagiergefäße (TorA-Assay) oder 15-mL-Hungate-Röhrchen. Die Kolben wurden bei ca. 180 Upm schüttelnd inkubiert. Für die anoxische Anzucht wurden die Gefäße bis zum Rand gefüllt und maximal eine 1 cm große Gasphase für die Möglichkeit zur besseren Durchmischung des Mediums belassen. Die Gefäße wurden stehend, ohne Durchmischung inkubiert.

Das Wachstum der Zellen wurde photometrisch durch die Messung der Optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Die Messung erfolgte durch Entnahme einer 1-mL-Probe der homogen durchmischten Kultur in einer Küvette mit der Schichtdicke 1 cm in einem Photometer (Libra S11, Biochrom). Erfolgte die OD₆₀₀-Messung von Kulturen in Glasreagenzgläsern oder der Hungate-Röhrchen, wurde diese direkt im Röhrchen nach Homogenisierung der Bakteriensuspension im Röhrchenphotometer (Genesys 20, Thermo Scientific) bestimmt. Als Leerwert diente dabei das jeweilige unbeimpfte Medium.

Die Zellernte erfolgte mittels Zentrifugation in einer Eppendorf Tischzentrifuge (*Mini spin plus*: max. 2 mL Volumen; 5.000 g 5 min bzw. *5804R*: max. 50 mL Volumen; 5.000 g, 10 min, 4 °C) oder in einer *Sorvall RC-6 Plus* (100 mL Volumen; 10.000 g, 10 min, 4 °C).

2.2.3 Stammerhaltung

Zur Stammerhaltung wurden neu hergestellte oder übernommene Stämme zunächst auf LB-Platten vereinzelt. Diese Platten konnten mit Parafilm umschlossen bis zu mehreren Monate bei 4 °C gelagert werden. Für eine längere Lagerung wurde eine Glycerinkultur erstellt. Dazu wurde von der vereinzelt Kolonie eine 5-mL-Übernachtskultur (ÜNK) angelegt. 400 µL davon wurden mit 400 µL LB-Glycerin-(30 % (w/v))-Medium gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.3 Molekularbiologische Arbeiten

2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung reiner Plasmid-DNA wurden 5 mL einer *E.-coli*-Übernachtskultur geerntet und die DNA mit dem *Plasmid Miniprep Kit 1* (Peach, Erlangen) gewonnen. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben, die Elution erfolgte in 40-50 µL H₂O_{bidest.} Durch Eindampfen der Plasmid-DNA in einer *Speed vac (Savant™ SPD11V, Thermo Scientific)* oder Zugabe einer entsprechenden Menge H₂O_{bidest.} konnte die Konzentration der DNA wie gewünscht variiert werden. Die tatsächliche Konzentration der Plasmid-DNA wurde in einem Nanodrop-Spektralphotometer (*Nanodrop2000, Thermo Scientific*) durch die Messung des 260/280 nm-Verhältnisses ermittelt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.3.2.1 Standard-PCR

Die hier durchgeführten PCR-Arbeiten dienen zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Im Reaktionsansatz (Tab. 7) wurde die *Pfu*-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) oder die *Phusion-High-Fidelity*-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt) eingesetzt. Die lyophilisierten Primer (Metabion, Martinsried oder Biomers, Ulm) wurden in H₂O_{bidest.} gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/µL eingestellt. Für Standard-PCRs wurden die Primer auf 25 pmol/µL verdünnt. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler *Tpersonal™* (Biometra, Göttingen). Die *annealing*-Temperatur wurde der Schmelztemperatur der verwendeten Primer angepasst. Die Extensions-Zeit war abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments und der Syntheseleistung der jeweiligen Polymerase (Pfu: 0,5 kb/min; Phusion: 1 kb/15 s). Ein Standard-PCR-Programm für den Thermocycler ist in Tab. 8

aufgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer für die Standard-PCR sind in Tab. 6 zu finden.

Tab. 6: Primer für Standard-PCRs.

Bezeichnung	Basensequenz 5' → 3'	Bemerkung
DsbB::Cm-P1-cr	TAGCGGCAGGAAAAAAGCGCTCCCGCAGGA GCGCCGAATGGAggttaggctggagctgcttc	Amplifikation CamR-Kassette in pKD3, mit <i>umuC</i> - homologem Bereich
DsbB::Cm-P2-cr	TTGGTTTAAACTGCGCACTCTATGCATATTG CAGGGAAATGATTcatatgaatctcccttag	Amplifikation CamR-Kassette in pKD3, mit <i>umuC</i> -homologem Bereich

Tab. 7: Pipettieransatz (50 µL) für Standard-PCR.

Menge	Komponente
10-100 ng	<i>template</i>
1 µL	Primer F (25 pmol/µL)
1 µL	Primer R (25 pmol/µL)
1 µL	dNTPs (10 pmol/µL)
1 µL	Pfu-Polymerase
5 µL	10fach Pfu-Puffer
+/-2,5 µL	DMSO
ad 50 µL	H ₂ O _{dest.}

Es wurde für jede PCR eine Negativkontrolle ohne *template* mitgeführt.

Tab. 8: Amplifizierungsprogramm Standard-PCR.

Zyklusschritt	Zeit	Temperatur
Schritt 1: Denaturierung	2 min	96-98 °C
Schritt 2: Denaturierung	30 s	96-98 °C
Schritt 3: <i>annealing</i>	1 min	x °C
Schritt 4: Extension	x min	68 °C
Schritt 5:Pause	-	8 °C

Von Schritt 4 zurück auf Schritt 2 für 30 Zyklen.

2.3.2.2 *QuikChange-Site-Directed*-Mutagenese

Mit der Methode *QuikChange-Site-Directed*-Mutagenese (Agilent, Waldbronn) wurden gezielt Basenaustausche in Plasmid-DNA eingeführt. Die dabei gewünschten Austausche wurden durch die verwendeten Primer eingeführt, in denen die entsprechenden veränderten Basen in

etwa mittig lagen. Im Anschluss an die *QuikChange*-PCR wurden die amplifizierten Plasmide für 2 h mit dem Restriktionsenzym DpnI versetzt, um die methylierte Plasmid-DNA, die als *template* eingesetzt wurde, zu degradieren.

Die Komponenten für einen PCR-Ansatz mit 50 µL Endvolumen und die Bedingungen für ein Amplifizierungsprogramm sind in Tab. 10 Tab. 11 angegeben. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer für die *QuikChange*-PCR sind in Tab. 9 aufgelistet.

Tab. 9: Primer für *QuikChange-Site-Directed-Mutagenesis*-PCR.

Bezeichnung	Basensequenz 5' → 3'	Bemerkung
<i>Für Codonaustausche in pAH120-Derivaten</i>		
<i>tatA</i> -G2>C-F-cr	CATCTACCACAGAGGAACACAT ATG <u>TGCGG</u> TATCAGTATTTGGCAGTTATTG	Codonaustausch in <i>tatA</i> von G2 zu C
<i>tatA</i> -G2>C-R-cr	CAATAACTGCCAAATACTGATAC <u>CGCA</u> catATGTGTTCCCTCTGTGGTAGATG	Codonaustausch in <i>tatA</i> von G2 zu C
<i>tatA</i> -S27>C-F-cr	GCACCAAAAAGCTCGG <u>CTGC</u> ATCGGTTCCGATCTTG	Codonaustausch in <i>tatA</i> von S27 zu C
<i>tatA</i> -S27>C-R-cr	CAAGATCGGAACCGAT <u>GCA</u> GCCGAGCTTTTTGGTGC	Codonaustausch in <i>tatA</i> von S27 zu C
<i>tatA</i> -A42>C-F	GCGTCGATCAAAGGCTTTAAAAAAT <u>G</u> CATGAG CGATGATGAACCAAAGCAGG	Codon-Austausch in <i>tatA</i> von A42 zu C
<i>tatA</i> -A42>C-R	CCTGCTTTGGTTCATCATCGCTCAT <u>GCA</u> TTTTTT AAAGCCTTTGATCGACGC	Codon-Austausch in <i>tatA</i> von A42 zu C
<i>tatC</i> -P48>A-F-cr	CTATCACCTGGTATCCGCG <u>GCG</u> TTGATC AAGCAGTTGCCGCAAG	Codonaustausch in <i>tatC</i> von P48 zu A
<i>tatC</i> -P48>A-R-cr	CTTGCGGCAACTGCTTGATCAAC <u>GCGC</u> GGATACCAGGTGATAG	Codonaustausch in <i>tatC</i> von P48 zu A

für Codonaustausche in pABS-Derivaten

pABS- <i>tatA</i> (G2C)-F	CACAGAGGAACATGTATGTGCGGTATCAGTATTTGGCAG	Codon-Austausch in <i>tatA</i> von G2 zu C
---------------------------	---	---

Bezeichnung	Basensequenz 5' → 3'	Bemerkung
pABS- <i>tatA</i> (G2C)-R	CTGCCAAATACTGATACCGCACATACATGTTCTCTGTG	Codon-Austausch in <i>tatA</i> von G2 zu C
pABS- <i>tatA</i> (G3C)-F	CACAGAGGAACATGTATGGGTTGCATCAGTATTTGGCA GTTATTG	Codon-Austausch in <i>tatA</i> von G3 zu C
pABS- <i>tatA</i> (G3C)-R	CAATAACTGCCAAATACTGATGCAACCCATACATGTTCTCTGTG	Codon-Austausch in <i>tatA</i> von G3 zu C

Tab. 10: Pipettieransatz (50 µL) für *QuickChange*-PCR.

Menge	Komponente
10-100 ng	<i>template</i>
1 µL	Primer F (5 pmol/µL)
1 µL	Primer R (5 pmol/µL)
1 µL	dNTPs (10 pmol/µL)
1 µL	Pfu-Polymerase
5 µL	10fach Pfu-Puffer
+/-2,5 µL	DMSO
ad 50 µL	H ₂ O _{bidest.}

Tab. 11: Amplifizierungsprogramm *QuickChange*-PCR.

Zyklusschritt	Zeit	Temperatur
Schritt 1: Denaturierung	2 min	96-98 °C
Schritt 2: Denaturierung	30 s	96-98 °C
Schritt 3: <i>annealing</i>	1 min	x °C
Schritt 4: Extension	x min	68 °C
Schritt 5:Pause	-	8 °C

Von Schritt 4 zurück auf Schritt 2 für 25 Zyklen.

2.3.2.3 Kolonie-PCR/Kontroll-PCR

Zur Kontrolle von Genknockouts wurden Kolonie-PCRs von den betreffenden Stämmen gemacht. Dabei wurde mit einem sterilen Zahnstocher Zellmaterial einer Einzelkolonie entnommen und in 25 µL H₂O_{bidest.} unter leichtem Drehen des Zahnstochers überführt. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C aufgekocht und anschließend 5 µL der Zellsuspension als-

PCR-*template* eingesetzt. Die eingesetzte Primerkonzentration lag bei 10 pmol/μL. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tab. 12 aufgelistet.

Tab. 12: Primer für Kontroll-PCRs.

Bezeichnung	Basensequenz 5' → 3'	Bemerkung
<i>yciU</i> -R-cr	CCAGACCAATCACCCTTCG	Forwardprimer für <i>clsA</i> (Stammkontrolle BKT12)
<i>yciY</i> -R-cr	ATCGCAAACAATAACGAGTTACG	Reverseprimer für <i>clsA</i> (Stammkontrolle BKT12)
<i>ybhP</i> -F-cr	AAGTTCATCCGCTGCATGTGG	Forwardprimer für <i>clsB</i> (Stammkontrolle BKT12)
<i>ybhN</i> -R-cr	TGCCGAGAATACGCAGCGTAG	Reverseprimer für <i>clsB</i> (Stammkontrolle BKT12)
<i>ymdB</i> -F-cr	AACAGCTATACGTCAGTGGC	Forwardprimer für <i>clsC</i> (Stammkontrolle BKT12)
<i>opgC</i> -F-cr	AAATTCATTTGCGCATCCCG	Reverseprimer für <i>clsC</i> (Stammkontrolle BKT12)
<i>ydbD</i> -F-cr	GAACTGGATTTAGTCCGCCAGC	Kontrolle <i>ynbA knockout</i> (Phagentransduktion)
<i>ynbB</i> -R-cr	CCGCTAATAATGCCTGTAATG	Kontrolle <i>ynbA knockout</i> (Phagentransduktion)
<i>ynjE</i> -F-cr	TGTGGAAAGCGTGGAATATC	Kontrolle <i>ynjF knockout</i> (Phagentransduktion)
k1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	Kontrollprimer für Kan- Kassette (Phagentransduktion)
kanR-F	ACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGC	Kontrollprimer für Kan- Kassette (Phagentransduktion)
k2	CGGTGCCCTGAATGAACTCC	Kontrollprimer für Kan- Kassette (Phagentransduktion)
kt	CGGCCACAGTCGATGAATCC	Kontrollprimer für Kan- Kassette (Phagentransduktion)
P1- <i>single copy</i>	GGCATCACGGCAATATAC	Testprimer für die <i>single-</i> <i>copy</i> -Integration
P2- <i>single copy</i>	ACTTAACGGCTGACATGG	Testprimer für die <i>single-</i> <i>copy</i> -Integration
P3- <i>single copy</i>	ACGAGTATCGAGATGGCA	Testprimer für die <i>single-</i> <i>copy</i> -Integration

Bezeichnung	Basensequenz 5' → 3'	Bemerkung
P4- <i>single copy</i>	TCTGGTCTGGTAGCAATG	Testprimer für die <i>single-copy</i> -Integration
CmR-Test-c1	TTATACGCAAGGCGACAAGG	Kontrollprimer für Cam-Kassette (Datsenko/Wanner <i>knockout</i>)
CmR-Test-c2	GATCTTCCGTCACAGGTAGG	Kontrollprimer für Cam-kassette (Datsenko/Wanner <i>knockout</i>)
<i>umuC</i> -F-cr	ATCAATATTGTCGGTTTATCTCCAC	Kontrollprimer <i>dsbB knockout</i> (Datsenko/Wanner <i>knockout</i>)
<i>nhaB</i> -F-cr	TCGCTACGCCGAACGGTCAGG	Kontrollprimer <i>dsbB knockout</i> (Datsenko/Wanner <i>knockout</i>)

2.3.3 Restriktionsverdau und Ligation von DNA-Fragmenten

Plasmide oder durch PCR amplifizierte DNA-Fragmente wurden mit Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben verdaut (Fermentas, St. Leon-Rot oder NEB, Frankfurt a. M.). Analytische Verdaue (Testverdaue) wurden in einem Volumen von 20 µL und präparative Verdaue in 80 µL bis 160 µL durchgeführt. Die Verdaue erfolgten bei der für die Enzyme spezifischen Temperatur im Brutschrank (nur 37 °C) oder im Thermoshaker für 1 h (analytisch) bzw. 3 h bis über Nacht (präparativ). Als Reaktionspuffer wurden die jeweils vom Hersteller empfohlenen verwendet. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.3.4) aufgereinigt.

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase mit Reaktionspuffer des Herstellers (Fermentas, St. Leon-Rot oder NEB, Frankfurt a. M.) verwendet. Der Reaktionsansatz betrug 20 µL, die Inkubationszeit betrug 2 h bis über Nacht bei 22 °C (Fermentas-Ligase) oder 16 °C. Das Verhältnis der zu ligierenden Fragmente wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.3.4) abgeschätzt.

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden horizontale Flachbettapparaturen (Peqlab/VWR, Erlangen) verwendet. Größere DNA-Fragmente oder Plasmide wurden in einem 1%igen (w/v) und kleinere Fragmente in einem 2%igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Der in 1x TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA) aufgekochten Agarose wurde nach dem deutlichen Abkühlen vor dem Gießen 0,6 µg Ethidiumbromid/ mL oder 5 µL *HDGreen Plus*

(Fermentas) zugesetzt. Für präparative Auftrennungen wurden 50 μL Taschen verwendet für analytische 30 μL Taschen. Das Probevolumen für analytische Gele betrug 3-5 μL und für präparative Gele 50 μL (PCR-Ansatz) bzw. 80-160 μL (DNA-Restriktion). Bei Volumina $>50 \mu\text{L}$ wurde die Probe auf mehrere Taschen aufgeteilt. Vor dem Beladen der Gele wurden die Proben 1:10 mit Probenpuffer (50 % (v/v) Glycerin, 200 mM EDTA, 0,2 % Xylencyanol oder Bromphenolblau) gemischt. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1x TBE-Puffer bei 130 V (Ethidiumbromid) oder 100 V (*HDGreen Plus*) ohne Stromlimitierung. Als Größenstandard wurden 3-5 μL der *Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder Plus* oder *Gene RulerTM 100 bp Ladder Plus* (Fermentas, St. Leon-Rot) mitgeführt. Die DNA-Banden wurden anschließend unter UV-Licht mittels *AlphaimagerTM 2200* (Innotech GmbH) oder *Intas-UV-System Gel Stick* (Intas Science Imaging Instruments, Göttingen) detektiert.

2.3.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

2.3.5.1 Aufreinigung über das *NucleoSpin Extract II Kit*

Um das durch eine PCR oder durch einen Restriktionsverdau erstellte DNA-Fragment aus einem Agarose-Gel aufzureinigen, wurde das betreffende Fragment auf einem UV-Tisch als fluoreszierende Bande sichtbar gemacht und mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Aufreinigung wurde das *NucleoSpin Extract II Kit* (Machery-Nagel GmbH & Co. KG) verwendet. Über das gleiche Kit wurden direkt PCR-Produkte oder Restriktionsverdau aufgereinigt. Die in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ eluierten DNA-Fragmente und Plasmide wurden entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren.

2.3.5.2 Entsalzung von DNA

Um DNA in elektrokompente Zellen transformieren zu können, muss diese zunächst entsalzt werden. Für einen Ansatz wurden 5 μL DNA-Suspension mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 50 μL aufgefüllt. Anschließend wurden 500 μL Butanol hinzugegeben und für 5 s gevortext. Die DNA wurde für 10 min bei 14.000 g abzentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette gründlich vom unsichtbaren Pellet abgenommen. Das Pellet wurde für etwa 5 min in einer *Speed vac* (SavantTM SPD11V, Thermo Scientific) getrocknet und anschließend im Ausgangsvolumen aufgenommen.

2.3.6 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Aufnahme plasmidärer oder linearer DNA durch *E.-coli*-Stämme war es notwendig, die Zellen für die Aufnahme dieser kompetent zu machen. Dazu wurden je nach Protokoll und

Anwendung die Zellen chemisch oder elektrisch kompetent gemacht. Die einfachste und schnellste Methode war die Einbringung von DNA mit der Fast Transformation (2.3.7.1).

2.3.6.1 Ultra-kompetente Zellen nach Sambrook und Russel (2001)

Zur Zellanzucht wurden 25 mL LB-Medium mit 0,5 mL ÜNK beimpft und unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,55 inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum auf Eis abgestoppt und die Kultur für 10 min bei 4000 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 7,5 mL eiskaltem Transformationspuffer (Tab. 13) resuspendiert und 45 min auf Eis belassen. Anschließend wurden die Zellen erneut für 10 min bei 4000 g bei 4 °C abzentrifugiert, das Pellet in 2,5 mL eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert und wieder 45 min auf Eis inkubiert. 150 µL DMSO wurden hinzugefügt, gemischt und 10 min auf Eis belassen. 200-µL-Aliquots in Flüssig-Stickstoff einfrieren, dann bei -80 °C lagern.

Tab. 13: Transformationspuffer (Angaben für 1 L).

Masse; Molarität	Substanz
10,88 g	MnCl ₂ * 4H ₂ O
2,2 g	CaCl ₂ * 2H ₂ O
18,65 g	KCl
20 mL; 0,5 M	PIPES (pH 6,7)

2.3.6.2 Elektrokompetente Zellen

Zur Zellanzucht wurden 25 mL LB-Medium mit 0,5 mL ÜNK beimpft und unter Schütteln bei 37 °C zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 wachsen lassen, anschließend das Wachstum auf Eis abgestoppt. Die Zellen wurden für 10 min bei 4000 g und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit 1 Volumen eiskaltem, sterilem H₂O_{bidest.} gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut für 10 min bei 4000 g und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 3 mL eiskaltem 10 %igen Glycerin aufgenommen. Die darauffolgende Zentrifugation fand für 10 min bei 5000 g und 4 °C statt. Das Pellet wurde in 0,5 mL 10 %igem Glycerin aufgenommen und in 40-µL-Aliquots abgefüllt, in Flüssig-Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.7 Transformation von *E.-coli*-Stämmen

2.3.7.1 Fast Transformation

Eine 5-mL-LB-Kultur wurde mit 100 µL einer ÜNK beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 inkubiert. 1 mL der Kultur wurden für 10 min bei 3000 g abzentrifugiert und das

Zellpellet in 1/10 Volumen TSS-Puffer (LB-Medium, 10 % PEG (MG 3350-8000), 5 % DMSO, 20-50 mM Mg²⁺, pH 6.5) resuspendiert. Daraufhin wurden 5 µL Plasmid-DNA-Suspension hinzugefügt. Gut durchmischt wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 0,9 mL LB und 20 mM Glucose hinzugefügt und für 60 min bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden bei 3000 g abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet im zurücklaufenden Tropfen resuspendiert, ausplattiert und die Platte bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.3.7.2 Transformation mit ultra-kompetenten Zellen (Hitzeschock)

Je 100 µL ultrakompetente Zellen (2.3.6.1) wurden aufgetaut, mit 5 µL Plasmid-DNA bei Raumtemperatur gemischt und 30 min auf Eis belassen. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 60 s in einem Thermoshaker. Der Ansatz wurde nun sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Je 900 µL LB-Medium (alternativ auch SOC-Medium, 2.2.1) wurden bei RT hinzugefügt und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden zentrifugiert bei 4000 rpm (kleine Tischzentrifuge) für 5 min. Der Überstand wurde abgekippt und Pellet in zurücklaufendem Tropfen resuspendiert, alles ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.3.7.3 Transformation mit elektrokompetenten Zellen (Elektroporation)

40 µL elektrokompetente Zellen wurden in eine sterile 1-cm-Küvette (Peqlab, Erlangen) gefüllt und mit 1-2 µL entsalztem Plasmid gemischt. Die befüllte Küvette wurde in ein Elektroporationsgerät *Electro Cell Manipulator*® 600 (BTX Elektroporation System) gestellt. Die Elektroporation wurde bei 2,44 kV, 2,5 kV Resistance und 25 µF durchgeführt. Direkt nach dem Impuls wurde das Gerät ausgeschaltet und sofort 1 mL SOC- (oder LB)-Medium hinzugegeben und in ein 1,5-mL-Reagiergefäß überführt und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden bei 4000 g für 5 min anezentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, das Pellet in dem zurücklaufendem Tropfen resuspendiert. Der Ansatz wurde ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.3.8 *Single-copy*-Integration von DNA in die λ attachment site

Diese Methode von Haldimann und Wanner (2001) wurde angewandt, um Gene stabil und ohne Überproduktionsartefakte in *E.-coli*-Stämmen exprimieren zu können und natürliche, physiologische Bedingungen zu untersuchen. Dazu wurden die Gene von Interesse singulär in das Genom integriert. Das zu integrierende Gen wurde zunächst auf ein *conditional-replication, integration and modular* (CRIM)-Plasmid (pAH120) kloniert und in den *E.-coli*-

pir⁺-Stamm BW23473 transformiert. CRIM-Plasmide integrieren spezifisch in die λ *attachment site* des Genoms. Der Zielstamm für die Integration wurde mit dem Integrations-Helferplasmid pINT-ts (Hasan et al. 1994) transformiert. Zur Integration wurde der Zielstamm im 50 mL LB-Medium und bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die 30 °C waren erforderlich aufgrund des thermosensitiven *ori* des pINT-ts. Aus der Kultur wurden elektrokompetente Zellen hergestellt (2.3.6.2) und das CRIM-Plasmid durch Elektroporation in die Zelle gebracht (2.3.7.3). Die Zellen wurden mit 1 mL SOC-Medium aufgefüllt und anschließend schüttelnd bei 37 °C für 1 h inkubiert, anschließend für 30 min bei 42 °C (Verlust des Helfer-Plasmids). Der Elektroporationsansatz wurde zunächst auf LB/Kan15 ausplattiert (reduzierte Antibiotikums-Konzentration, da sich auch die Kan^R-Kassette nun nur noch als einzelne Kopie im Genom befindet) und bei 37 °C inkubiert. Die Transformanten wurden zunächst ohne Antibiotikum vereinzelt und anschließend auf den Verlust des Helfer-Plasmids (kein Wachstum auf Amp) getestet. Desweiteren mussten die Transformanten normales Wachstum auf Platten mit 15 µg/mL und eingeschränktes Wachstum auf 50 µg/mL Kanamycin zeigen. Kolonien, die diese Kriterien erfüllten, wurden mittels Kolonie-PCR (2.3.2.3) näher auf die korrekte Integration untersucht. Es wurden 4 verschiedene Primerkombinationen genutzt: P1 und P2, P1 und P4, P2 und P3, sowie P3 und P4. Abschließend wurden die Kolonie-PCRs mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (2.3.4) und der Klon nur dann als richtig gewertet, wenn bei den Primerkombinationen P1 und P2 sowie P3 und P4 PCR-Produkte im Agarose-Gel detektiert wurden.

2.3.9 Geninaktivierung nach Datsenko und Wanner

Mit dieser Methode (Datsenko und Wanner 2000) war es möglich, einzelne chromosomale Gene in *E.-coli*-Stämmen gezielt zu inaktivieren. Durch *site*-spezifische Rekombination wurde das Gen von Interesse gegen eine Resistenzkassette (hier Chloramphenicol) mit flankierenden FRT *sites* ausgetauscht. Die FRT *sites* ermöglichen eine nachträgliche Entfernung der Resistenzkassette (2.3.11). Auf diese Resistenzkassette wurde selektiert und die richtige Position im Genom und damit die Inaktivierung des Ursprungsgens durch Kontroll-PCR festgestellt.

Vorbereitend wurde eine PCR mit dem Plasmid pKD3 durchgeführt, welches die Chloramphenicol-Resistenzkassette mit den FRT *sites* trägt. Die Primer wurden spezifisch so gewählt, dass neben den bindenden Bereichen auf pKD3 auch 36-50 bp lange Bereiche homolog zu den flankierenden chromosomalen Sequenzen stromauf- und stromabwärts vom

auszutauschenden Gen enthalten waren. Der Stamm mit dem zu inaktivierenden Gen wurde zunächst mit dem Helfer-Plasmid pKD46 transformiert, das das Red-System des λ -Phagen mit einer Rekombinase für die homologe Rekombination trägt. Zur späteren leichteren Entfernung des Plasmids besitzt dieses einen temperatursensitiven *ori*. Dieser Stamm wurde im 5-mL-Maßstab bei 30 °C angezogen und das Red-System mit 1-100 mM L-Arabinose von Beginn an induziert. Die Anzucht erfolgte bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,6. Der Stamm wurde elektrokompent gemacht durch 100fache Konzentration der Zellen und 3-maligem waschen in eiskaltem 10%igem Glycerol. Anschließend erfolgte die Elektroporation mit 25 μ L elektrokompenten Zellen und 10-100 ng PCR-Produkt. Der Schock erfolgte wie in 2.3.7.3, die Zellen wurden mit 1 mL SOC-Medium vermischt und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Eine Hälfte der Zellen auf LB-Cm-Platten ausplattieren und über Nacht bei 37 °C inkubieren, falls keine Klone wachsen, die zweite Hälfte der Zellen ausplattieren, die über Nacht bei RT gelagert wurden, ausplattierte Zellen dann über Nacht bei 37 °C. Es erfolgte die Vereinzelnung mehrerer Klone und der Test auf Ampicillin-Sensitivität (Helferplasmid dürfte sich bei 37 °C nicht repliziert haben). Abschließend wurde eine Kontroll-PCR mit mindestens 2 Primerpaaren durchgeführt, um festzustellen, ob der Stamm das Gen gegen die Cam-Kassette ausgetauscht hat. Die Primer wurden so gewählt, dass jeweils 1 Primer innerhalb der Cam-Kassette band, der andere im jeweils flankierenden Gen bzw. Sequenzabschnitt.

2.3.10 Geninaktivierung durch Phagentransduktion mit P1_{vir}

Ein durch eine Kanamycinresistenzkassette ausgeschaltetes Gen eines *E.-coli*-Stammes (Donorstamm) soll in einen anderen Stamm (Akzeptorstamm) gebracht werden und dort über ein homologes Rekombinationsereignis in das Genom an der gleichen Stelle eingeführt werden. P1 ist ursprünglich ein temperenter Phage, zur Phagentransduktion wird hier die Mutante P1_{vir} verwendet, die nicht mehr zur Lysogenie fähig ist. P1_{vir} verpackt im Laufe des Zyklus im Wirtsbakterium in einige Phagenhüllen auch zufällsmäßige Abschnitte bakterieller DNA (generelle Transduktion). Es folgt die Lyse des Wirts (Donorstamm). Bei Infektion eines Akzeptorstammes wird mit Hilfe der *site*-spezifischen Rekombinase Cre (codiert vom Phagen) die transduzierte DNA ins Chromosom des Akzeptors rekombiniert. Die Infektion und Lysisereignisse können über die Calciumkonzentration im Medium kontrolliert werden, da P1 Calcium für seine Infektion benötigt. Wird Citrat hinzugefügt, wird die Calciumkonzentration im Medium soweit gesenkt, dass keine Infektion mehr stattfinden kann.

Donor-Lysatherstellung

5 mL L_{Kan50}-Medium (Tab. 14) wurden mit dem Donorstamm inokuliert und über Nacht bei 37 °C wachsen lassen. Am darauffolgenden Tag wurden 9 mL L-Ca²⁺-Medium (Tab. 15) mit 1 mL Donor-ÜNK inokuliert (in 100 mL Kolben) und 90 min wachsen lassen bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6-0,7. 2 x 180 µL Zellen wurden in sterile Reagiergefäße aliquotiert, je 20 µL „neutrales“ Phagenlysat hinzugefügt (ca. 8 x 10⁷ Phagen / mL, Lysat 31 aus Phagenlysat Sammlung Reupke, AG Brüser, aus *E. coli* MC4100) und 25 min bei 30 °C inkubiert. 2 x 1800 µL L-Ca²⁺-Weichagar (Tab. 17) wurden in 2-mL-Reagiergefäße vorgelegt und bei 45 °C im Thermoblock flüssig gehalten. Es wurden 200 µL Zellen-Lysat-Gemisch hinzupipettiert, kurz invertiert und sofort auf L-Ca²⁺-Agarplatten (Tab. 16) gegossen und verteilt. Die Platten wurden nach Festwerden des Topagars herumgedreht und für 6 h (bis über Nacht, je nachdem, wann Lysisbildung zu erkennen war) bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde auf beide Platten je 3 mL L-Mg²⁺-Medium pipettiert, der Topagar mit einem Drigalsky-Spatel abgeschabt und alles in ein 50-mL-Reagiergefäß überführt. Anschließend wurde 0,1 mL Chloroform pro 4 mL Reagiergefäß-Inhalt hinzupipettiert und 1 min kräftig geschüttelt. Daraufhin wurde 30 min bei 37 °C, im Anschluss 90 min bei RT inkubiert. Der Inhalt wurde 10 min bei 5000 g bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand (Lysat) wurde in steriles Gefäß überführt, 100 µL Chloroform hinzugefügt, stark geschüttelt und bei 4 °C gelagert (Lagerung so über Monate möglich).

Phagentiterbestimmung

Der P1-sensitiven Stamm MC4100 wurde über Nacht in LB bei 37 °C angezogen. 1 mL ÜNK wurden zu 9 mL L-Ca²⁺-Medium (50-mL-Kolben) pipettiert und 90 min wachsen gelassen bis ca. 2 x 10⁸ Zellen / mL. Daraufhin wurden 5 x 180-µL-Aliquots entnommen und in 2-mL-Reagiergefäße gefüllt. Nun wurden 20 µL Phagenlösung (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵; verdünnt in L-Ca²⁺-Medium) hinzupipettiert, gemischt und für 25 min bei 30 °C in einem Heizblock ohne Schütteln (Adsorption) inkubiert. Die 200 µL Zellen/Phagengemisch wurden in 1,8 mL L-Ca²⁺-Weichagar (flüssig, 45 °C) pipettiert, über Kopf gemischt und direkt auf L-Ca²⁺-Agar-Platten gegossen, verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubieren. Am nächsten Tag erfolgte das Auszählen der Plaques. Für eine effektive Phagentransduktion ist der Zielwert mindestens 8 x 10⁷ Phagen / mL.

Transduktion in den Akzeptorstamm

5 mL LB_{Kan50} wurden mit dem Akzeptorstamm inokuliert und über Nacht bei 37 °C wachsen lassen. Am darauffolgenden Tag wurden 9 mL L-Ca²⁺-Medium mit 1 mL Akzeptor-ÜNK in 100 mL Kolben inokuliert und 90 min wachsen lassen (bis ca. 2×10^8 Zellen / mL => OD₆₀₀ = 0,6-0,7)

Folgende Ansätze wurden in Reagiergefäßen gemischt:

- 1 mL Kultur + 10 µL Lysat unverdünnt
- 1 mL Kultur + 10 µL Lysat (10^{-1})
- 1 mL Kultur + 10 µL Lysat (10^{-2})
- 1 mL Kultur (Kontrolle)

Diese wurden für 30 min bei 30 °C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurden je 0,1 mL 200 mM Natriumcitrat hinzupipettiert, was das Ca²⁺ abfängt und eine weitere Infektion durch den Phagen verhindert. Dies geschah für 20 min bei 37 °C schüttelnd. Die Zellen wurden für 3 min bei 4000 g und RT abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 mL LB/20 mM Na-Citrat resuspendiert und die Suspension erneut für 3 min bei 4000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 1 mL LB/20 mM Na-Citrat resuspendiert und die Zellen nach folgendem Schema ausplattiert:

- Transformationsansätze: je Verdünnung 50 µL auf L-Citrat_{Kan50}-Platten (20 mM Citrat) ausplattieren
- Kontrolle: 50 µL auf L-Ca²⁺-Platten ausplattieren

Der Rest der Ansätze wurde für 3 min bei 2000 g zentrifugiert, der Überstand ausgegossen und das Pellet in der Restflüssigkeit resuspendiert.

- Transduktionsansätze: alles auf L-Citrat_{Kan50}-Platten ausplattieren
- Kontrolle: alles auf L-Ca²⁺-Platten ausplattieren

Alle Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Vereinzlung wurden die erhaltenen Klone mittels Kolonie-PCR auf die korrekte Transduktion kontrolliert. Dabei wurden Primerpaare gewählt, die einmal innerhalb der Kanamycinkassette und einmal im flankierenden Gen bzw. Sequenzabschnitt banden.

Im Folgenden sind die Medien für die Phagentransduktion aufgeführt:

Tab. 14 L-Medium (pro Liter).

Masse	Substanz
10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
1 g	Glucose

pH auf 7.0 einstellen, autoklavieren

Tab. 15: L-Ca²⁺-Medium oder L-Mg²⁺-Medium (pro Liter).

Masse	Substanz
10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
1 g	Glucose

pH auf 7.0 einstellen, autoklavieren
wenn kühl: 2,5 mL 1 M CaCl₂ (steril) oder 2,5 mL MgCl₂ (steril) dazu

Tab. 16: L-Ca²⁺-Agar (pro Liter).

Masse; Volumen	Substanz
1 L	L-Medium
15 g	Agar

autoklavieren
vor dem Gießen 2,5 mL 1 M CaCl₂ (steril) dazu

Tab. 17: L-Ca²⁺-Weichagar (pro Liter).

Masse; Volumen	Substanz
1 L	L-Medium
6,5 g	Agar (0,65 %)

autoklavieren
vor dem Gießen 2,5 mL 1 M CaCl₂ (steril) dazu

Tab. 18 L-Citrat-Agar (pro Liter).

Masse; Volumen	Substanz
1 L	L-Medium
15 g	Agar

autoklavieren

vor dem Gießen 20 mM Natriumcitrat (steril) dazu

2.3.11 Entfernung der Antibiotikaresistenzkassette nach Geninaktivierung

Wurde eine Antibiotikaresistenzkassette mit Hilfe der FLP-Rekombinase ins Genom integriert, besitzt die Kassette flankierend FRT *sites* (FLP-Erkennungsstellen) über die die Kassette nachträglich wieder entfernt werden kann. Dazu wurde zunächst der Stamm mit der zu entfernenden Kassette mit dem Helfer-Plasmid pCP20 (Cherepanov und Wackernagel 1995) transformiert. In dieser Arbeit sollte ein Doppelknockout im Stamm UE54 vorgenommen werden. Als Ausgangsstamm wurde eine Variante des Stammes UE54 verwendet aus der die Kan-Kassette bereits über dieses Verfahren entfernt wurde (UE54 kan^S). Über Phagentransduktion wurde in diesem Stamm zunächst *ynbA* inaktiviert und dadurch eine Kan-Kassette chromosomal eingebracht. Da anschließend ein weiterer *knockout* (*ynjF*) über die gleiche Methode stattfinden sollte, musste zuvor die Kan-Kassette entfernt werden. Das Helfer-Plasmid pCP20 besitzt einen temperatursensitiven *ori* und eine Temperatur-abhängige Synthese der FLP-Rekombinase (Datsenko und Wanner 2000). Die bei 30 °C auf LB-Ampicillin vereinzelt Transformanten wurden einmalig ohne Antibiotikum bei 43 °C vereinzelt und anschließend auf den Verlust des Helfer-Plasmids (kein Wachstum auf Amp) und die Kan-Kassette getestet (kein Wachstum auf Kan). Korrekte Klone wurden nochmals mittels Kolonie-PCR getestet. Flankierend zur Resistenzkassette bindende Primer sollten miteinander ein Produkt ergeben, nicht aber mit den in der Kan-Kassette bindenden.

2.3.12 Entfernung des temperatursensitiven Plasmids pMS5 zur Erzeugung des PE-defizienten Stammes GN10 (*curing*)

Für die Untersuchung der Phospholipide wurde der PE-defiziente Stamm GN10 (*ΔpssA10::cam^R* W3110, Saha, 1996) verwendet, der absolut kein PE mehr auszubilden vermag. Zur stabilen Lagerung des Stammes wurde GN10 mit einem *pssA*-enthaltenen Plasmid in Kultur gehalten. Dieser Stamm GN10/pMS5 wurde auch vergleichend als PE-Wildtypstamm

verwendet. Vor jedem Experiment wurde das temperatursensitive Plasmid pMS5 durch einen Temperaturshift aus dem Stamm entfernt. Dabei wurde zunächst eine thermosensitive Kolonie durch Test auf Wachstum LB (30 °C und 43 °C) gewonnen. Das Plasmid war thermosensitiv, sobald das Wachstum NUR bei 30 °C und nicht bei 43 °C stattfand. Ohne das Plasmid sollte kein Wachstum ohne zusätzliche MgCl₂-Zugabe möglich sein. Von dieser Kolonie wurde eine ÜNK mit 50 mM MgCl bei 30 °C angezogen. Ein neues LB/MgCl₂-Röhrchen wurde mit der ÜNK 1:2500 beimpft und unter gleichen Bedingungen für 1 Stunde bei 30 °C geschüttelt. Anschließend erfolgte ein Temperaturshift für 3 h bei 43 °C. Unverdünnte Kultur, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³-Verdünnungen wurden auf LB/50 mM MgCl₂ ausplattiert. Kolonien von GN10 waren klein und wuchsen sehr langsam, für eine Erleichterung des Pickens wurden die Platten für 2 Tage bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Stamm jeweils auf den mit dem Wegfall des Plasmids verbundenen Ampicillinresistenzverlust getestet (Saha et al. 1996).

2.3.13 Synthese eines cysteinfreien TatCs

Zur Untersuchung des möglichen Einflusses bzw. Inhibierung vom thiolreaktiven N-Phenylmaleimid (NPM) auf das Tat-System, wurde die Synthese eines cysteinfreien TatCs in Auftrag gegeben. TatC enthält vier Cysteinreste die durch NPM modifiziert werden können und es somit inaktiv machen könnte. Um diese Art der Inhibierung zu untersuchen und auszuschließen, wurde ein TorA-Assay mit NPM durchgeführt und dabei das native TatABC-System mit dem modifizierten, cysteinfreien Tat-System verglichen.

Die vier vorhandenen Cysteinocodons wurden durch Alaninocodons ausgetauscht. Die Synthese des cysteinfreien TatCs erfolgte durch Life Technologies (Invitrogen) auf einen pMK-RQ-Klonierungsvektor. Dieser enthielt für die Klonierung in den Expressionsvektor pABS eine BpI- und eine NdeI-Schnittstelle. BpI ist keine natürliche Schnittstelle im natürlichen *tatABC*-Operon. Diese wurde als *Silent-mutagenesis*-Schnittstelle in den pABS-*tatABC* mittels *QuickChange*-PCR in *tatB* eingeführt. Anschließend konnte das cysteinfreie *tatC* mittels BpI/NdeI in den pABS-Expressionsvektor kloniert werden.

2.3.14 DNA-Sequenzierung

Zur Kontrolle von Basenaustauschen bei der *QuickChange*-PCR, der korrekten Ligation von Plasmiden und Kontrolle von PCR-Produkten wurde eine Überprüfung der Sequenzen erforderlich. Die Sequenzierung wurde von SeqLab/Microsynth (Göttingen) vorgenommen. Für ein Sequenzierungsansatz wurde ein Volumen von 12 µL DNA + 3 µL des entsprechenden

Primers benötigt. Die Konzentration des Primers betrug 20 pmol/μL. Die DNA-Mengen lagen bei Plasmiden bei 50-100 ng bei PCR-Produkten um ca. 100 ng/μL (Faustregel: Fragmentlänge geteilt durch 4).

2.4 Proteinbiochemische Arbeiten

2.4.1 Disulfidquervernetzung von TatA-Variaten

Für die Quervernetzungsexperimente mit Cysteinvarianten in TatA wurde als Ausgangsstamm *E. coli* DADE verwendet. Die *tatABC*-Varianten wurden zum einen genomisch integriert (2.3.8) oder von einem pABS-Vektor exprimiert. In beiden Fällen wurde die Expression über einen *tat*-Promotor reguliert.

Zur Quervernetzung der eingefügten Cysteine wurden 5-mL-ÜNKs der Varianten inokuliert und bei 37 °C schüttelnd angezogen. Am folgenden Tag wurden 100-mL-LB-Hauptkulturen 2 %ig beimpft und unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 1 wachsen lassen. Die Zellernte erfolgte für 10 min bei 10.000 g, 4 °C. Anschließend wurde das Zellpellet SOFORT in 5 mL 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 15 mM Iodacetamid (IAA) resuspendiert. Die schnelle, dauerhafte Modifizierung (Alkylierung) der Thiolgruppen der Cysteine soll eine unspezifische Ausbildung von Disulfiden verhindern. Die Reaktion erfolgte für 1 h im Dunkeln bei RT. Anschließend wurde der Zellsuspension eine Spatelspitze DNaseI zugefügt und die Zellen in einem 15-mL-Reagiergefäß auf Eis per Ultraschall aufgeschlossen (Branson sonifier; Intensität: 4; Duty Cycle 50 %; 3 min pro Tube; 15 Pulse *on/off*-Intervalle). Die Zelltrümmer wurden bei 5.000 g und 4 °C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde in ein UZ-Röhrchen überführt und die Membranen für 45 min und 4° C bei 130.000 g zentrifugiert (Beckman Optima L-80XP). Es erfolgte ein vollständiges Entfernen des Überstandes und die Aufnahme und Resuspension der Membranen in 200 μL 100 mM Tris HCl pH 8,0. Die gelöste Membran wurde in 1,5-mL-Plastikreaktionsgefäße zusammen mit 200 μL nicht-reduzierendem SDS-PAGE-Probenpuffer pipettiert und die Proben bei -20 °C eingefroren.

Anschließend wurde eine SDS-PAGE (2.4.5.1) mit einem 15 %igen Gel gemacht und die Proben vor dem Auftrag für 5min bei 95 °C aufgeköcht. Pro Tasche wurden 10 μL Probe aufgetragen. Es erfolgte ein Western Blot, das Blocken über Nacht in 1 % MM-Pulver und die Entwicklung mit α-TatA-Antikörper (2.4.5.4).

2.4.2 Carbonatwaschung von Membranen

Um sicherzustellen, dass bei einer präparierten Membranfraktion auch alle peripher an der Membran haftenden Proteine abgelöst werden, wurde eine Carbonatwaschung im Anschluss an eine übliche Membranpräparation (2.4.1) vorgenommen. Ein Teil resuspendierter Membran wurde mit einem Teil 200 mM Na₂CO₃ (in H₂O) versetzt und 5 min durchmischt (mehrfach vortexen). Die Membranen wurden für 45 min zentrifugiert, 130.000 g bei 4 °C. Vom Überstand wurde eine entsprechende Probe abgenommen und 1:2 mit SDS-Probenpuffer (hier nicht-reduzierend) versetzt. Der restlichen Überstand wurde vollständig entfernt und die gewaschene Membran im ursprünglichen Volumen 100 mM Tris HCl pH 8.0 resuspendiert. Die Probe wurde im gleichen Volumen (nicht-reduzierenden) SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und für die SDS-PAGE eingesetzt.

2.4.3 Solubilisierung von Membranproteinen

Um Membranproteine aus ihrer Lipidumgebung in Lösung zu bringen, werden verschiedene Detergenzien eingesetzt. Diese können denaturierend oder nicht-denaturierend sein. Werden die Proteine anschließend ohnehin z.B. in einer denaturierenden PAGE weiter untersucht, kommen stärkere Detergenzien wie SDS zum Einsatz. Die natürliche Konformation der Proteine bleibt dabei nicht erhalten. Um einen möglichen Einfluss der potentiellen Inhibitoren auf den TatBC-Komplex in einer *Blue-Native*-PAGE beobachten zu können, war es notwendig die BC-Komplexe schonend und nicht-denaturierend aus der Cytoplasmamembran zu lösen. Dafür wurde Digitonin gewählt, das sich schon in der Vergangenheit als gutes, sehr mildes Detergenz für diesen Komplex herausgestellt hatte, dabei zugleich den Komplex gut in Lösung brachte und die natürliche Konformation erhielt (Richter und Brüser, 2005).

Für die Solubilisierung wurden 100 mL LB-Medium mit 4 mL ÜNK angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 1 wurden die Zellen geerntet (4 °C, 5000 g, 10 min) und über Nacht weggefroren. Das Zellpellet wurde in 4 mL Aufschlusspuffer (Tab. 19) aufgenommen und 25 µL DNaseI (10 mg/mL) und 2 mM PMSF zugefügt. Der Zellaufschluss erfolgte mit einer Passage in der French Press bei 14000 psi. Die Zelltrümmer wurden für 5 min und 10.000 g bei 4 °C abgetrennt. 1 mL Überstand wurde abgenommen und die Membran bei 100.000 g für 30 min bei 4 °C pelletiert. Die Membran wurde anschließend in 200 µL Aufschlusspuffer resuspendiert. Zu 50 µL gelöster Membran wurden 50 µL Solubilisierungspuffer (Aufschlusspuffer + 1 % Digitonin) hinzugefügt und zur Solubilisierung für 1 h leicht

schüttelnd bei 4 °C gestellt. Der solubilisierter Überstand wurde für 30 min bei 100.000 g von der Membran abgetrennt und in der Blue-Native-(BN)-PAGE (2.4.5.2) eingesetzt.

Anzumerken ist hier, dass das in der Arbeit untersuchte membranständige TatA für die SDS-PAGE keiner vorangegangenen Solubilisierung aus der Membran bedurfte. Die Membranen wurden direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen und in die PAGE eingesetzt und Tata zeigte immer normales Laufverhalten mit einer Bande um 17 kDa.

Tab. 19: Aufschlusspuffer (frisch, einen Tag zuvor ansetzen).

Molarität; Volumen	Substanz
50 mM	Bis Tris-HCl pH 7,0
20 %	Saccharose (w/v)
10 mM	MgCl ₂

2.4.4 TCA-Fällung von Proteinen

Für die Aufkonzentrierung löslicher peri-oder cytoplasmatischer Proteine wurden die Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt und in einem kleineren Volumen wieder aufgenommen. Diese wurden anschließend in einer SDS-PAGE (3.4.5.1) weiter untersucht. Dazu wurden 100 µL Proteinprobe 20 µL 100 %ig TCA (100%ige TCA-Lösung: 50 g TCA in 22 mL H₂O) zugefügt und invertiert. Der Ansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert und anschließend für 10 min bei 14000 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 1 mL Aceton hinzugegeben und einmal invertiert. Es erfolgte wiederum eine Zentrifugation für 10 min bei 14000 g. Erneut wurde der Überstand verworfen und das Pellet vollständig getrocknet (*Speed vac* oder 1 h RT).

Für eine anschließende SDS-PAGE wurde das Pellet in 50 µL SDS-Probenpuffer aufgenommen; sollte sich hierbei die Suspension gelb verfärben, wurde der pH mit Ammoniakdampf mittels einer Pasteurpipette eingestellt; die Probe färbte sich wieder blau.

2.4.5 Analytische Proteinseparation

2.4.5.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE zur Auftrennung der Proteine wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Die mit SDS-Probenpuffer (Tab. 20) versetzten Proteinproben wurden für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend auf SDS-Gelen (4,5 %iges Sammelgel, 15 %iges Trenngel, (Tab. 21) aufgetragen. Als Marker wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo

Scientific) verwendet. Für den Gellauf wurden Mini-PROTEAN Tetra Cell-Kammern von Bio-Rad benutzt. Nach dem Einsetzen der Gele wurden die Kammern mit SDS-Laufpuffer gefüllt (Tab. 22) Bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten, wurde eine Spannung von 80 V angelegt; anschließend fand der restliche Gellauf bei 130 V statt und wurde beendet, sobald die blaue Lauffront das Gel verlassen hatte.

Tab. 20: Zusammensetzung des SDS-PAGE-Probenpuffers. Für den nicht-reduzierenden Probenpuffer wurde DTT weggelassen!

Substanz	Volumen/Masse	
Tris-HCl	8 mL	0,5 M pH 6,8
Glycerin	10 mL	100%ig
DTT	1,54 g	
SDS	2 g	
Bromphenolblau	0,6 mL	2%ig

ad 50 mL H₂O_{bidest.}

Tab. 21: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele (Menge für 2 Gele).

Substanz	Volumen Sammelgel (4,5 %)	Volumen Trenngel (15 %)
30 %Acrylamid (w/v)/	0,75 mL	6 mL
0,8 % Bis-Acrylamid (w/v)		
H ₂ O _{bidest.}	3 mL	3 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	/	3 mL
0,3 % SDS		
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 mL	/
0,4 % SDS		
10 % APS	50 µL	100 µL
TEMED	5 µL	10 µL

Tab. 22: Zusammensetzung des 10 x SDS-Laufpuffers.

Konzentration	Molarität; Volumen
Glycin	200 mM
Tris-HCl, pH 8,8	25 mM
SDS	1 % (v/v)

2.4.5.2 Blue-native-PAGE

90 µL des solubilisierten Überstandes (aus 2.4.3.) wurden mit 10 µL Probenpuffer (Tab. 23) gemischt. Es wurden BN-Acrylamid-Gradientengele (5 bis 13,5 %; Tab. 24) verwendet. Dabei wurden 7 µL Probe aufgetragen und 7 µL Marker (*NativeMark™ Unstained Protein Standard*, novex, Life Technologies) mitgeführt. Der Lauf erfolgte bei 100 V für insgesamt ca. 6 h bei 4 °C im Kühlraum. Durch das Coomassie im Kathodenpuffer (0,5 M Tricin, 150 mM Bis Tris-HCl pH 7, 0,01 % Serva G250) färbten sich die Proteinkomplexe blau. Als Anodenpuffer wurde 0,25 M Bis Tris-HCl pH 7,0 verwendet. Nach etwa halbem Lauf wurde der Kathodenpuffer gegen Coomassie-freien Kathodenpuffer gewechselt. Entweder erfolgte der weitere Lauf weiter bei 100 V oder über Nacht bei 40 V. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel in 50 mL Towbin-Puffer + 0,5 mL 10 % SDS für 10 min inkubiert und ein Western Blot durchgeführt (2.4.5.4) Die Markerbanden wurden abgeschnitten und in einer Ponceau-S-Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 % Essigsäure (v/v)) für 1 h schwenkend angefärbt. Anschließend wurde mit H₂O solange gespült bis Banden zu erkennen waren. Diese wurden sofort mit einem Kugelschreiber nachgezeichnet. Die Proteindetektion erfolgte wie in 2.4.5.4 beschrieben mit TatB und TatC-Antikörper.

Tab. 23: Zusammensetzung BN-PAGE-Probenpuffer.

Substanz	Masse
5 % Serva G250	0,25 mg
100 mM Bis Tris-HCl pH 7,0	0,105 g / 5 mL
500 mM Aminocaprinsäure	0,328 / 5 mL
30 % Saccharose	1,5 g / 5 mL

Lagerung bei – 20 °C

Tab. 24 Zusammensetzung der BN-Gele.

	4 % Sammelgel (für 2 Gele)	5 % Trenngel (für 1 Gel)	13,5 % Trenngel (für 1 Gel)
49,5 % Acrylamid	0,242 mL	0,212 mL	0,573 mL
3 x Gel-Puffer	1 mL	0,7 mL	0,7 mL
75 % Glycerin	-	0,14 mL	0,56 mL
H ₂ O	1,72 mL	1,028 mL	0,247 mL
TEMED	6 µL	2 µL	2 µL
5 % APS	32 µL	11 µL	11 µL
In Gradientenmischer		1,88 mL	1,8 mL vom Mixer
Total:	3 mL	2,1 mL	2,1 mL

Gele wurden 1,5 h bis 2 h vor der Verwendung getrocknet. Gegossene Gele waren mehrere Tage im Kühlschrank haltbar. Der 3 x Gel-Puffer setzte sich aus 150 mM Bis-TrisHCl pH 7,0 und 1,5 M 6-Aminocaprinsäure zusammen und wurde bei 4 °C gelagert.

2.4.5.3 Coomassie-Färbung von Proteinen

Um die bei der nativen PAGE (3.4.6.3) aufgetragenen Proteinmengen quantitativ vergleichen zu können, wurden SDS-Polyacrylamidgele mit den Proben laufen gelassen und anschließend für 1 h unter langsamen Schwenken in einer *Coomassie-Brilliant-Blue*-Lösung (Tab. 25) inkubiert. Anschließend wurden die Gele unter mehrfachem Wechsel der Entfärberlösung (Tab. 26) geschwenkt, sodass die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Gelbilder wurden mit einem Scanner (Epson perfection V700 Photo) aufgenommen.

Tab. 25 Zusammensetzung der *Coomassie-Brilliant-Blue*-Lösung.

Substanz	Konzentration
<i>Coomassie-Brilliant-Blue</i> R250	0,2 % (w/v)
<i>Coomassie-Brilliant-Blue</i> G250	0,05 % (w/v)
Methanol	20 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Tab. 26: Zusammensetzung der Entfärberlösung.

Substanz	Konzentration
Ethanol	20 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
H ₂ O	70 % (v/v)

2.4.5.4 Western-Blot und Proteindetektion

Western Blot

Die Proteine aus der SDS-PAGE (2.4.5.1) wurden über einen *Semi-dry*-Blot von den Polyacrylamid-Gelen auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Dafür wurden Fastblot Semi-Dry Blotter von Biometra verwendet. Der Aufbau des Blots war wie folgt: Zwei Filterpapiere und die Membran wurden in Towbin-Puffer (Tab. 27) getränkt. Auf die Anodenplatte der Blotting-Apparatur wurde eines der Filterpapiere gelegt, darüber die Membran, dann das Gel und oben auf das zweite Filterpapier. Den Abschluss bildete die Kathodenplatte. Das Blotting erfolgte mit einer Stromstärke von 44 mA pro Blot für 1 bis 1,5 h. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran in PBS-Puffer (Tab. 28) mit 5 % Magermilchpulver über Nacht unter leichtem Schwenken geblockt.

Tab. 27: Zusammensetzung des Towbin-Puffers

Substanz	Molarität; Volumen
Glycin	170 mM
Tris	25 mM
Methanol	20 % (v/v)

Tab. 28: Zusammensetzung des PBS-Puffers.

Substanz	Molarität
NaCl	13,7 mM
KCl	3 mM
Na ₂ HPO ₄	4 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM

Proteindetektion

Nach dem Blocken mit Magermilchpulver wurde die Membran dreimal mit PBS für 5 min unter leichtem Schwenken gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper für 1 h schwenkend inkubiert. Antikörper für TatA, TatB, TatC, HiPIP und die β -Lactamase wurden 1:2500-1:5000 in PBS, 0,5 % BSA und 0,02 % Na-Acid verwendet. Zur Erkennung des Biotin-Carboxyl-Carrier-Proteins (BCCP) wurde das Strep-Tactin®-HRP-Konjugat in einer 1:3000-Verdünnung in PBS mit 0,5 % BSA verwendet.

Die Membranen wurden anschließend dreimal für 5 min in PBS gewaschen und entweder direkt der ECL-(*enhanced chemiluminescence*)-Reaktion unterzogen oder mit einem weiteren sekundären Antikörper behandelt. Die sekundären Antikörper *Goat-anti-rabbit*- und *Goat-anti-mouse*-IgG-HRP-Konjugat wurden 1:5000 verdünnt in PBS mit 0,5 % BSA für 1h inkubiert.

Tab. 29: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Typ	Antigen	Verdünnung	Quelle
Anti-HiPIP-AK	Kaninchen-IgG (Serum)	precursor-HiPIP	1:2500	Brüser et al. 1998
Anti-TatA-AK	Kaninchen-IgG (Serum)	TatA/E	1:5000	Yahr und Wickner 2001
Anti-TatB-AK	Kaninchen-IgG (Serum)	TatB	1:5000	Yahr und Wickner 2001
Anti-TatC-AK	Kaninchen-IgG (Serum)	TatC	1:5000	Alami et al. 2002
Anti- β -Lactamase	Maus-IgG	β -Lactamase	1:5000	Acris, Herford
<i>Goat-anti-rabbit</i> -HRP-Konjugat	Ziegen-IgG (Serum)	Kaninchen-IgG	1:5000	Bio-Rad, IgG-München
<i>Goat-anti-mouse</i> -HRP-Konjugat	Ziegen-IgG (Serum)	Maus-IgG	1:5000	Bio-Rad, IgG-München
Strep-Tactin®-HRP-Konjugat	rekombinant	Strep-tagII	1:3000	IBA, Göttingen

Nach der Antikörperinkubation wurde die Membran dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 mL Lösung A (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,4 mM *p*-Coumarsiure (in DMSO), 2,5 mM Luminol (in DMSO) und 5 mL Lösung B (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,018 % H₂O₂) für etwa 15 sec inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde mit dem Imager *DNr Bio-Imaging Systems MF-CHemiBIS 4.2* detektiert und die Signale durch das Programm *GelCapture* verarbeitet.

2.4.6 *In-vivo*-Analysen des Tat-Transports

Um die Funktionalität des Tat-Systems in den *E. coli*-Stämmen zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Transport verschiedener Substrate untersucht. Alle hier getesteten Substrate wurden mit *in-vivo*-Analysen untersucht, wodurch mögliche Verfälschungen in artifiziellen Systemen ausgeschlossen werden konnten. Ein weiterer Vorteil war, dass das Tat-System bis auf die pABS-basierten *tatABC*-Konstrukte auf Wildtyplevel exprimiert wurde und auch die Substrate nicht stark überproduziert wurden. Verwendet wurden natürlich im Genom existierende Substrate oder auf *low-copy*-Vektoren klonierte Substrate mit *Ptat* als Promotor.

2.4.6.1 HiPIP-Transport

Die subzelluläre Fraktionierung wurde zum Zwecke der Untersuchung des Transports des Substrates HiPIP durchgeführt. Für dieses Substrat aus *Allochrochromatium vinosum* wurde ein Transport über die Cytoplasmamembran in *E. coli* ausschließlich über den Tat-Transportweg gezeigt (Kipping et al. 2003, Brüser et al. 2003). Die zu untersuchenden Stämme wurden mit dem Vektor pEXH5-*tac* transformiert, der das *hip*-Gen aus *Allochrochromatium vinosum* unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors trägt. Die Transportanalysen erfolgten ohne Induktion, nur mit der Expression von *hip* durch den *leaky* Promotor.

Die Kultivierung und subzelluläre Fraktionierung wurde wie folgt durchgeführt: 50 mL LB (100 µg/mL Amp) wurden mit 2 mL einer Übernachtskultur angeimpft. Die Anzucht erfolgte unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bis Anschließend wurden die Zellen bei 3.800 g für 10 min geerntet. Das Zellpellet wurde in 20 mL TES-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 0,1 mM EDTA, 20 % Saccharose) resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Dann wurde es erneut wie bei der Ernte abzentrifugiert und das Pellet in 1 mL eiskaltem 5 mM MgSO₄ resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Für die Abtrennung der periplasmatischen Fraktion erfolgte die Zentrifugation bei 23.000 g für 10 min bei 4 °C. 100 µL des Überstandes wurden mit 100 µL SDS-Probenpuffer versetzt. Das Pellet erneut in 1 mL 5 mM MgSO₄ aufgenommen und eine Spatelspitze DNase I hinzugefügt. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss per Ultraschall auf Eis (3 min, 15 sec Intervalle, Duty Cycle 50 %, Intensität 4). Die Zelltrümmer wurden für 10 min bei 23.000 g abgetrennt. Zur Abtrennung der Membranfraktion vom Cytoplasma wurden 900 µL des Überstandes für 30 min bei 4 °C und 130.000 g. 100 µL Überstand (Cytoplasmafraktion) wurden mit 100 µL SDS-Probenpuffer versetzt, der Rest verworfen. Das Membranpellet wurde erneut in 900 µL 5 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert und 100 µL für die SDS-PAGE abgenommen und mit 100 µL Probenpuffer versetzt.

2.4.6.2 TMAO-Atmung

Die Wachstumsrate von *E. coli* auf einem Glycerol/TMAO-Minimalmedium ist abhängig von der Effektivität des Tat-Systems, das Enzym TMAO-Reduktase ins Periplasma zu transportieren. Ist der Transport geschwächt, ist dies durch niedrigere Wachstumsraten direkt erkennbar. Ohne Transport des TorA findet kein Wachstum auf dem Medium statt.

Variante M9-Minimalmedium (Standard)

Für die Vorkultur wurde M9-Medium (Tab. 30) mit 0,5 % Glucose als C-Quelle verwendet. Die Kulturen wurden in 5-mL-Röhrchen aerob über Nacht geschüttelt. Die Inkubation der Hauptkulturen fand in 15-mL-Hungate-Röhrchen statt. Diese wurden bis ca. 1 cm unter den Rand mit M9-Glycerol/TMAO-Medium (Tab. 32) befüllt, Antibiotika wurden bei Bedarf zugefügt. Pro Stamm wurden Triplikate angesetzt, also drei Röhrchen pro Vorkultur. Beim Pflanz wurden die Hauptkulturen mit gleicher Zellmenge: 20 µL der Vorkultur mit der niedrigsten OD₆₀₀ und entsprechend weniger Volumen bei höherer OD₆₀₀. Die Hauptkulturen wurden mit Gummisepten und Schraubdeckeln verschlossen und mehrfach über Kopf geschwenkt, um eine gute anfängliche Durchmischung von Medium, Zusätzen und Zellen zu erreichen. Die Inkubation erfolgte stehend bei 37 °C. Das Wachstum wurde über die Messung der OD₆₀₀ im Röhrchenphotometer verfolgt. Die Messung erfolgte etwa alle 4 h über mehrere Tage; die erste Messung des Tages möglichst früh die letzte möglichst spät. Unmittelbar vor jeder Messung wurden die Röhrchen durch mehrmaliges Invertieren durchgemischt.

Tab. 30: Vorkulturmedium: M9-Medium (Angaben für 1 L).

Volumen	Substanz
200 mL	5 x M9-Salze
1 mL	1 M MgSO ₄
25 mL	20 %ige Glucose = 0,5 %ig
1 mL	1 % Thiamin
0,1 mL	1 M CaCl ₂
1 mL	SL12 Spurenelemente

Tab. 31: 5 x M9-Salze (pro L).

Volumen	Substanz
30 g	Na ₂ HPO ₄
15 g	KH ₂ PO ₄
5 g	NH ₄ Cl oder 12,4 g (NH ₄) ₂ SO ₄
2,5 g	NaCl

Tab. 32: Hauptkulturmedium: TMAO-Medium (Angaben für 1 L).

Lösung a)

Volumen	Substanz
200 mL	5 x M9-Salze (siehe M9-Medium)
1 mL	1 M MgSO ₄
1 mL	SL12 Spurenelemente

ad 950 mL H₂O_{dest.}, autoklavieren

Lösung b)

Volumen	Substanz
11 g	TMAO (Trimethylamin-N-Oxid)
9,3 g	Glycerol (86 %ig), Endkonz.: 0,8 %
1 mL	1 mM Na ₂ SeO ₃
1 mL	1 % Thiamin
15 mg	CaCl ₂ (100 µL einer 1 M Lösung)

ad 50 mL H₂O_{dest.}, sterilfiltrieren

Lösung a) und b) vereinen, mischen und in sterilisierte 15-mL-Hungate-Röhrchen abfüllen

Tab. 33: SL-12-Spurenelementlösung (Angaben für 1 L).

Substanz	Masse
EDTA-Na ₂ * 2 H ₂ O	3000 mg
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	1100 mg
H ₃ BO ₃	300 mg
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	190 mg
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	50 mg
ZnCl ₂	42 mg
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	24 mg
NaMoO ₄ * 2 H ₂ O	18 mg
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	2 mg

EDTA-Na₂ wird zuerst gelöst, anschließend die weiteren Komponenten.

Variante MOPS-gepuffertes Minimalmedium

Der PE-defiziente *E.-coli*-Stamm GN10 benötigt für sein Wachstum erhöhte Konzentrationen an divalenten Kationen (50 mM MgCl₂). Das Löslichkeitsprodukt wäre im phosphatgepufferten M9-Medium um ein Vielfaches überschritten. Aus diesem Grund musste ein alternatives Minimalmedium zur TMAO-Atmung verwendet werden. Gewählt wurde das MOPS-gepufferte Minimalmedium (Tab. 34) von Neidhardt *et al.*, 1974, dem zusätzlich 50 mM MgCl₂ und aufgrund der Tryptophan-Auxotrophie von GN10 20 µg/mL Tryptophan zugesetzt wurden. Auch hier wurden 15-mL-Hungate-Röhrchen als Hauptkulturgefäße verwendet.

Tab. 34: MOPS-Minimalmedium (Angaben für 1 L, Neidhardt et al., 1974).

Substanz	Volumen
10 x MOPS-Mix	100 mL (Herstellung siehe unten)
0,132 M K ₂ HPO ₄	10 mL
H ₂ O _{dest.}	880 mL (bei Verwendung von Glycerol als C-Quelle entsprechend anpassen!)
1 mg/mL Thiamin	0,1 mL
TOTAL	990 mL

Die oberen Bestandteile mischen und mit etwa 300 µL 10 M NaOH auf pH 7,2 einstellen und sterilfiltrieren.

Vor Verwendung 10 mL 100 x C-Quelle dazugeben. Bei Verwendung von Glycerol entsprechende Menge abwiegen (Endkonz. 0,8 %). Medium kann in Aliquots bei -20 °C eingefroren gelagert werden.

Herstellung einzelner Komponenten:

10 x MOPS mix:

- MOPS 83,72 g
- Tricine 7,17 g

In ca. 300 mL H₂O_{dest} lösen und mit 10 M KOH auf pH 7,4 einstellen.

Ansetzen und hinzufügen:

- FeSO₄*7H₂O 0,028 g ad 10 mL H₂O (=0,01 M in der Stammlösung)

Hinzufügen in der angezeigten Reihenfolge:

- 1,9 M NH₄Cl 50 mL
- 0,276 M K₂SO₄ 10 mL
- 0,02 M CaCl₂*2 H₂O 0,25 mL
- 2,5 M MgCl₂ 2,1 mL
- 5 M NaCl 100 mL
- Spurenelementlösung 0,2 mL
- autoklaviertes H₂O_{dest.} 387 mL

sterilfiltrieren in 1-L-Gefäß. Aliquotieren in Plastikgefäße und bei -21 °C einfrieren (hier: in 50-mL-Reagiergefäße).

Tab. 35: Spurenelementlösung (50 mL).

Substanz	Masse
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4 H ₂ O	0,009 g
H ₃ BO ₃	0,062 g
CoCl ₂	0,018 g
CuSO ₄	0,006 g
MnCl ₂	0,040 g
ZnSO ₄	0,007 g

sterilfiltrieren in 50-mL-Reagiergefäß

Vorkulturen Zusätze (Angaben als Endkonzentrationen):

Obenstehendes Minimalmedium mit Glucose als C-Quelle, 50 mM MgCl₂ und 20 µg/mL Tryptophan

Hauptkulturen Zusätze (Angaben als Endkonzentrationen):

Obenstehendes Minimalmedium mit Glycerol als C-Quelle, 50 mM MgCl₂ und 20 µg/mL Tryptophan, 1,1 %TMAO und 1 µM Na₂SeO₃.

2.4.6.3 TorA-Aktivitätsassay

Für die Anzucht wurden je Stamm 2 x 100-mL-Kolben mit 50 mL LB mit 2 mL Übernachtskultur beimpft. Nach 2 h Wachstum bei 37 °C wurde die OD₆₀₀ gemessen und gleiche Zellmengen (geringste OD = 50 mL, andere entsprechend weniger) in 50-mL-Reagiergefäßen abzentrifugiert (10 min RT, 5000 rpm). Das Zellpellet wurde in 1 mL LB + 0,5 % Glycerol + 0,4 % Natriumnitrat resuspendiert. Ein Ansatz wurde auf 50 mL LB + 0,5 % Glycerol + 0,4 % Natriumnitrat (Negativkontrolle, anaerob, ohne TMAO-Induktion) aufgefüllt, der andere Ansatz auf 50 mL LB + 0,5 % Glycerol + 0,4 % Natriumnitrat + 1,1 % TMAO. Beide Ansätze wurden 1 h stehend bei 37 °C inkubiert (TorA-Induktion im TMAO-haltigen Ansatz). Anschließend wurden die Zellen bei 3.800 g für 10 min geerntet. Das Zellpellet wurde in 20 mL TES-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 0,1 mM EDTA, 20 % Saccharose) resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Dann wurde es erneut wie bei der Ernte zentrifugiert und das Pellet in 1 mL eiskaltem 5 mM MgSO₄ resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Für die Abtrennung der periplasmatischen Fraktion erfolgte die Zentrifugation bei 23.000 g für 10 min bei 4 °C. Der Überstand (=periplasmatische Fraktion) wurde bis zum Auftrag auf die nativen Gele auf Eis gelagert. Auch eine Übernachts-Lagerung der Proben im Kühlschrank ist ohne starken Verlust der enzymatischen Aktivität möglich.

Der Enzymnachweis von TorA erfolgte in nativen Gelen (nach Silvestro et al. 1989). Dazu wurden 10 µL der Periplasmafraktion 1:1 mit nativem Probenpuffer (Tab. 36) gemischt und auf ein natives Gel (Tab. 38) aufgetragen. Als Laufpuffer wurde ein SDS-freier Puffer (Tab. 37) verwendet und eine Spannung von 100 V an die Gelkammer angelegt.

Während des Laufs wurden 30 mL einer Methylviologen-Lösung (100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer pH 6,5, 2 mM Methylviologen) hergestellt und ebenso 20 mL einer TMAO-Lösung

(100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 -Puffer pH 6,5, 2 M TMAO). Beide Lösungen wurden in verschlossenen 50-mL-Reagiergefäßen über eine Kanüle mindestens 1 h mit N_2 begast. Nach Beenden der nativen PAGE wurde eine Spatelspitze Natrium-Dithionit in die Methylviologen-Lösung gegeben, was eine tiefblaue Färbung ergab und hierin das Gel aufgerollt für 10 min bis zu seiner Blaufärbung inkubiert, während weiterhin mit N_2 begast wurde. Durch leichtes Schwenken zwischendurch wurde eine gleichmäßige Durchfärbung des Gels erreicht. Anschließend wurde das Gel in eine Schale mit der TMAO-Lösung gelegt und gewartet bis helle TorA-Banden sichtbar wurden. Je nach Menge und Qualität des Dithionits in der Lösung dauerte das Sichtbarwerden der Banden 1-30 min. Zusätzlich zur Oxidation des Methylviologens durch TorA erfolgte die Entfärbung des gesamten Gels durch Luftsauerstoff, weswegen möglichst wenig geschwenkt und weiterhin mit N_2 begast wurde. Die Dokumentation der Gele erfolgte auf einem Weißlichttisch mit einer handelsüblichen einfachen Canon-Kamera.

Tab. 36: Nativer Probenpuffer.

Volumen	Substanz
250 μ L	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
460 μ L	86 % Glycerin
1 mg	Bromphenolblau
	ad 4 mL H_2O

Tab. 37: SDS-freier Laufpuffer.

Volumen	Substanz
25 mM	Tris-HCl pH 8,8
0,2 M	Glycin

Tab. 38: Native 10 %-Gele (Angabe für 2 Gele).

Substanz	Volumen (Trenngel)	Volumen (Sammelgel)
30 %T Acrylamid /2,7 %C Bis-Acrylamid	Trenngel 10 % 4 mL	Sammelgel 4,5 % 0,75 mL
H ₂ O	5 mL	3 mL
1,5 M TrisHCl, pH 8,8	3 mL	-
0,5 M TrisHCl, pH 6,8	-	1,25 mL
10 % APS	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5 µL

2.4.6.4 SDS-Phänotyp

Dieser Test beruht auf der Beobachtung, dass *E.-coli*-Stämme, die beeinflusst sind in ihrer Fähigkeit, die Amidasen AmiA und AmiC zu transportieren, eine erhöhte Sensitivität gegenüber SDS zeigen (Ize et al. 2003). Die genaue Ursache dieser Beobachtung ist noch nicht geklärt. Hier wurde das Wachstum der Stämme auf sechs unterschiedlichen Konzentrationen an SDS kontrolliert (0; 0,5; 1; 2; 3 und 4 % (w/v) SDS). Alle Ansätze wurden als Triplikate angesetzt.

100 µL Übernachtskultur wurden in 5-mL-Röhrchen mit LB mit der entsprechenden Menge SDS überführt. Die Kulturen wurden für 3 h aerob bei etwa 200 U/min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte bei 600 nm in einem UV-Vis-Spektrophotometer bestimmt. Die OD₆₀₀ der Kulturen mit SDS –gemittelte Werte der drei Ansätze in Prozent- wurde ins Verhältnis zur OD₆₀₀ der Kulturen ohne SDS (=100 %) gesetzt.

2.4.6.5 Kettenphänotyp

Die Untersuchung des Kettenphänotyps erfolgte durch die einfache visuelle Auswertung durchlichtmikroskopischer Aufnahmen. Die Untersuchung der Funktionalität des Tat-Systems beruht hierbei auf dem Ausmaß, die Amidasen AmiA und AmiC zu transportieren. Liegt eine Einschränkung des Transports der Substrate in den *E.-coli*-Zellen vor, können sich die Zellen nach der Teilung nicht mehr vollständig voneinander lösen, sodass sie wie eine Kette aneinandergereiht bleiben. Dies wird als Kettenphänotyp bezeichnet. Die Kettenlänge kann

variieren. Allerdings kann auch schon eine Einschränkung vorliegen, wenn vermehrt Zweier- und Dreierketten in der Kultur vorliegen.

Zur Bestimmung des Kettenphänotyps wurden die Zellen in LB-Medium angezogen und in der exponentiellen Phase (OD 0,6 bis 1) auf Agar-Slides (2.7.1) getropft und mittels Durchlichtmikroskopie (Abschnitt 2.7.2) ausgewertet.

2.5 Lipidbiochemische Methoden

Zur Routineuntersuchung und Stammkontrolle der Phospholipidmutanten und deren Wildtypen wurden die Lipidfraktionen der Stämme isoliert (2.5.1) und in einer Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und charakterisiert (2.5.2). Zellmaterial wurde dazu direkt aus den Kulturröhrchen des entsprechenden Versuches verwendet (HiPIP-Transport, TMAO-Atmung, SDS-Phänotyp, Kettenphänotyp), um entsprechende Wachstums- bzw. Transport-Effekte konkret auf das Fehlen einzelner Phospholipide zurückführen zu können.

2.5.1 Lipidextraktion nach Ames

Die Extraktion der Lipide aus *E.-coli*-Zellen wurde nach einer Methode von Bligh und Dyer (1959) bzw. Ames (1968) durchgeführt. Dazu wurden 15 mL Zellkultur abzentrifugiert (OD₆₀₀ variierte je nach Wachstumsphase) und in 0,2 mL 0,9 %igem NaCl aufgenommen. Nach folgendem Schema wurde der Extraktionsmix in einem Reagenzglas hergestellt: 0,5 mL Methanol + 0,25 mL Chloroform + 0,2 mL Zellkultur (Verhältnis 2 : 1 : 0,8 –Methanol : Chloroform : „Wasser“). Für 10 min wurde der Ansatz immer wieder stark geschüttelt. Zur Abtrennung der Lipide in der Chloroformfraktion von der wasserlöslichen Fraktion wurde zunächst eine Verdünnung des Extraktionsmixes hergestellt: 1 Volumen Chloroform (0,95 mL) wurde hinzupipettiert, der Ansatz geschüttelt und 1 Volumen Wasser (0,95 mL) hinzugegeben und erneut geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 g und RT. Dabei verblieb die Wasser-Methanol-Phase oben, es bildete sich eine weiße Interphase und die organische lipidenthaltende Chloroformphase unten. Die organische Phase wurde vorsichtig mit einer 1-mL-Pipette abgenommen, indem durch die obere Phase und Interphase hindurch gestochen wurde und die untere Phase vom Boden des Gefäßes fast vollständig abgenommen wurde. Die Phase wurde in ein kleines verschraubbares Glasgefäß überführt. Das Chloroform wurde unterm Abzug über Nacht oder mit einer lösungsmittelgeeigneten Vakuumpumpe in einem Exicator ca. 45 min vollständig entfernt und anschließend die trockene Lipide in kleinem Volumen Chloroform (100 µL) aufgenommen und das Gefäß fest mit einer

Teflondichtung ausgestatteten Deckel verschlossen. Die Lagerung war bei -20 °C über Wochen möglich.

Für die NMR-Analysen (2.6) wurden Lipide aus größeren Zellvolumina (1 L) mit der hier beschriebenen Methode extrahiert.

2.5.2 Dünnschichtchromatographische Analysen von Phospholipiden

Eine schnelle Methode zur Stammkontrolle und Überprüfung der Ausbildung der Phospholipide in den *E.-coli*-Stämmen wurde die Dünnschichtchromatographie (DC) nach Mozharov (1985) angewendet. Als DC-Platten wurden Alufolien-Silicagel-Platten (Merck-Millipore, Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm) verwendet. Die Platten wurden einmal mit Chloroform/Methanol (1:1) gewaschen (Lauf ohne vorherigen Auftrag) und oben ca. 2 cm Lauffront abgeschnitten. Anschließend wurde die Platte geviertelt und zum Trocknen in einem Exsikkator mit Blaugel gelagert. Zum Probenauftrag wurde 1,5 cm vom unteren Rand eine Linie mit Bleistift gezogen und 30 µL Lipidextrakt (2.5.1) mit einer 10-µL-Pipette (weiße Plastikspitze) punktförmig nach und nach aufgetragen. Nach dem Auftrag und der vollständigen Trocknung aller Proben wurden die Lipide in 3 verschiedenen Laufsystemen stufenweise aufgetrennt (Tab. 39). Zunächst wurde die Platte in eine Laufkammer mit System 1 gestellt. Die Kammer wurde so gewählt dass ca. der Füllstand von 0,5 cm eingehalten wurde (also 1 cm unterhalb des Probenauftrags). Der Lauf in System 1 erfolgte bis etwa zur Hälfte der Platte. System 2 lief bis ca. 2/3 der Platte und System 3 bis vollständig bis kurz unter den Rand. Zwischen den Läufen wurde die Platte unter dem Abzug bis zur vollständigen Trocknung gelagert und erst anschließend ins nächste Laufmittel gestellt. Zur Auftrennung von PE, PG und CL reichten System 1 und 2 aus, sodass System 3 in späteren Versuchen weggelassen wurde. In diesem Falle lief System 1 bis $\frac{2}{3}$, System 2 vollständig über die Platte.

Nach Trocknung der Platte wurde diese mit dem Detektionsspray eingesprüht und die Lipide bei 140 °C für einige Minuten im Ofen verkohlt. Bilder der Platten mit den Lipidsignalen wurden im Scanner (*Epson perfection V700 Photo*) aufgenommen.

Tab. 39: Lauf- und Detektionsmittel DC Phospholipide.

System 1

Substanz	Volumen
Chloroform	40 mL
Methanol	10 mL
0,25 % NaCl in H ₂ O	6 mL
Isopropanol	25 mL
Triethylamin	18 mL

System 2

Substanz	Volumen
Chloroform	30 mL
Methanol	10 mL
Isopropanol	25 mL
Ethylacetat	7 mL
Triethylamin	35 mL

System 3

Substanz	Volumen
n-Hexan	80 mL
Diethylether	20 mL
Ameisensäure	2 mL

Detektionsspray

Substanz	Volumen
H ₂ SO ₄	34 mL
Ethanol	33 mL
Wasser	33 mL

2.6 ³¹P-NMR-Spektroskopie

Vorbereitend wurden die Anzuchten, Zellernte und Lipidextraktionen am Institut für Mikrobiologie an der Leibniz Universität Hannover durchgeführt.

Pro Stamm und Bedingung wurden 1-L-Hauptkulturen bis zur exponentiellen Phase (OD₆₀₀ von 0,8 bis 1) oder bis zur stationären Phase (TMAO-Medium: OD₆₀₀ von 1,5; LB ca. OD₆₀₀ von 3) bei 37 °C angezogen. Oxische Anzuchten erfolgten unter Schütteln in 3-L-Erlenmeyerkolben mit Schikane, anoxische Anzuchten in 1-L-Schottflaschen mit Gummistopfen im Stehen. Die Lipidextraktionen wurden wie in 3.5.1 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden für die Extraktionen 100-fache Volumina im Vergleich zum Ursprungsprotokoll verwendet: 20 mL Zellkultur, 25 mL Chloroform, 50 mL Methanol und alles ohne anschließende Volumenvergrößerung in großen Glaszentrifugenröhrchen bei 1000 g abzentrifugiert. Das Chloroform wurde an einem Rotationsverdampfer abgezogen, die Lipide in ca. 2 mL Chloroform aufgenommen, in kleine verschließbare Glasgefäße überführt und das Chloroform über Nacht unterm Abzug verdampft. In dieser Form wurden die Proben am Folgetag nach Leipzig verschickt.

Die direkten Arbeiten am NMR-Spektroskop wurden am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Universität Leipzig unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Schiller durchgeführt. Durch die NMR-Spektroskopie sollte die unerwartete Bildung der anionischen Phospholipide im *ΔpgsA*-Stamm UE54 untersucht werden und auch geringste Spuren von PG und/oder CL detektiert werden können. Die Untersuchungen wurden an einem 600-MHz-Hochfeld-NMR-Spektroskop (Bruker) durchgeführt unter Verwendung eines Flüssigkeits-Hochauflösungs-5 mm-³¹P-Probenkopfes. Gelöst wurden die Phospholipide in wässrigem Na-Cholat. Mit der Phosphor-NMR konnten vor allem die relativen Anteile der Phospholipide exakt bestimmt werden.

2.7 Mikroskopische Methoden

Zur Feststellung des Phänotyps der *E.-coli*-Stämme wurden durchlichtmikroskopische Aufnahmen unter Verwendung von Agar-Slides angefertigt.

2.7.1 Herstellung von Agar-Slides

Um möglichst scharfe Aufnahmen einer Bakterienkultur zu bekommen, wurden Zellen auf einer Agaroseoberfläche fixiert, waren somit unbeweglich und lagen in einer Ebene. Dazu wurden 0,8 mL 1 %ige Agarose in H₂O (ca. 50 °C heiß) auf einen Objektträger als langen Streifen pipettiert und sofort ein zweiter Objektträger darübergelegt, sodass sich die Agarose über die ganze Oberfläche verteilte und eine glatte Oberfläche erhielt. Für wenige Minuten ließ man die Agarose fest werden, um anschließend einen Objektträger seitlich wegzuschieben, wobei die Agarose auf einem der beiden Objektträger verblieb. Anschließend wurde 1 µL Bakteriensuspension auf die Oberfläche getropft und ganz leicht mit der Seite der Pipettenspitze verteilt. Es waren auch mehrere Proben pro Objektträger möglich. Man ließ die Probe für ca. 5 min antrocknen bis kein Feuchtigkeitsfilm mehr sichtbar war. Auf die Oberfläche wurde ein Deckglas aufgelegt und mit mittelmäßigem Druck angedrückt.

2.7.2 Durchlichtmikroskopie

Für die durchlichtmikroskopischen Aufnahmen der Agar-Slides wurde das Mikroskop *Axio Imager.M2* mit der Kamera *AxioCam MRm* und einem 100x/1,30 Ölimmersionsobjektiv (*EC Plan-Neofluar*) der Firma Carl Zeiss aufgenommen. Zur Kontrastverstärkung wurde Phasenkontrast verwendet (Ph 3). Die Aufnahme und Darstellung der Bilder erfolgte mit der Software *AxioVision Rel. 4.8.2*.

2.8 Zentrifugen und Rotoren

In der folgenden Tabelle sind alle in der Dissertation verwendeten Zentrifugen und Rotoren aufgelistet.

Tab. 40: Verwendete Zentrifugen und Rotoren.

Zentrifuge	Rotor
Eppendorf Zentrifuge 5804R	A-4-44 und F45-30-11
Eppendorf MiniSpin Plus	FE010
Sorvall RC6 Plus	Fiber Lite (Thermo Fisher) F14-6x250y
Sorvall Lynx 4000	Fiber Lite (Thermo Fisher) F14-6x250y
Beckman Optima L-80XP	70.1Ti
Beckman Optima MAX-XP	TLA-55
Sorvall Discovery M120SE	S100-AT4

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der Phospholipidzusammensetzung der Cytoplasmamembran auf den Tat-Transport

Die Komponenten der Tat-Translokase sind in die Phospholipiddoppelschicht der Cytoplasmamembran integriert. Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der Phospholipide hinsichtlich Ladung und Struktur liegt es auf der Hand, dass ein spezifisches Zusammenspiel von Phospholipiden und Tat-Komponenten gegeben ist. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse zu den verschiedenen *in-vivo*-Funktionalitätsstudien des Tat-Systems gezeigt, in denen mit Membranen gearbeitet wurde, denen spezifische Phospholipide komplett fehlten.

3.1.1 Das anionische Phospholipid Cardiolipin wird für den Tat-Transport nicht benötigt

In den nachfolgenden Tests wird der *in-vivo*-Transport verschiedener Tat-Substrate des cardiolipindefizienten Stammes BKT12 mit seinem Phospholipid-Wildtyp W3110 verglichen.

3.1.1.1 Cardiolipin ist nicht notwendig für den Transport von HiPIP

Subzelluläre Fraktionierungen der Phospholipidmutante und des Wildtyps zeigten gleich starken Transport des Tat-Substrates HiPIP. In den periplasmatischen Fraktionen konnten gleich starke Banden maturen (also transportierten) HiPIPs nachgewiesen werden. Extrem schwache Banden von *precursor*- und maturem HiPIP in der Cytoplasmafraktion wiesen auf einen fast vollständigen Transport des Proteins aus dem Cytoplasma ins Periplasma hin (Abb. 8).

Die subzellulären Fraktionierungen wurden sauber erstellt. Als Kontrollen dazu dienten die periplasmatische β -Lactamase, die ausschließlich in der Periplasmafraktion zu detektieren war und das Biotincarboxyl-Carrierprotein (BCCP). Dieses war hauptsächlich in der Cytoplasmafraktion und zu geringen Teilen auch in der Membranfraktion, jedoch nicht in der periplasmatischen Fraktion nachzuweisen.

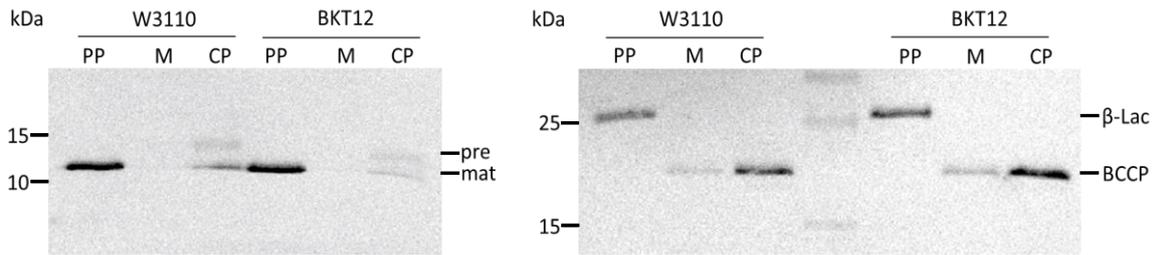


Abb. 8 Uneingeschränkter HiPIP-Transport in der Cardiolipin-defizienten Mutante BKT12. Gezeigt ist die Transportanalyse von HiPIP in W3110 und BKT12 mittels Immunoblot nach subzellulärer Fraktionierung. Links: HiPIP-Detektion mit α -HiPIP in den Fraktionen Periplasma (PP), Membran (M) und Cytoplasma (CP). Dabei wird zwischen dem transportierten, murenen HiPIP (mat) und dem nicht transportierten precursor-HiPIP (pre) unterschieden. HiPIP lag sowohl im Phospholipid-Wildtyp W3110 als auch in der Mutante BKT12 fast vollständig transportiert im PP vor; verbleibender precursor war nur im Cytoplasma zu detektieren. Rechts: Die Kontrolle der Fraktionierung erfolgte durch die Detektion fraktionsspezifischer Proteine. Periplasmatisch: β -Lactamase (β -Lac; β -Lactamase-AK) und cytoplasmatisch: Biotincarboxyl-Carrierprotein (BCCP) durch das StrepTactin-Konjugat; die leichte Detektion von BCCP in der Membranfraktion ist gewöhnlich.

3.1.1.2 Wachstum auf Glycerol/TMAO verlief bei BKT12 und W3110 gleich

Die Messungen des Wachstumsverlaufs erfolgten photometrisch über die optische Dichte bei 600 nm. Beide Stämme zeigten einen vergleichbaren übereinstimmenden Wachstumsverlauf. Innerhalb von etwa 30 h stieg das Wachstum beider Stämme exponentiell an und erreichte schließlich die maximale optische Dichte von etwa 1,5 (Abb. 9). Somit zeigte der Cardiolipin-defiziente Stamm keine Einschränkung des Transportes des Tat-Substrates TorA.

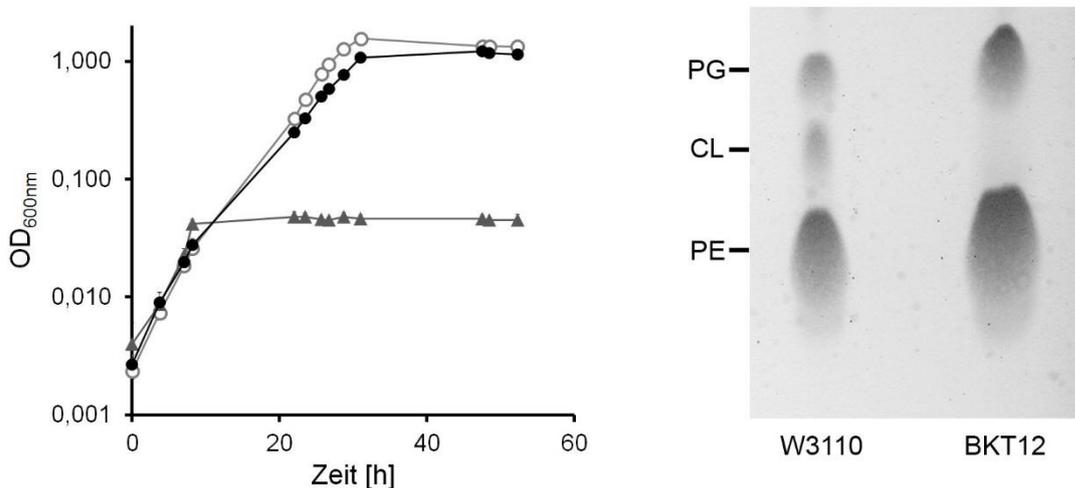


Abb. 9: Cardiolipin ist nicht notwendig für die TMAO-Atmung.

Links: Kulturen von W3110 (gefüllte Kreise), BKT12 (leere Kreise) zeigten einen ähnlichen Wachstumsverlauf auf Glycerol/TMAO. Der Kontrollstamm W3110 Δ tatAE (Dreiecke) mit nicht-funktionalem Tat-System kann TMAO nicht als Elektronenakzeptor verwenden. Die Wachstumstests wurden in Triplikaten durchgeführt. Rechts: Kontrolle der Kulturen nach Wachstum auf Glycerol/TMAO. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipide der Stämme W3110 und BKT12. Zu bemerken ist das Fehlen von Cardiolipin in BKT12.

Zur Kontrolle der Stämme auf die korrekte Ausbildung ihrer Phospholipide, wurde eine Lipidextraktion nach Abschluss der Wachstumstests aus den Kulturen durchgeführt und in einer DC aufgetrennt und detektiert. Diese bestätigte das Fehlen von Cardiolipin bei BKT12.

3.1.1.3 BKT12 zeigte keine erhöhte SDS-Sensitivität

Verringertes Wachstum von *E. coli* bei höheren Konzentrationen SDS im Kulturmedium kann auf einen verminderten Tat-Transport der Amidasen AmiA und AmiC zurückgeführt werden (Ize et al. 2003). Hier wurde das Wachstum (OD_{600}) nach 3 h gemessen. Als 100 % wurde die OD_{600} des entsprechenden Stammes bei 0 % SDS gesetzt. Eine leichte Abnahme des Wachstums bis auf etwa 90-80 % bei der höchsten SDS-Konzentration (4 %) ist typisch für ein voll funktionsfähiges Tat-System, wie beim Wildtyp W3110. Der cardiolipindefiziente Stamm BKT12 zeigte ein vergleichbares Wachstumsverhalten; bei 4 % SDS lag die OD_{600} bei 80 %. Im Vergleich dazu sank die OD_{600} bei 4 % SDS in der *tatAE*-Mutante des Phospholipid-Wildtyps auf etwa 15 % (Abb. 10).

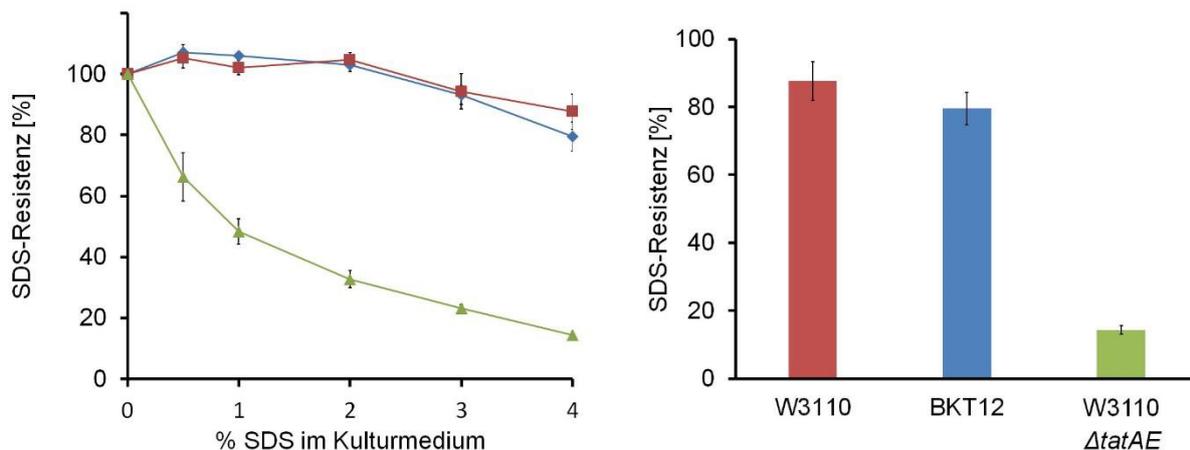


Abb. 10: Das Fehlen von Cardiolipin wirkte sich nicht auf die SDS-Resistenz aus.

Aufgetragen ist die OD_{600} in Prozent nach 3 h Wachstum in LB mit der entsprechenden SDS-Konzentration. Links: W3110 (rote Quadrate) und BKT12 (blaue Rauten) waren im gemessenen Bereich SDS-resistent. W3110 Δ tatAE (grüne Dreiecke) war sensitiv gegenüber SDS, mit steigender Konzentration sinkt die OD_{600} auf etwa 15%. Rechts: Vergleich der OD_{600} bei 4 % SDS nach 3 h Wachstum.

3.1.1.4 Zellen von BKT12 bildeten keinen Kettenphänotyp aus

Lichtmikroskopische Aufnahmen von der *clsABC*-Mutante BKT12 in der exponentiellen Wachstumsphase zeigten keine Zellen in Kettenform, die aufgrund unvollständiger Teilungen aneinander hingen, wie es für eine Störung beim Transport der Amidasen AmiA und AmiC typisch wäre. Der Phänotyp dieser Zellen war vergleichbar mit dem des Phospholipid-Wildtyps W3110, viele einzelne kurze Stäbchen und einige sich in der Teilung befindende Doppelzellen. BKT12 bildete überdies vereinzelt Zellfilamente, in denen allerdings keine Septen die Zellen voneinander abtrennten. Zellen des Kontrollstamms W3110 Δ *tatAE* bildeten einen starken Kettenphänotyp mit oft mehr als 10 aneinanderhängenden Ketten aus. Die Zellen innerhalb der Kette waren leicht verlängert im Vergleich zu einer typischen *E.-coli*-Zelle (auf ca. 3 μ m), zum Teil auch filamentös (Abb. 11).

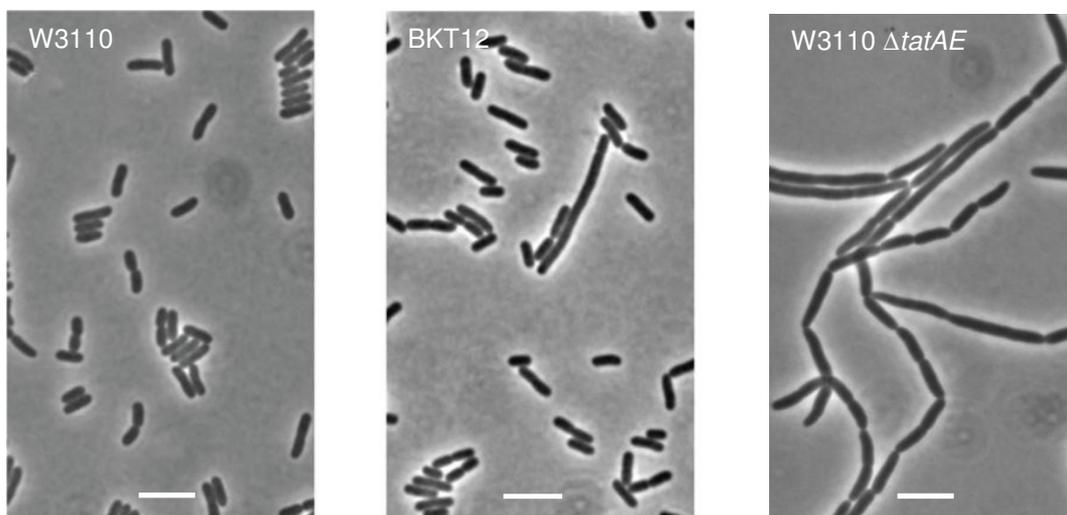


Abb. 11: Cardiolipindefizienz bewirkte keinen Kettenphänotyp. Normale Bildung kurzer Stäbchen beim Phospholipid-Wildtyp W3110 und im Cardiolipindefizienten Stamm BKT12. BKT12 bildete vereinzelt filamentöse Zellen aus. Der Kontrollstamm W3110 Δ *tatAE* zeigte einen starken Kettenphänotyp.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Cardiolipin-defiziente Mutante BKT12 in sämtlichen Transportassays die gleiche Effizienz wie der Phospholipid-Wildtyp W3110 aufwies. Der Transport der Substrate HiPIP, TorA und der Amidasen AmiA und AmiC war auch bei fehlendem Cardiolipin in der Membran uneingeschränkt gewährleistet.

3.1.2 Das anionische Phospholipid Phosphatidylglycerol wird für den Tat-Transport nicht benötigt

In den nachfolgenden Tests wurde der *in-vivo*-Transport von Tat-Substraten des Cardiolipin- und Phosphatidylglycerol-defizienten Stammes UE54 mit seinem Phospholipid-Wildtyp UE53 verglichen.

Versuche der subzellulären Fraktionierung mit UE54 zeigten inkonsistente Ergebnisse. Es konnten durchweg keine sauberen Fraktionen hergestellt werden. In der periplasmatischen Fraktion konnten die typischen periplasmatischen Proteine wie β -Lactamase nicht detektiert werden. Dies legte die Vermutung nahe, dass beim osmotischen Schock mit Sucrose/H₂O bereits beim Sucroseschritt die instabile Äußere Membran stark permeabilisierte und Proteine in dem Schritt verloren gingen. Schwächere Signale von Proteinen der Cytoplasmafraktion lassen zusätzlich eine Instabilität der Inneren Membran und ein Platzen der gesamten Zellen in den Schritten der Periplasmaabtrennung annehmen. Aus diesen Gründen gelangen keine sauberen subzellulären Fraktionierungen des $\Delta pgsA$ -Stammes UE54.

Zusätzlich wurde festgestellt, dass eine Deletion von *tatA* und *tatE* im PG/CL-defizienten Stamm keinen Kettenphänotyp verursacht (3.1.2.5). Ein ausbleibender Kettenphänotyp in UE54 sagt dementsprechend nichts über die Funktionalität des Tat-Systems aus.

Mit den hier verwendeten Methoden kann aufgrund dieser Gegebenheiten die spezifische Notwendigkeit der anionischen Phospholipide PG und CL für die Funktionalität des Tat-Systems nur durch das Wachstumsverhalten auf TMAO getestet werden.

3.1.2.1 Wachstum von UE54 und UE53 verlief auf Glycerol/TMAO gleich

Die Messungen des Wachstumsverlaufs erfolgten photometrisch über die optische Dichte bei 600 nm. Beide Stämme zeigten einen vergleichbaren übereinstimmenden Wachstumsverlauf. Innerhalb von etwa 30 h stieg das Wachstum beider Stämme exponentiell an und erreichte schließlich die maximale optische Dichte von etwa 1,3 (Abb. 12). Somit zeigte UE54 keine Beeinträchtigung des TorA-Transports im Vergleich zum Phospholipid-Wildtyp.

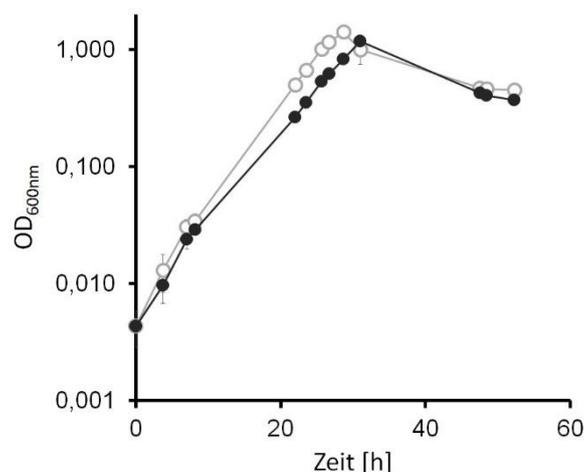


Abb. 12: Wachstum der *pgsA*-Nullmutante auf Glycerol/TMAO.

Kulturen von UE53 (gefüllte Kreise) und UE54 (leere Kreise) zeigten einen ähnlichen Wachstumsverlauf auf Glycerol/TMAO. Die Wachstumstests wurden in Triplikaten durchgeführt.

3.1.2.2 Ungewöhnliche Bildung von PG und CL in der *pgsA*-Nullmutante

Zur Kontrolle der Stämme auf ihre Reinheit wurden Lipide nach Abschluss der Wachstumstests auf TMAO (3.1.2.1) aus den Kulturen gewonnen. Auffälligerweise zeigten Lipidfraktionen dieser Kulturen des Stammes UE54 in der DC deutliche Spuren von Signalen in der Laufhöhe von PG und CL (Abb. 13).

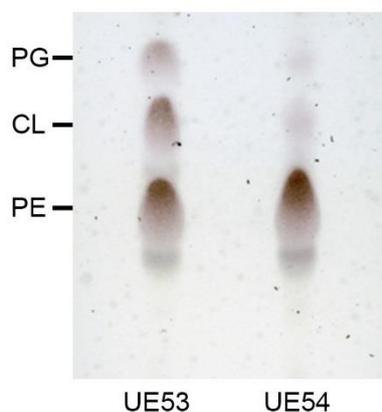


Abb. 13: Kontrolle der Kulturen nach Wachstum auf Glycerol/TMAO.

Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipide der Stämme UE53 und UE54. Zu bemerken ist das Auftreten von deutlichen Spuren PG und CL in UE54.

Zur eindeutigeren Charakterisierung wurden Lipide aus Kulturen während des Wachstums auf TMAO sowohl in der exponentiellen Phase als auch in der stationären Phase extrahiert und mittels NMR-Analyse untersucht. Diese Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Jürgen Schiller vom Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Universität Leipzig erstellt. Abgeleitet von den NMR-Analysen (Abb. 14) wurden die prozentualen Anteile der Phospholipide PE, PG und CL berechnet (Tab. 41). Es stellte sich heraus, dass UE54 aerob oder mit TMAO wachsend in exponentiellen Wachstumsphase deutliche Gehalte an CL aufwies. Allerdings war kein PG zu detektieren. Die exponentielle Phase ist die entscheidende Phase für den aktiven TorA-Transport und somit für den Assay. Erst in der stationären Phase während der TMAO-Atmung konnten sowohl CL als auch in geringen Spuren PG nachgewiesen werden. Ungewöhnlich war das generell umgekehrte Verhältnis von PG/CL bereits im *pgsA*-Wildtypstamm UE53. Aerob auf M9-Medium mit Glycerol wachsend wurde hier achtmal so viel CL wie PG gemessen.

In der Literatur sind unter anderem wachstumsphasenabhängige Unterschiede in den Gehalten der beiden anionischen PL beschrieben (Cronan 1968), jedoch wurde immer mehr PG als CL detektiert. Hier wurde der Gehalt in Zellen untersucht, die auf M9-Medium mit Glycerol als C-Quelle gewachsen waren. In Abschnitt 3.1.2.4 wird näher auf die Analyse der PG und CL-Gehalte in Abhängigkeit von Kultivierungsbedingungen/C-Quelle eingegangen.

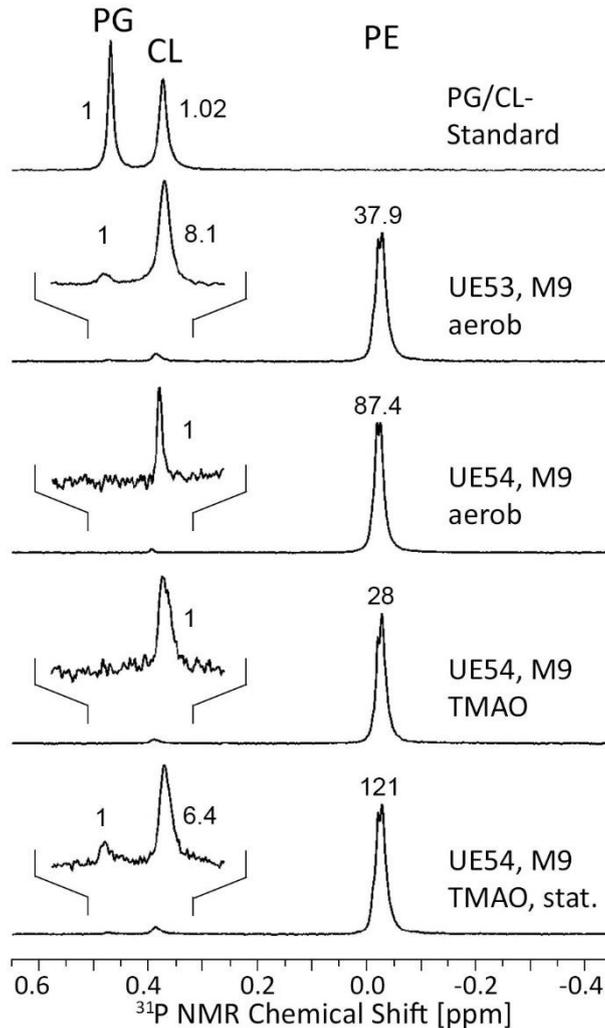


Abb. 14: NMR-Analyse der Phospholipide PE, PG und CL. Die Analyse erfolgte mit Lipidextrakten von UE53 und UE54 gewachsen auf M9/Glycerol entweder aerob oder anaerob mit TMAO. Unter allen Bedingungen wurde CL im Überschuss zu PG gebildet. PG wurde in UE54 nur in der stationären Phase der TMAO-Atmung detektiert (M9, TMAO, stat.).

Tab. 41: Prozentuale Anteile der Phospholipide von Kulturen gewachsen auf M9/Glycerol mit entweder O₂ oder TMAO als Elektronenakzeptor.

Stamm/Medium	PG-Gehalt [%]	CL-Gehalt [%]	PE-Gehalt[%]
UE53, M9 aerob, Glycerol	2,2	17,2	80,6
UE54, M9 aerob, Glycerol	/	1,1	98,9
UE54, M9 TMAO, Glycerol	/	3,5	96,5
UE54, M9 TMAO, Glycerol, stat.	0,8	5	94,2

Anmerkungen: 1. Der Gehalt an weiteren Phospholipid-Komponenten (PA, CDP-Diacylglycerol) wurde nicht bestimmt. 2. Die prozentualen Angaben wurden anhand der NMR-Analysedaten berechnet, wobei 100 % der Summe aus PE, PG und CL entsprach.

3.1.2.3 *Knockouts* der *pgsA*-Paralogen *ynbA* und *ynjF* haben keinen Einfluss auf die PG und CL-Bildung bei UE54

Aufgrund des Auftretens von PG und CL unter bestimmten Wachstumsbedingungen im ausgewiesenen PG/CL-defizienten Stamm UE54 musste ein alternativer Biosyntheseweg zur Bildung dieser anionischen Phospholipide angenommen werden. In der Literatur ist kein derartiger Weg beschrieben; die Bildung von PG und damit auch von CL verläuft demnach ausschließlich über *pgsA*. Die beiden Gene *ynbA* und *ynjF* sind zwei Paraloge zum *pgsA* aus der Superfamilie der CDP-Alkohol-Phosphatidyltransferasen. Diese katalysieren die Abspaltung eines CMP von einem CDP-Alkohol durch einen weiteren Alkohol unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung und der gleichzeitigen Lösung einer Phosphoanhydridbindung. Dementsprechend stellte sich die Frage, ob eins oder beide Gene in der Lage sind -möglicherweise nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen- die Funktion von *pgsA* zu ersetzen. Es wurden Einzelknockouts und ein Doppelknockout der beiden Paralogen im UE54 erstellt und diese unter M9/Glycerol/O₂-Wachstumsbedingungen bis zur stationären Phase angezogen. Anschließend wurden Dünnschichtchromatographien mit den Lipidfraktionen hergestellt. In den Einzelknockouts sowie im *ynbA/ynjF*-Doppelknockout war ebenso wie im UE54 eindeutige Signale von PG und CL nachzuweisen (Abb. 15). Demnach haben YnbA und YnjF keine homologe Funktion zu PgsA.

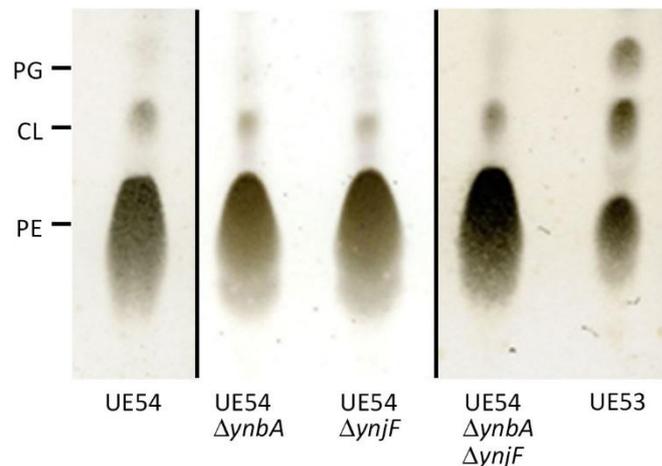


Abb. 15: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Phospholipide der *pgsA*-Mutante UE54 und dessen Einzel- und Doppelknockout-Stämme der *pgsA*-Paralogen *ynbA* und *ynjF*. Ebenso wie UE54 bildeten die Stämme mit den zusätzlichen Deletionen in *ynbA* und *ynjF* auf M9/Glycerol/O₂ CL und geringe Spuren PG aus.

3.1.2.4 C-Quelle hat Einfluss auf die Ausbildung der anionischen Phospholipide im $\Delta pgsA$ -Stamm

Während des oxischen, exponentiellen Wachstums auf einer komplexen C-Quelle (LB; Abb. 16 links) bildete die $\Delta pgsA$ -Mutante weder PG noch CL. Auf M9-Minimalmedium wurden sowohl oxisch als auch mit anderen externen Elektronenakzeptoren und Glycerol oder Glucose als C-Quelle im Medium wieder anionische Phospholipide gebildet. Auffällig war, dass Glucose-genährte Zellen von UE54 eher PG ausbildeten und weniger CL, Glycerol-genährte Zellen mehr CL und wenig PG. Alle Daten deuten auf eine starke Regulation durch die verwertete C-Quelle hin. Wurde Glycerol als C-Quelle veratmet, war der Elektronenakzeptor ohne Einfluss auf die Phospholipidausbildung. UE54 bildete sowohl aerob wachsend als auch mit Nitrat, Fumarat, TMAO und DMSO als Elektronenakzeptor PG und CL aus (Abb. 16 rechts)

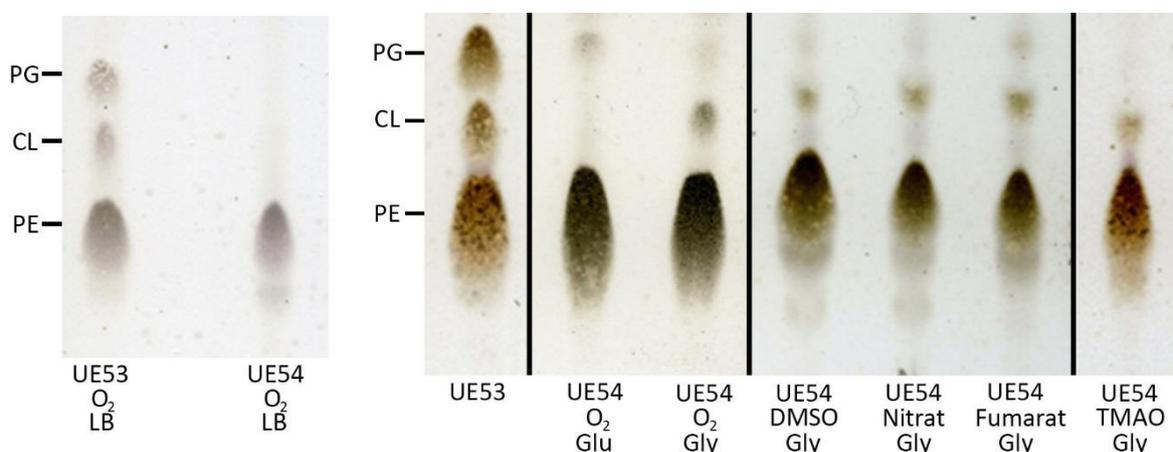


Abb. 16: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Phospholipide der $pgsA$ -Mutante UE54 und der Wildtyp UE53 unter verschiedenen Anzuchtbedingungen.

Links: LB-Medium, aerobe Atmung. UE54 zeigte keine Bildung von PG oder CL. Beim UE54 ist ein *spot* unterhalb von PE zu erkennen, höchstwahrscheinlich Phosphatidsäure (PA). Rechts: M9-Medium. Unter aeroben Bedingungen wurde wieder PG und CL gebildet. War Glucose die C-Quelle wurde eher PG und weniger CL synthetisiert, bei Glycerol trat verstärkt CL und weniger PG auf. Die PG/CL-Bildung war unabhängig vom verwendeten Elektronenakzeptor.

Die Ergebnisse der PG/CL-Ausbildung des Stammes UE54 in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen sind in Tab. 42 zusammengefasst.

Tab. 42: Ausbildung anionischer Phospholipide in der *pgsA*-Mutante UE54 in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen.

C-Quelle	Elektronenakzeptor	PG-Bildung	CL-Bildung
LB	O ₂	-	-
LB Glycerol	O ₂	++	+
M9 Glucose	O ₂	+	(+)
M9 Glycerol	O ₂	+	++
M9 Glycerol	TMAO	+	++
M9 Glycerol	DMSO		++
M9 Glycerol	Nitrat	+	++
M9 Glycerol	Fumarat	+	++

3.1.2.5 Zellen von UE54 und UE54 *tatAE* bilden keinen Kettenphänotyp aus

Lichtmikroskopische Aufnahmen von der *pgsA*-Mutante UE54 in der exponentiellen Wachstumsphase zeigten kurze Stäbchen, die leicht verkürzt im Vergleich zum Phospholipid-Wildtyp UE53 waren (Abb. 17). Es lagen keine Zellen in Kettenform vor, die aufgrund unvollständiger Teilungen aneinander hingen, wie es für eine Störung beim Transport der Amidasen AmiA und AmiC typisch wäre. Zellen der Δ *tatAE*-Kontrolle des Phospholipid-Wildtyps UE53 bildeten einen Kettenphänotyp aus, wohingegen die Δ *tatAE*-Kontrolle der *pgsA*-Nullmutante keinen derartigen Phänotyp aufwies. Hier lagen zu einem sehr großen Anteil verkürzte Einzelzellen vor, vergleichbar mit UE54 mit funktionalem *tatAE*. Aufgrund dieser Tatsache kann vom ausbleibenden Kettenphänotyp in UE54 nicht auf die Funktionalität des Tat-Systems und damit die Ersetzbarkeit von PG und CL geschlossen werden.

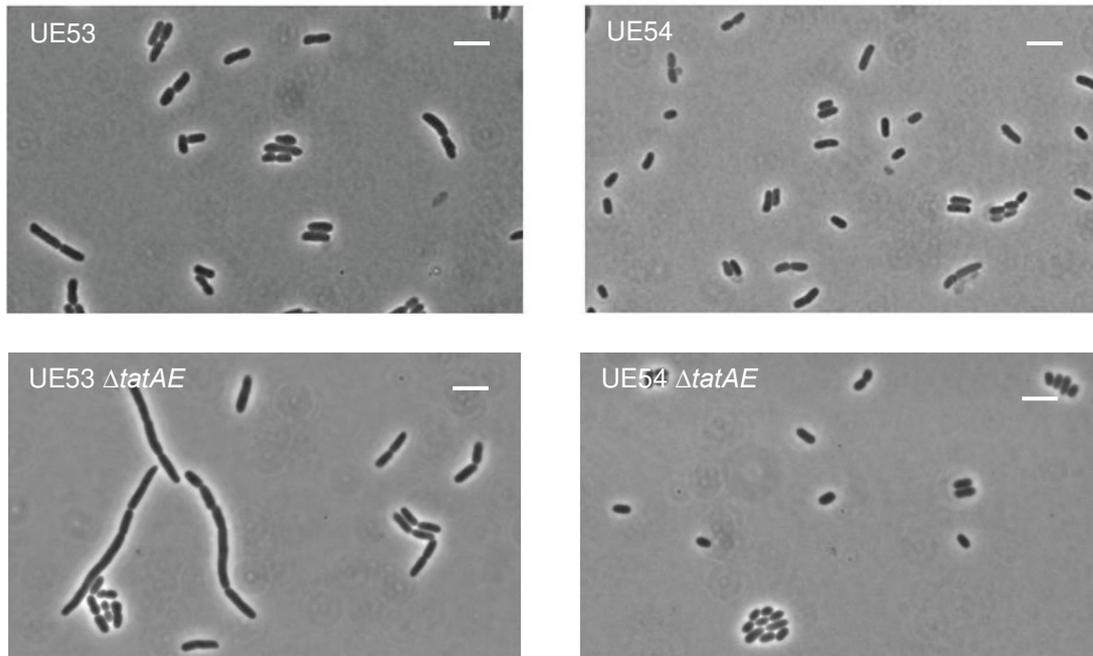


Abb. 17: Zellphänotypen von UE53, UE54, UE53 Δ tatAE und UE54 Δ tatAE .

Zellen der Stämme UE53 und BKT12 mit typischen Stäbchen, leicht verkürzte Stäbchen bei UE54. Typischer Kettenphänotyp bei UE53 Δ tatAE. Zellen von UE54 Δ tatAE lagen nicht in Ketten vor, der Phänotyp ähnelte UE54 mit funktionalem *tatAE*. Die Skala zeigt eine Länge von 5 μ m an.

3.1.2.6 UE53 und UE54 zeigen erhöhte SDS-Sensitivität

Ein verringertes Wachstum von *E. coli* bei höheren Konzentrationen SDS im Kulturmedium kann auf einen verminderten Tat-Transport der Amidasen AmiA und AmiC zurückgeführt werden (Ize et al. 2003). Hier wurde das Wachstum (OD_{600}) nach 3 h gemessen. Als 100 % wurde die OD_{600} des entsprechenden Stammes bei 0% SDS gesetzt. W3110 wurde als SDS-resistenter Stamm zur Kontrolle gewählt, da im Phospholipid-Wildtypstamm UE53 bereits durch das Fehlen vom Braunschen Lipoprotein die Zellhülle instabil und permeabel ist und eine erhöhte Sensitivität auf SDS anzunehmen war. Es zeigte sich, dass tatsächlich eine deutliche SDS-Sensitivität festzustellen war, die mit ca. 23 % Wachstum bei 4 % SDS in einem ähnlichem Bereich lag wie der Δ tatAE-Stamm (6 %) und UE54 (30 %; Abb. 18). Somit kann eine mögliche Auswirkung von SDS auf den Transport der Amidasen bei Fehlen von PG und CL in der Zellhülle mit diesem Test nicht nachgewiesen werden.

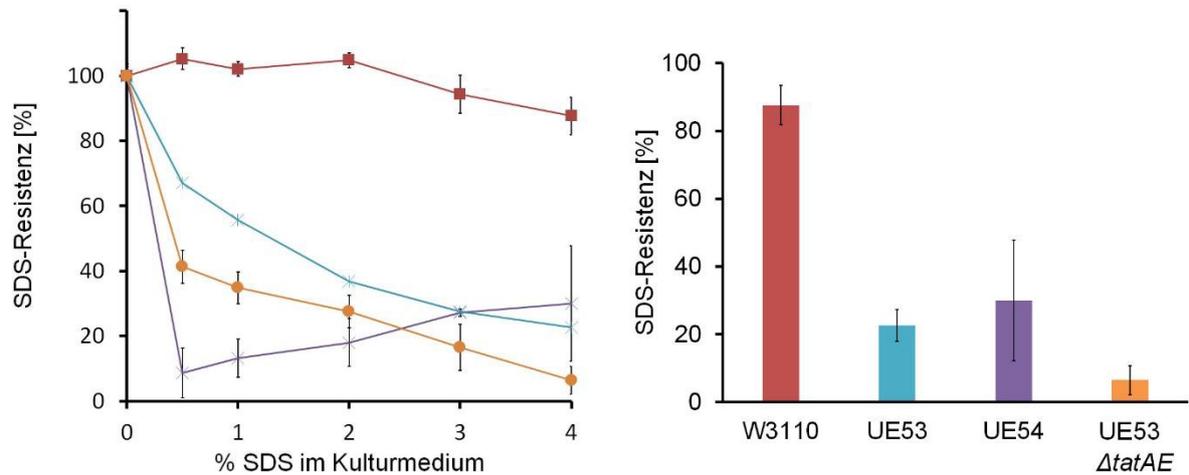


Abb. 18: SDS-Sensitivität von UE53 und UE54. Links: Aufgetragen ist die OD₆₀₀ in Prozent nach 3 h Wachstum in LB mit der entsprechenden SDS-Konzentration. W3110 (rote Quadrate) war über den gemessenen Bereich SDS-resistent. Bereits der Phospholipid-Wildtyp UE53 (blaue Kreuze) war sensitiv gegenüber SDS, ebenso UE53 Δ tatAE (orange Kreise). Mit steigender Konzentration sank die OD₆₀₀ auf unter 25 %. Auch UE54 (violette Kreuze) war SDS-sensitiv, wobei die geringste OD₆₀₀ bei 0,5 % SDS (9%) gemessen wurde und bei 4 % SDS auf etwa 30 % wieder anstieg. Rechts: Vergleich der OD₆₀₀ bei 4 % SDS nach 3 h Wachstum.

Interessanterweise zeigte die Sensitivitätskurve von UE54 einen ungewöhnlichen Verlauf. Bei der geringsten SDS-Konzentration mit 0,5 % war das Wachstum geringer (ca. 9 %) als bei der höchsten (4 % SDS und 30 % Wachstum). Diese Tendenz wurde auch in einem Wiederholungsexperiment reproduziert (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf einen mehrfachen Effekt des SDS auf die Zellhülle hin. Einen negativen Effekt als anionisches Detergenz, das die Zellhülle durch das Herauslösen von Membranproteinen destabilisiert, der bei geringen Konzentrationen überwiegt; und einen positiven, der bei höheren SDS-Konzentrationen auftritt und das Wachstum im Vergleich zu geringen SDS-Konzentrationen verbessert.

3.1.3 Das zwitterionische Phospholipid Phosphatidylethanolamin ist für den Tat-Transport notwendig

In den nachfolgenden Tests wird der *in-vivo*-Transport von Tat-Substraten des Phosphatidylethanolamin-defizienten Stammes GN10 mit seinem Phospholipid-Wildtyp GN10/pMS5 verglichen.

Ähnlich wie beim Δ pgsA-Stamm UE54 konnten auch beim Δ pssA-Stamm GN10 bei der subzellulären Fraktionierung zum Nachweis des Transports von HiPIP keine sauberen Fraktionen hergestellt werden. Signale von HiPIP und der Fraktionierungskontrollproteine

BCCP und β -Lactamase waren generell sehr schwach detektierbar (Daten nicht gezeigt). Möglich ist eine Hypersensitivität der Zellen gegenüber den benutzten Lösungen und Chemikalien beim osmotischen Schock, sodass die Zellen schon lysierten und peri- als auch cytoplasmatische Proteine mit der Entfernung des TES-Puffers bereits verloren gingen. Auch der SDS-Phänotyp war aufgrund der labilen Zellhülle nicht aussagekräftig. Aufgrund dieser Eigenschaften des PssA-defizienten Stammes wurden in dieser Arbeit alleinig Wachstumsassays auf TMAO und der Zell-Phänotyp für die Auswertung in Betracht gezogen.

3.1.3.1 Zellen von GN10 bildeten keinen Kettenphänotyp aus

Kulturen der exponentiellen Phase von GN10 bildeten lange Zellfilamente aus. Diese waren sehr unterschiedlich lang (bis über 50 μm) und zeigten häufig Ausstülpungen und beulenartige Fortsätze. Die Filamente waren nur sehr selten durch Septen voneinander getrennt (Abb. 19). Die Daten sind in Übereinstimmung mit der bestehenden Literatur (Raetz 1976).

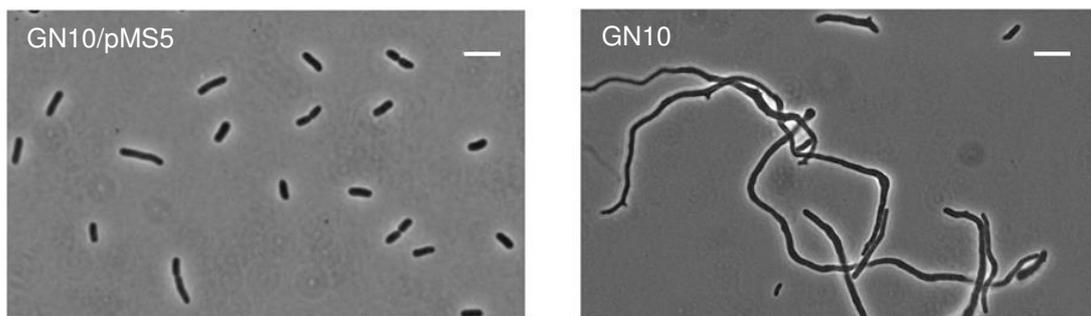


Abb. 19: Zellphänotypen von GN10/pMS5 und GN10.

Links: Zellen von GN10/pMS5 mit typischen kurzen Stäbchen, rechts: Stark filamentöser Phänotyp von GN10, Zellen mit Verdickungen, Ausstülpungen und kleinen Fortsätzen. Die Skala zeigt eine Länge von 5 μm an.

Beim Kettenphänotyp durch ein nicht funktionales Tat-System werden die Zellen inklusive Cytoplasma voneinander abgetrennt, allerdings kann die Abspaltung des N-Acetylmuramins von der Peptidkette nicht erfolgen, sodass sich das Petidoglycan nicht separiert (Heidrich et al. 2001; Ize et al. 2003). Demnach ist es möglich, dass hier der Transport der Amidasen durch das Fehlen von PE beeinflusst ist. Jedoch sind durch das Fehlen von PE bereits frühe Schritte der Zellteilung gestört (Mileykovskaya 1998), wodurch mögliche nachfolgende Defekte nicht sichtbar werden.

3.1.3.2 GN10 zeigte kein Wachstum auf Glycerol/TMAO

Für GN10 wurde ein TMAO-Wachstumsassay auf Minimalmedium etabliert. Für andere Stämme wird dieser Test standardmäßig auf M9-Medium durchgeführt. Da PE-defiziente Stämme erhöhte Konzentrationen an divalenten Kationen im Medium benötigen, musste ein alternativer Puffer zu dem im M9-Medium eingesetzten Phosphat-Puffer verwendet werden. Das Löslichkeitsprodukt von Magnesiumphosphat ist im M9-Medium bei den eingesetzten Mengen um das Vielfache überschritten. Es wurde ein MOPS-Puffer-basierendes Minimalmedium verwendet (Neidhardt 1974), dem 50 mM $MgCl_2$ und 20 $\mu g/mL$ Tryptophan zugesetzt wurden. Es konnte ein gutes aerobes Wachstum mit Glycerol als alleiniger Kohlenstoffquelle erreicht werden (Abb. 20 rechts). Wachstum unter diesen Wachstumsbedingungen war jedoch nur möglich, wenn eine Animpfdichte von OD_{600} von 0,1 nicht unterschritten wurde.

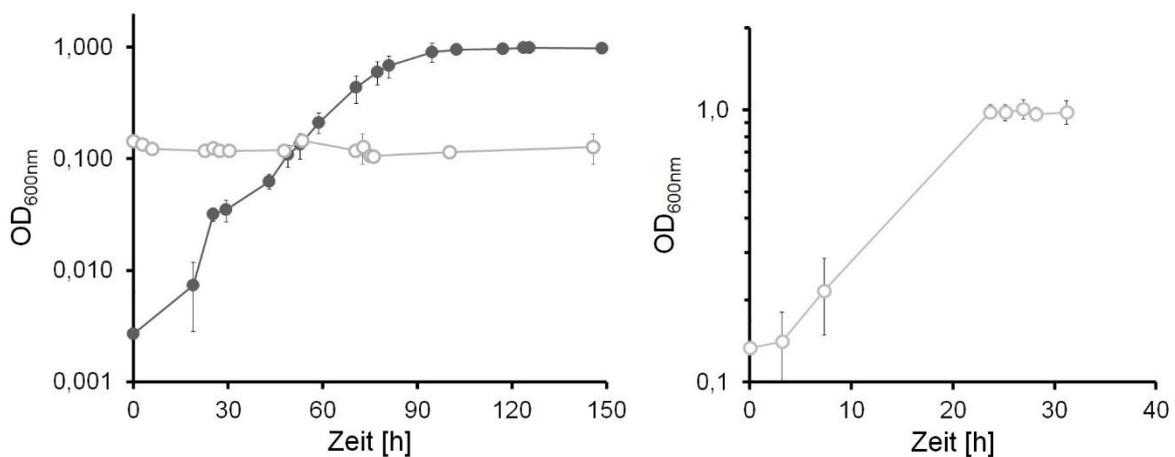


Abb. 20: Der PE-defiziente Stamm GN10 wuchs nicht auf Glycerol/TMAO.

Links: Glycerol/TMAO-Wachstum. GN10/pMS5 (gefüllte Kreise) wuchs innerhalb von etwa 90 h auf eine OD_{600} von über 1. GN10 (leere Kreise) wuchs nicht auf Glycerol/TMAO. Rechts: Glycerol/ O_2 -Wachstum. GN10 wuchs innerhalb von 20 h auf eine OD_{600} von über 1 auf Glycerol/ O_2 . Die Wachstumstests wurden in Triplikaten durchgeführt.

Unter gleichen Wachstumsbedingungen wurde nun der TMAO-Assay durchgeführt. Der einzige Unterschied war das Fehlen von O_2 durch Inkubation im geschlossenen Hungaterörchen und der Gabe von 1,1% TMAO als Elektronenakzeptor. GN10 wuchs nicht unter diesen Bedingungen (Abb. 20 links), wohingegen GN10/pMS5 ein sehr gutes Wachstum auf dem Glycerol-TMAO-MOPS-Medium zeigte. Das Wachstum und somit der Transport des

Tat-Substrates TorA kann eindeutig auf das zwingend notwendige Vorhandensein von PE in der Zellhülle zurückgeführt werden.

Es wurde eine Verifizierung des Stammes GN10 durchgeführt. Nach der Inkubation auf dem MOPS-Medium (sowohl mit O₂ als auch mit TMAO) wurden Proben mit einer Impföse entnommen und hintereinander auf Platten LB ohne MgCl₂, dann auf LB mit 50 mM MgCl₂ ausgestrichen. Alle Kulturen zeigten ausschließlich Wachstum auf den MgCl₂-supplementierten Platten und absolut kein Wachstum auf reinem LB.

3.2 Auswirkungen der Quervernetzung des TatA-N-Terminus und der APH auf die Tat-Transporteffizienz in Cysteinvarianten von TatA

Im Folgenden werden die Ergebnisse zu den Selbstinteraktionsstudien von TatA gezeigt. Es wurden Einzel- und Doppelpolycysteinaustausche in den Bereichen des N-Terminus (G2C und G3C) sowie in der APH (S27C und A42C) vorgenommen (Abb. 21) und die Disulfidbildung untersucht und Funktionalitätsanalysen der Varianten vorgenommen.

3.2.1 Cysteingelabelte N-Termini von TatA neigten stark zur Ausbildung von Disulfiden

Liegen die Aminosäurereste zweier Proteine in unmittelbarer räumlicher Nähe, kann dies durch den Austausch der Aminosäure gegen ein Cystein nachgewiesen werden. Sobald die Domäne mit dem Austausch im oxidierenden Milieu (Periplasma) liegt, bilden sich spontan Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen aus. Zwei somit verbundene TatA-Monomere können in der nicht-reduzierenden SDS-PAGE eindeutig als Dimer auf einer Laufhöhe von etwa 27 kDA detektiert werden. Cysteinaustausche im N-terminalen Bereich von TatA, führen zu einer starken Disulfidbildung. Zum einen wurde dies in *single-copy*-integrierten TatA-Varianten (Abb. 22 A) untersucht, zum anderen in Vektor-basierten TatA-Varianten (Abb. 22 B); beide Systeme zeigten grundsätzlich die gleiche Dimerbildung der Varianten. Die getesteten TatA-Varianten mit Einzel-Austauschen an Positionen G2 und G3 neigen zu einer starken Dimerisierung unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Dabei ist die Dimerbildung so stark, dass nur etwa 1/4 bis 1/10 des gesamten membranständigen TatAs als Monomer vorliegt. Cysteinaustausche innerhalb der amphipathischen Helix (S27C und A42C) resultierten in sehr schwacher Dimerbildung. Unter reduzierenden Bedingungen (nachträgliche Zugabe von 1 μ L

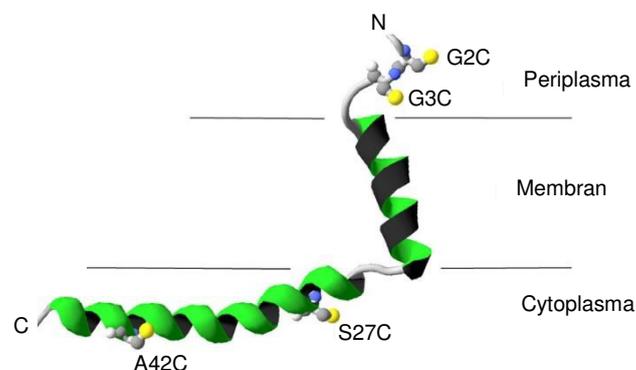


Abb. 21 Lage der Cysteinaustausche in TatA. G2C und G3C befinden sich am N-Terminus von TatA, die Austausche S27C und A42C in der APH.

β -Mercaptoethanol zu 10 μ L Proteinprobe), liegt das gesamte TatA aller Varianten als Monomer vor. Dies zeigt, dass die Dimerbildung ein Resultat der Ausbildung von Disulfiden der eingeführten Cysteine ist.

Bei wiederholten Membranpräparationen konnte mit den Varianten S27C und A42C schwache bis mäßige Dimerbildung von TatA festgestellt werden. Ein Einfluss von dem thiomodifizierenden Agens unmittelbar nach der Zellernte (15 mM IAA oder 25 mM N-Ethylmaleimid (NEM)) konnte nicht festgestellt werden, die leichte Dimerbildung war unabhängig von der Zugabe zu detektieren.

Die ausgebildeten Dimere sind nachweislich auf Grund von Disulfidbindungen zwischen den Protomeren entstanden. In einer reduzierenden SDS-PAGE, wo die Disulfidbindungen durch im Probenpuffer vorhandenes β -Mercaptoethanol zu Thiolgruppen reduziert werden, ist alleinig monomeres TatA nachzuweisen (Abb. 22 A unten). Dies zeigt, dass die Oligomerisierung ausschließlich durch ortsspezifische Quervernetzung durch Disulfidbindungen zustande kommt und nicht durch andere unspezifische Wechselwirkungen zwischen den Proteinen.

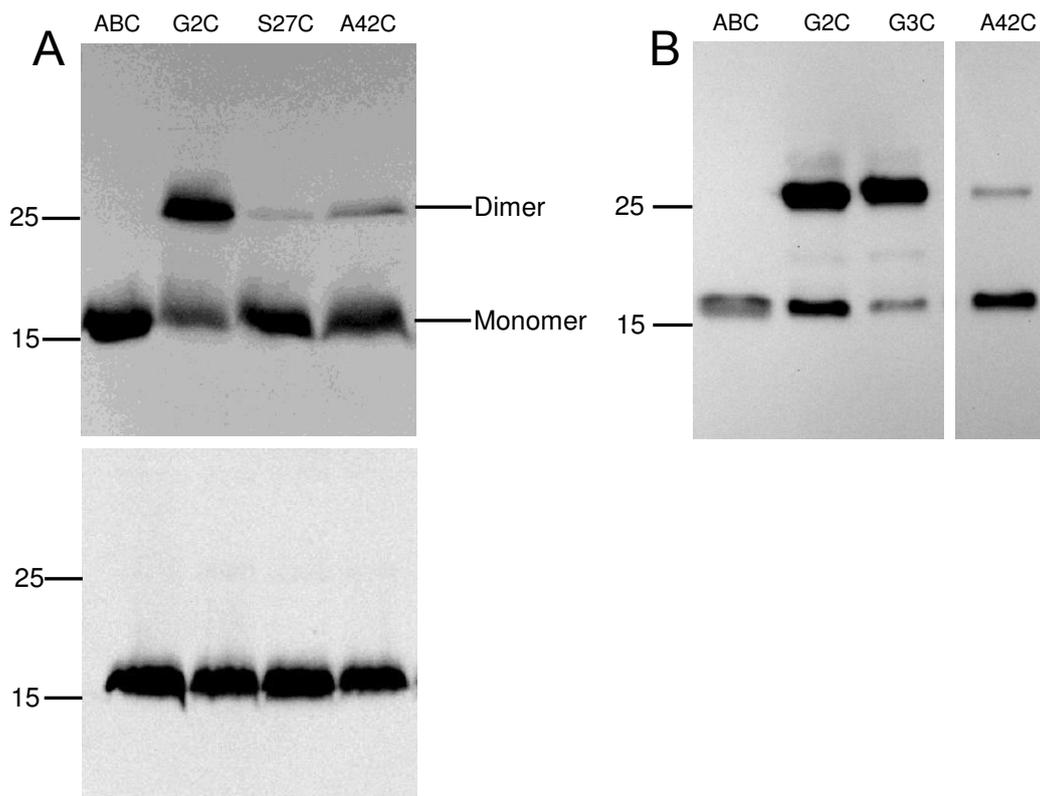


Abb. 22: Disulfidbildung der TatA-Einzelcysteinvarianten.

Gezeigt sind Immunoblots von Membranpräparationen (α -TatA). A: *Single-copy*-basierte TatA-Einzelcysteinenaustausche, oben: nicht-reduzierende SDS-PAGE, N-terminaler Austausch G2C führte zu einer starken Dimerbildung, Austausch in der APH S27C und A42C resultierten in einer leichten Dimerbildung von TatA; unten: reduzierende SDS-PAGE, Disulfidbindungen wurden reduziert, TatA liegt komplett als Monomer vor. B: pABS-basierte TatA-Einzelcysteinenaustausche. Beide N-terminale Austausche G2C, G3C führten zu starker Dimerbildung, der Austausch A42 in der APH führte zu leichter Dimerbildung.

Ist der Tat-Transport inaktiviert durch einen Austausch in TatC (P48A), bei dem die Integrität des BC-Komplexes gestört ist (Barrett et al. 2005), liegt dennoch die gleiche Stärke der Dimerbildung von TatA vor wie beim funktionalen Tat-System (Abb. 23). Bei einem inaktivierten Tat-Transport ist der absolute TatA-Gehalt aller Cysteinvarianten und des TatA-WT der Membran stark verringert im Vergleich zu allen Cysteinvarianten mit dem P48A-Austausch in TatC.

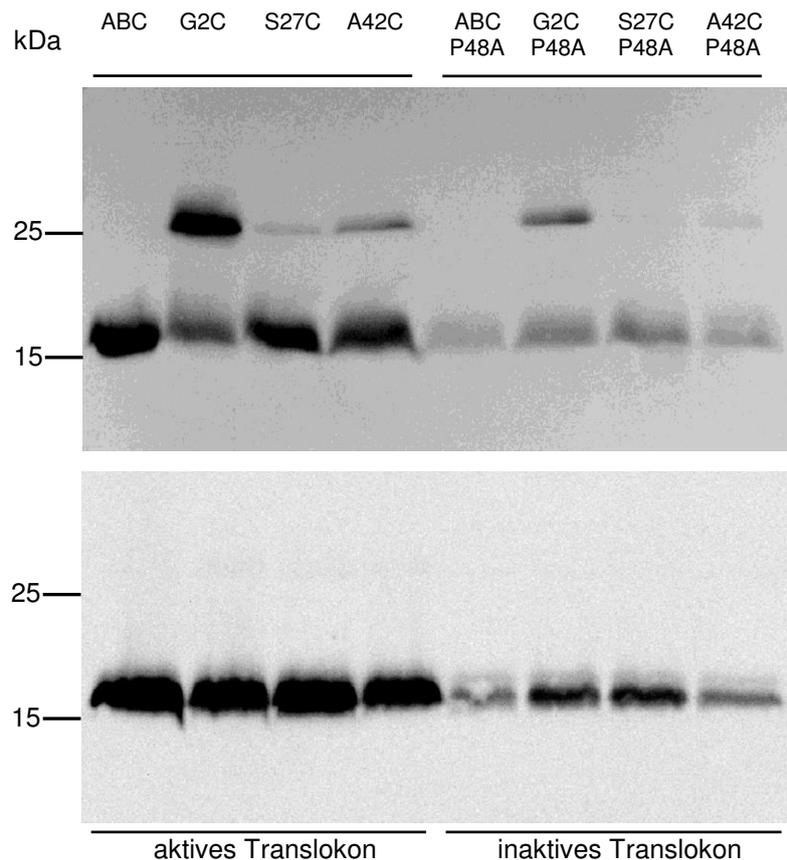


Abb. 23: Einfluss des aktiven Transports auf die Disulfidbildung und Menge membranständigen TatAs
Gezeigt sind Immunoblots von Membranpräparationen (α -TatA). *Single-copy*-basierte TatA-Einzelcysteinaustausche, oben: nicht-reduzierende SDS-PAGE, die Inaktivierung des Translokons (P48A-Austausch in TatC) veränderte nicht die Stärke der Dimerbildung der TatA-Varianten; unten: reduzierende SDS-PAGE, Disulfidbindungen wurden reduziert, TatA lag komplett als Monomer vor. Die Inaktivierung des Translokons reduzierte die Menge an TatA in der Membran.

3.2.2 Die Doppelcysteinvariante G2C;G3C bildete homooligomere TatA-Assoziationen

Werden zwei Cysteinaustausche in den N-terminalen Bereich von TatA eingebracht (G2C und G3C) ist eine weitere Oligomerisierung von TatA möglich. Die *in-vivo* gebildeten Oligomere können so quervernetzt werden und im Vergleich zum Einzelaustausch, wo höchstens eine

Dimerbildung untersucht werden kann, höheroligomere Assoziationen bilden. Eine *single-copy*-Integration der Doppelcysteinvariante von TatA in die λ *attachment site* resultiert in einer schwachen „Leiterbildung“ und Oligomerisierung (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der schwachen Signalstärke der TatA-Leiter im Westernblot, wurde das Expressionsniveau leicht heraufgesetzt und die Doppelcysteinvariante mittels *tatABC*-System mit Hilfe des Niedrig-Kopien-Vektors pABS (ca. 15 Kopien) über den natürlichen Promotor *ptat* exprimiert. Hier wurde die oligomere Assoziation im Westernblot sehr deutlich (Abb. 24). TatA-Protomere oligomerisieren in Form vom Dimer (ca. 28 kDa) bis hin zum Decamer (>250-kDa-Markerbande). Weitere höhere Oligomere lassen sich erahnen, jedoch stößt hier die Auftrennung der SDS-PAGE an ihre Grenzen. Auch der Einsatz von 10 % Gelen und erhöhtem Probevolumen brachte keine Verbesserung.

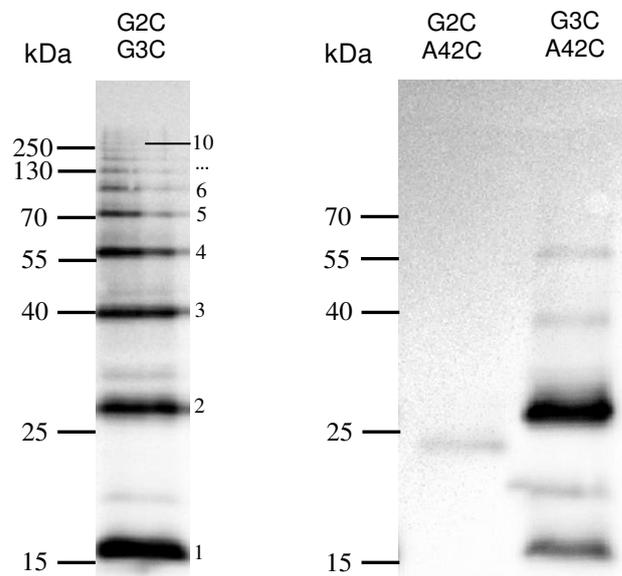


Abb. 24: Doppelcysteinaustausche in TatA führen zu TatA-Netzwerken.

Gezeigt sind Immunoblots von Membranpräparationen (α -TatA) nicht-reduzierender SDS-PAGEs. Expression durch pABS-*tatABC*. Links: Der G2C;G3C-Austausch führte zu einer Oligomerisierung von Tat-A-Protomeren bis mindestens zum Decamer. Schwaches TatA-Signal in der G2C; A42C-Variante bei ca. 20 kDa. Netzwerkbildung und Oligomerisierung von TatA in der G3C;A42C-Variante bis zum Tetramer.

Weitere Quervernetzungsexperimente wurden mit Doppelcysteinvarianten durchgeführt, die jeweils ein Cystein am N-Terminus (G2C oder G3C) und ein Cystein am Ende der amphipathischen Helix (A42C) besaßen. In der G2C;A42C-Variante konnte im Westernblot kein TatA-Signal auf Höhe des monomeren TatAs detektiert werden. Nur eine Bande bei etwa 23 kDa war nachzuweisen. Möglicherweise integriert diese Variante nicht mehr in die Membran, was die geringe Signalstärke erklären würde. Die G23C;A42C-Variante zeigt eine Leiterbildung von TatA mit Mono-Di, Tri und Tetramerbildung mit Laufhöhen entsprechend der der G2C; G3C-Variante. Höhermolekulare TatA-Oligomere sind nicht erkennbar. Zwischen

dem Monomer und dem Dimer konnte eine weitere TatA-Bande auf Laufhöhe von ca. 20 kDa detektiert werden. Diese Bande tritt auch -allerdings viel abgeschwächer- bei den Einzylcysteinaustauschen auf.

3.2.3 Zunehmende Quervernetzung von TatA verhinderte den Transport von HiPIP und der Amidasen

Um die Funktionalität der über den N-Terminus oder APH quervernetzten TatA-Protomere zu verfolgen, wurde der Transport des Modellsubstrates HiPIP untersucht (Abb. 25). Als zweiter Hinweis für die Funktionalität wurde der Transport der Amidasen AmiA und AmiC anhand des Zellphänotyps geprüft (Abb. 26). Der Transport von HiPIP ist in den einfach quervernetzten aller TatA-Varianten ungestört. In den periplasmatischen Fraktionen aller Einzylcysteinvarianten und des TatA-WT wurden starke Signale auf Höhe des murenen HiPIPs detektiert. *Precursor*-HiPIP war selten oder nur schwach in den cytoplasmatischen Fraktionen zu detektieren. Dazu entsprechend verhielt sich der Phänotyp der Einzylcysteinaustausche. Die Kulturen der sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Zellen wiesen die typischen Phänotyp-Charakteristika einer *E.-coli*-Kultur auf. Hier sind kurze Stäbchen oder sich in der Teilung befindende Zellen stark vorherrschend.

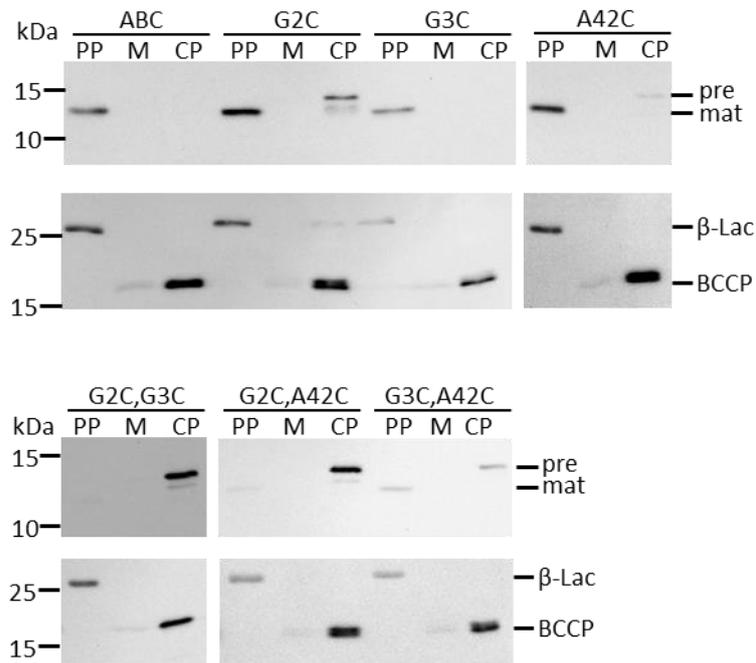


Abb. 25 Transportanalysen von HiPIP in den TatA-Cysteinvarianten.

Gezeigt sind Immunoblots nach subzellulärer Fraktionierung. Periplasma (PP), Membran (M) und Cytoplasma (CP). Der jeweils obere Blot zeigt die Detektion mit α -HiPIP. Dabei wird zwischen dem transportierten, murenen HiPIP (mat) und dem nicht transportierten *precursor*-HiPIP (pre) unterschieden. Im jeweils unteren Blot erfolgte die Detektion fraktionsspezifischer Proteine. Periplasmatisch die β -Lactamase (β -Lac, β -Lactamase-AK) und cytoplasmatisch das Biotincarboxyl-Carrierprotein (BCCP) durch das StrepTactin-Konjugat; die leichte Detektion von BCCP in der Membranfraktion ist gewöhnlich. Varianten ABC (WT, ohne Cysteinaustausch) und die Einzelaustausche G2C, G3C und A42C transportierten vollständig. Die TatA-Variante mit dem Doppelcysteinaustauschen G2C,G3C transportierte kein HiPIP mehr, die Varianten G2C,A42C sowie G3C,A42C nur sehr schwach. Gezeigt sind pABS-basierte Cysteinvarianten.

Bei zunehmender Quervernetzung des N-Terminus von TatA durch die Einführung eines zweiten Cysteins (G2C und G3C) wurde der Transport der getesteten Substrate verhindert. HiPIP lag nur als *precursor* im Cytoplasma vor, absolut kein transportiertes (matures) HiPIP im Periplasma war detektierbar (Abb. 25 oben). Darüber hinaus bildete der Stamm einen sehr stark ausgeprägten Kettenphänotyp (Abb. 26). Die Kulturen der Doppelcysteinvarianten, mit einem Austausch im N-Terminus, dem anderen in der APH (G2C; A42C bzw. G3C; A42C) transportieren nur sehr schwach das Substrat HiPIP (Abb. 25 unten). In den Periplasmafraktionen konnte ein schwaches Signal auf Höhe des murenen HiPIPs nachgewiesen werden. Der Zell-Phänotyp in beiden Varianten hingegen war kaum beeinträchtigt; er ähnelte mit vielen Einzelzellen dem Wildtyp. Anteilmäßig waren etwas mehr 2er-Zellketten zu finden, welche noch etwas verstärkt in der G3C; A42C-Variante als in der G2C; A42C-Variante vorlagen (Abb. 26).

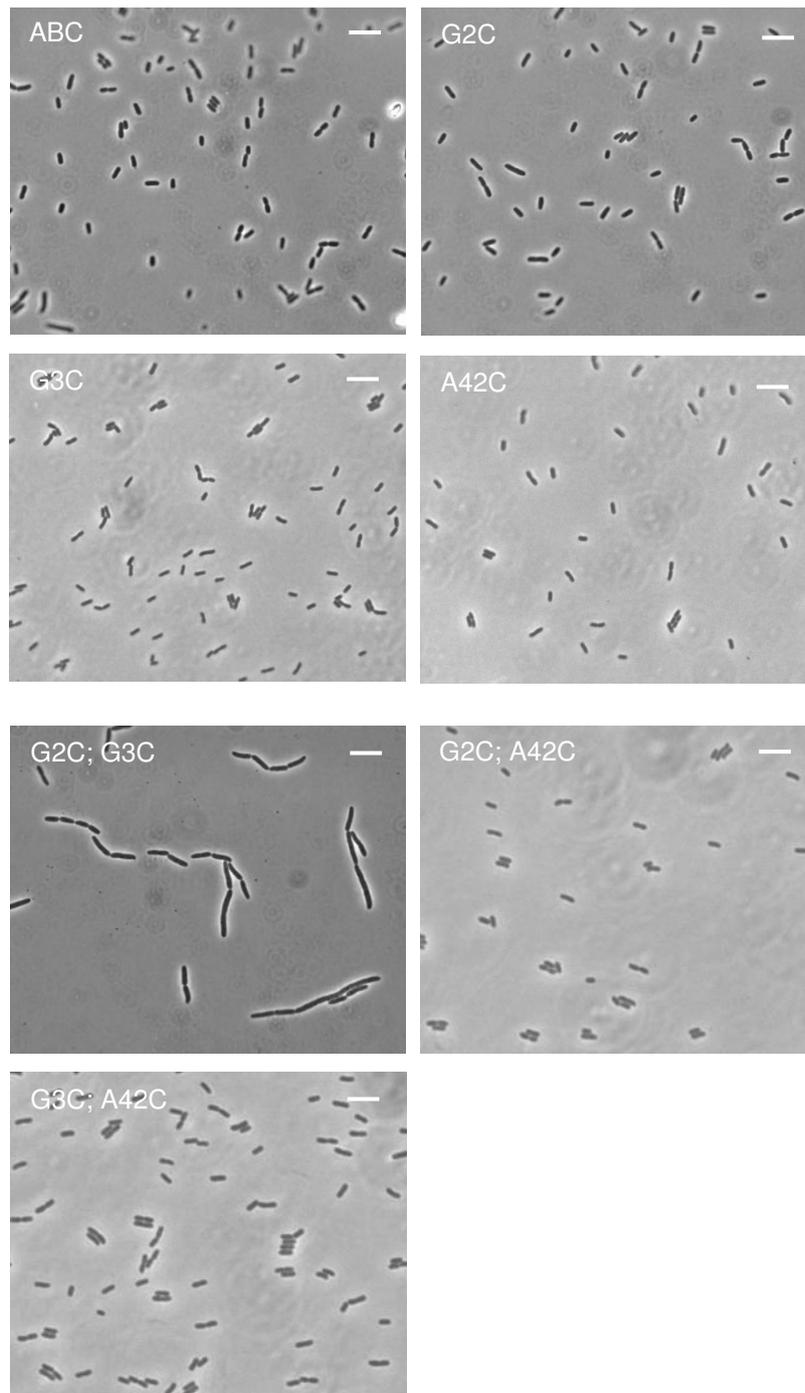


Abb. 26: Zellphänotypen der Einzel- und Doppelcysteinaustausche in TatA.

Zellen der Einzelcysteinaustausche von TatA G2C, G3C und A42C lagen als typische einzelne Stäbchen vor wie die Zellen des unveränderten Tat-System (ABC). Typischer Kettenphänotyp beim Doppelcysteinaustausch G2C;G3C. Zellen der Doppelcysteinaustausche G2C;A42C und G3C;A42C wiederum lagen nicht in Ketten sondern einzeln vor. Gezeigt sind pABS-basierte Cysteinvarianten. Die Skala zeigt eine Länge von 5 µm an.

3.2.4 TatA der Doppelcysteinvariante G2C;G3C integrierte vollständig in die Cytoplasmamembran

TatA mit dem Doppelcysteinaustausch im N-Terminus (G2C und G3C) bildet oligomere Assoziationen in der SDS-PAGE aus (3.2.2). Eine starke Quervernetzung von TatA (weiter als bis zum Dimer) verhindert den Transport von HiPIP und der Amidasen AmiA und AmiC (3.2.3). Ein erheblicher Anteil liegt dennoch in dieser Variante als Monomer vor. Ähnliche Mengen monomeren TatAs in der Doppelcysteinvariante (G2C; G3C) können keinen vergleichbaren Tat-Transport bewerkstelligen wie im Einzelaustausch oder im TatA-Wildtyp. In diesem Zusammenhang bestand die Möglichkeit, dass ein Doppelcysteinaustausch an den Positionen G2C und G3C eine korrekte Integration in die Membran verhindert, sodass auch keine Funktionalität des nicht quervernetzten Anteils gegeben ist. Sollte TatA nicht richtig in die Membran integrieren und nur peripher an der Membran anliegen, könnte es durch die Waschung der Membran mit Carbonat abgewaschen werden. Wurde die Membran mit Carbonat gewaschen, enthielt die Waschfraktion anschließend kein nachzuweisendes TatA mehr, weder mono- noch oligomeres (Abb. 27). TatA der Doppelcysteinvariante G2C; G3C integriert vollständig in die Membran.

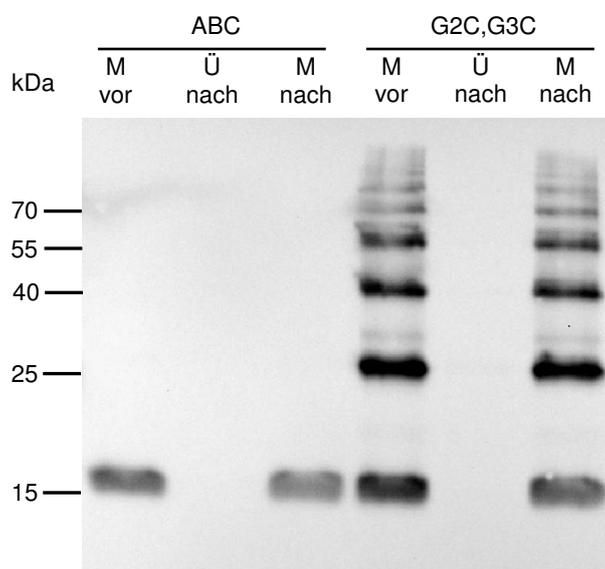


Abb. 27: Carbonatwaschung der Membranfraktionen der Doppelcysteinvariante G2C;G3C und des TatABC-WT.

Gezeigt ist ein Immunoblot von Membranpräparationen (α -TatA) einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE. Gezeigt sind pABS-basierte Cysteinvarianten. Aufgetragen sind die Fraktionen der ungewaschenen Membran (M vor), des Überstandes der Waschung der Membran (Ü nach) und der gewaschenen Membran (M nach). Sowohl natürliches TatA (ABC) als auch die Doppelcysteinvariante G2C;G3C von TatA integrierten vollständig in die Membran, der Überstand der Waschung enthielt keinerlei TatA.

3.2.5 TatA der Cytoplasmafraktion zeigte vergleichbare Disulfidbildung wie das membranständige TatA

Die Präparationen von membranständigem TatA zeigen eine eindeutige Lokalisation des N-Terminus auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran (3.2.1). Immer wieder wurde in der Literatur von löslichem, cytoplasmatischem TatA berichtet (Keersmaecker et al. 2007; Schreiber et al. 2006; Taubert et al. 2015), das möglicherweise spezifische Aufgaben im Cytoplasma übernimmt. Hier sollte geklärt werden, ob das „lösliche“ TatA die gleichen Eigenschaften und Disulfidbildungen aufweist, wie das membranständige. Entsprechend der Methoden für Anzucht, Ernte und Fraktionierung des membranständigen TatAs wurde die Cytoplasmafraktion der G2C und der S27C-Variante sowie des nicht-modifizierten TatAs (ABC) hergestellt und die Proteine TCA-gefällt. TatA der Cytoplasmafraktion der genannten Varianten zeigt die gleiche Ausbildung von Disulfiden wie das der Membranfraktionen (Abb. 28).

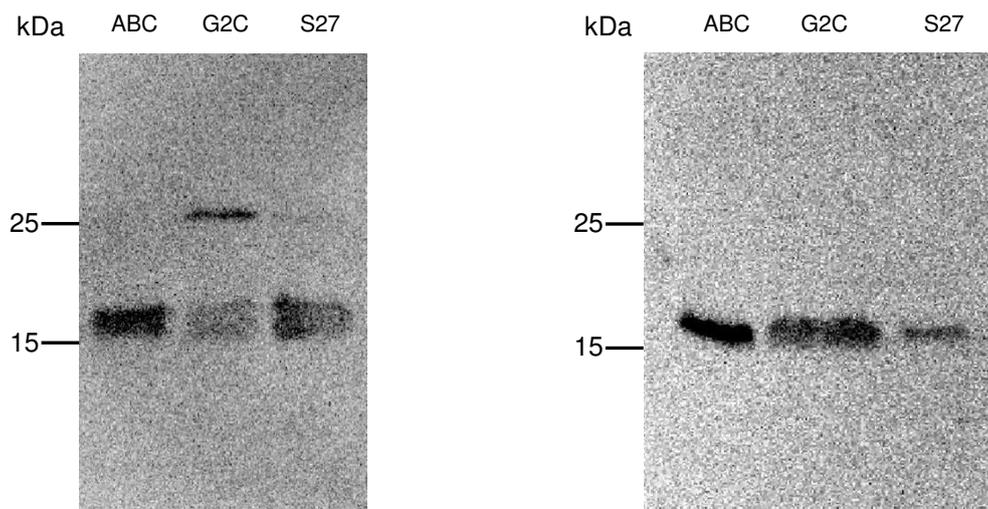


Abb. 28: TatA der Cytoplasmafraktionen von Varianten mit Einzelsysteinaustauschen.

Gezeigt sind Immunoblots von Cytoplasmafraktionen nach TCA-Fällung (α -TatA). *Single-copy*-integrierte Cysteinvarianten. Links: Nicht-reduzierende SDS-PAGE. G2C-Variante mit deutlicher Dimerbildung, S27-Variante mit schwacher Dimerbildung. Rechts: Reduzierende SDS-PAGE. Durch die Zugabe von 1 μ L β -Mercaptoethanol in 10 μ L Probe wurden die Disulfide vollständig reduziert und TatA lag ausschließlich als Monomer vor.

3.2.6 Für den Abfluss der Elektronen bei der Disulfidbildung ist nicht das Dsb-System (DsbB) und keine Komponenten der Atmungskette verantwortlich

Das Dsb-System ist für die Oxidation von Thiolgruppen in Proteinen im oxidativen Bereich von Periplasma und Membran zuständig. Zur Untersuchung, ob das Dsb-System für den Abtransport der Elektronen bei der Bildung der Disulfide zuständig ist, wurde hier das Gen

dsbB in den Stämmen mit den TatA-Cysteinvarianten G2C inaktiviert und die Disulfidbildung beobachtet. DsbB ist die membranständige Komponente des Dsb-Systems. Das Fehlen von DsbB hat keinen Einfluss auf die Ausbildung der Disulfide in TatA. Die Dimerbildung im Einzelcysteinaustausch G2C war +/- *dsbB* gleich (Abb. 29).

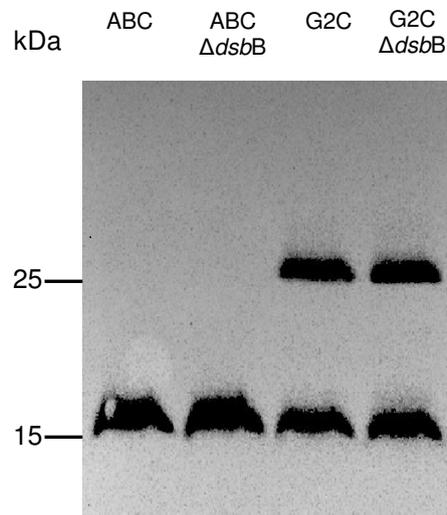


Abb. 29: Disulfidbildung in TatA-Variante G2C ist nicht von DsbB abhängig.

Gezeigt sind Immunoblots von Membranpräparationen (α -TatA) einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE. Die Dimerbildung in der G2C-Variante von TatA war bei inaktiviertem Dsb-System immer noch vergleichbar gegeben. Gezeigt sind *single-copy*-integrierte TatA-Varianten.

Auch sind offensichtlich keine spezifischen Komponenten der Atmungskette erforderlich für den Abtransport der Elektronen der Disulfidbildung und auch generell kein bestehender Elektronenfluss über Atmungskettenkomponenten notwendig. Sowohl bei der Nitratatmung (LB/Glycerol/Nitrat) als auch unter Gärungsbedingungen (LB) wurde weiterhin Disulfidbildung beobachtet (Abb. 30).

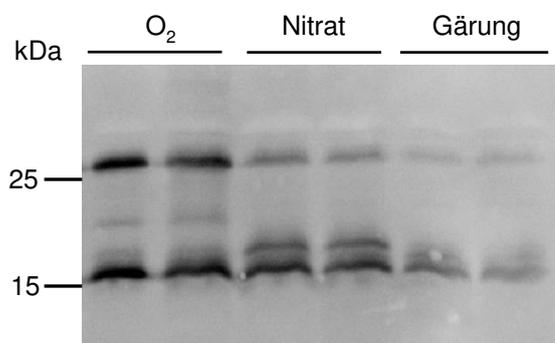


Abb. 30: Disulfidbildung der TatA-G2C-Variante bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen.

Gezeigt ist ein Immunoblot von Membranpräparationen (α -TatA) einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE. Die Variante basiert auf *single-copy*-integriertem TatABC. Jeweils 2 Spuren der gleichen Kultivierungsbedingung wurden aufgetragen. LB (O₂); LB/Glycerol/Nitrat und Gärung auf LB. Unter allen Bedingungen trat die Disulfidbildung von TatA auf.

3.3 Inhibitoren des Tat-Systems bei *Pseudomonas aeruginosa* haben keinen Einfluss auf den Tat-Transport in *Escherichia coli*

3.3.1 Wachstumseffekte von Bay11 und NPM

Vasil et al. (2012) zeigten die Wirksamkeit der Substanzen Bay11 und NPM auf den Tat-Transport der hämolytischen Phospholipase C. Im Bereich von 20 bis 40 μM zeigten diese Substanzen steigende inhibitorische Wirkung auf den Transport. Die Inhibitoren des Tat-Systems von *P. aeruginosa* sollten in *in-vivo*-Versuchen auf ihre Wirksamkeit in *E. coli* untersucht werden. Die Substanzen wurden freundlicherweise von Marcus Kalesse (Institut für Organische Chemie, LUH) zur synthetisiert und zur Verfügung gestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden die von Vasil eingesetzten, getesteten Konzentrationen von 20 und 40 μM verwendet. Die Substanzen wurden gleich zu Beginn der Anzucht nach Inokulieren eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass vor allem Bay11 einen stark wachstumsinhibitorischen Effekt besaß und in Anwesenheit von 40 μM Bay11 kein Anstieg der OD_{600} über mehrere Stunden festzustellen war (Daten nicht gezeigt). Auch bei 20 μM war noch eine leichte Verzögerung im Wachstum im Vergleich ohne Inhibitorsubstanz festzustellen, die allerdings noch akzeptabel war (ca. um 50 % verzögertes Wachstum, Daten nicht gezeigt). Diese Konzentration wurde in den *in-vivo*-Transportanalysen verwendet. Auch NPM zeigte sich inhibitorisch auf das Wachstum von *E. coli*. Eine Konzentration von 40 μM verzögerte in etwa das Wachstum wie 20 μM Bay11 und wurde als Testkonzentration eingesetzt. Geerntet wurden die Kulturen (+/- Inhibitor) immer zu einer bestimmten OD_{600} (siehe jeweiliger Versuch), sodass die Zellen sich für einen direkten Vergleich in der gleichen Wachstumsphase befanden.

3.3.2 Stabilität des BC-Komplexes bleibt unbeeinflusst (BN-PAGE)

In diesem Versuch wurde die Stabilität des TatBC-Komplexes in Hinsicht auf NPM untersucht. Nach der Zellernte und Membranfraktionierung wurden direkt 200 μ M NPM zum Solubilisierungsansatz hinzugefügt und für 1 h inkubiert. Anschließend wurde eine BN-PAGE durchgeführt. Sowohl mit als auch ohne NPM konnten die zwei typischen distinkten Komplexbanden detektiert werden (Abb. 31). Allerdings liefen sie insgesamt höher als in den bereits veröffentlichten Fällen. Der niedrigere Komplex lief bei etwa 520 kDa, der höhere bei ca. 660 kDa (vergleiche 440er und 580er-Komplexe, Richter und Brüser 2005). Somit hat NPM keinen Einfluss auf die Ausbildung korrekter TatBC-Komplexe.

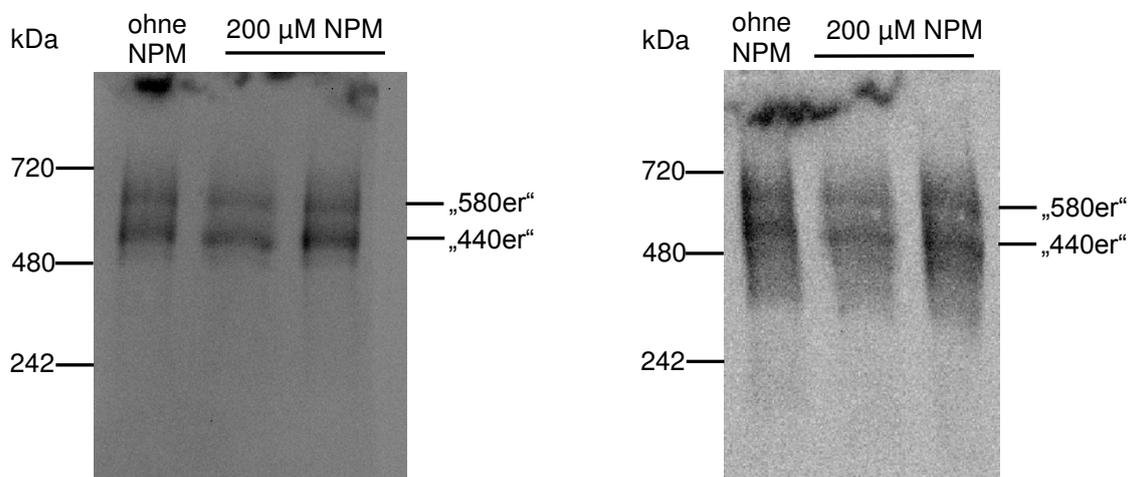


Abb. 31: TatBC-Komplexe bleiben unbeeinflusst durch den Einsatz von NPM.

BN-PAGE der solubilisierten Membranproteine von MC4100. Die linke Spur ist jeweils 10 μ L Probe ohne NPM-Behandlung. Die rechten beiden Spuren sind Digitonin-solubilierte Proteine mit 200 μ M NPM behandelt (5 und 10 μ L Auftrag). Linker Blot: α -TatB, rechter Blot: α -TatC.

3.3.3 Der Transport von HiPIP bleibt unbeeinflusst von Bay11 und NPM

Banden von maturem HiPIP waren gleichermaßen in den periplasmatischen Fraktionen bei Anzuchten mit Bay11, NPM bzw. ohne Inhibitorsubstanz zu detektieren (Abb. 32). Die cytoplasmatischen HiPIP-Banden sind ebenfalls unter allen drei Versuchsbedingungen ähnlich stark (*precursor* und *mature* Bande). Somit ist der Transport des Tat-Substrates HiPIP unbeeinflusst von Bay11 und NPM

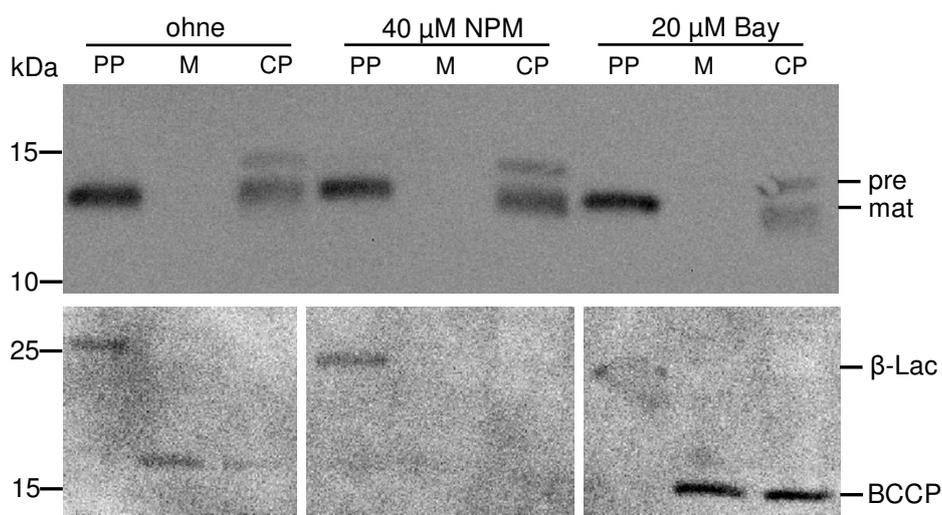


Abb. 32: Transportanalysen von HiPIP in Abhängigkeit von NPM und Bay11.

Gezeigt sind Immunoblots nach subzellulärer Fraktionierung. Periplasma (PP), Membran (M) und Cytoplasma (CP). Der obere Blot zeigt die Detektion mit α -HiPIP. Dabei wird zwischen dem transportierten, maturen HiPIP (*mat*) und dem nicht transportierten *precursor*-HiPIP (*pre*) unterschieden. Im unteren Blot erfolgte die Detektion fraktionsspezifischer Kontrollproteine. Periplasmatisch die β -Lactamase (β -Lac, β -Lactamase-AK) und cytoplasmatisch das Biotincarboxyl-Carrierprotein (BCCP) durch das StrepTactin-Konjugat; die leichte Detektion von BCCP in der Membranfraktion ist gewöhnlich. Unabhängig von der Zugabe von NPM oder Bay11 konnte ein Großteil von HiPIP in der maturen Form in der periplasmatischen Fraktion detektiert werden. Geringe Mengen *precursor* und matures HiPIP wurden im Cytoplasma detektiert.

3.3.4 Cysteine von TatC sind kein transportbeeinflussender Angriffspunkt für NPM

Es sollte eine mögliche Reaktion der Cysteine des Tat-Systems und eine damit verbundene Beeinflussung des Tat-Transports durch das thiolmodifizierende Agens NPM untersucht werden. Dabei wurde vergleichend der Transport in einem natürlichen TatABC-System und einem System ohne Cysteine getestet (die vier Cysteine von TatC wurden gegen Alanine ausgetauscht). In einem TorA-Aktivitätsassay wurden die periplasmatischen Fraktionen auf ein natives Gel aufgetragen. Es wiesen alle Aktivitätsbanden eine ähnliche Stärke auf und auch die Kontrolle im Coomassie-Gel zeigten gleichmäßig aufgetragene Proteinmengen (Abb. 33).

Somit hat eine mögliche Modifikation von NPM auf das cysteinhaltige TatC keine Inhibierung des Tat-Transports zur Folge. Auch wird das Tat-System nicht anderweitig durch NPM modifiziert, sodass eine Beeinträchtigung des TorA-Transportes stattfindet.

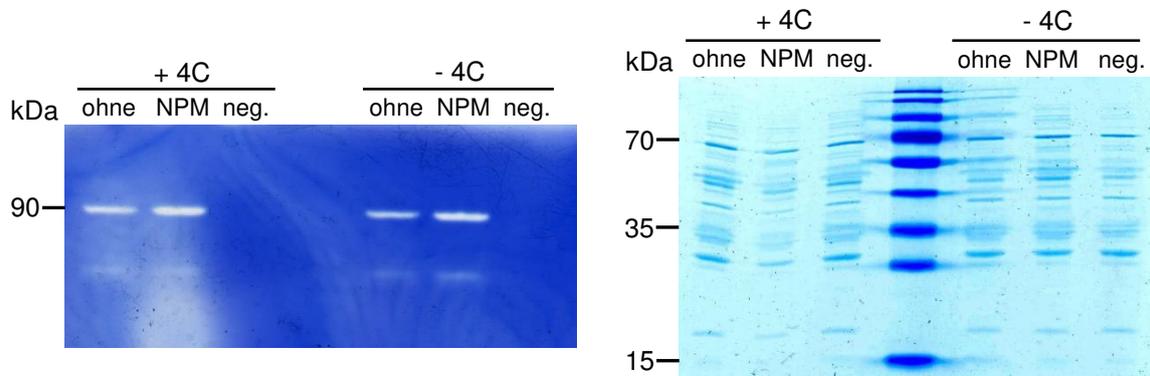


Abb. 33: NPM hat keinen transportbeeinflussenden Effekt auf die Cysteine von TatC.

Auftrag der periplasmatischen Fraktionen in einer nativen-PAGE. Links: TorA-Aktivitätsgel. TorA wurde bei etwa 90 kDa detektiert. In den ersten drei Spuren wurden Fraktionen der TatC-Variante mit Cysteinen (MC4100) aufgetragen, in den letzten drei Spuren Fraktionen der cysteinfreien Variante (DADE/pABS-*tatABC-4C*). Es wurden Kulturen ohne NPM (ohne) und mit 40 μ M NPM (NPM) getestet. In beiden war die TorA-Aktivität gleich stark. In der Negativkontrolle (neg.), wo keine Induktion von TorA stattfand, war kein TorA zu detektieren. Rechts: Coomassie-Gel zur Kontrolle auf gleiche Proteinmengen. Die im TorA-Assay eingesetzten periplasmatischen Fraktionen hatten demnach vergleichbare Proteinkonzentrationen.

3.3.5 Die periplasmatische TorA-Aktivität ist unbeeinflusst von Bay11 und NPM

Die periplasmatischen TorA-Banden spiegeln die Aktivität des Enzyms wider. Die Banden sind unter allen getesteten Versuchsbedingungen (20 μ M Bay11, 40 μ M NPM bzw. ohne „Inhibitor“) ähnlich stark (Abb. 34). Die TorA-Bande unter Versuchsbedingung „ohne Inhibitor“ ist etwas schwächer als die der beiden anderen. Eine Kontrolle der Proteinmengen im Coomassie-Gel zeigt eine leicht geringere Proteinmenge der Probe „ohne Inhibitor“ im Vergleich zu den Proben mit Bay11 und NPM. Dies erklärt die schwächere TorA-Aktivitätsbande ohne Inhibitor. Somit ist der Transport des Enzyms ins Periplasma durch die getesteten Substanzen nicht beeinflusst.

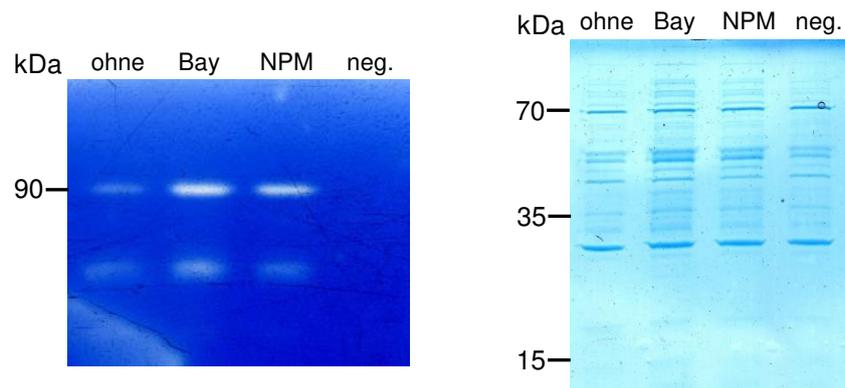


Abb. 34: Bay11 und NPM haben keinen Effekt auf die periplasmatische TorA-Aktivität.

Auftrag der periplasmatischen Fraktionen in einer nativen-PAGE von MC4100. Links: TorA-Aktivitätsgel. TorA wurde bei etwa 90 kDa detektiert. Es wurden Kulturen ohne „Inhibitorsubstanz“ (ohne), 20 mM Bay11 (Bay) und mit 40 μ M NPM (NPM) getestet. Die TorA-Aktivität war unter Berücksichtigung der aufgetragenen Proteinmengen vergleichbar. In der Negativkontrolle (neg.), wo keine Induktion von TorA stattfand, war kein TorA zu detektieren. Rechts: Coomassie-Gel zur Kontrolle auf gleiche Proteinmengen. Die im TorA-Assay eingesetzten periplasmatischen Fraktionen hatten demnach vergleichbare Proteinkonzentrationen, alleinig Probe „ohne“ war etwas schwächer konzentriert.

4. Diskussion

4.1 Einfluss der Phospholipidzusammensetzung der Cytoplasmamembran auf den Tat-Transport

4.1.1 Cardiolipin und Phosphatidylglycerol sind nicht spezifisch notwendig für den Tat-Transport

Cardiolipin (ClsABC)

Cardiolipin ist ein typisches Phospholipid der energetisierten Bakterienmembran und ist assoziiert mit Energie-transduzierenden Membranproteinkomplexen wie Komplex I, III und IV der Atmungskette oder Photosynthese-Reaktionszentren. Cardiolipin akkumuliert an den Polen der Zelle (Mileykovskaya und Dowhan 2000) und bildet dort Bereiche, in denen das Phospholipid konzentriert vorliegt, sogenannte *lipid rafts* oder Lipidflöße (Renner und Weibel 2011). Für einige Membranproteine konnte gezeigt werden, dass sie Cardiolipin-abhängig an den Zellpolen lokalisieren, wie beispielsweise für die Transporter ProP und MscS (Romantsov et al. 2010). Es gibt bereits einige Hinweise für eine hauptsächlich polare Lokalisation des Tat-Translokons in *E. coli*. Das Tat-System transportiert PMF-abhängig Substrate über die Cytoplasmamembran. Somit ist eine energetisierte Membran für Cardiolipin und das Tat-Translokons erforderlich. Dementsprechend wurde bereits eine Cardiolipin-abhängige Lokalisation und mögliche Assemblierung des Tat-Translokons an den Zellpolen von *E. coli* vermutet (Rose et al. 2013). Diese Hypothese wird verstärkt durch die Tatsache, dass eine entsprechende positive Beeinflussung des Sec-Transportsystems durch Cardiolipin gefunden werden konnte (Gold et al. 2010). CL ist fest an SecYEG gebunden und unterstützt die SecYEG-SecA-Komplexbildung. Ebenso stimuliert CL die ATPase-Aktivität von SecA.

Aus diesen Gründen ist eine CL-Abhängigkeit bei der Assemblierung der Komponenten und/oder des funktionellen Transports des Tat-Translokons naheliegend und wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Durch die in der Arbeit durchgeführten physiologischen und biochemischen Tests konnte erstmalig gezeigt werden, dass Cardiolipin in der Cytoplasmamembran von *E. coli* für einen funktionellen Transport von Substraten über das Tat-System nicht notwendig ist. Das Fehlen zeigte keinerlei Einschränkung auf die Effektivität der Translokation der Substrate HiPIP, TorA und der Amidasen AmiA und AmiC. Initiale Untersuchungen zu diesem Thema zeigte bereits Schlösser in ihrer Bachelorarbeit (Schlösser 2013).

Phosphatidylglycerol und Cardiolipin (PgsA)

In mehreren Studien konnte das Erfordernis von PG und/oder CL für das Sec-System gezeigt werden. Vrije et al. (1988) konnten in *in-vivo*-Studien Einschränkungen des Transportes von OmpA und PhoE bereits in Stämmen mit reduzierten Leveln von PG und CL nachweisen. Ebenso ergaben die Arbeiten von Lill et al. (1990) und Breukink et al. (1992), dass die Insertion von SecA, einem Schlüsselenzym des Sec-Wegs, PG für die Membraninsertion und für seine ATPase-Aktivität benötigt. Hingegen der Sec-Transport von Nika war in Stämmen mit reduzierten Leveln von PL und CL nicht beeinträchtigt (Mikhaleva et al. 1999). Es liegt auf der Hand, dass in *psgA*-Nullmutanten die Funktionalität des Sec-Systems sich komplett anders darstellt und stark beeinträchtigt sein kann.

Auch für das Tat-System gibt es Studien, die einen positiven Einfluss von negativ geladenen Phospholipiden auf das Tat-System zeigen. So wurde bereits eine Interaktion der amphipathischen Helix von TatA mit negativ geladenen Phospholipiden (Chan et al. 2011) nachgewiesen. Ebenso wurde eine verstärkte Interaktion des positive geladenen HiPIP-Signalpeptids mit negativ geladenen Phospholipiden in Lipidmonolayern beschrieben (Brehmer et al. 2012). Den deutlichsten Hinweis auf einen Abhängigkeit vom Tat-Transport erbrachte Mikhaleva et al. (1999) mit *in-vivo*-Transportstudien. Hier wurden starke Einschränkungen des Transports von TorA in Zellen mit auf etwa 40 % reduzierten PG/CL-Gehalten gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass keine spezifische Notwendigkeit von PG oder CL für eine volle Funktion des Tat-Systems in der Cytoplasmamembran besteht. Dies schließt auf der anderen Seite nicht aus, dass generell anionische Phospholipide eine Rolle für die Funktionalität des Tat-Transports spielen. Im folgenden Abschnitt wird näher diskutiert, wie andere negative geladene Biosynthesestufen PG und CL im $\Delta pgsA$ -Stamm ersetzen können.

4.1.2 Negativ geladene Biosynthesestufen der Phospholipide ersetzen bestimmte Funktionen von PG und CL

Sind spezifische negativ geladene Phospholipide notwendig für die volle Funktion des Tat-Systems? Initiale Untersuchungen zu diesem Thema zeigte bereits Schlösser in ihrer Bachelorarbeit (Schlösser 2013). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der *psgA*-Nullmutante UE54 auf TMAO-Minimalmedium exakt wie im Wildtyp stattfindet (3.1.2.1), sodass der TorA-Transport nicht eingeschränkt ist. In diesem Test ist unter

den Wachstumsbedingungen absolut kein PG vorhanden und auch CL nur in geringeren Konzentrationen als im WT (ca. 3,6 % verglichen mit 17 % im WT auf M9/Glycerol/O₂, Tab. 42). Somit konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass PG nicht spezifisch notwendig ist. Dass CL für das Tat-System nicht spezifisch erforderlich ist, wurde durch die Transportuntersuchungen mit der Cardiolipin-Tripelmutante BKT12 gezeigt. In der Literatur wurde bereits die ersetzende Funktion von Phospholipid-Biosynthesestufen für PG und CL diskutiert. So ist in einer *pgsA*-Mutante mit reduzierten Leveln PG und CL bereits ein erhöhter Anteil des Biosynthese-Vorläufermoleküls Phosphatidsäure (PA) festgestellt worden (Saha et al. 1996). Dabei stieg der Gehalt im Vergleich zum *pgsA*-Wildtyp von <0,1 % auf 3,8 % der Phospholipid-Gesamtmenge. Erhöhte Konzentrationen an Phosphatidsäure (PA) waren auch in dieser Arbeit bei der Stammkontrolle mittels DC im Vergleich von UE53 und UE54 zu sehen (Abb. 16), direkt unterhalb des PE-Spots. Gleichzeitig mit dem Anstieg von PA wurden auch die anionischen Lipide CDP-Diacylglycerol (CDP-DAG) und N-Acetylphosphatidylethanolamin (N-Acetyl-PE) in erhöhten Konzentrationen gefunden, sobald die anionischen Phospholipide PG und CL nicht mehr vorhanden waren (Kikuchi et al. 2000; Shiba et al. 2004; Mileykovskaya et al. 2009). In *pgsA*-Nullmutanten können diese sauren Intermediate die Eigenschaften von PG ersetzen, indem sie ebenso wie PG negative Ladungen in die Membran einführen (Matsumoto, 2001; Suzuki, 2002). Im Gegensatz zum Sec-System, für welches wie oben beschrieben (4.1.1) in einigen Fällen eine spezifische Abhängigkeit von PG und CL nachgewiesen werden konnte, kann das Tat-System offensichtlich diese Phospholipid-Komponenten für eine volle Funktionalität nutzen.

4.1.3 Es existiert ein *PgsA*-unabhängiger, alternativer Biosyntheseweg für PG und CL

Die Ausbildung von PG und CL im $\Delta pgsA$ -Stamm UE54 unter bestimmten Kultivierungsbedingungen warf die Frage nach einem alternativen Biosyntheseweg für die beiden anionischen Phospholipide auf. Die beiden Gene *ynbA* und *ynjF* aus der gleichen Familie der CDP-Alkohol-Phosphatidyltransferasen konnten in dieser Arbeit ausgeschlossen werden eine derartige Funktion zu übernehmen. Lipidextraktionen der Einzel- und Doppelknockouts von *ynbA* und *ynjF* zeigten unter den entsprechenden Wachstumsbedingungen noch immer eine gleich starke Ausbildung von PG und CL wie im reinen $\Delta pgsA$ -Stamm.

Es muss also einen anderen *in vivo* bislang noch nicht gezeigten Weg geben, PG und damit CL zu synthetisieren. Vorstellbar ist, dass eine andere Phosphatidyltransferase des

Phospholipidbiosynthesewegs dies bewerkstelligt. Naheliegender ist die Phosphatidylserinsynthase PssA. PssA nutzt als gemeinsames Substrat mit PgsA CDP-Diacylglycerol, Während PgsA das CDP-Diacylglycerol mit Glycerol-3-P umsetzt, katalysiert PssA die Reaktion mit L-Serin als zweites Substrat (Abb. 35). Einen deutlichen Nachweis, dass das PssA ein breites Substratspektrum besitzt und alternativ zu Serin auch Glycerol und Glycerol-3-P mit CDP-Diacylglycerol umsetzen kann, konnten Larson und Dowhan (1976) *in vitro* mit gereinigter Phosphatidylserinsynthase erbringen. Diese Reaktion fand zwar sehr langsam statt, war dennoch deutlich. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals *in vivo* in einer *pgsA*-Nullmutante die Ausbildung von PG und CL nachgewiesen werden. Unter Wachstumsbedingungen mit Glycerol als C-Quelle verstärkte sich die ungewöhnliche Ausbildung von PG und CL im Vergleich zu Wachstum auf komplexer C-Quelle (LB; Abb. 16). Es liegt nahe, dass die Zellen das als C-Quelle eingesetzte Glycerol als Substrat für die Katalyse mit CDP-DAG durch PssA verwenden. Genauer gesagt, wird Glycerol zunächst bei der Aufnahme in die Zelle durch die Glycerolkinase GlpK zu Glycerol-3-P phosphoryliert und dann in die Biosynthesewege eingeschleust.

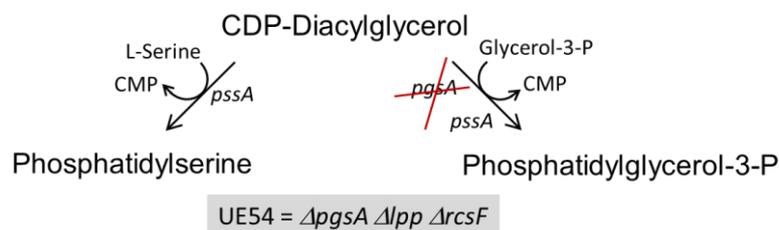


Abb. 35: Mögliche *in-vivo*-Nebenreaktion der Phosphatidylserin-Synthase (PssA). PssA nutzt anstelle von Serin auch Glycerol-3-P als Substrat, um zusammen mit CDP-Diacylglycerol den Weg zur PG-Synthese einzuleiten und die Reaktion zu Phosphatidylglycerol-3-P zu katalysieren.

Interessanterweise wurde in Abhängigkeit von der gegebenen C-Quelle mehr oder weniger PG oder CL gebildet. Bei Glucosegabe wurde verstärkt PG nachgewiesen, bei Glycerolverwertung mehr CL. Glycerol kann direkt als Glycerol-3-P in die Biosynthese über PG zu CL laufen, Glucose wird über Dihydroxyaceton ebenfalls zu Glycerol-3-P umgesetzt. Möglicherweise werden Enzyme der CL- oder PG-Bildung substratspezifisch (Glucose/Glycerol) aktiviert oder inhibiert, sodass es zu unterschiedlichen Gehalten an PG und CL in Abhängigkeit dieser C-Quellen kommt.

4.1.4 Membran- und Zellwandeigenschaften der *pgsA*-Mutante UE54

Schwächung der Zellhülle durch das Fehlen von Lpp und PgsA

Eine interessante Feststellung während der Durchführung der Transportassays, die eine subzelluläre Fraktionierung in Periplasmam, Membran und Cytoplasma beinhalteten, war eine völlig unzureichende Abtrennung der Fraktionen der *pgsA*-Mutante UE54 voneinander. Um die Translokation des Modellsubstrates HiPIP zu untersuchen, wurde die Standard-Fraktionierungsmethode durch osmotischen Schock (2.4.6.1) durchgeführt. Der Nachweis von HiPIP war anschließend kaum noch möglich, vor allem periplasmatisch waren meist weder HiPIP noch das Kontrollprotein β -Lactamase zu detektieren. Zusätzlich waren häufiger die cytoplasmatischen Fraktionen mit periplasmatischen Proteinen verunreinigt und die erwarteten cytoplasmatischen Proteine nur schwächer vorhanden. Auch ein TorA-Aktivitätsassay zeigte eine sehr starke Verunreinigung der periplasmatischen Fraktionen mit dem cytoplasmatischen BCCP (Daten nicht gezeigt).

Zu den schlechten Ergebnissen bei der subzellulären Fraktionierungen trägt zum großen Teil vermutlich das Fehlen des Braunschen Lipoproteins Lpp bei. In *E. coli* ist Lpp in der Äußeren Membran lokalisiert und dort entweder frei oder kovalent (Inouye, 1972) über ein C-terminales Lysin (Braun, 1969) mit dem Peptidoglycan verknüpft. Sowohl Instabilität (Suzuki, 1978) als auch erhöhte Permeabilität (Ni, 2007) der Äußeren Membran wurden bereits in früheren Studien in *E. coli* belegt, wenn das Braunsche Lipoprotein fehlte. Es zeigte sich, dass typische periplasmatische Proteine (zum Beispiel Alkalische Phosphatase, Suzuki, 1978) verstärkt ins umgebende Kulturmedium entlassen wurden. Lipoproteine und Lipopolysaccharide der Äußeren Membran haben eine Funktion als Barriere für periplasmatische Proteine nicht nach außen zu gelangen. Dennoch konnte der PL-Wildtyp UE53, dem ebenso wie UE54 das Braunsche Lipoprotein fehlt, recht gut und sauber mit osmotischem Schock fraktioniert werden. Es scheinen beide Effekte zusammen kommen zu müssen: das Fehlen von Lpp und PG und CL, um eine derartige Instabilität der Membranen zu erreichen und eine saubere Fraktionierung nicht möglich zu machen.

Die Deletion von *lpp* ist in der *pgsA*-Nullmutante notwendig, nur dann ist sie überlebensfähig. Dies ist auf folgenden Umstand zurückzuführen: Das Lipoprotein durchläuft eine Modifikation bei der Translokation über die Innere (Sec-Transport bei *E. coli*) hin zur Äußeren Membran. Dabei wird der Diacylrest eines PGs auf ein Cystein der Lipobox des Präprolipoproteins übertragen (Sankaran, 1994). Erst anschließend wird das Signalpeptid abgespalten und das Lipoprotein kann aus der Inneren Membran ins Periplasma entlassen werden. Dort gelangt es nach weiteren Modifikationen in die Äußere Membran, bleibt aber durch ein C-terminales

Lysin kovalent mit dem Peptidoglycan verknüpft. Ist nun wie in der *pgsA*-Mutante kein PG vorhanden, kann die Cysteinmodifikation mit dem Diacylrest nicht stattfinden und das Lpp bleibt in der Cytoplasmamembran stecken, da daraufhin auch keine Prozessierung des Signalpeptides stattfindet. Durch eine Verknüpfung eines C-terminalen Cysteins des Lpp mit dem Peptidoglycan wird eine anormale Assoziation von Innerer Membran mit dem Peptidoglycan hergestellt, was zur Lyse der Zellen führt (Suzuki, 2002). Zwar fehlt der *pgsA*-Mutante das so häufig vorkommende Lpp, jedoch sind andere Lipoproteine der Äußeren Membran wie Pal, LolB und OsmB immer noch vorhanden und können ebenfalls nicht den Prozessierungsschritt der Diacylierung des Cysteins mit PG durchlaufen. Dies resultiert scheinbar nicht in einer sofortigen Lyse der Zellen (wie beim Vorhandensein des Lpp), jedoch destabilisiert es die Zellhülle derart, dass die Zellen hypersensitiv gegenüber osmotischen Schocks bei der subzellulären Fraktionierung waren. Suzuki et al. (1978) zeigten, dass EDTA, welches im Sucrosepuffer beim osmotischen Schock verwendet wird, eine weitere instabilisierende Funktion ausübt. Auch „mildere“ Methoden zur Periplasmaabtrennung mit Sucrose-EDTA-Puffer (ohne anschließenden osmotischen Schock, Quan et al. 2013) oder Chloroform (ohne EDTA-Zusatz; (Ames et al. 1984)) erbrachten keine saubereren Fraktionen (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt das hohe Ausmaß der Instabilität der Zellmembranen gegenüber chemischen Einflüssen.

Wie bereits erwähnt, akkumuliert der Δlpp - $\Delta pgsA$ -Stamm Zwischenstufen der Phospholipidbiosynthese, vor allem Phosphatidsäure und CDP-Diacylglycerol (4.1.2). Diese Substanzen können *in vitro* auch als Substrate für die Lipoproteinmodifikation genutzt werden, jedoch geschieht dies sehr ineffizient (Sankaran, 1994). Somit können diese Substanzen die Translokation noch gewährleisten, haben aber eine unzureichende Funktion als PG-Ersatz für die Cysteinmodifikation am Lpp.

Im Zuge der Transportassays konnte ein weiterer Effekt hinsichtlich der Stabilität der Zellmembranen beobachtet werden (Abb. 18): Das anionische Detergenz SDS hatte in bestimmten Konzentrationen sowohl in UE53 (Δlpp) als auch UE54 ($\Delta lpp \Delta pgsA$) einen destabilisierenden Effekt und hemmt das Wachstum der Kulturen. Transportstudien über den SDS-Phänotyp sind dementsprechend im Δlpp -Hintergrund nicht sinnvoll. Bereits bei geringen Konzentrationen an SDS kam es zu verzögertem Wachstum. Hierbei wurde der Wachstumseffekt des Δlpp noch von $\Delta pgsA$ verstärkt. Bei UE53 trat bei 0,5 % SDS im Kulturmedium nur etwa 40 % des Wachstums, bei UE54 nur etwa 10 % des Wachstums im Vergleich zu 0 % SDS auf. Interessanterweise war das Wachstum von UE54 bei steigenden

SDS-Konzentrationen wieder besser (30 % des Wachstums bei 4 % SDS im Vergleich zu 0 % SDS). Dies deutet auf einen mehrfachen Effekt des SDS auf die Zellhülle hin. Zum einen auf einen negativen Effekt, der bei geringen Konzentrationen überwiegt: SDS ist ein anionisches Detergenz, das die Zellhülle durch das Herauslösen von Membranproteinen destabilisiert. Zum anderen auf einen positiven Effekt bei erhöhten SDS-Konzentrationen: SDS kann eventuell in höheren Konzentrationen durch Ladungsausgleich die negativen Ladungen von PG und CL ersetzen, der schädigende Effekt der Solubilisierung der Membranproteine wirkt sich bei hohen Konzentrationen nicht stärker auf das Wachstum aus.

Fehlendes PG und CL hebt den Kettenphänotyp in der Δ tatAE-Mutante auf

Eine *tatAE*-Mutation führt in *E. coli* dazu, dass die Amidasen AmiA und AmiC nicht mehr Tat-abhängig transportiert werden. Dies bedeutet, dass zwar die Zellen inklusive Cytoplasmamembran voneinander abgetrennt werden und auch ein Mureinseptum eingezogen wird. Allerdings kann das Mureinseptum nicht gespalten werden und die Zellen bleiben als Ketten aneinander hängen (Heidrich et al. 2001). Der *pgsA*-Wildtypstamm UE53 wies diesen Kettenphänotyp auf, wenn *tatAE* inaktiviert ist. Interessanterweise bildete die Δ *tatAE*-Variante der *pgsA*-Nullmutante keinen derartigen Phänotyp aus. Hier lagen zum großen Teil verkürzte Einzelzellen vor, vergleichbar mit UE54 mit funktionalem *tatAE*. Aus einem bestimmten Grund ist in diesem Stamm die vollständige Separation des Mureinsacculus wieder gegeben, was darauf hindeutet, dass entweder AmiA und AmiC wieder transportiert werden und das Tat-System an sich funktional ist oder dass die Sec-abhängig transportierte Amidase AmiB soweit überproduziert wird, dass sie die Funktion von AmiA und AmiC ersetzen kann. Wird *amiB* hochreguliert, wurde festgestellt, dass der Δ *tat*-SDS-Phänotyp wieder aufgehoben wurde und die Zellen SDS-resistenter wurden (Ize et al. 2003). Dies war im Stamm UE54 Δ *tatAE* nicht gegeben. Möglicherweise spielte hier das Fehlen von PG und/CL mit der zusätzlichen Deletion von *lpp* eine entscheidende Rolle. So kann es sein, dass AmiB hochreguliert wird, die Äußere Membran allerdings durch Δ *lpp* und Δ *pgsA* derart geschwächt ist, dass die Aufhebung des äußere-Membran-schwächenden Effekts von Δ *tat* nicht zu bemerken ist. Interessant wäre, ob in dem Stamm nur der Kettenphänotyp aufgehoben ist oder generell Tat-Transport möglich ist. Denkbar wäre, dass die Cytoplasmamembran durch das Fehlen von PG und CL derart geschwächt ist, dass die translozierende Domäne TatA (oder TatE) nicht mehr notwendig ist und TatBC die Translokation des Substrates über die Membran alleine bewerkstelligt. TatA wird in einem Tat-Modell als Komponente beschrieben, die die Translokation durch ein sogenanntes „*membrane weakening*“ ermöglicht (Brüser und Sanders 2003; Hou und Brüser

2011). TatA schwächt die Membran demnach durch eine lokal beschränkte Membranverdünnung durch eine Transmembranhelix, die kürzer ist als die Membrandicke. Diese wäre entsprechend nicht mehr notwendig, wenn die Membran an sich durch die *pgsA*-Deletion ohnehin geschwächt wäre. Um zu klären, ob der Stamm generell ohne *tatAE* Tat-Substrate transportiert, wären Transportassays mit UE54 Δ *tatAE* für weitere Tat-Substrate erforderlich.

4.1.5 Das zwitterionische PE ist notwendig für den Tat-Transport

PE ist in *E. coli* mit ca. 75 % Anteil am Gesamtphospholipidgehalt das am häufigsten vorkommende Phospholipid. Eine *pssA*-Nullmutation ist unter normalen Kultivierungsbedingungen lethal für den Stamm. PE besitzt keine Nettoladung und hat damit eine wichtige Funktion als inerter Bestandteil für die Integration anderer Membrankomponenten (DeChavigny et al. 1991). Es bildet hexagonale, nicht-Lipiddoppelschicht-(LDS)-Strukturen in Membranen aus. Diese Funktion ist unter anderem für die korrekte Faltung und Aktivität von Membranproteinen zwingend erforderlich (van der Does et al. 2000; Stubbs und Slater 1996). Wird dem Kultivierungsmedium eine erhöhte Konzentration an divalenten Kationen zugesetzt, ist die Δ *pssA*-Mutante wieder lebensfähig. Es konnte gezeigt werden, dass Cardiolipin die Eigenschaft hat, unter erhöhten Konzentrationen an divalenten Kationen die hexagonalen, nicht-LDS-Eigenschaften von PE anzunehmen und so die negative Nettoladung des Cardiolipins ausgeglichen wird (Rand und Sengupta 1972; DeChavigny et al. 1991; Rietveld et al. 1993; Rietveld et al. 1994). Grund für die Ausbildung der nicht-LDS-Strukturen scheint die Tatsache zu sein, dass eingeführte positive Ladungen die Abstoßung der negativ geladenen Kopfgruppen verringern. Dadurch werden die Kopfgruppen enger zusammengelagert und die Seitenketten nehmen im Verhältnis mehr Raum ein, was zu einer konischen Form des Cardiolipins führt (Rand und Sengupta 1972; Abb. 6). Eine gewisse ersetzende Funktion von PE durch CL beim Tat-Transport ist daher möglich und naheliegend. Dafür spricht auch, dass im PE defizienten Stamm GN10 der CL-Gehalt sehr stark erhöht ist (von 5-10 % im WT auf über 60 %; Saha et al. 1996) und damit allein mengenmäßig das fehlende PE substituiert. Versuche ein *cls*-Nullallel in einen *pssI*-Hintergrund zu bringen schlugen fehl (Nishijima et al. 1988), was nahelegt, dass diese Doppelmutation lethal zu sein scheint. Diese Mutationen bewirken stark reduzierte Level der entsprechenden Phospholipide. Kann also die verstärkte Produktion von Cardiolipin zur Kompensation der *pssA*-Mutation in

der Zelle nicht mehr erfolgen, ist es nicht möglich, PE durch eine andere Komponente zu ersetzen.

Die gezeigte kompensatorische Wirkung des Cardiolipins ist allerdings nicht für die Funktionalität von Sec- und Tat-System ausreichend. Zwar konnte in *in-vitro*-Experimenten beim Transport von Substraten durch das Sec-System gezeigt werden, dass zwar nicht-LDS-ausbildende Phospholipide notwendig für die Translokation sind (Rietveld et al. 1995), dass jedoch PE nicht spezifisch notwendig ist und CL die Funktion von PE ersetzen kann, sofern divalente Kationen in erhöhten Konzentrationen vorliegen. In *in-vivo*-Experimenten wurde allerdings entgegengesetzt dazu gezeigt, dass der Transport des Sec-Substrates PhoA und MalE durch das Fehlen von PE beeinträchtigt ist (Mikhaleva et al. 1999, Mikhaleva et al. 2001). Für das Tat-System wurde sowohl in der Studie von Mikhaleva et al. (1999) als auch in den Experimenten dieser Arbeit gezeigt, dass das Tat-System unter PE-Defizienz nicht mehr funktional ist, selbst wenn dem Kulturmedium 50 mM MgCl₂ zugesetzt sind. Auch hier reicht die nicht-LDS-Eigenschaft des CL nicht aus, sondern PE muss noch weitere notwendige Funktionen besitzen, die spezifisch sind und nicht ersetzt werden können

Bereits im Wachstum der *pssA*-Nullmutante gab es weitreichende Einschränkungen, die CL nicht beheben kann: Kolonien dieses Stammes, die sich über Nacht gebildet haben, waren sehr klein. Um mit Wildtypstammgröße vergleichbare Kolonien zu erhalten, ließ man diese 2 Tage wachsen. Auch in der Flüssigkultur war die Zellteilung verlangsamt und der Zell-Phänotyp zeigte starke Defekte. Zellen von GN10 bildeten sehr lange, teilweise unförmige und unseptierte Filamente mit Ausstülpungen und beulenartigen Fortsätzen. Zusätzlich reagierte der Stamm auf jegliche getestete Behandlung mit Chemikalien für die Abtrennung periplasmatischer Proteine mit der Lyse der Zellen. Die ersetzende Funktion von PE durch CL ist aufgrund der hier genannten Punkte allenfalls eingeschränkt und nur in bestimmten Aspekten (*in-vitro*-Sec-Transport) gültig.

4.2 Quervernetzung von TatA

Die Quervernetzungsexperimente mit Einzelaustauschen im N-Terminus von TatA zeigten eine starke Dimerbildung von TatA und somit die eindeutige Lokalisation des N-Terminus im oxidativen Periplasma oder der Membran an. Dies war sowohl *in vivo* bei aktivem Tat-Transport als auch bei inaktiviertem Tat-System durch den TatC-Austausch P48A der Fall. Die Substitution P48A in der ersten periplasmatischen Schleife von TatC störte die Interaktion von

TatB und TatC, sodass die Ausbildung des TatBC-Komplexes verhindert wird (Barrett et al. 2005). In beiden Fällen (Transport/ kein Transport) war die Stärke der Dimerbildung gleich, was darauf schließen lässt, dass keine transportinduzierte Konformationsänderung von TatA stattfindet, bei der der N-Terminus das Periplasma verlässt. Auch eine Distanzänderung der N-Termini horizontal zur Membran während des Transportes scheint nicht gegeben. Ist die TatBC-Komplexbildung durch den P48A-Austausch gestört, ist folgerichtig eine Rekrutierung von TatA an den Komplex nicht mehr gegeben. Barrett et. al (2005) konnten jedoch immer noch eine veränderte Form von TatABC-Komplexen in *E.-coli*-Membranen nachweisen, die allerdings stark in ihrer TatB:TatC-Stöchiometrie vom Wildtyp-Tat-System abwichen. Die hier vorliegenden Daten weisen dennoch auf eine ebenso eng benachbarte Lage der TatA-Monomere hin, wie im Falle des aktiven Transportes. Somit liegt TatA in der Membran unabhängig von der Funktionalität des Tat-Systems und der Ausbildung eines stabilen BC-Komplexes als Multi- oder zumindest Dimer vor, was ebenfalls durch die Daten von Barrett et al. (2005) nachgewiesen wird. In der Studie zeigte TatA mit dem P48A-Austausch im TatC im nativen Gel das gleiche Oligomerisierungsverhalten („TatA-Leiter“) wie TatA im funktionellen System.

Zum anderen kann aus der hier gezeigten Dimerbildung von TatA die Flexibilität des N-Terminus abgelesen werden. Beide Varianten G2C und G3C zeigen gleich starke Dimerbildung. Würde der N-Terminus eine „starre“ Konformation besitzen und eine feste Ausrichtung haben, wäre die Dimerbildung an einer Interaktionsstelle im N-Terminus weniger stark ausgeprägt als an der anderen. G2 und G3 von TatA gehören laut Strukturvorhersagen bereits zur Transmembranhelix (Hicks et al. 2003), jedoch sind Glycine sehr flexible Aminosäurereste, die am N-terminalen Ende von TatA liegen. Somit kann sich der äußerste N-Terminus von TatA scheinbar sehr flexibel ausrichten.

Ein weiterer Aspekt ist die Ausbildung von Disulfiden in der A42C-Variante. Die Lokalisation der APH von TatA wurde bei Greene et al. (2007) als rein cytoplasmatisch angesehen. Die ebenso von Greene et al. (2007) beobachtete Disulfidbildung wurde als Artefakt durch nachträgliche Dimerbildung bei der Membranpräparation ohne Zugabe eines modifizierendes Agens verstanden. Diese konnten sie durch die Zugabe von NEM vollständig unterdrücken und ausschließlich monomeres TatA detektieren. In der vorliegenden Arbeit war dies niemals der Fall. NEM oder IAA wurde sofort nach der Zellernte zum Zellpellet zugefügt, sodass die nachträgliche Bildung von Disulfiden maximal verringert wurde. Unabhängig von der Gabe von IAA oder NEM trat stets eine leichte bis mäßig starke Dimerbildung auf.

Für eine benachbarte Lage der amphipatischen Helices und damit Möglichkeit zur Disulfidbildung sprechen die neueren Daten von Zhang et al. (2014). Hier wurde eine Seite-an-Seite-Lokalisation von zwei TatA-Monomeren in einer L-Konformation gezeigt. Dass die APH eine Konformationsänderung aus dem reduktiven Cytoplasma in die Membran vollzieht, zeigen Walther et al. (2013). Somit wäre demnach eine zumindest zeitweise Lokalisation der A42C-Position in oxidativer Umgebung realistisch und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit.

4.2.1 Dimeres TatA ist funktionsfähig

Der Transport von Tat-Substraten war durch die einfache Quervernetzung des N-Terminus nicht gestört. Weder veränderten die Einzelaustausche G2C und G3C die Konformation des TatA-Monomers derart, dass der Transport beeinträchtigt ist, noch schien die Quervernetzung zweier TatA-Protomere die Konformation und Flexibilität derart zu mindern, dass die Fähigkeit Tat-Substrate über die Membran zu transportieren gestört ist. Dies kann durch die Arbeit von Greene et al. (2007) bestätigt werden, wo ein funktionsfähiges Tat-Translokon mit den G2C- und G3C-Varianten nachgewiesen werden kann. Etwa 80-90 % des gesamten TatAs liegen sowohl bei der G2C- als auch bei der G3C-Variante in der Dimerform vor. Trotzdem war hier der Transport von HiPIP ebenso gut wie mit Wildtyp-TatA. Zwar lag TatA bei keiner Variante vollständig als quervernetztes Dimer vor, jedoch sollten Einschränkungen des Tat-Transportes zu sehen sein, wenn das Dimer nicht funktional wäre und nur das verbleibende monomere TatA in den Varianten den Transport übernehmen würde. Der Zell-Phänotyp der TatA-Varianten mit N-terminalen Cysteinen wies in die gleiche Richtung: Die Zellen der Einzelcysteinaustausche zeigten den typischen Phänotyp einer exponentiellen *E.-coli*-Kultur. Kurze Stäbchen oder sich in der Teilung befindende Zellen waren charakteristisch. Die Amidasen wurden wie im TatA-Wildtyp transportiert.

Die A42C-Variante transportierte ohne Einschränkungen HiPIP und die Amidasen. Bei der eher schwach auftretenden Dimerbildung kann allerdings nicht über eine als Dimer funktionierende, an der APH quervernetzte TatA-Variante spekuliert werden, sondern nur gezeigt werden, dass die Cysteinvariante als Monomer komplett funktionell war. Das Alanin an der Position 42 scheint keine zwingend konservierte und funktionell wichtige Position zu sein. Die mögliche Konformationsänderung von TatA durch den Austausch mit dem Cystein an der Position stört den Transport offensichtlich nicht. Im Gegensatz dazu steht die Studie von Greene et al. (2007):

Ein A42C-Austausch zeigte keine Disulfidbildung, jedoch einen völligen Verlust der Funktionalität. Möglicherweise kann die Variante noch kleinere Substrate transportieren -wie die hier getesteten Amidasen und HiPIP-, ist jedoch nicht in der Lage das etwa 90 kDa große TorA zu translozieren.

4.2.2 Weitere Quervernetzung des N-Terminus verhindert den Transport, nicht aber die Integration von TatA in die Membran

In 4.2.1 wurde die Funktionalität von TatA als Dimer besprochen und dass die volle Funktionalität des Tat-Systems nicht ausschließlich auf die restliche, nicht quervernetzte Monomerform zurückzuführen sein kann. Dass TatA *in vivo* ohne kovalente Quervernetzungen verschiedenen Oligomerisierungsstufen annimmt, konnte bereits gezeigt werden (Barrett et al. 2005). Während des Transports ermöglicht oligomeres TatA den Membrandurchtritt des Substrates. Möglicherweise ist der Grad der Oligomerisierung abhängig von der Substratgröße (Gohlke et al. 2005), was auch die verschiedenen Stufen bei der Quervernetzung durch den Doppelcysteinaustausch G2C; G3C und die TatA-Netzwerkbildung in der Blue-Native-PAGE bei Barrett et al. (2005) erklärt. Die spontane Disulfid-Quervernetzung von mehreren N-Termini untersteicht die *in-vivo*-Clusterung dieser Bereiche von TatA. Das Zusammenspiel dieser flexiblen Reste spielt möglicherweise eine bedeutende Rolle bei der lokalen Störung der Membranintegrität und ermöglicht somit den Substraten die Membranpassage. In Abb. 36 wird die Zusammenlagerung oligomeren TatAs und der N-Termini dargestellt.

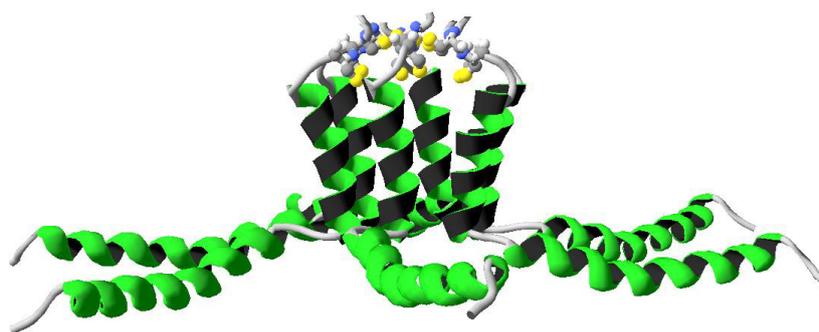


Abb. 36: N-Termini von TatA in räumlicher Nähe zueinander. Darstellung von 6 TatA-Protomeren. Senkrechte Helices entsprechen den Transmembranbereichen, die waagrecht liegenden Helices stellen die amphipatischen Bereiche von TatA dar.

Wichtig für die Funktionalität von TatA scheint allerdings eine gewisse Flexibilität und Konformation des N-Terminus zu sein. Wird dieser über mehrfache Quervernetzungen über G2 und G3 fixiert, ist der Transport von Tat-Substraten nicht mehr möglich. Auffällig war allerdings

ein hoher Anteil monomeren, nicht quervernetzten TatAs in der Doppelcysteinmutante G2C;G3C. Auch dieses war nicht funktional. Da die Einzelaustausche beider Positionen keinen Einfluss auf der Transport hatten, nimmt der N-Terminus des monomeren TatAs der G2C;G3C-Variante durch den Austausch beider Glycine gegen Cysteine eine Konformation ein, die einen absoluten Verlust der Funktionalität zur Folge hat.

Ausgeschlossen werden kann, dass eine unvollständige inkorrekte Integration der G2C;G3C-Doppelcysteinvariante von TatA den Verlust der Funktionalität hervorruft. Die Carbonatwaschung der Membran zeigte, dass diese Variante von TatA komplett in die Membran integrierte. Zu bemerken ist hierbei, dass alle in der Arbeit vorliegenden Experimente mit TatA ohne einen zusätzlichen Solubilisierungsschritt von TatA aus der Membran mit einem Detergenz erfolgten, wie es bereits gezeigt wurde (Mehner 2011). Somit ist TatA an sich nicht fest in der Membran integriert. Quervernetztes, oligomeres TatA ließ sich ebenso wie monomeres TatA im SDS-PAGE-Puffer aus der Membran lösen. Das Solubilisierungsverhalten ist offensichtlich nicht vom Grad der Quervernetzung von TatA-Protomeren abhängig, denn der Gesamtgehalt an detektiertem TatA ist zwischen den nicht-Quervernetzten und quervernetzten Varianten sehr ähnlich.

Werden die Quervernetzungen nicht durch zwei Austausche am N-Terminus vorgenommen, sondern jeweils einer im N-Terminus (G2C oder G3C) und einer in der APH (A42C) können ebenfalls oligomere TatA-Assoziationen ausgebildet werden, die im Falle von G3C;A42C bis zum Tetramer gehen. Diese Varianten sind nicht völlig funktionslos, erlauben schwachen HiPIP-Transport und guten AmiA und AmiC-Transport. Diese Varianten können theoretisch durch die derart platzierten Cysteine eine Reihe von Quervernetzungen eingehen, weshalb höchstwahrscheinlich nicht alle TatA-Signale die typische Laufhöhe in der SDS-PAGE haben. Erstens kann sich eine intramolekulare Disulfidbindung ausbilden, was das Molekül kompakter machen und eine niedrigere Laufhöhe in der SDS-PAGE zur Folge haben könnte. Diese Möglichkeit würde allerdings (zumindest temporär) eine räumliche Nähe vom N-Terminus (G2C bzw. G3C) und dem Ende der APH (A42C) (z. B. durch eine Konformationsänderung während des Transportes) voraussetzen. Gouffi et al. (2004) zeigten in ihrem Modell des Transportes eine enge Lage der TMH und der APH. Dies könnte die 20-kDa-Bande in der G2C;A42C-Variante erklären. Zweitens können sich Disulfide zwischen Cysteinen gleicher Position zweier TatA-Monomere ausbilden, was der Oligomerbildung im Einzelaustausch entspricht. Diese Quervernetzung ist *in vivo* auch die wahrscheinlichste, wenn während des Transportes stets die TatA-Protomere die gleiche Lage und Konformation zueinander einnehmen. Drittens

kann das gleiche zwischen Cysteinen unterschiedlicher Positionen in TatA unter Protomeren auftreten. Voraussetzung hierfür ist wie unter erstens eine Konformationsänderung, damit die Reste zweier voneinander auf dem Protein entfernter Austausch in räumliche Nähe des jeweils anderen Rests auf einem weiteren Protomer gelangen. Die amphipathische Helix müsste in räumliche Nähe des N-Terminus gelangen oder umgekehrt.

4.2.3 TatA der Cytoplasmafraktion stammt aus der Membran

In der Literatur wurde bereits in verschiedenen Organismen die Ausbildung löslichen TatAs beschrieben. Dieses wurde sowohl in Eubakterien, Archaeen und pflanzlichen Plastiden gefunden (Pop et al. 2003; Dilks et al. 2005; Frielingsdorf et al. 2008). In dem Zuge wurde auch die Bindung von Tat-Substraten an eben diese Fraktion von TatA nachgewiesen und über die Aufgabe dieser Subpopulation von TatA spekuliert (Keersmaecker et al. 2007; Schreiber et al. 2006; Taubert et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit zeigten Untersuchungen von cytoplasmatischen mit Membranfraktion eine vergleichbare Bildung von Disulfidbindungen in den TatA-Varianten G2 sowie S27. Die Disulfidbindung zwischen Cysteinen sollte aufgrund des prinzipiell reduzierenden Milieus des Cytoplasmas nicht stattfinden. Zwar gibt es Beispiele für die Ausbildung solcher Bindungen im Cytoplasma wie für die Ribonukleotidreduktase (Aberg et al. 1989) oder für die Regulation des Transkriptionsfaktors OxyR (Zheng et al. 1998) im Zusammenspiel mit Thioredoxin/Glutaredoxin, jedoch werden diese Reaktionen spezifisch über Enzyme katalysiert und reguliert. Für TatA ist es im natürlichen System extrem unwahrscheinlich, dass so eine spezifische Umgebung durch ein derartiges System geschaffen wird, da die Cysteine künstlich in TatA eingebracht wurden und der Mechanismus von vornherein unsinnig für ein natürliches cysteinloses TatA wäre. Vielmehr liegt der Schluss nahe, dass „lösliches cytoplasmatisches“ TatA in der lebenden Zelle ebenso membranintegriert mit einem periplasmatisch orientierten N-Terminus vorlag und sich präparationsbedingt bei den Fraktionierungsschritten aus der Membran gelöst hat. Dass TatA mit seiner einfachen Transmembranhelix nicht allzu fest in der Membran verankert ist und sich leicht herauslöst, zeigt bereits die Tatsache, dass sich TatA der Membranfraktion ohne Solubilisierungsschritt in der SDS-PAGE auftrennen lässt und auf monomerer Größe zu detektieren ist. Die vorliegenden Daten können nicht ausschließen, dass geringe Mengen löslichen TatAs existieren, und dass diese Subpopulation eine separate Aufgabe im Cytoplasma erfüllt -wie die Bindung von Substraten an TatA und eine mögliche Rekrutierung dieser an die Membran-, jedoch deutet die oxidative Disulfidbildung des löslichen TatAs auf eine N-terminale Lokalisation von TatA im

Periplasma hin. Somit könnten es nur katalytische Mengen TatAs sein, die eine tatsächliche Funktion im Cytoplasma erfüllen.

4.2.4 Abfluss der Elektronen bei der Disulfidbildung wird weder durch das Dsb-System bewerkstelligt, noch ist ein bestehender Elektronenfluss über Komponenten der Atmungskette notwendig

Zur Ausbildung von Disulfidbrücken und somit zur Quervernetzung ist eine Oxidation und somit ein Abtransport von Elektronen von den Cysteinresten von TatA notwendig. Im Periplasma und in der Cytoplasmamembran ist das Dsb-System für diese Reaktion und die Elektronenübernahme bei der Entstehung von Disulfiden zuständig. Dabei übernimmt DsbA als lösliches periplasmatisches Protein unter Ausbildung von zwei Thiol-Gruppen die Elektronen und überträgt diese auf ein Disulfid im membranständigen DsbB. Dieses schleust die Elektronen direkt in den Chinonpool der Membran ein. Greene et al. (2007) sahen bereits, dass ein *knockout* von DsbA die Ausbildung der Disulfide in TatA nicht verhindern konnte. Vorstellbar war es allerdings, dass die Elektronen direkt vom DsbB übernommen werden konnten. Um eine vollständige Beteiligung des Dsb-Systems auszuschließen, wurde hier das Gen *dsbB* für die membranständige Komponente des Dsb-Systems ausgeschaltet und die Disulfidbildung beobachtet. Auch die Inaktivierung von DsbB hatte keinen Einfluss auf die Ausbildung der Disulfide in TatA. Die Dimerbildung in den Einzelsysteinaustauschen war +/- *dsbB* gleich (Abb.29).

Auch ist kein gleichzeitig bestehender Elektronenfluss an den membranständigen Komponenten der Atmungskette notwendig, um den Abtransport der Elektronen bei der Disulfidbildung zu gewährleisten. Sowohl bei aerober und anaerober Atmung als auch bei Gärung wurden gleichermaßen Disulfide zwischen den Cysteinen von TatA gebildet (Abb.30). Scheinbar sind auch bei gärender Lebensweise Chinone oder ähnliche Komponenten in der Cytoplasmamembran vorhanden, die einen effektiven Elektronenabtransport gewährleisten können.

4.3 *In-vivo*-Tat-Transport ist unbeeinflusst durch Bay11 und NPM

In *P. aeruginosa* konnten zwei Komponenten, Bay11-7082 (Bay) und N-Pyrenylmaleimide (NPM), in einem Hochdurchsatz-Screening identifiziert werden, die eindeutig den Tat-abhängigen Transport der hämolytischen Phospholipase C (PlcH, Vasil et al. (2012)) inhibierten.

Bay und NPM reagieren chemisch mit Cysteinresten von Aminosäuren. Im Tat-System von *P. aeruginosa* ist nur ein einziger Cysteinrest vorhanden (C208 in TatC). Dieser liegt geschützt in der TatC-Struktur (Rollauer et al. 2012) und wird dementsprechend als unwahrscheinlich für einen Angriffspunkt der beiden Inhibitoren angesehen. Das *E.-coli*-Tat-System besitzt vier Cysteine, die durch beide Substanzen modifiziert werden könnten. Abgeleitet von der Inhibition des *P.-aeruginosa*-Tat-Systems ist allerdings eine Interaktion wahrscheinlich, die eine nicht-kovalente Bindung einer Tat-Komponente mit dem Inhibitor beinhaltet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Substanzen auch in *E. coli* den Tat-Transport einschränken. *In-vivo*-Transportanalysen zeigten absolut keine inhibitorische Wirkung von Bay und NPM. Eine neue Studie aus diesem Jahr (2016), die ebenfalls Bay11 und NPM auf den *E.-coli*-Tat-Transport *in vivo* testeten, bestätigte dieses Ergebnis (Bageshwar et al. 2016). In diesen Untersuchungen wurde ebenfalls ein Hochdurchsatz-Screening mit etwa 380.000 möglicher Inhibitoren des Tat-Systems *in vivo* und *in vitro* durchgeführt. Einige der getesteten Substanzen inhibierten indirekt das Tat-System, indem sie das Membranpotential $\Delta\psi$ zerstörten. Keine der getesteten Substanzen zeigte die direkte Inhibition und Interaktion mit einer Tat-Komponente. Spezifische Inhibitoren des Tat-Systems zu finden ist von großem Interesse, da der Tat-Transport für die Pathogenität vieler Bakterien wichtig ist (Buck et al. 2008). Durch den Einsatz kleiner, spezifisch am Tat-System wirkender Substanzen wäre die Bekämpfung von antibiotikaresistenten Organismen denkbar. Da das Tat-System in tierischen und damit menschlichen Zellen nicht auftritt, wäre eine spezifische Wirkung auf eine Tat-Komponente unbedenklich für die Gesundheit des menschlichen Organismus. Dementsprechend sind weitere verbesserte Screeningverfahren auf Tat-Inhibitoren von höchstem Interesse.

Literaturverzeichnis

- Aberg, A.; Hahne, S.; Karlsson, M.; Larsson, A.; Ormö, M.; Ahgren, A.; Sjöberg, B. M. (1989): Evidence for two different classes of redox-active cysteines in ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. In: *J. Biol. Chem.* 264, S. 12249–12252.
- Alami, M.; Lüke, 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*. In: *Mol. Cell* 12, S. 937–946.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2002): *The Lipid Bilayer*. New York: Garland Science.
- Ames, G. F. (1968): Lipids of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: Structure and Metabolism. In: *J. Bacteriol.* 95 (3), S. 833–843.
- Ames, G. F.; Prody, C.; Kustu, S. (1984): Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. In: *J. Bacteriol.* 160, S. 1181–1183.
- Attard, G. S.; Templer, R. H.; Smith, W. S.; Hunt, A. N.; Jackowski, S. (2000): Modulation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase by membrane curvature elastic stress. In: *PNAS* 97, S. 9032–9036.
- Bachmann, B. J. (1972): Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. In: *Bacteriol. Rev.* 36, S. 525–557.
- Bachmann, J.; Bauer, B.; Zwicker, K.; Ludwig, B.; Anderka, O. (2006): The Rieske protein from *Paracoccus denitrificans* is inserted into the cytoplasmic membrane by the twin-arginine translocase. In: *FEBS J.* 273, S. 4817–4830.
- Bageshwar, U. K.; Musser, S. M. (2007): Two electrical potential-dependent steps are required for transport by the *Escherichia coli* Tat machinery. In: *J. Cell Biol.* 179, S. 87–99.
- Bageshwar, U. K.; Verplank, L.; Baker, D.; Dong, W.; Hamsanathan, S.; Whitaker, N. et al. (2016): High Throughput Screen for *Escherichia coli* Twin Arginine Translocation (Tat) Inhibitors. In: *PLOS ONE* 11, e0149659.
- Barrett, C.M.L.; Mangels, D.; Robinson, C. (2005): Mutations in Subunits of the *Escherichia coli* Twin-arginine Translocase Block Function via Differing Effects on Translocation Activity or Tat Complex Structure. In: *J. Mol. Biol.* 347, S. 453–463.
- Behrendt, J.; Brüser, T. (2014): The TatBC complex of the Tat protein translocase in *Escherichia coli* and its transition to the substrate-bound TatABC complex. In: *Biochemistry* 53, S. 2344–2354.
- Berks, B. C. (1996): A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? In: *Mol. Microbiol.* 22, S. 393–404.
- Berthelmann, F.; Brüser, T. (2004): Localization of the Tat translocon components in *Escherichia coli*. In: *FEBS letters* 569, S. 82–88.
- 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*. In: *J. Biol. Chem.* 283, S. 25281–25289.
- Bligh, E. G.; Dyer, W. J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. In: *Can. J. Biochem. Phys.* 37, S. 911–917.
- Bogsch, E. G.; Brink, S.; Robinson, C. (1997): Pathway specificity for a Δ pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a ‘Sec-avoidance’ motif in the transfer peptide and a ‘Sec-incompatible’ mature protein. In: *EMBO J.* 16, S. 3851–3859.

- Bolhuis, A.; Mathers, J. E.; Thomas, J. D.; Barrett, C. M.; Robinson, C. (2001): TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. In: *J. Biol. Chem.* 276, S. 20213–20219.
- Botelho, A. V.; Gibson, N. J.; Thurmond, R. L.; Wang, Y.; Brown, M. F. (2002): Conformational energetics of rhodopsin modulated by nonlamellar-forming lipids. In: *Biochemistry* 41, S. 6354–6368.
- Brehmer, T.; Kerth, A.; Graubner, W.; Malesevic, M.; Hou, B.; Brüser, T.; Blume, A. (2012): Negatively Charged Phospholipids Trigger the Interaction of a Bacterial Tat Substrate Precursor Protein with Lipid Monolayers. In: *Langmuir* 28, S. 3534–3541.
- Breukink, E.; Demel, R. A.; Korte-Kool, G. de; Kruijff, B. de (1992): SecA insertion into phospholipids is stimulated by negatively charged lipids and inhibited by ATP. A monolayer study. In: *Biochemistry* 31, S. 1119–1124.
- Brüser, T.; Sanders, C. (2003): An alternative model of the twin arginine translocation system. In: *Microbiol. Res.* 158 (1), S. 7–17.
- Brüser, T.; Yano, T.; Brune, D. C.; Daldal, F. (2003): Membrane targeting of a folded and cofactor-containing protein. In: *FEBS J.* 270, S. 1211–1221.
- Buck, E. de; Lammertyn, E.; Anne, J. (2008): The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence. In: *Trends Microbiol.* 16, S. 442–453.
- Buck, E. de; Vranckx, L.; Meyen, E.; Maes, L.; Vandersmissen, L.; Anne, J.; Lammertyn, E. (2007): The twin-arginine translocation pathway is necessary for correct membrane insertion of the Rieske Fe/S protein in *Legionella pneumophila*. In: *FEBS letters* 581, S. 259–264.
- Chan, Catherine S.; Haney, Evan F.; Vogel, Hans J.; Turner, Raymond J. (2011): Towards understanding the Tat translocation mechanism through structural and biophysical studies of the amphipathic region of TatA from *Escherichia coli*. In: *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes* 1808, S. 2289–2296.
- Cherepanov, P. P.; Wackernagel, W. (1995): Gene disruption in *Escherichia coli*. TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. In: *Gene* 158, S. 9–14.
- Cristóbal, S.; de Gier, J.-W.; Nielsen, H.; von Heijne, G. (1999): Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. In: *EMBO J.* 18 (11), S. 2982–2990.
- Cronan, J. E. (1968): Phospholipid alterations during growth of *Escherichia coli*. In: *J. Bacteriol.* 95.
- Cronan, J. E. (2003): Bacterial membrane lipids: where do we stand? In: *Annu. Rev. Microbiol.* 57, S. 203–224.
- Cullis, P. R.; Kruijff, B. de (1979): Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. In: *Biochim. Biophys. Acta - Reviews on Biomembranes* 559, S. 399–420.
- Curran, A. R.; Templer, R. H.; Booth, P. J. (1999): Modulation of folding and assembly of the membrane protein bacteriorhodopsin by intermolecular forces within the lipid bilayer. In: *Biochemistry* 38, S. 9328–9336.
- Datsenko, K. A.; Wanner, B. L. (2000): One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. In: *PNAS* 97, S. 6640–6645.
- DeChavigny, A.; Heacock, P. N.; Dowhan, W. (1991): Sequence and inactivation of the *pss* gene of *Escherichia coli*. Phosphatidylethanolamine may not be essential for cell viability. In: *J. Biol. Chem.* 266, S. 5323–5332.
- Dilks, K.; Gimenez, M. I.; Pohlschroder, M. (2005): Genetic and biochemical analysis of the twin-arginine translocation pathway in halophilic archaea. In: *J. Bacteriol.* 187, S. 8104–8113.

- Ding, Z.; Christie, P. J. (2003): *Agrobacterium tumefaciens* Twin-Arginine-Dependent Translocation Is Important for Virulence, Flagellation, and Chemotaxis but Not Type IV Secretion. In: *J. Bacteriol.* 185, S. 760–771.
- Duong, F.; Wickner, W. (1997): The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. In: *EMBO J.* 16, S. 4871–4879.
- Frielingsdorf, S.; Jakob, M.; Klösigen, R. B. (2008): A stromal pool of TatA promotes Tat-dependent protein transport across the thylakoid membrane. In: *J. Biol. Chem.* 283, S. 33838–33845.
- Gohlke, U.; Pullan, L.; McDevitt, C. A.; Porcelli, I.; Leeuw, E. de; Palmer, T. et al. (2005): The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. In: *PNAS* 102, S. 10482–10486.
- Gold, V. A. M.; Robson, A.; Bao, H.; Romantsov, T.; Duong, F.; Collinson, I. (2010): The action of cardiolipin on the bacterial translocon. In: *PNAS* 107, S. 10044–10049.
- Gouffi, K.; Gerard, F.; Santini, C.-L.; Wu, L.-F. (2004): Dual topology of the *Escherichia coli* TatA protein. In: *J. Biol. Chem.* 279, S. 11608–11615.
- Greene, N. P.; Porcelli, I.; Buchanan, G.; Hicks, M. G.; Schermann, S. M.; Palmer, T.; Berks, B. C. (2007): Cysteine scanning mutagenesis and disulfide mapping studies of the TatA component of the bacterial twin arginine translocase. In: *J. Biol. Chem.* 282, S. 23937–23945.
- Haldimann, A.; Wanner, B. L. (2001): Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. In: *J. Bacteriol.* 183, S. 6384–6393.
- Hasan, N.; Koob, M.; Szybalski, W. (1994): *Escherichia coli* genome targeting, I. Cre-lox-mediated *in vitro* generation of ori-plasmids and their *in vivo* chromosomal integration and retrieval. In: *Gene* 150, S. 51–56.
- Heidrich, C.; Templin, M.; Ursinus, A.; Merdanovic, M.; Berger, J.; Schwarz, H. et al. (2001): Involvement of N-acetylmuramylalanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. In: *Mol. Microbiol.* 41, S. 167–178.
- Heidrich, E. (2011): Entwicklung eines Systems zur Untersuchung von TatC-Interaktionen *in vivo*. Bachelorarbeit, Leibniz Universität Hannover.
- Hicks, M. G.; Leeuw, E. de; Porcelli, I.; Buchanan, G.; Berks, B. C.; Palmer, T. (2003): The *Escherichia coli* twin-arginine translocase: conserved residues of TatA and TatB family components involved in protein transport. In: *FEBS letters* 539, S. 61–67.
- Hinsley, A. P.; Stanley, N. R.; Palmer, T.; Berks, B. C. (2001): A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the ‘invariant’ arginine residues of the consensus targeting motif. In: *FEBS letters* 497.
- Hou, B.; Brüser, T. (2011): The Tat-dependent protein translocation pathway. In: *BioMol. Concepts* 2, S. 507–523.
- Hui, S. W.; Sen, A. (1989): Effects of lipid packing on polymorphic phase behavior and membrane properties. In: *PNAS* 86, S. 5825–5829.
- Ito, K. (1992): SecY and integral membrane components of the *Escherichia coli* protein translocation system. In: *Mol. Microbiol.* 6, S. 2423–2428.
- Ize, B.; Stanley, N. R.; Buchanan, G.; Palmer, T. (2003): Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity. In: *Mol. Microbiol.* 48, S. 1183–1193.
- Jack, R. L.; Sargent, F.; Berks, B. C.; Sawers, G.; Palmer, T. (2001): Constitutive Expression of *Escherichia coli* tat Genes Indicates an Important Role for the Twin-Arginine Translocase during Aerobic and Anaerobic Growth. In: *J. Bacteriol.* 188, S. 1801–1804.

- Juliana, C.; Fernandes-Alnemri, T.; Wu, J.; Datta, P.; Solorzano, L.; Yu, J.-W. et al. (2010): Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. In: *J. Biol. Chem.* 285, S. 9792–9802.
- Keersmaecker, S. de; Vrancken, K.; van Mellaert, L.; Anne, J.; Geukens, N. (2007): The Tat pathway in *Streptomyces lividans*: interaction of Tat subunits and their role in translocation. In: *Microbiology* 153, S. 1087–1094.
- Kikuchi, S.; Shibuya, I.; Matsumoto, K. (2000): Viability of an *Escherichia coli* *pgsA* null mutant lacking detectable phosphatidylglycerol and cardiolipin. In: *J. Bacteriol.* 182, S. 371–376.
- Kipping, M.; Lilie, H.; Lindenstrauss, U.; Andreesen, JR; Griesinger, C.; Carlomagno, T.; Brüser, T. (2003): Structural studies on a twin-arginine signal sequence. In: *FEBS letters* 550, S. 18–22.
- Kruijff, B. de (1997): Lipid polymorphism and biomembrane function. In: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, S. 564–569.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. In: *Nature* 227, S. 680–685.
- Larson, T. J.; Dowhan, W. (1976): Ribosomal-associated phosphatidylserine synthetase from *Escherichia coli*: purification by substrate-specific elution from phosphocellulose using cytidine 5'-diphospho-1,2-diacyl-sn-glycerol. In: *Biochemistry* 15, S. 5212–5218.
- Lewis, J.; Cafiso, D. S. (1999): Correlation between the free energy of a channel-forming voltage-gated peptide and the spontaneous curvature of bilayer lipids. In: *Biochemistry* 38, S. 5932–5938.
- Lill, R.; Dowhan, W.; Wickner, W. (1990): The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. In: *Cell* 60, S. 271–280.
- McDonough, J. A.; Hacker, K. E.; Flores, A. R.; Pavelka, M. S., JR; Braunstein, M. (2005): The twin-arginine translocation pathway of *Mycobacterium smegmatis* is functional and required for the export of mycobacterial beta-lactamases. In: *J. Bacteriol.* 187, S. 7667–7679.
- Mehner, D. (2011): Charakterisierung und Identifizierung eines Interaktionspartners des Tat-Translokons von *Escherichia coli*. Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- Meloni, S.; Rey, L.; Sidler, S.; Imperial, J.; Ruiz-Argueso, T.; Palacios, J. M. (2003): The twin-arginine translocation (Tat) system is essential for *Rhizobium*-legume symbiosis. In: *Mol. Microbiol.* 48, S. 1195–1207.
- Mikhaleva, N. I.; Golovastov, V. V.; Zolov, S. N.; Bogdanov, M. V.; Dowhan, W.; Nesmeyanova, M. A. (2001): Depletion of phosphatidylethanolamine affects secretion of *Escherichia coli* alkaline phosphatase and its transcriptional expression. In: *FEBS letters* 493, S. 85–90.
- Mikhaleva, N. I.; Santini, C.-L.; Giordano, G.; Nesmeyanova, M. A.; Wu, L.-F. (1999): Requirement for phospholipids of the translocation of the trimethylamine *N*-oxide reductase through the Tat pathway in *Escherichia coli*. In: *FEBS letters* 463, S. 331–335.
- Mileykovskaya, E.; Dowhan, W. (2000): Visualization of Phospholipid Domains in *Escherichia coli* by Using the Cardiolipin-Specific Fluorescent Dye 10-*N*-Nonyl Acridine Orange. In: *J. Bacteriol.* 182, S. 1172–1175.
- Mileykovskaya, E.; Ryan, A. C.; Mo, X.; Lin, C.-C.; Khalaf, K. I.; Dowhan, W.; Garrett, T. A. (2009): Phosphatidic acid and *N*-acylphosphatidylethanolamine form membrane domains in *Escherichia coli* mutant lacking cardiolipin and phosphatidylglycerol. In: *J. Biol. Chem.* 284, S. 2990–3000.
- Mozharov, A. D. (1985): Effective Separation of Bacterial Phospholipids and Neutral Lipids in one Dimensional Thin Layer Chromatography. In: *Anal. Lett.* 18, S. 609–616.

- Müller, S. D.; Angelis, A. A. de; Walther, T. H.; Grage, S. L.; Lange, C.; Opella, S. J.; Ulrich, A. S. (2007): Structural characterization of the pore forming protein TatA_d of the twin-arginine translocase in membranes by solid-state ¹⁵N-NMR. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1768, S. 3071–3079.
- Natale, P.; Brüser, T.; Driessen, A. J. M. (2008): Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-distinct translocases and mechanisms. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1778, S. 1735–1756.
- Nishijima, S.; Asami, Y.; Uetake, N.; Yamagoe, S.; Ohta, A.; Shibuya, I. (1988): Disruption of the *Escherichia coli* *cls* gene responsible for cardiolipin synthesis. In: *J. Bacteriol.* 170, S. 775–780.
- Nouwen, N.; Laan, M. van der; Driessen, A. J.M (2001): SecDFyajC is not required for the maintenance of the proton motive force. In: *FEBS letters* 508, S. 103–106.
- Oates, J.; Barrett, C. M.; Barnett, J. P.; Byrne, K. G.; Bolhuis, A.; Robinson, C. (2005): The *Escherichia coli* twin-arginine translocation apparatus incorporates a distinct form of TatABC complex, spectrum of modular TatA complexes and minor TatAB complex. In: *J. Mol. Biol.* 346, S. 295–305.
- Pop, O. I.; Westermann, M.; Volkmer-Engert, R.; Schulz, D.; Lemke, C.; Schreiber, S. et al. (2003): Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatA_d indicates protein-mediated targeting of the Tat export in *Bacillus subtilis*. In: *J. Biol. Chem.* 278, S. 38428–38436.
- Porcelli, I.; Leeuw, E. de; Wallis, R.; van den Brink-van der Laan, E.; Kruijff, B. de; Wallace, B. A. et al. (2002): Characterization and Membrane Assembly of the TatA Component of the *Escherichia coli* Twin-Arginine Protein Transport System. In: *Biochemistry* 41, S. 13690–13697.
- Posey, J. E.; Shinnick, T. M.; Quinn, F. D. (2006): Characterization of the twin-arginine translocase secretion system of *Mycobacterium smegmatis*. In: *J. Bacteriol.* 188, S. 1332–1340.
- Quan, S.; Hiniker, A.; Collet, J.-F.; Bardwell, J. C. A. (2013): Isolation of bacteria envelope proteins. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 966, S. 359–366.
- Raetz, C. R. (1976): Phosphatidylserine synthetase mutants of *Escherichia coli*. Genetic mapping and membrane phospholipid composition. In: *J. Biol. Chem.* 251, S. 3242–3249.
- Rand, R. P.; Sengupta, S. (1972): Cardiolipin forms hexagonal structures with divalent cations. In: *Biochim. Biophys. Acta* 255, S. 484–492.
- Randall, L. L.; Topping, T. B.; Hardy, S. J.; Pavlov, M. Y.; Freistoffer, D. V. (1997): Binding of SecB to ribosome-bound polypeptides has the same characteristics as binding to full-length, denatured proteins. In: *PNAS* 94, S. 802–807.
- Renner, L. D.; Weibel, D. B. (2011): Cardiolipin microdomains localize to negatively curved regions of *Escherichia coli* membranes. In: *PNAS* 108, S. 6264–6269.
- Richter, S.; Brüser, T. (2005): Targeting of Unfolded PhoA to the TAT Translocon of *Escherichia coli*. In: *J. Biol. Chem.* 280, S. 42723–42730.
- Rietveld, A. G.; Chupin, V. V.; Koorengel, M. C.; Wienk, H. L.; Dowhan, W.; Kruijff, B. de (1994): Regulation of lipid polymorphism is essential for the viability of phosphatidylethanolamine-deficient *Escherichia coli* cells. In: *J. Biol. Chem.* 269, S. 28670–28675.
- Rietveld, A. G.; Killian, J. A.; Dowhan, W.; Kruijff, B. de (1993): Polymorphic regulation of membrane phospholipid composition in *Escherichia coli*. In: *J. Biol. Chem.* 268, S. 12427–12433.
- Rietveld, A. G.; Koorengel, M. C.; Kruijff, B. de (1995): Non-bilayer lipids are required for efficient protein transport across the plasma membrane of *Escherichia coli*. In: *EMBO J.* 14, S. 5506–5513.
- 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. In: *J. Biol. Chem.* 274, S. 13223–13228.

- Rodriguez, F.; Rouse, S. L.; Tait, C. E.; Harmer, J.; Riso, A. de; Timmel, C. R. et al. (2013): Structural model for the protein-translocating element of the twin-arginine transport system. In: *PNAS* 110, 1092–1101.
- Rollauer, S. E.; Tarry, M. J.; Graham, J. E.; Jaaskelainen, M.; Jäger, F.; Johnson, S. et al. (2012): Structure of the TatC core of the twin-arginine protein transport system. In: *Nature* 492, S. 210–214.
- Romantsov, T.; Battle, A. R.; Hendel, J. L.; Martinac, B.; Wood, J. M. (2010): Protein Localization in *Escherichia coli* Cells. Comparison of the Cytoplasmic Membrane Proteins ProP, LacY, ProW, AqpZ, MscS, and MscL. In: *J. Bacteriol.* 192, S. 912–924.
- Rose, P.; Fröbel, J.; Graumann, P. L.; Müller, M. (2013): Substrate-Dependent Assembly of the Tat Translocase as Observed in Live *Escherichia coli* Cells. In: *PLoS ONE* 8, e69488.
- Saha, S. K.; Nishijima, S.; Matsuzaki, H.; Shibuya, I.; Matsumoto, K. (1996): A regulatory mechanism for the balanced synthesis of membrane phospholipid species in *Escherichia coli*. In: *Biosci. Biotech. Biochem.* 60, S. 111–116.
- Saier, M. H. (2006): Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. In: *J. Membrane Biol.* 214, S. 75–90.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (Hg.) (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sargent, F.; Gohlke, U.; Leeuw, E. de; Stanley, N. R.; Palmer, T.; Saibil, H. R.; Berks, B. C. (2001): Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure. In: *FEBS J.* 268, S. 3361–3367.
- Schlösser, A. S. (2013): Einfluss von Phospholipiden auf den Transport von Substraten des Tat-Systems in *Escherichia coli*. Bachelorarbeit, Leibniz Universität Hannover.
- Schreiber, S.; Stengel, R.; Westermann, M.; Volkmer-Engert, R.; Pop, O. I.; Müller, J. P. (2006): Affinity of TatCd for TatA_d elucidates its receptor function in the *Bacillus subtilis* twin arginine translocation (Tat) translocase system. In: *J. Biol. Chem.* 281, S. 19977–19984.
- Senisterra, G.; Epanand, R. M. (1993): Role of membrane defects in the regulation of the activity of protein kinase C. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 300, S. 378–383.
- Shiba, Y.; Yokoyama, Y.; Aono, Y.; Kiuchi, T.; Kusaka, J.; Matsumoto, K.; Hara, H. (2004): Activation of the Rcs signal transduction system is responsible for the thermosensitive growth defect of an *Escherichia coli* mutant lacking phosphatidylglycerol and cardiolipin. In: *J. Bacteriol.* 186, S. 6526–6535.
- Silvestro, A.; Pommier, J.; Pascal, M. C.; Giordano, G. (1989): The inducible trimethylamine *N*-oxide reductase of *Escherichia coli* K12: its localization and inducers. In: *Biochim. Biophys. Acta* 999, S. 208–216.
- Stubbs, C. D.; Slater, S. J. (1996): The effects of non-lamellar forming lipids on membrane protein-lipid interactions. In: *Chem. Phys. Lipids* 81, S. 185–195.
- Suzuki, H.; Nishimura, Y.; Yasuda, S.; Nishimura, A.; Yamada, M.; Hirota, Y. (1978): Murein-lipoprotein of *Escherichia coli*: a protein involved in the stabilization of bacterial cell envelope. In: *Molec. Gen. Genet.* 167, S. 1–9.
- Tan, B. K.; Bogdanov, M.; Zhao, J.; Dowhan, W.; Raetz, C. R. H.; Guan, Z. (2012): Discovery of a cardiolipin synthase utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates. In: *PNAS* 109, S. 16504–16509.
- Tate, M. W.; Eikenberry, E. F.; Turner, D. C.; Shyamsunder, E.; Gruner, S. M. (1991): Nonbilayer phases of membrane lipids. In: *Chem. Phys. Lipids* 57, S. 147–164.

- Taubert, J.; Hou, B.; Risselada, H. J.; Mehner, D.; Lünsdorf, H.; Grubmüller, H.; Brüser, T. (2015): TatBC-Independent TatA/Tat Substrate Interactions Contribute to Transport Efficiency. In: *PLoS ONE* 10, e0119761.
- van den Brink-van der Laan, E.; Killian, J. A.; Kruijff, B. de (2004): Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1666, S. 275–288.
- van der Does, C.; Swaving, J.; van Klompenburg, W.; Driessen, A. J. (2000): Non-bilayer lipids stimulate the activity of the reconstituted bacterial protein translocase. In: *J. Biol. Chem.* 275, S. 2472–2478.
- Vasil, M. L.; Tomaras, A. P.; Pritchard, A. E. (2012): Identification and evaluation of twin-arginine translocase inhibitors. In: *Antimicrob. Agents Ch.* 56, S. 6223–6234.
- Vasilenko, I.; Kruijff, B. de; Verkleij, A. J. (1982): Polymorphic phase behaviour of cardiolipin from bovine heart and from *Bacillus subtilis* as detected by ³¹P-NMR and freeze-fracture techniques. In: *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes* 684, S. 282–286.
- Voulhoux, R.; Ball, G.; Ize, B.; Vasil, M. L.; Lazdunski, A.; Wu, L. F.; Filloux, A. (2001): Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. In: *EMBO J.* 20, S. 6735–6741.
- Vrije, T. de; Swart, R. L. De; Dowhan, W.; Tommassen, J.; Kruijff, B. de (1988): Phosphatidylglycerol is involved in protein translocation across *Escherichia coli* inner membranes. In: *Nature* 334, S. 173–175.
- Vrontou, E.; Karamanou, S.; Baud, C.; Sianidis, G.; Economou, A. (2004): Global co-ordination of protein translocation by the SecA IRA1 switch. In: *J. Biol. Chem.* 279, S. 22490–22497.
- Walther, T. H.; Gottselig, C.; Grage, S. L.; Wolf, M.; Vargiu, A. V.; Klein, M. J. et al. (2013): Folding and self-assembly of the TatA translocation pore based on a charge zipper mechanism. In: *Cell* 152, S. 316–326.
- Wexler, M.; Sargent, F.; Jack, R. L.; Stanley, N. R.; Bogsch, E. G.; Robinson, C. et al. (2000): TatD Is a Cytoplasmic Protein with DNase Activity. No requirement for TatD family proteins in Sec-independent protein export. In: *J. Biol. Chem.* 275, S. 16717–16722.
- Yen, M.-R.; Tseng, Y.-H.; Nguyen, E. H.; Wu, L.-F.; Saier, M. H., JR (2002): Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. In: *Arch. Microbiol.* 177, S. 441–450.
- Zhang, Y.; Hu, Y.; Li, H.; Jin, C. (2014): Structural Basis for TatA Oligomerization: An NMR Study of *Escherichia coli* TatA Dimeric Structure. In: *PLoS ONE* 9, e103157.
- Zheng, M.; Aslund, F.; Storz, G. (1998): Activation of the OxyR Transcription Factor by Reversible Disulfide Bond Formation. In: *Science* 279, S. 1718–1722.

Lebenslauf

Claudia Rathmann

Herrenhäuser Straße 2,
30419 Hannover

* 23.12.1982, Hannover

Berufserfahrung

- ab 04.2015 Erstellung der Doktorarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. Thomas Brüser, Institut für Mikrobiologie, Leibniz Universität Hannover
Thema: Determinanten für die Membranpassage von Tat-abhängig transportierten Proteinen in *Escherichia coli*
- 10.2011 – 03.2015 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Brüser
Institut für Mikrobiologie, Leibniz Universität Hannover
- 04.2008 – 09.2011 Lehrkraft für besondere Aufgaben/Wissenschaftliche Hilfskraft
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Auling
Institut für Mikrobiologie, Leibniz Universität Hannover,
Leitung und Betreuung studentischer Laborpraktika
Forschungsprojekt: Umweltmikrobiologische Untersuchungen verschiedener Stillgewässer
02. 2009, 6. Aktionstag gegen Schimmel,
Verbraucherzentrale Niedersachsen, Begutachtung von Proben aus dem Haushalt, Beratung von Mietern
- 09.2005 – 03.2007 Studentische Hilfskraft am Institut für Mikrobiologie, Hannover
Betreuung studentischer Praktika, Themen: Mikrobiologische Grundtechniken, Physiologie, Bakterienmutagenese
Kultivierung und Stammerhaltung von marinen und limnischen Anreicherungskulturen von *Beggiatoa* spp.

Ausbildung

- 2002 – 2008 Diplom-Studium der Biologie
Leibniz Universität Hannover
Schwerpunkte: Mikrobiologie, Biochemie und Ökologie
Diplomarbeit: „Subpopulationen mit unterschiedlichen Zelleinschlüssen in einer marinen *Beggiatoa*-Kultur“, Institut für Mikrobiologie, in Kooperation mit dem Max Planck Institut für marine Mikrobiologie in Bremen
Abschlussnote: sehr gut
- 2002 Abitur, Gymnasium Schillerschule Hannover