

Charakterisierung und Identifizierung
eines Interaktionspartners
des Tat-Translokons
von *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

Diplom-Biologin Denise Mehner

geboren am 17.07.1981 in Neubrandenburg.

2011

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brüser

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Axel Schippers

Tag der Promotion: 09.09.2011

Zusammenfassung

Bereits im Cytoplasma gefaltete Proteine werden in Bakterien, Archaeen und in pflanzlichen Chloroplasten mit Hilfe des *twin-arginine translocation* (Tat)-Systems über die Membran transloziert, welches in *E. coli* aus den Proteinen TatA/E, TatB und TatC besteht. Der genaue Aufbau des Translokons sowie der Transportmechanismus sind noch nicht geklärt, sodass die Ergebnisse dieser Arbeit dazu beitragen, Aufbau und Mechanismus des Tat-Systems besser zu verstehen. PspA, ebenfalls Untersuchungsobjekt dieser Arbeit, ist das Effektorprotein des Psp-Systems, einer Stressantwort, deren Hauptfunktion wahrscheinlich in der Stabilisierung der Membran und damit Aufrechterhaltung der protonenmotorischen Kraft unter Membranstress liegt.

Die *hinge*-Region scheint im Gegensatz zu den für Interaktionen wichtigen N- und C-terminalen Bereichen der Proteine TatA und TatB von nur geringer Bedeutung für die Proteinfunktionalität zu sein, denn obwohl die *hinge*-Region sowohl in TatA als auch in TatB hoch konserviert ist, führten Verlängerungen in dieser Region nicht zum unweigerlichen Verlust der Funktionalität des Tat-Systems.

Für den Tat-Mechanismus wichtige Interaktionen wurden durch 2-Hybriduntersuchungen identifiziert. So konnten für alle Tat-Komponenten untereinander Interaktionsdomänen identifiziert werden, die eine gleichzeitige -und notwendige- Interaktion von Proteinen mit mehreren Interaktionspartnern erlauben, wobei eine sterische Behinderung der verschiedenen Interaktionspartner untereinander möglicherweise verhindert wird. TatA-Oligomere interagieren über den C-Terminus miteinander, während die TatB-TatC-Bindung im TatBC-Komplex über die Transmembrandomäne von TatB vermittelt wird.

Mit Hilfe von Pulldown-Untersuchungen konnte die direkte Interaktion von TatA und PspA in Abhängigkeit des hydrophoben N-Terminus (Transmembranhelix) von TatA nachgewiesen werden. TatE, eine weitere Komponente des Tat-Systems, die TatA funktionell ersetzen kann, konnte in gleicher Weise wie TatA mit PspA interagieren. In EM-Aufnahmen konnten neben getrennt liegenden TatA-Oligomeren (Röhren) und kugelförmigen PspA-Komplexen mit einer netzartigen Feinstruktur auch Komplexe beobachtet werden, die für eine Verbindung beider Proteine sprechen und als „Superkomplexe“ angeordnet sind. Durch die Methode des *in-vivo*-Crosslinkings konnte die TatA-abhängige Interaktion mit PspA bestätigt werden.

Für das Membranprotein TatA konnte neben der bereits beschriebenen TatA-PspA-Interaktion auch eine direkte, interaktionsabhängige Induktion von *pspA* nachgewiesen werden, auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass das eigentliche Interaktionssignal die Schwächung der Membran durch insertiertes TatA darstellt.

Schlagwörter: *Escherichia coli*, *twin-arginine translocation*-System, *phage-shock*-System

Abstract

The twin-arginine translocation (Tat)-pathway transports already folded proteins across the membrane of bacteria, archaea and plant plastids. In *E. coli*, it is comprised of the proteins TatA/E, TatB and TatC. Since the structure of the translocon as well as the transport mechanism are still up for discussion, the results of this study will improve the knowledge of the Tat-system regarding its structural composition and the mechanism behind it. The protein PspA, which was also investigated in this work, is the effector protein of a stress response that is thought to play a role in stabilizing the proton motive force during impairment of membrane integrity.

It could be shown that the hinge-region of the proteins TatA and TatB is—in contrast to their respective N- and C-termini— of only little importance for the functionality of the proteins. Even though this region is highly conserved in both TatA and TatB, its elongation did not impair the function of the Tat-system.

Interactions of Tat-system components were investigated by 2-hybrid assays, leading to the identification of domains for the interactions of all four Tat-proteins. These particular domains were shown to be mostly confined to different regions of the proteins, allowing for multiple interactions between Tat-components simultaneously without sterical hindrance. TatA-oligomers are formed by the interactions of TatA-C-termini, while the interaction of TatB and TatC is mediated by the transmembrane helix (TMH) of TatB.

Pull-down assays revealed a direct interaction between PspA and the hydrophobic N-terminus of TatA as well as its paralogue TatE. Copurified TatA and PspA proteins were shown to form the well known tubes (TatA) and spherical scaffolds (PspA) as well as supercomplexes comprised by both tubes and spheres in electron microscopy. Via *in-vivo* crosslinking, the interaction of TatA and PspA was independently confirmed. In addition to the interaction of TatA and PspA, a TatA dependent induction of *pspA* could also be demonstrated. While this induction is most likely a consequence of the direct TatA-PspA interaction, it cannot be excluded that the membrane weakening by integration of TatA into the membrane is the actual signal for a rather indirect induction of *pspA*.

Keywords: *Escherichia coli* , twin-arginine translocation, phage-shock-system

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Abstract	5
Abkürzungsverzeichnis	10
1 Einleitung	14
1.1 Das Sec-System in <i>E. coli</i>	15
1.1.1 Der posttranslationale Sec-Weg	15
1.1.2 Der cotranslationale Weg	16
1.2 Das Tat-System in <i>E. coli</i>	16
1.2.1 Die Tat-Komponenten	17
1.2.2 Die Tat-Substrate	18
1.2.3 Das Tat-Signalpeptid	19
1.2.4 Der Tat-Mechanismus	20
1.3 Das Psp-System	22
1.3.1 Die Komponenten des Psp-Systems	22
1.3.2 Die PspA-Antwort	24
1.4 Zielstellung	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Bakterienstämme und Plasmide	26
2.2 Molekulargenetische Methoden	47
2.2.1 Plasmid-Minipräparation	47
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	48
2.2.3 DNA-Restriktion	48
2.2.4 Reinigung von DNA-Fragmenten	49
2.2.5 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	49
2.2.6 Dephosphorylierung	49
2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten	49
2.2.8 Herstellung kompetenter Zellen	50
2.2.9 Entsalzung von Plasmid-DNA	51
2.2.10 Elektroporation	51
2.2.11 Transformation CaCl ₂ - bzw. ultrakompetenter Zellen	52
2.2.12 Fast-Transformation	52
2.2.13 Polymerasekettenreaktion (PCR)	52
2.2.14 DNA-Sequenzierung	69
2.2.15 Single-copy-Integration	70
2.2.16 Entfernung einer Antibiotika-Resistenz aus dem Genom	71
2.2.17 Erstellung der benötigten Plasmide für das BACTH-System	71
2.3 Kultivierungsbedingungen	72
2.3.1 Nährmedien und Zusätze	72
2.3.2 Anzucht und Zellernte	74
2.3.3 Stammhaltung	75
2.4 Proteinbiochemische Methoden	75
2.4.1 Proteinbestimmung nach Lowry	75
2.4.2 Proteinbestimmung mit Roti®-Nanoquant	76

2.4.3	Präparation von löslichen (cytoplasmatischen) Proteinen und-Membranproteinen	76
2.4.4	Solubilisierung von Membranproteinen	77
2.4.5	Strep-Tactin®-Affinitätschromatographie	77
2.4.6	Ni-Chelat-Affinitätschromatographie	78
2.4.7	<i>In-vivo</i> -Crosslinking	78
2.4.8	TCA-Fällung von Proteine	79
2.4.9	Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (SDZ)	80
2.4.10	SDS-PAGE	80
2.4.11	STORM bzw. TYPHOON	82
2.4.12	Auftrennung von Membranproteinkomplexen mittels <i>Blue-Native</i> -PAGE	82
2.4.13	Coomassie-Färbung von Proteinen	84
2.4.14	Trocknung von Proteingelen	84
2.4.15	Western-Blot und Proteindetektion	84
2.4.16	MALDI-TOF (matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisations - <i>time-of-flight</i> - Spektrometrie)	88
2.5	Funktionalitäts-Tests	88
2.5.1	<i>In-vivo</i> -Translokationsanalyse: Periplasmafraktionierung ohne Lysozym	88
2.5.2	SDS-Sensitivitätsmessung	89
2.5.3	TMAO-Wachstum	90
2.6	Mikroskopische Techniken	90
2.6.1	Durchlicht-Mikroskopie	90
2.6.2	Elektronen-Mikroskopie	90
2.7	Enzymologische Methoden	91
2.7.1	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität mit ganzen Zellen nach Miller (1992) mod.	91
2.7.2	Interaktionsassay auf festem Medium	92
2.8	Chemikalien und Geräte	92
2.8.1	Zentrifugen und Rotoren	92
2.8.2	Chemikalien und Enzyme	94
3	Ergebnisse	95
3.1	Interaktion von TatA mit PspA	95
3.1.1	Rekombinant produziertes TatA interagiert mit PspA	95
3.1.2	Rekombinant produziertes TatE interagiert mit PspA	97
3.1.3	PspA interagiert nicht mit der hydrophilen Domäne von TatA	99
3.1.4	Der N-Terminus von TatA ist ausreichend für die Interaktion mit PspA	100
3.1.5	Die TatA-PspA-Interaktion ist nicht von einer einzelnen Aminosäure im N-Terminus von TatA abhängig	103
3.1.6	TatA interagiert auch mit rekombinantem PspA	106
3.1.7	TatA interagiert auch ohne Überproduktion mit PspA	108
3.1.8	Populationspezifische Sedimentation von TatA	109
3.2	PspA-Induktionsstudien	112
3.2.1	TatA induziert <i>pspA</i> -Expression	113
3.2.2	Der N-Terminus von TatA ist ausreichend für die <i>pspA</i> -Induktion.	114

3.2.3	Die <i>pspA</i> -Induktion ist nicht von einer einzelnen Aminosäure im N-Terminus von TatA abhängig.	116
3.2.4	Der Austausch größerer Bereiche im N-Terminus von TatA verhindert die <i>pspA</i> -Induktion	117
3.2.5	Die <i>pspA</i> -Induktion wird durch Isoleucin 6 in TatA beeinflusst.	119
3.2.6	Die <i>pspA</i> -Induktion benötigt wahrscheinlich Psp-Komponenten	122
3.3	Interaktionsstudien von TatA mit Hilfe von bakteriellen 2-Hybrid-Systemen	124
3.3.1	Strategie des BACTH-Systems	125
3.3.2	Funktionalität der BACTH-Fusionen	128
3.3.3	Die Interaktion von TatA und PspA ist mit dem BACTH-System nicht nachzuweisen.	134
3.3.4	Die Interaktionen der Tat-Komponenten kann mit dem BACTH-System nachgewiesen werden.	138
3.3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse des BACTH-Systems	145
3.3.6	Strategie des LexA-basierten 2-Hybrid-Systems	147
3.3.7	Funktionalität der LexA-Fusionen	149
3.3.8	Bei allen Tat-Komponenten bis auf TatC können Homodimere mit Hilfe des LexA-basierten 2H-Systems nachgewiesen werden	151
3.3.9	Die Interaktion von TatA mit PspA war mit dem LexA-basierten 2-Hybrid-System nicht nachzuweisen	152
3.4	<i>In-vivo</i> -Crosslinking von TatA	152
3.5	Funktionalitätsanalysen von mutierten Tat-Systemen	156
3.5.1	Funktionsanalysen von mutierten Tat-Systemen in der Transmembranhelix	157
3.5.2	Funktionsanalysen von mutierten Tat-Systemen im <i>hinge</i> oder in der amphipathischen Helix	167
4	Diskussion	176
4.1	Veränderungen der <i>hinge</i> -Region von TatA und TatB haben keinen entscheidenden Einfluss auf die Funktionalität des Tat-Systems	176
4.2	Interaktionsstudien mit Komponenten des Tat-Systems und PspA	178
4.2.1	Der C-Terminus von TatA ist für die TatA-Oligomerisierung von Bedeutung	178
4.2.2	Die TatB-Selbstinteraktion und die TatB-TatC-Interaktion werden durch die Transmembranhelix von TatB vermittelt	179
4.2.3	Kritische Betrachtung zum Nachweis von Interaktionen von - (Membran-) Proteinen mit Hilfe von 2H-Systemen	180
4.2.4	Vergleich der 2H-Ergebnisse mit denen von Maldonado <i>et al.</i> (2011b)	182
4.2.5	TatA und TatE interagieren mit PspA	183
4.2.6	Die TatA-PspA-Interaktion wird durch den N-Terminus von TatA vermittelt.	185
4.2.7	TatA und PspA bilden homo-oligomere Strukturen und cosedimentieren in TatA-PspA-Superkomplexen	186
4.3	<i>pspA</i> wird TatA-abhängig induziert	189
4.3.1	<i>pspA</i> wird in Abhängigkeit des N-Terminus von TatA induziert	189
4.3.2	<i>pspA</i> wird direkt durch die TatA-PspA-Interaktion induziert	190
4.4	Modell der TatA-abhängigen PspA-Rekrutierung an die Membran	192

Literaturverzeichnis	195
A Anhang	218
A.1 TatA interagiert auch nach C12E9-Behandlung mit PspA	218
A.2 Interaktionsassay von TatA mit PspA bzw. TatA-Derivat (TatA-T22) mit sich selbst auf Selektionsmedium	219
A.3 Überblick über die Interaktionsassays auf Selektionsmedium	220
A.4 Überblick über die Interaktionsassays auf Selektionsmedium 2	221
A.5 Für die Interaktion mit TatA bzw. TatE muss der N-Terminus von TatB frei zugänglich sein	222
A.6 Affinitätschromatographische Anreicherung von UV-gecrosslinktem TatA- (I28-pBpa)	224
B Publikationsliste	225

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5-triphosphat
BACTH	<i>Bacterial-Adenylate-Cyclase-based-Two-Hybrid-System</i>
BiFC	<i>bimolecular fluorescence complementation</i>
BN	Blue-Native
bp	Basenpaar(e)
Cam	Chloramphenicol
CD	Zirkulardichroismus
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CP	Cytoplasma
CPM	Cytoplasmamembran
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i>
ECL	<i>enhanced-chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFTEM	<i>energy-filtered transmission electron microscopy</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.) = und andere
FAD	Flavinadenindinukleotid
GTP	Guanosin-5-triphosphat
IMAC	Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani (Komplexmedium)
M	Membranen

MALDI/TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation / time-of-flight</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mol%	Prozentualer Gehalt (in mol) pro mol
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NADP	Nikotinamidadenindinukleotid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OM	<i>outer membrane, (Äußere Membran)</i>
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pBpa	para-Benzoyl-L-Phenylalanin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMF	protonenmotorische Kraft (<i>proton motive force</i>)
PMSF	Phenylmethansulphonylfluorid
PP	Periplasma
Psp	<i>phage shock protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	<i>general secretion pathway</i>
SS	Signalpeptid
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tat	<i>twin-arginine translocation pathway</i>
TBE	Tris-Borat-Acetat
TCA	Trichloressigsäure
Tet	Tetracyclin
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TES	Tris-EDTA-Saccharose
TMAO	Trimethylamin-N-Oxid
TMH	Transmembranhelix
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>unit</i> (Einheit der Enzymaktivität, 1U = 1μmol Substrat/min)
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜNK	Übernachtkultur
UV/Vis	ultraviolette/sichtbares Licht

v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
Δ pH	Protonengradient
2H	<i>Two</i> -Hybrid

Häufig verwendete Proteine, Proteinkomplexe und Konstrukte

AmiA	N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase (Tat-Substrat)
AmiC	N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase (Tat-Substrat)
ATPase	Adenosintriphosphatase
BCCP	Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein
BSA	bovines Serumalbumin
CueO	<i>multi-copper oxidase</i> (Tat-Substrat)
DmsA	Untereinheit der DMSO-Reduktase (Tat-Substrat)
DmsD	spezifisches Chaperon mit Affinität zum DmsA-Signalpeptid
DnaK	cytoplasmatisches Chaperon
DNase	Desoxyribonuklease
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
HiPIP	<i>high potential iron-sulfur protein</i> (Tat-Substrat)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunoglobulin G
LacZ	β -Galaktosidase
LepB	Signalpeptidase
OMP	<i>outer membrane protein</i>
Pfu	thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
PspA	<i>phage shock protein A</i>
PspB	<i>phage shock protein B</i>
PspC	<i>phage shock protein C</i>
PspF	<i>phage shock protein F</i>
SecA	Komponente des Sec-Systems = ATPase
SecB	Komponente des Sec-Systems = Chaperon
SecYEG	Komponenten des Sec-Systems = Translokon

SlyD	Chaperon mit zusätzlicher Prolin-cis/trans-Isomerase-Aktivität, bindet an Tat-Signalpeptiden (Sly = <i>sensitivity to lysis</i>)
SRP	<i>signal recognition particle</i>
SufI	wahrscheinlich an der Zellteilung beteiligt (Tat-Substrat)
TatA	eine der drei Hauptkomponenten des Tat-Systems
TatA(CT)	TatA ab Aminosäure K41 bis zum C-Terminus
TatA(HC)	TatA ab Aminosäure F20S bis zum C-Terminus
TatA(NT)	TatA-N-Terminus, Aminosäuren 1 bis 21
TatB	eine der drei Hauptkomponenten des Tat-Systems
TatC	eine der drei Hauptkomponenten des Tat-Systems
TatD	Komponente des Tat-Systems mit unbekannter Funktion = Nuklease
TatE	Komponente des Tat-Systems
TorA	TMAO-Reduktase (Tat-Substrat)
TorD	spezifisches Chaperon mit Affinität zum TorA-Signalpeptid
YcdB	Hämoprotein (Tat-Substrat)
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

Tabelle 1: Ein- und Drei-Buchstabencode der Aminosäuren

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

1 Einleitung

Biologische Systeme sind stets bestrebt lebenswichtige Substanzen unter geringstem Energieaufwand aufzunehmen, und diese unter größtmöglicher Energiekonservierung in ihren komplexen Stoffwechsel einzubinden, um sich schließlich gegen konkurrierende Systeme evolutionär durchzusetzen. Im Laufe der Zeit haben sich sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Zellen separate Reaktionsräume (Kompartimente) entwickelt, die durch Barrieren (meist biologische Membranen) voneinander abgegrenzt sind. Durch die Schaffung dieser Reaktionsräume können parallel ablaufende Prozesse mit divergenten physikochemischen Eigenschaften stattfinden und Reaktionsabläufe optimiert werden. Im Gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* existieren zwei Reaktionsräume: das Cytoplasma (CP) und das Periplasma (PP). Das Periplasma wird nach innen (CP) durch die Cytoplasmamembran und nach außen (umgebendes Medium) durch die Äußere Membran (OM) begrenzt. Gram-positive Bakterien wie *Bacillus subtilis* besitzen keine Äußere Membran, wodurch ihnen auch das Periplasma fehlt.

Die bakterielle Proteinbiosynthese erfolgt im Cytoplasma. Da der endgültige Wirkort von 452 Zellhüllproteinen jedoch außerhalb des Cytoplasmas liegt, müssen diese entweder über oder in die Membran transportiert werden (Palmer *et al.*, 2005). Für den Transport bestimmte Präproteine (*precursor*) weisen eine für das jeweilige Transportsystem spezifische Signalsequenz auf (Blobel und Dobberstein, 1975), die nach dem Transport zumeist abgespalten wird (Milstein *et al.*, 1972; Danese und Silhavy, 1998). Signalpeptide löslicher, periplasmatischer Proteine bestehen in der Regel aus drei Abschnitten: einer kurzen, positiv geladenen N-terminalen Region (n-Region), einer hydrophoben Region (h-Region) und einer polaren c-Region, in der sich, falls erforderlich, die Signalerkennungssequenz für die Signalpeptidase LepB befindet (Pugsley, 1993; Cristóbal *et al.*, 1999).

Die Transportsysteme der Cytoplasmamembran (CPM) unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Energetisierung und die transportierten Substrate hinsichtlich ihres Faltungszustandes. Der Hauptanteil an Proteinen wird im ungefalteten Zustand mit Hilfe des Sec-Systems (*general secretion pathway*) transportiert (siehe Abschnitt 1.1). Proteine, die im Cytoplasma zunächst Cofaktoren einbauen müssen, zu oligomeren Strukturen assemblieren oder sehr schnelle Faltungskinetiken aufweisen (Berks, 1996), nutzen das Tat-System (siehe Abschnitt 1.2). Dieser alternative Transportweg in und

hauptsächlich über die Cytoplasmamembran wurde zuerst von Weiner *et al.* (1998) als Mtt-System (**m**embrane **t**argeting and **t**ranslocation) beschrieben und kurze Zeit später aufgrund seines kennzeichnenden Zwillings-Arginin-Motives im Signalpeptid zum Tat-Weg (*twin-arginine translocation*) umbenannt (Sargent *et al.*, 1998b).

1.1 Das Sec-System in *E. coli*

Das ubiquitär verbreitete Sec-System ist sowohl in Bacteria und Archaea als auch in den eukaryotischen Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und der Chloroplasten vertreten (Saier, 2006). Substrate des Sec-Systems weisen ein N-terminales Signalpeptid auf und können entweder SecB-abhängig über den posttranslationalen Weg (Abschnitt 1.1.1) oder (*signal recognition particle*) SRP-abhängig cotranslational (Abschnitt 1.1.2) transportiert werden.

1.1.1 Der posttranslationale Sec-Weg

Sobald das naszierende Protein aufgrund seiner geringen Hydrophobizität vom Triggerfaktor, einer Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase, gebunden wird (Valent *et al.*, 1995), wird der posttranslationale Weg beschritten. Nach Freisetzung vom Ribosom assoziiert der *precursor* direkt mit dem Homodimer SecA (Vrontou *et al.*, 2004) oder wird durch das tetramere cytoplasmatische Chaperon SecB gebunden (Randall *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1996). Im Anschluss interagiert SecB mit dem C-Terminus der ATPase SecA (Breukink *et al.*, 1995), die ihrerseits mit einem trimeren Membrankomplex aus SecYEG peripher assoziiert ist (Schatz und Beckwith, 1990). SecA wird durch die Anwesenheit des nicht-essentiellen SecDFYajC-Komplexes stabilisiert (Duong und Wickner, 1997) und bindet sowohl Bereiche der Signalsequenz des *precursor* als auch Bereiche des maturen Proteins (Fekkes *et al.*, 1997). Die Translokation wird durch die Bindung von ATP an SecA initiiert, wodurch eine Konformationsänderung induziert (Economou und Wickner, 1994) und SecB entlassen wird. Die stückweise Insertion des an SecA gekoppelten *precursor* in die SecY-Pore ist von der ATP-Hydrolyse und der protonenmotorischen Kraft (PMF) abhängig (Hunt *et al.*, 2002; Zimmermann und Wickner, 1983; Schiebel *et al.*, 1991). Die Struktur des SecYEG-Komplexes wurde sowohl für Archaea (Van *et al.*, 2004) als auch für *E. coli* (Breyton *et al.*, 2002; Bostina *et al.*, 2005) geklärt.

1.1.2 Der cotranslationale Weg

Integrale Membranproteine werden cotranslational transportiert (De Gier *et al.*, 1997). Sobald ca. 70 AS-Reste der naszierenden Polypeptidkette aus dem Ribosomen herausragen, bindet das sogenannte SRP (*signal recognition particle*) stark hydrophobe Bereiche (Transmembrandomänen) des *precursor* (Luirink und Dobberstein, 1994; Lee und Bernstein, 2001). Der Komplex aus Ribosom, naszierender Polypeptidkette und SRP bindet GTP-abhängig an den membranständigen Rezeptor FtsZ, der seinerseits eine lösliche GTPase ist (De Gier und Luirink, 2001; Miller *et al.*, 1994). Durch eine sich anschließende GTP-Hydrolyse an FtsZ und SRP wird das Ribosom mit der naszierenden Kette an den SecYEG-Komplex übergeben (Valent *et al.*, 1998). Mit der sich nun fortsetzenden Translation am Ribosom wird die Polypeptidkette direkt in die SecYEG-Pore geleitet. Transmembrandomänen werden dabei mit Hilfe des Membranproteins YidC lateral aus dem Translokon entlassen (Beck *et al.*, 2001). Werden Membranproteine mit großen periplasmatischen Domänen transportiert, wird zur Unterstützung die ATPase SecA hinzugezogen (Dalbey und Chen, 2004; Scotti *et al.*, 1999).

1.2 Das Tat-System in *E. coli*

Neben dem Sec-System als Transportweg für ungefaltete Proteine existiert in vielen Bacteria, Archaea aber auch in der Thylakoidmembran der Chloroplasten und eventuell auch in pflanzlichen Mitochondrien mit dem Tat-Weg ein zweites Sekretionssystem (Berks, 1996; Sargent *et al.*, 1998b; Bogsch *et al.*, 1998; Sargent *et al.*, 1999). Der Grundstein für die Entdeckung eines alternativen Sekretionsweg über die Cytoplasmamembran wurde schon 1986 durch die Entdeckung der ersten Tat-Signalsequenz einer Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* durch Prickril *et al.* gelegt. Diese Hydrogenase wird als Heterodimer, bestehend aus kleiner und großer Untereinheit, in das Periplasma transportiert, obwohl nur die kleine Untereinheit ein Signalpeptid aufweist. Es dauerte weitere 11 Jahre, bis in der Thylakoidmembran einer Mais-Mutante die erste Tat-Komponente (Hcf106) entdeckt werden konnte (Settles *et al.*, 1997). Heute ist bekannt, dass das bakterielle Tat-System sowohl den Mechanismus betreffend als auch strukturell mit dem pflanzlichen System verwandt ist (Mori und Cline, 2001). Im Unterschied zum Sec-System wird der Transportvorgang aber nicht durch ATP (für

SecA) oder GTP (für SRP und FtsZ) energetisiert, sondern durch die *proton motive force* (PMF) an der CPM (Yahr und Wickner, 2001; Berks *et al.*, 2003).

1.2.1 Die Tat-Komponenten

In *E. coli* sind die Tat-Komponenten innerhalb des *tatABCD*-Operons codiert. Allerdings sind davon in *E. coli* nur die Membranproteine TatA/E, TatB und TatC (siehe Abb. 1.1) essentiell (Sargent *et al.*, 1998b; Weiner *et al.*, 1998; Bogsch *et al.*, 1998; Sargent *et al.*, 1999), während für das lösliche Protein TatD bisher nur eine Tat-unabhängige Nukleaseaktivität nachgewiesen werden konnte (Wexler *et al.*, 2000). In der Thylakoidmembran der Chloroplasten existieren für die Tat-Komponenten TatA, TatB und TatC orthologe Proteine, die als Tha4, Hcf106 und cpTatC bezeichnet werden (Müller und Klösgen, 2005). Getrennt vom *tatABCD*-Operon liegt *tatE*, das wahrscheinlich auf eine Genduplikation von *tatA* zurückzuführen ist (Jack *et al.*, 2001; Yen *et al.*, 2002). TatE ist in der Lage, TatA funktionell zu ersetzen (Sargent *et al.*, 1998b).

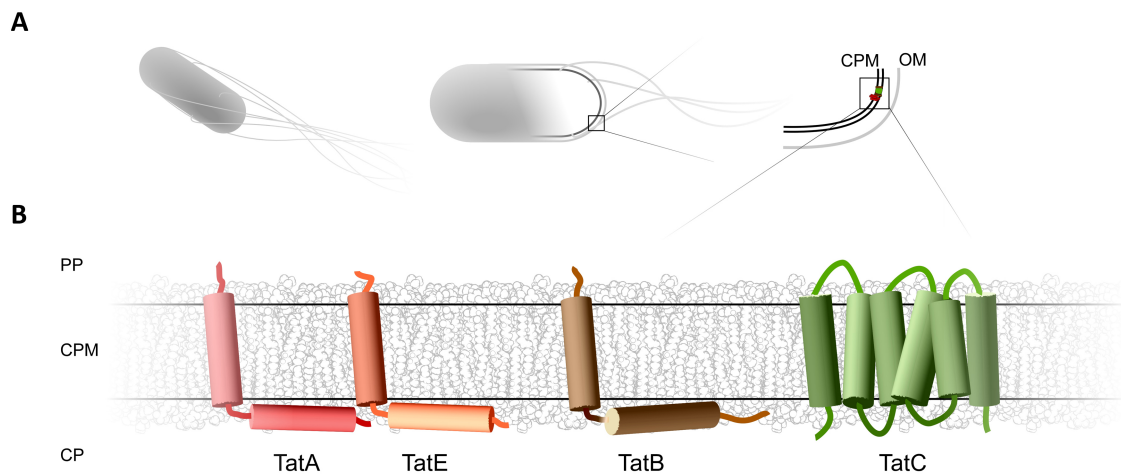


Abbildung 1.1: Schematische Übersicht der Anordnung der Komponenten des Tat-Systems aus *E. coli* in der Zelle. [A] Schematische Lokalisation des Tat-Systems in *E. coli* [B] in der Cytoplasmamembran. PP – Periplasma, CPM – Cytoplasmamembran, CP – Cytoplasma und OM – Äußere Membran

TatA, TatE und TatB sind integrale Membranproteine, die sich in ihrer Struktur stark ähneln. Auf die N-terminale Transmembranhelix folgt eine kurze und flexible Scharnier-Region (*hinge*), die amphipathische Helix und ein unstrukturierter C-Terminus mit variabler Länge (Sargent *et al.*, 1998b; Chanal *et al.*, 1998). Im Vergleich zu TatA verfügt TatB hierbei über einen längeren C-terminalen Bereich. Neueste NMR-Studien zu TatA_d aus *B. subtilis* bestätigen die vorhergesagten Strukturen (Müller *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2010). Die N-Termini von TatA/E und TatB sind im Periplasma und der

C-Terminus von TatB ist im Cytoplasma lokalisiert (Barrett und Robinson, 2005). Für die Topologie von TatA gibt es zwei Möglichkeiten. So könnte der C-Terminus entweder wie bei TatB im Cytoplasma lokalisiert sein (Porcelli *et al.*, 2002), oder aber durch den Transport induziert zwischen Periplasma und Cytoplasma wechseln (*dual-topology*, Gouffi *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2007). Mit Hilfe von CD- und DSC-Studien eines synthetischen Peptids konnte indes gezeigt werden, dass die amphipathische Helix mit Membranlipiden interagieren kann (Chan *et al.*, 2011). Rekombinantes TatA ohne N-terminale Transmembranhelix soll löslich sein, wohingegen TatB ohne TMH weiter mit der CPM interagieren kann (De Leeuw *et al.*, 2001). Für TatA sind nur die ersten 50 AS und für TatB die ersten 101 Reste essentiell, um eine Translokation zu ermöglichen (Lee *et al.*, 2002). Mutationsstudien in TatA weisen auf essentielle Positionen in der Transmembranhelix (Q8) und in der amphipathischen Helix (F39 und weitere Cystein-Austausche) hin (Barrett und Robinson, 2005; Hicks *et al.*, 2003, 2005; Greene *et al.*, 2007). TatA bildet große homo-oligomere Komplexe (Oates *et al.*, 2005), die im Elektronenmikroskop sowohl als ringartige Strukturen als auch als Röhren sichtbar sind (Gohlke *et al.*, 2005; Berthelmann *et al.*, 2008).

TatC ist mit 6 Transmembrandurchgängen die größte Tat-Komponente (Behrendt *et al.*, 2004), wobei sowohl der N- als auch der C-Terminus von TatC im Cytoplasma lokalisiert sind. TatB und TatC bilden zusammen den TatBC-Komplex (Bolhuis *et al.*, 2001), der die Signalsequenz der Tat-Substrate erkennt (Cline und Mori, 2001; Alami *et al.*, 2003).

1.2.2 Die Tat-Substrate

Die Anzahl der Tat-abhängig transportierten Substrate variiert sehr zwischen den verschiedenen Organismen. So konnten in *B. subtilis* bisher nur zwei Tat-Substrate gefunden werden (Jongbloed *et al.*, 2000), während für den Actinomyceten *Streptomyces coelicolor* ca. 145 Tat-Substrate vorausgesagt werden (Widdick *et al.*, 2006). Aufgrund der hohen Kaliumkonzentration im Cytoplasma von halophilen Archaea werden Proteine dort hauptsächlich mit Hilfe des Tat-Systems transportiert (Rose *et al.*, 2002; Hutcheon und Bolhuis, 2003; Pohlschröder *et al.*, 2004), in *E. coli* werden dagegen nur 27 von 452 Zellhüllproteinen Tat-abhängig transportiert (Palmer *et al.*, 2005). Zu diesen gehören vor allem Substrate, die Funktionen in der anaeroben Atmung (Hydrogenasen, Formiat-Dehydrogenase, Trimethylamin-N-Oxid (TMAO)-Reduktase, Dime-

thylsulfoxid (DMSO)–Reduktase) besitzen und im Cytoplasma ihre Cofaktoren assemblieren müssen (Lee *et al.*, 2006b; Berks *et al.*, 2005). Die Art der eingebauten Cofaktoren ist sehr variabel, so werden unter anderem [FeS]- und [NiFe]-Cluster, Molybdopterin, FAD, NADP⁺, Kupferzentren, *b*-Typ-Häm und viele mehr assembliert (Berks *et al.*, 2005; Sturm *et al.*, 2006). Es werden aber auch Cofaktor-freie Substrate transportiert, deren Faltungskinetik eventuell einen Transport über das Sec-System verhindert (Brüser *et al.*, 1998). Zu ihnen zählen die periplasmatischen Amidasen (AmiA und AmiC) und SufI, die für die Zellteilung von Bedeutung sind (Bernhardt und De Boer, 2003; Ize *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 1988).

Das Tat-System spielt auch eine Rolle in der Pathogenität einiger Organismen. So konnten in *Pseudomonas aeruginosa* zwei Phospholipasen als Tat-abhängige Virulenzfaktoren identifiziert werden (Voulhoux *et al.*, 2001; Ochsner *et al.*, 2002). Sowohl in *Yersinia pseudotuberculosis* (Lavander *et al.*, 2006) als auch in *Agrobacterium tumefaciens* (Ding und Christie, 2003) ist das Tat-System essentiell.

1.2.3 Das Tat-Signalpeptid

Allen Tat-Substraten ist gemein, dass sie entweder ein N-terminales Signalpeptid aufweisen (siehe Abb. 1.2) oder aber in einem Komplex mit einem zweiten Protein transportiert werden, das ein Tat-Signalpeptid beherbergt. Dieser sogenannte *hitchhiker*-Mechanismus konnte bislang für die DmsA-Untereinheit der DMSO-Reduktase und für die Hydrogenasen 1 und 2 in *E. coli* gezeigt werden (Rodrigue *et al.*, 1999; Van Dongen *et al.*, 1988).

Das Tat-Signalpeptid besteht aus einer polaren n-Region, einer ungeladenen, schwach hydrophoben h-Region und einer leicht polaren c-Region (Cristóbal *et al.*, 1999). Im Vergleich zum Sec-System ist die h-Region der Tat-Signalpeptide weniger hydrophob (Cristóbal *et al.*, 1999) und in der Nähe der LepB-Erkennungstelle sind meist basische Reste lokalisiert, die als *sec-avoidance*-Motiv beschrieben wurden (Bogsch *et al.*, 1997). In allen Tat-Substraten findet sich am C-Terminus der n-Region ein konserviertes Sequenzmotiv der Form Z-R-R-x-Φ-Φ. Dabei steht Z für einen polaren Rest und Φ für hydrophobe Reste (Natale *et al.*, 2008). In diesen konservierten Sequenzbereich ist das namensgebende *twin-arginine*-Motiv eingebettet. Das konservierte RR-Motiv ist nicht essentiell, da natürliche „KR“-Variationen (das Rieske-Protein im Cytochrom-*b₆f*-

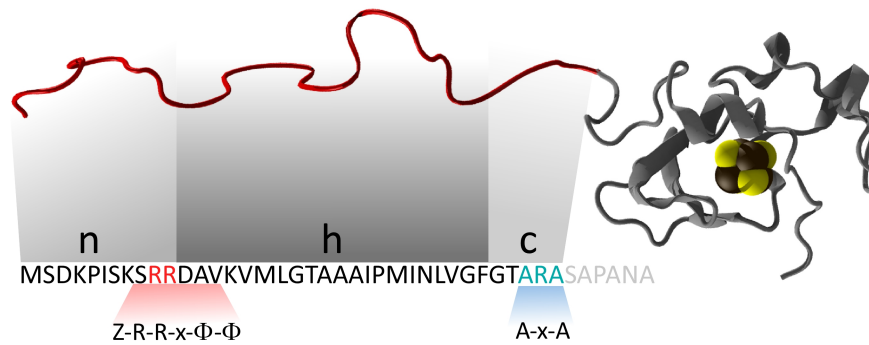


Abbildung 1.2: Schematische Übersicht über den Aufbau des Tat-Signalpeptides für HiPIP. Das N-terminale Signalpeptid (rot) besteht aus einer n-, h- und c-Region und ist im Vergleich zum maturen Protein (rechts) unstrukturiert. Zwischen der n- und der h-Region befindet sich das namensgebende RR-Motiv innerhalb eines konservierten Sequenzmotives (rot), am C-terminalen Ende der c-Region ist die Schnittstelle der Signalpetidase LepB lokalisiert (blau).

Komplexes in Chloroplasten und die TtrB-Untereinheit der Tetrathionat-Reduktase aus *Salmonella enterica*) bekannt sind (Molik *et al.*, 2001; Hinsley *et al.*, 2001). Interessant ist, dass das Signalpeptid im Fall der Rieske-Proteine als Membrananker dient (Bachmann *et al.*, 2006; Molik *et al.*, 2001).

In einigen Fällen kann die Faltung der Tat-Substrate im Cytoplasma durch spezielle bzw. generelle Chaperone unterstützt werden. Diese speziellen Chaperone sind zumeist gemeinsam mit dem entsprechenden Tat-Substrat in einem Operon codiert. So konnten in *E. coli* für die TMAO-Reduktase das spezifische Chaperon TorD (Jack *et al.*, 2004), für die DMSO-Reduktase das Chaperon DmsD (Oresnik *et al.*, 2001) und für die periplasmatische Nitratreduktase NapA das Chaperon NapF (Nilavongse *et al.*, 2006) identifiziert werden. Als generelle Chaperone wurden SlyD, DnaK, und GroEL identifiziert (Oresnik *et al.*, 2001; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2007; Graubner *et al.*, 2007), die wahrscheinlich aufgrund ihrer Bindung an das Signalpeptid einen proteolytischen Angriff verhindern können.

1.2.4 Der Tat-Mechanismus

Auch 13 Jahre nach Entdeckung der ersten Tat-Komponente ist der Transportmechanismus noch unklar. Ein entscheidender Aspekt bei der Aufklärung des Mechanismus ist das große Spektrum an Tat-Substraten. So muss sowohl für das kleinste

bekanntes Tat-Substrat HiPIP (*high potential iron-sulfur protein*, 9 kDa) aus *Allochro-matium vinosum* als auch für den FdnGH-Subkomplex der Formiat-Dehydrogenase-N aus *E. coli* (142 kDa) sichergestellt sein (Berks *et al.*, 2000), dass während des Trans-portes kein ungehinderter Ionen- oder Protonenaustausch über die CPM erfolgt. Ab-hängig von den jeweils verwendeten Detergenzien oder Methoden konnten bisher zwei Mechanismus-relevante Komplexe identifiziert werden. Zum einen ist dies der TatBC-Komplex (Bolhuis *et al.*, 2001; Oates *et al.*, 2005), in dem TatB und TatC-Protomere in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 vorkommen sollen (Bolhuis *et al.*, 2001; McDevitt *et al.*, 2005). Zum anderen existieren neben dem TatBC-Komplex auch TatA-Komplexe (Porcelli *et al.*, 2002; Sargent *et al.*, 2001; Oates *et al.*, 2005), die in ihrer molekularen Masse zwischen 50 und 600 kDa schwer sind. Umstritten ist allerdings, ob TatA für die Funktion und Stabilität des TatBC-Komplexes notwendig ist (McDevitt *et al.*, 2005; Mangels *et al.*, 2005), da der TatBC-Rezeptor-Komplex in *E. coli* TatA-unabhängig assemblieren kann (Behrendt *et al.*, 2007; Orriss *et al.*, 2007).

Der Transportmechanismus stellt sich wie folgt dar: Zunächst inseriert das Tat-Substrat Tat-unabhängig in die CPM (Brüser und Sanders, 2003; Brüser *et al.*, 2003), wo es an TatC bindet. In *in-vitro*-Studien mit dem Tat-Substrat SufI aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass TatC spezifisch an das RR-Motiv des Signalpeptides bindet (Cline und Mori, 2001; Alami *et al.*, 2003; Gérard und Cline, 2006). In TatC soll dabei der ganze N-terminale Bereich für die Bindung des Signalpeptides verantwortlich sein (Holzapfel *et al.*, 2007). Infolge der Substratbindung werden TatA-Oligomere PMF-abhängig an den TatBC-Komplex rekrutiert, wodurch die vollständige Translokase assembliert (Mori und Cline, 2002; Alami *et al.*, 2003; Dabney-Smith *et al.*, 2006). Das Zwei-Komponenten-Tat-System unterscheidet sich vom Drei-Komponenten-Tat-System dar-in, dass sowohl membranintegrales als auch lösliches TatA existiert (De Keersmaeker *et al.*, 2005b; Pop *et al.*, 2003). Dabei soll lösliches TatA die Tat-Substrate binden und an die Membran dirigieren (Pop *et al.*, 2003; De Keersmaeker *et al.*, 2005b,a). Lösliches TatA_d aus *B. subtilis* dirigiert sein Substrat (PhoD) zur Membran, um dann TatC_d-abhängig in die CPM zu integrieren (Schreiber *et al.*, 2006).

Ob die nun folgende Translokation durch eine wassergefüllte Pore aus TatA-Protomeren geschieht (Sargent *et al.*, 2006) oder ob zunächst TatC das Signalpeptid in die Membran zieht (*pulling*), wodurch diese punktuell geschwächt wird (*weakening*, Brüser und San-ders, 2003), konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Nach erfolgter Transloka-

tion zerfällt die Translokase und muss wahrscheinlich für jedes transportierte Substrat erneut assemblieren (Brüser und Sanders, 2003; Mori und Cline, 2002).

1.3 Das Psp-System

Bakterien sind ständig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt. Um auf entsprechende Umweltreize (Stressoren) gezielt und möglichst schnell zu reagieren, haben sich im Laufe der Evolution verschiedenste Stressantworten entwickelt. Eines dieser Stressantwortsysteme soll bei der Aufrechterhaltung der protonenmotorischen Kraft mitwirken (Kleerebezem *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 2007; Engl *et al.*, 2009) und wurde 1990 bei der starken Produktion des Phagenproteins pIV entdeckt (Brissette *et al.*, 1990). Daraufhin wurde es als *phage-shock-protein*-Antwort (Psp) bezeichnet.

1.3.1 Die Komponenten des Psp-Systems

Obwohl das Psp-System zunächst in *E. coli* entdeckt wurde (Brissette *et al.*, 1991), sind seine Komponenten oder deren homologe Proteine sowohl in Bacteria, Archaea als auch in pflanzlichen Chloroplasten vertreten (Darwin, 2005; Bidle *et al.*, 2008; Vrancken *et al.*, 2008; Kroll *et al.*, 2001). In *E. coli* sind die Komponenten des Psp-Systems in einem *pspABCDE*-Operon codiert (Brissette *et al.*, 1991). Stromaufwärts auf dem Gegenstrang gelegen wird PspF codiert, das für die σ^{54} -abhängige Induktion des *psp*-Operons verantwortlich ist (siehe Abb.1.3).

Das Regulatorprotein PspF gehört zur Familie der AAA⁺-Proteine (*ATPases associated with various cellular activities*). Die *pspF*-Expression wird nahezu konstitutiv durch den *sigma*-Faktor 70 induziert, wobei PspF seine eigene Genexpression reprimiert (Jovanovic *et al.*, 1999). Das erste Gen des *psp*-Operons ist *pspA*, welches für das eigentliche Effektorprotein des Psp-Systems, PspA codiert. Durch seine Bindung an PspF dient PspA gleichzeitig als negativer Regulator der Stressantwort (Dworkin *et al.*, 2000; Elderkin *et al.*, 2002, 2005; Jovanovic *et al.*, 1996). Das *coiled-coil*-Protein (Osadnik, 2009) kann ebenfalls mit den Membranproteinen PspC und PspB interagieren (Dworkin *et al.*, 2000; Elderkin *et al.*, 2005; Maxson und Darwin, 2006; Jovanovic *et al.*, 2009, 2010). 2004 wurden die ersten *Single-Particle*-Analysen von angereicherten PspA-Komplexen veröffentlicht (Hankamer *et al.*, 2004). PspA wurde dabei als neunfach-symmetrischer Ring beschrieben. Ähnlich geartete Strukturen wurden auch

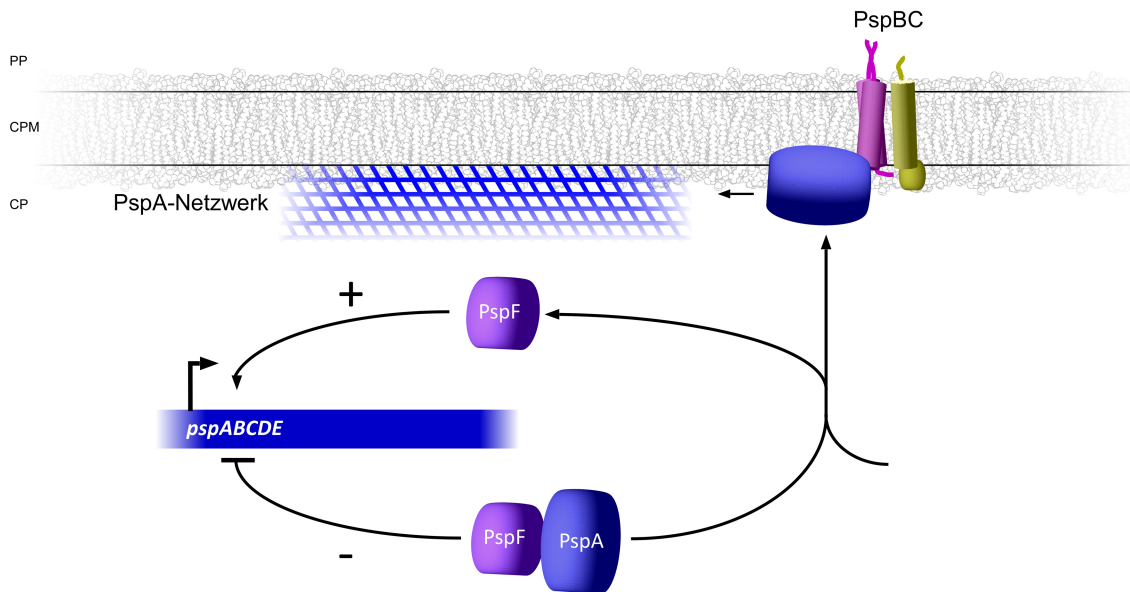


Abbildung 1.3: Schematische Übersicht über Lokalisation der Psp-Komponenten innerhalb der Zelle von *E. coli*. PspF wird im Cytoplasma durch seinen negativen Regulator PspF gebunden und verhindert die Induktion des *psp*-Operons. Unter Stressbedingungen (Membranstress) dissoziiert PspA von PspF, wodurch PspF σ^{54} -abhängig das *pspABCDE*-Operon induziert. PspA kann infolgedessen mit den membranständigen Psp-Komponenten PspC und PspB interagieren, wodurch sich an der Membran ein oligomeres Netz aus PspA ausbilden kann. **PP** – Periplasma, **CPM** – Cytoplasmamembran, **CP** – Cytoplasma

für das PspA-Homolog VIPP1 aus Chloroplasten gezeigt (Aseeva *et al.*, 2004; Fuhrmann *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu beschrieben Liu *et al.* (2007) eher röhrenförmige Strukturen von VIPP1 aus *Chlamydomonas*. All diesen Strukturuntersuchungen ist gemein, dass PspA aus Membranen durch das zwitterionische Detergenz CHAPS angereichert wurde. Im Kontrast dazu zeigten Standar *et al.* (2008), dass PspA ohne CHAPS-Zugabe kugelförmige Komplexe bilden, die eine gerüstartige Feinstruktur ausbilden können. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass durch die CHAPS-Zugabe bei der Solubilisierung der Membranen die oligomeren Strukturen von PspA kollabieren oder sich partiell disassemblierte Komplexe formen. Hendrik Osadnik bestätigte diese Aussagen in seiner Diplomarbeit (Osadnik, 2009). Standar *et al.* (2008) spekulieren in diesem Zusammenhang über netzartige PspA-Strukturen, die die CPM abdichten können, sodass sich die PMF wieder stabilisieren könnte. Getrennt vom *psp*-Operon ist PspG codiert, das nicht zuerst in *E. coli* sondern in *Yersinia enterocolitica* entdeckt wurde (Green und Darwin, 2004). Die *pspG*-Expression wird wie die der Gene des *psp*-Operons durch die Anwesenheit von PspF positiv und durch PspA negativ reguliert (Green und Darwin, 2004). Sowohl für PspE, eine periplasmatische Rhodanase (Adams *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2008), als auch für PspD, ein peripher membranassoziertes Protein, das *in vivo* nicht mit PspA interagiert (Adams *et al.*, 2003), wurden bislang keine

relevanten Funktionen innerhalb des Psp-Systems nachgewiesen. In *Y. enterocolitica* sind die Membranproteine PspC und PspB essentiell, PspA jedoch nicht (Darwin und Miller, 2001; Maxson und Darwin, 2006).

1.3.2 Die PspA-Antwort

Nach der Entdeckung einer pIV-Sekretin-abhängigen *pspA*-Induktion (Brissette *et al.*, 1990), die zur Entdeckung des Psp-Systems führte, wurden bisher eine Vielzahl von verschiedenen Bedingungen (Stressoren) untersucht, die eine *pspA*-Induktion bewirken. Darunter fallen z. B.: osmotischer Schock (Weber *et al.*, 2006), Hitze- und Kälteschock (Peter *et al.*, 2004; White-Ziegler *et al.*, 2008), Wachstum in der stationären Phase (Weiner und Model, 1994) und 10% Ethanol oder Cyclooctan (Brissette *et al.*, 1990; Kobayashi *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass all diesen Bedingungen gemein ist, dass die Membranintegrität geschwächt wird. Deshalb ist es nicht erstaunlich, dass bei Defekten in den Sekretionssystemen der Cytoplasmamembran (YidC, Tat- und Sec-System) eine *pspA*-Induktion beobachtet wurde (Jones *et al.*, 2003; Van der Laan *et al.*, 2003; DeLisa *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang zeigten DeLisa *et al.* (2004), dass infolge einer Blockade des Tat-Translokons *pspA* induziert wurde und dass diese Blockade durch rekombinante Expression *pspAs* aufgehoben werden konnte. In uninduzierten Zellen ist die PspA-Konzentration hingegen relativ gering (Brissette *et al.*, 1990).

Obwohl bislang eine große Anzahl an Stressoren beschrieben wurde, ist bislang ungeklärt wo oder durch wen diese Stresssignale aufgenommen werden, damit die Psp-Antwort auslöst werden kann. Im nichtinduzierten Zustand bindet PspF an seinen negativen Regulator PspA (Dworkin *et al.*, 2000; Elderkin *et al.*, 2002). An der Weiterleitung eines Signals vom Periplasma bzw. der Membran in das Cytoplasma könnten die Membranproteine PspB und PspC beteiligt sein. PspC soll durch seine Interaktion mit PspB in der Membran stabilisiert werden (Maxson und Darwin, 2006; Gueguen *et al.*, 2009). Gueguen *et al.* (2009) spekulieren, dass die cytoplasmatische Domäne von PspC die Interaktion mit PspA im stressfreien Zustand unterbindet. Wurde diese Domäne allerdings deletiert, konnte die PspA-PspBC-Interaktion stattfinden. Eine PspB Interaktion mit PspA ist PspC-abhängig (Adams *et al.*, 2003). Unter Stressbedingungen könnte auch die cytoplasmatische Domäne von PspC eine Konformationsänderung durchführen, wodurch PspA sich von PspF ablösen und an PspC binden könnte

(Jovanovic *et al.*, 2010). Infolgedessen würde PspF die σ^{54} -abhängigen *pspA*- und *pspG*-Promotoren aktivieren, sodass die Transkription des *psp*-Operons und *pspG* induziert würde (Jovanovic *et al.*, 1996; Green und Darwin, 2004; Lloyd *et al.*, 2004).

1.4 Zielstellung

Ziel dieser Dissertation war es, die Interaktion PspAs mit der Tat-Komponente TatA näher zu charakterisieren. Dafür wurden verschiedene TatA-Derivate affinitätschromatographisch angereichert und auf ihre Fähigkeit zur Interaktion mit PspA hin getestet. Es wurde gleichzeitig geprüft, ob die beobachtete TatA-PspA-Interaktion eventuell ein Expressionsartefakt ist. Im Anschluss sollten die durch Affinitätschromatographie beobachteten Interaktionen mit Hilfe von Two-Hybrid-Systemen und *in-vivo* Crosslinkings bestätigt werden.

Für den Transportmechanismus sind spezifische Interaktionen der einzelnen Tat-Komponenten untereinander und mit sich selbst von größter Bedeutung. Deshalb wurden die Tat-Komponenten und TatA-Derivate mittels Two-Hybrid-Systemen auf ihre Oligomerisierungsfähigkeit geprüft. Außerdem sollte die funktionelle Bedeutung des N-Terminus von TatA und der *hinge*-Region von TatA und TatB analysiert werden.

2 Material und Methoden

Alle Medien zur Anzucht und Kultivierung wurden 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Substanzen wie Antibiotika, Arabinose, Rhamnose, Calcium- und Magnesiumchlorid etc. wurden hingegen sterilfiltriert (*Rotilabo*-Spritzenfilter, steril, 0,22 μm , Carl Roth, Karlsruhe) und erst nach dem Abkühlen der Medien zugesetzt. Es wurde, wenn nicht anders angegeben, durchgängig bidestilliertes Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) für alle Arbeiten verwendet.

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Im Anschluss sind alle in dieser Dissertation verwendeten *E. coli*-Stämme (Tabelle 2) aufgeführt:

Tabelle 2: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genetische Charakteristika	Herkunft/ Referenz
BILKO	MC4100 ΔtatC	Bogsch <i>et al.</i> (1998)
BØD	MC4100 ΔtatB	Sargent <i>et al.</i> (1999)
BTH101	F ⁻ , <i>cya-99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL1</i> (Str ^R), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i>	Karimova und Ladant (2005)
BW23473	$\Delta(\text{lacIZYA } \text{argF})U169$, <i>rph-1</i> , <i>rpoS396</i> (Am), <i>robA1</i> , <i>creC510</i> , <i>hsdR514</i> ΔendA9 , <i>uidA</i> (<i>MluI</i>):: <i>pir</i> (wt), <i>recA1</i>	Haldimann und Wanner (2001)
BW25113	$\Delta\text{araBAD567}$, <i>lacZ4787</i> (:: <i>rrnB-3</i>), $\Delta\text{rhaBAD568}$, <i>rph-1</i> , <i>lacIp-4000</i> (<i>lacI</i> ^Q), <i>hsdR514</i> , Λ^-	Datsenko und Wanner (2000)
DADE	MC4100 $\Delta\text{tatABCD}\Delta\text{tatE}$	Wexler <i>et al.</i> (2000)

Tabelle 2: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genetische Charakteristika	Herkunft/ Referenz
DHM1	F ⁻ , <i>cya-854</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> (NaI ^R), <i>thi1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>spoT1</i> , <i>rfbD1</i> , <i>glnV44(AS)</i>	Karimova <i>et al.</i> (2005)
JARV16	MC4100 Δ <i>tatA</i> Δ <i>tatE</i>	Sargent <i>et al.</i> (1999)
JARV16 <i>tatA-strep</i>	JARV16 <i>attB::tatA-strep</i>	diese Arbeit
JARV16 <i>ara</i> ^R	JARV16 <i>ara</i> ^R	Berthelmann und Brüser (2004)
JARV16 <i>ara</i> ^R <i>tatA</i> (I6- pBpa)- <i>strep</i>	JARV16 <i>ara</i> ^R <i>attB::tatA</i> (I6-TAG)- <i>strep</i>	diese Arbeit
JARV16 <i>ara</i> ^R <i>tatA</i> (W7- pBpa)- <i>strep</i>	JARV16 <i>ara</i> ^R <i>attB::tatA</i> (W7-TAG)- <i>strep</i>	diese Arbeit
JARV16 <i>ara</i> ^R <i>tatA</i> (Q8- pBpa)- <i>strep</i>	JARV16 <i>ara</i> ^R <i>attB::tatA</i> (Q8-TAG)- <i>strep</i>	diese Arbeit
JARV16 <i>ara</i> ^R <i>tatA</i> (L9- pBpa)- <i>strep</i>	JARV16 <i>ara</i> ^R <i>attB::tatA</i> (L9-TAG)- <i>strep</i>	diese Arbeit
JARV16 <i>ara</i> ^R <i>tatA</i> (L10- pBpa)- <i>strep</i>	JARV16 <i>ara</i> ^R <i>attB::tatA</i> (L10-TAG)- <i>strep</i>	diese Arbeit
JARV16 <i>ara</i> ^R <i>tatA</i> (I11- pBpa)- <i>strep</i>	JARV16 <i>ara</i> ^R <i>attB::tatA</i> (I11-TAG)- <i>strep</i>	diese Arbeit
JARV16 <i>ara</i> ^R <i>tatA</i> (I12- pBpa)- <i>strep</i>	JARV16 <i>ara</i> ^R <i>attB::tatA</i> (I12-TAG)- <i>strep</i>	diese Arbeit
JARV16 <i>ara</i> ^R <i>tatA</i> (A13- pBpa)- <i>strep</i>	JARV16 <i>ara</i> ^R <i>attB::tatA</i> (A13-TAG)- <i>strep</i>	diese Arbeit
JARV16 <i>ara</i> ^R <i>tatA</i> (V14- pBpa)- <i>strep</i>	JARV16 <i>ara</i> ^R <i>attB::tatA</i> (V14-TAG)- <i>strep</i>	diese Arbeit

Tabelle 2: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genetische Charakteristika	Herkunft/ Referenz
JARV16 <i>ara</i> ^R <i>tatA</i> (I15-pBpa)- <i>strep</i>	JARV16 <i>ara</i> ^R <i>attB::tatA</i> (I15-TAG)- <i>strep</i>	diese Arbeit
JARV16 <i>ara</i> ^R <i>tatA</i> (L18-pBpa)- <i>strep</i>	JARV16 <i>ara</i> ^R <i>attB::tatA</i> (L18-TAG)- <i>strep</i>	diese Arbeit
JARV16 <i>ara</i> ^R <i>tatA</i> (F20-pBpa)- <i>strep</i>	JARV16 <i>ara</i> ^R <i>attB::tatA</i> (F20-TAG)- <i>strep</i>	diese Arbeit
JARV16 <i>ara</i> ^R <i>tatA</i> (I28-pBpa)- <i>strep</i>	JARV16 <i>ara</i> ^R <i>attB::tatA</i> (I28-TAG)- <i>strep</i>	diese Arbeit
JWK1296	BW25113 Δ <i>pspF::kan</i>	Baba <i>et al.</i> (2006)
JWK1297	BW25113 Δ <i>pspA::kan</i>	Baba <i>et al.</i> (2006)
JWK1297 Δ <i>kan</i> ^S	JWK1297	diese Arbeit
JWK1298	BW25113 Δ <i>pspB::kan</i>	Baba <i>et al.</i> (2006)
JWK1299	BW25113 Δ <i>pspC::kan</i>	Baba <i>et al.</i> (2006)
MC4100	<i>F</i> ⁻ , <i>araD319</i> , Δ <i>lacU169</i> , <i>relA1</i> , <i>rpsL150</i> , <i>thi</i> , <i>mot</i> , <i>flB5301</i> , <i>deoC7</i> , <i>ptsF25</i> , <i>rbsR</i>	Casadaban (1976)
MC4100 <i>ara</i> ^R	MC4100 <i>ara</i> ^R	Berthelmann und Brüser (2004)
SU101	Derivat von JL1434, chromosomales <i>lacZ</i> unter Kontrolle eines <i>lexA</i> -Wildtyp-Operators, <i>sulA</i> -Promotor	Dmitrova <i>et al.</i> (1998)
SU202	Derivat von JL1434, chromosomales <i>lacZ</i> unter Kontrolle eines <i>lexA</i> -Hybrid-Operators, <i>sulA</i> -Promotor	Dmitrova <i>et al.</i> (1998)

Tabelle 2: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genetische Charakteristika	Herkunft/ Referenz
XL1-Blue MRF' Kan	$\Delta mcrA183$, F' , $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$, $endA1$, $supE44$, $thi-1$, $recA1$, $gyrA96$, $relA1$, lac (F^- $proAB$ $lacI^Q$ Z $\Delta M15$ $Tn5$ (Kan^R))	Agilent (Waldbronn)
XL1-Blue MRF' Tet	$\Delta mcrA183$, F' , $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$, $endA1$, $supE44$, $thi-1$, $recA1$, $gyrA96$, $relA1$, lac (F^- $proAB$ $lacI^Q$ Z $\Delta M15$ $Tn5$ (Tet^R))	Agilent (Waldbronn)

Alle verwendeten Plasmide sind im Anschluss aufgeführt (Tabelle 3):

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pABS	Cam^R	pACYC184 Derivat (Sambrook <i>et al.</i> (1989), p15A- <i>origin</i>)	Behrendt <i>et al.</i> (2004)
pABS- <i>tatABC</i>	Cam^R	pACYC184 Derivat mit <i>tatABC</i> , <i>tatA</i> -Promotor	Berthelmann und Brüser (2004)
pABS- <i>tatA</i> (+ G23) <i>BC</i>	Cam^R	pABS- <i>tatABC</i> mit einem zusätzlichen Glycin an Position 23 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pABS- <i>tatA</i> (+ G23, 24) <i>BC</i>	Cam^R	pABS- <i>tatABC</i> mit zwei zusätzlichen Glycinen an Position 23, 24 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pABS- <i>tatA</i> (+ P28) <i>BC</i>	Cam^R	pABS- <i>tatABC</i> mit einem zusätzlichen Prolin an Position 28 in <i>tatA</i>	Laborbestand

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pABS- <i>tatA</i> (+ P28, G29) <i>BC</i>	Cam ^R	pABS- <i>tatABC</i> mit einem zusätzlichen Prolin an Position 28 und Glycin an Position 29 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pABS- <i>tatA</i> (MfeI>ATG) <i>BC</i>	Cam ^R	pABS- <i>tatABC</i> mit MfeI anstelle des Start-Codons in <i>tatA</i>	Behrendt Dissertation in Vorbereitung
pABS- <i>tatAB</i> (+ G23) <i>C</i>	Cam ^R	pABS- <i>tatABC</i> mit einem zusätzlichen Glycin an Position 23 in <i>tatB</i>	Mehner (2006)
pABS- <i>tatAB</i> (+ G23, 24) <i>C</i>	Cam ^R	pABS- <i>tatABC</i> mit zwei zusätzlichen Glycinen an Position 23, 24 in <i>tatB</i>	Mehner (2006)
pABS- <i>tatAB</i> (+ G23, 24, 25) <i>C</i>	Cam ^R	pABS- <i>tatABC</i> mit drei zusätzlichen Glycinen an Position 23, 24, 25 in <i>tatB</i>	Laborbestand
pABS- <i>tatAB</i> (+ G23, 24, 25, 26) <i>C</i>	Cam ^R	pABS- <i>tatABC</i> mit vier zusätzlichen Glycinen an Position 23, 24, 25, 26 in <i>tatB</i>	Laborbestand
pBAD22	Amp ^R	<i>araC araBAD</i> Promotor, <i>rrnB</i> Terminator, pBR- <i>origin</i> , Vektor mit L-Arabinose regulierbarer Expression	Guzman <i>et al.</i> (1995)
pBAD- <i>pspA-H6</i>	Amp ^R	pBAD22 mit <i>pspA-H6</i>	Standar <i>et al.</i> (2008)
pBW22	Amp ^R	<i>rhaBAD</i> Promotor, ColE1- <i>origin</i>	Wilms <i>et al.</i> (2001)
pBW- <i>tatA</i>	Amp ^R	pBW- <i>tatA-strep</i> mit Stopp-Codon vor dem <i>Strep</i> -tag	diese Arbeit
pBW- <i>tatA-H6</i>	Amp ^R	pBW22 mit NdeI/BamHI klonierten <i>tatA</i>	Berthelmann <i>et al.</i> (2008)

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pBW- <i>tatA-strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA-H6</i> mit <i>tatA</i> Austausch des Strep- <i>tagII</i> anstelle His- <i>tag</i>	Mehner (2006)
pBW- <i>tatB-H6</i>	Amp ^R	pBW22 mit NdeI/BamHI klonierten <i>tatB</i>	Mehner (2006)
pBW- <i>tatB-strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatB-H6</i> mit <i>tatB</i> Austausch des Strep- <i>tagII</i> anstelle His- <i>tag</i>	Graubner, Disser- tation in Vorberei- tung
pBW- <i>tatA(HC)-strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatB-strep</i> mit <i>tatA</i> - Fragment ab Codon F20S	Mehner (2006)
pBW- <i>tatA(CT)-strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatB-strep</i> mit <i>tatA</i> - Fragment ab Codon K41	Mehner (2006)
pBW- <i>hip-strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW22 mit <i>hip</i>	Graubner <i>et al.</i> (2007)
pBW-mat- <i>hip-strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW22 mit <i>hip</i> ohne Si- gnalsequenz	Graubner <i>et al.</i> (2007)
pBW-mat- <i>hip-tatA(HC)-strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW-mat- <i>hip-strep</i> mit BamHI/BglII klonierten <i>tatA</i> - Fragment ab Codon F20S	diese Arbeit
pBW-mat- <i>hip-tatA-strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW-mat- <i>hip-strep</i> mit BamHI/BglII klonierten <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA-mat-hip-strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA-strep</i> mit BamHI/BglII klonierten <i>hip</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA-BamHI-hinter-hinge-strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA-strep</i> mit BamHI nach dem Codon 21 in <i>tatA</i>	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pBW- <i>tatA</i> (NT)-mat- <i>hip-strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BamHI-hinter- <i>hinge-strep</i> mit BamHI/BglII klonierten <i>hip</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (NT-G3D)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> (NT)- <i>strep</i> mit einem Austausch G3D in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (NT-W7A)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> (NT)- <i>strep</i> mit einem Austausch W7A in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (NT-Q8L)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> (NT)- <i>strep</i> mit einem Austausch Q8L in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (NT-W7A,Q8L)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> (NT)- <i>strep</i> mit einem Austausch von W7Q8 zu A7L8 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> -BglII-hinter- <i>hinge-strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA-strep</i> mit BglIII nach dem Codon 21 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (a)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglIII klonierten STGGG-Austausch in den Codons 7-21 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (b)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglIII klonierten STGGG-Austausch in den Codons 2-6 und 12-21 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (c)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglIII klonierten STGGG-Austausch in den Codons 2-16 in <i>tatA</i>	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pBW- <i>tatA</i> (bc)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglIII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglIII klonierten STGGG-Austausch in den Codons 2-6 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (neg.-Kon)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglIII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglIII klonierten STGGG-Austausch in den Codons 2-21 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (b-I)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglIII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglIII klonierten STGGG-Austausch in den Codons 2-5 und 12-21 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (b-SI)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglIII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglIII klonierten STGGG-Austausch in den Codons 2-4 und 12-21 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (b-ISI)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglIII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglIII klonierten STGGG-Austausch in den Codons 2-3 und 12-21 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (bc-I)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglIII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglIII klonierten STGG-Austausch in den Codons 2-5 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (bc-SI)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglIII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglIII klonierten STG-Austausch in den Codons 2-4 in <i>tatA</i>	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pBW- <i>tatA</i> (bc-ISI)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglII klonierten ST-Austausch in den Codons 2-3 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (I6A)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglII klonierten I6A-Austausch in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (I6D)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglII klonierten I6D-Austausch in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (I6F)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglII klonierten I6F-Austausch in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (I6K)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglII klonierten I6K-Austausch in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (I6S)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglII klonierten I6S-Austausch in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (D7D8)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglII klonierten D7D8-Austausch in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (K7K8)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglII klonierten K7K8-Austausch in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (K6K7K8)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglII klonierten K6K7K8-Austausch in <i>tatA</i>	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pBW- <i>tatA</i> (K7K8K9)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> -BglIII-hinter- <i>hinge-strep</i> mit NdeI/BglIII klonierten K7K8K9-Austausch in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatE-strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatB-strep</i> mit NdeI/BamHI klonierten <i>tatE</i>	diese Arbeit
pCP20	Amp ^R	<i>oriR_γ</i> Entfernung der Kanamycin-Kassette	Cherepanov und Wackernagel (1995)
pEXH5- <i>tac</i>	Amp ^R	pTB-DG-Derivat mit XbaI/HindIII klonierten <i>hip</i> von pEXH5 (unter Kontrolle von <i>P_{tac}</i>)	Richter und Brüser (2005)
pEX- <i>cueO-H6-tac</i>	Amp ^R	pTB-DG-Derivat mit XbaI/ScaI klonierten <i>cueO-H6</i>	Graubner <i>et al.</i> (2007)
pRK- <i>tatABC</i>	Tet ^R	pRK415 mit <i>tatABC</i>	Brüser <i>et al.</i> (2003)
pRK- <i>hip</i>	Tet ^R	pRK415 mit <i>hip</i>	Brüser <i>et al.</i> (2003)
pTB-DG	Amp ^R	Signalsequenz (ss) von <i>dmsA</i> fusioniert mit <i>gfp</i> unter Kontrolle von <i>P_{tac}</i> , pBR322- <i>origin</i>	Berthelmann und Brüser (2004)
pTB-DG-KK	Amp ^R	pTB-DG-Derivat mit RR>KK-Austausch im <i>dmsA</i> -Signalpeptid	Berthelmann <i>et al.</i> (2008)
pUL-ptat	Cam ^R	pCHAPS-Derivat mit pSC101- <i>origin</i>	Laborbestand
pUL- <i>ptat-tatA-strep</i>	Cam ^R	pUL- <i>ptat</i> -Derivat	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
Photo-aktivierbare Crosslinker			
pAH120	Kan ^R	<i>rhaB</i> Promotor, <i>oriR</i> , Λ	Haldimann und Wanner (2001)
pAH120- <i>tatA-strep</i>	Kan ^R	pAH120 Derivat mit NdeI/BssHIII <i>tatA</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>ptat-tatA-strep</i>	Kan ^R	pAH120- <i>tatA-strep</i> Derivat mit Austausch des <i>rhaB</i> Promotors gegen <i>tatA</i> Promotor	Laborbestand
pEVOL	Cam ^R	<i>araBAD</i> Promotor, tRNA ^{opt} _{CUA} , p15A- <i>origin</i> , <i>araC</i> Repressor	Young <i>et al.</i> (2010)
pINT-ts	Amp ^R	<i>intλ</i> Integrations-Plasmid	Hasan <i>et al.</i> (1994)
pAH120- <i>ptat-tatA</i> (I6-pBpa)- <i>strep</i>	Kan ^R	pAH120- <i>ptat-tatA-strep</i> Derivat mit Stopp-Codon TAG anstelle I6 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>ptat-tatA</i> (W7-pBpa)- <i>strep</i>	Kan ^R	pAH120- <i>ptat-tatA-strep</i> Derivat mit Stopp-Codon TAG anstelle W7 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>ptat-tatA</i> (Q8-pBpa)- <i>strep</i>	Kan ^R	pAH120- <i>ptat-tatA-strep</i> Derivat mit Stopp-Codon TAG anstelle Q8 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>ptat-tatA</i> (L9-pBpa)- <i>strep</i>	Kan ^R	pAH120- <i>ptat-tatA-strep</i> Derivat mit Stopp-Codon TAG anstelle L9 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>ptat-tatA</i> (L10-pBpa)- <i>strep</i>	Kan ^R	pAH120- <i>ptat-tatA-strep</i> Derivat mit Stopp-Codon TAG anstelle L10 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>ptat-tatA</i> (I11-pBpa)- <i>strep</i>	Kan ^R	pAH120- <i>ptat-tatA-strep</i> Derivat mit Stopp-Codon TAG anstelle I11 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>ptat-tatA</i> (I12-pBpa)- <i>strep</i>	Kan ^R	pAH120- <i>ptat-tatA-strep</i> Derivat mit Stopp-Codon TAG anstelle I12 in <i>tatA</i>	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pAH120- <i>ptat-tatA</i> (A13-pBpa)- <i>strep</i>	Kan ^R	pAH120- <i>ptat-tatA-strep</i> Derivat mit Stopp-Codon TAG anstelle A13 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>ptat-tatA</i> (V14-pBpa)- <i>strep</i>	Kan ^R	pAH120- <i>ptat-tatA-strep</i> Derivat mit Stopp-Codon TAG anstelle V14 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>ptat-tatA</i> (I15-pBpa)- <i>strep</i>	Kan ^R	pAH120- <i>ptat-tatA-strep</i> Derivat mit Stopp-Codon TAG anstelle I15 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>ptat-tatA</i> (L18-pBpa)- <i>strep</i>	Kan ^R	pAH120- <i>ptat-tatA-strep</i> Derivat mit Stopp-Codon TAG anstelle L18 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>ptat-tatA</i> (F20-pBpa)- <i>strep</i>	Kan ^R	pAH120- <i>ptat-tatA-strep</i> Derivat mit Stopp-Codons TAG anstelle F20 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pAH120- <i>ptat-tatA</i> (I28-pBpa)- <i>strep</i>	Kan ^R	pAH120- <i>ptat-tatA-strep</i> Derivat mit Stopp-Codon TAG anstelle I28 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (I6-pBpa)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA-strep</i> mit Stopp-Codon TAG anstelle Codon I6 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (W7-pBpa)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA-strep</i> mit Stopp-Codon TAG anstelle Codon W7 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (Q8-pBpa)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA-strep</i> mit Stopp-Codon TAG anstelle Codon Q8 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (L9-pBpa)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA-strep</i> mit Stopp-Codon TAG anstelle Codon L9 in <i>tatA</i>	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pBW- <i>tatA</i> (L10-pBpa)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA-strep</i> mit Stopp-Codon TAG anstelle Codon L10 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (I11-pBpa)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA-strep</i> mit Stopp-Codon TAG anstelle Codon I11 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (I12-pBpa)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA-strep</i> mit Stopp-Codon TAG anstelle Codon I12 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (A13-pBpa)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA-strep</i> mit Stopp-Codon TAG anstelle Codon A13 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (V14-pBpa)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA-strep</i> mit Stopp-Codon TAG anstelle Codon V14 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (I15-pBpa)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA-strep</i> mit Stopp-Codon TAG anstelle Codon I15 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (L18-pBpa)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA-strep</i> mit Stopp-Codon TAG anstelle Codon L18 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (F20-pBpa)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA-strep</i> mit Stopp-Codon TAG anstelle Codon F20 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i> (F20-pBpa)	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA</i> (F20-stop)- <i>strep</i> mit Stopp-Codon vor dem <i>Strep</i> -tagII	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pBW- <i>tatA</i> (I28-pBpa)- <i>strep</i>	Amp ^R	Derivat von pBW- <i>tatA-strep</i> mit Stopp-Codon TAG anstelle Codon I28 in <i>tatA</i>	diese Arbeit
LexA-basiertes 2-Hybrid-System			
pDP804	Amp ^R	LexA ₁₋₈₇ 408-Fos-Zipper-Fusion, p15A- <i>origin</i>	Dmitrova <i>et al.</i> (1998)
pMS604	Tet ^R	LexA ₁₋₈₇ WT-Fos-Zipper-Fusion, ColE1- <i>origin</i>	Porte <i>et al.</i> (1995)
pDP- <i>tatA-strep</i>	Amp ^R	pDP804-Derivat mit BglIII/BssHIII klonierten <i>tatA-strep</i>	diese Arbeit
pDP- <i>tatA</i> (NT)- <i>strep</i>	Amp ^R	pDP804-Derivat mit BglIII/BssHIII klonierten <i>tatA-strep</i> -Fragment bis Codon F20	diese Arbeit
pDP- <i>tatA</i> (HC)- <i>strep</i>	Amp ^R	pDP804-Derivat mit BglIII/BssHIII klonierten <i>tatA-strep</i> -Fragment ab Codon F20S	diese Arbeit
pDP- <i>tatA</i> (CT)- <i>strep</i>	Amp ^R	pDP804-Derivat mit BglIII/BssHIII klonierten <i>tatA-strep</i> -Fragment ab Codon K41	diese Arbeit
pDP- <i>tatB-strep</i>	Amp ^R	pDP804-Derivat mit BglIII/BssHIII klonierten <i>tatB-strep</i>	diese Arbeit
pDP- <i>tatC-strep</i>	Amp ^R	pDP804-Derivat mit BglIII/BssHIII klonierten <i>tatC-strep</i>	diese Arbeit
pDP- <i>tatE-strep</i>	Amp ^R	pDP804-Derivat mit BglIII/BssHIII klonierten <i>tatE-strep</i>	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pDP- <i>pspA-strep</i>	Amp ^R	pDP804-Derivat mit BglIII/MluI klonierten <i>pspA-strep</i>	diese Arbeit
pMS- <i>tatA-H6</i>	Tet ^R	pMS604-Derivat mit AgeI/XhoI klonierten <i>tatA-H6</i>	diese Arbeit
pMS- <i>tatA(HC)-H6</i>	Tet ^R	pMS604-Derivat mit AgeI/XhoI klonierten <i>tatA-H6</i> -Fragment	diese Arbeit
pMS- <i>tatA(CT)-H6</i>	Tet ^R	pMS604-Derivat mit AgeI/XhoI klonierten <i>tatA-H6</i> -Fragment	diese Arbeit
pMS-H6	Tet ^R	pMS604-Derivat mit AgeI/XhoI klonierten Stopp-Codon vor <i>tatA(HC)</i>	diese Arbeit
pMS- <i>tatA-strep</i>	Tet ^R	pMS604-Derivat mit AgeI/XhoI klonierten <i>tatA-strep</i>	diese Arbeit
pMS- <i>tatA(NT)-strep</i>	Tet ^R	pMS604-Derivat mit AgeI/XhoI klonierten <i>tatA-strep</i> -Fragment bis Codon F20	diese Arbeit
pMS- <i>tatA(HC)-strep</i>	Tet ^R	pMS604-Derivat mit AgeI/XhoI klonierten <i>tatA-strep</i> -Fragment ab Codon F20S	diese Arbeit
pMS- <i>tatA(CT)-strep</i>	Tet ^R	pMS604-Derivat mit AgeI/XhoI klonierten <i>tatA-strep</i> -Fragment ab Codon K41	diese Arbeit
pMS- <i>tatB-strep</i>	Tet ^R	pMS604-Derivat mit AgeI/XhoI klonierten <i>tatB-strep</i>	diese Arbeit
pMS- <i>tatC-strep</i>	Tet ^R	pMS604-Derivat mit AgeI/XhoI klonierten <i>tatC-strep</i>	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pMS- <i>tatE-strep</i>	Tet ^R	pMS604-Derivat mit AgeI/XhoI klonierten <i>tatE-strep</i>	diese Arbeit
pMS- <i>pspA-strep</i>	Tet ^R	pMS604-Derivat mit AgeI/XhoI klonierten <i>pspA-strep</i>	diese Arbeit
BACTH (<i>Bacterial-Adenylate-Cyclase-based-Two-Hybrid</i>)-System			
pUT18	Amp ^R	pUC19-Derivat, T18-Fragment (AS 225-399 der CyaA), P _{lac} , ColE1- <i>origin</i> , N-terminale Fusion an T18	Karimova <i>et al.</i> (2001)
pUT18C	Amp ^R	pUC19-Derivat, T18-Fragment (AS 225-399 der CyaA), P _{lac} , ColE1- <i>origin</i> , C-terminale Fusion an T18	Karimova <i>et al.</i> (2001)
pUT18C- <i>zip</i>	Amp ^R	pUT18C-Derivat mit Leucin-Zipper von GCN4 (Positivkontrolle)	Karimova <i>et al.</i> (1998)
pKT25	Kan ^R	pSU40-Derivat, T25-Fragment (AS 1-224 der CyaA), P _{lac} , p15A- <i>origin</i> , C-terminale Fusion an T25	Karimova <i>et al.</i> (2001)
pKNT25	Kan ^R	pSU40-Derivat, T25-Fragment (AS 1-224 der CyaA), P _{lac} , p15A- <i>origin</i> , N-terminale Fusion an T25	Karimova <i>et al.</i> (2005)
pKT25- <i>zip</i>	Kan ^R	pKT25-Derivat mit Leucin-Zipper von GCN4 (Positivkontrolle)	Karimova <i>et al.</i> (1998)
pUT18-7AS- <i>tatA-strep</i>	Amp ^R	pUT18-Derivat mit HindIII/KpnI klonierten <i>tatA-strep</i>	diese Arbeit
pUT18-7AS- <i>tatA(HC)-strep</i>	Amp ^R	pUT18-Derivat mit HindIII/KpnI klonierten <i>tatA-strep</i> -Fragment ab Codon F20S	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pUT18-7AS- <i>tatA</i> (CT)- <i>strep</i>	Amp ^R	pUT18-Derivat mit HindIII/KpnI klonierten <i>tatA-strep</i> ab Codon 41	diese Arbeit
pUT18- <i>tatA</i> (NT)- <i>strep</i>	Amp ^R	pUT18- <i>tatA-strep</i> -Derivat mit HindIII/BamHI klonierten <i>tatA-strep</i> bis Codon F20	diese Arbeit
pUT18-7AS- <i>tatA</i> (F20S)- <i>strep</i>	Amp ^R	pUT18-7AS- <i>tatA-strep</i> -Derivat Codon-Austausch F20S in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pUT18- <i>tatA</i> -(G21)- <i>strep</i>	Amp ^R	pUT18-Derivat mit HindIII/KpnI klonierten <i>tatA-strep</i> ab Codon G21	diese Arbeit
pUT18- <i>tatA</i> -(T22)- <i>strep</i>	Amp ^R	pUT18-Derivat mit HindIII/KpnI klonierten <i>tatA-strep</i> ab Codon T22	diese Arbeit
pUT18- <i>tatA</i> -(K23)- <i>strep</i>	Amp ^R	pUT18-Derivat mit HindIII/KpnI klonierten <i>tatA-strep</i> ab Codon K23	diese Arbeit
pUT18- <i>tatA</i> -(K24)- <i>strep</i>	Amp ^R	pUT18-Derivat mit HindIII/KpnI klonierten <i>tatA-strep</i> ab Codon K24	diese Arbeit
pUT18- <i>tatB-strep</i>	Amp ^R	pUT18- <i>tatA-strep</i> -Derivat NdeI/BamHI klonierten <i>tatB</i>	diese Arbeit
pUT18- <i>tatB</i> (HC)- <i>strep</i>	Amp ^R	pUT18- <i>tatA-strep</i> -Derivat NdeI/BamHI klonierten <i>tatB</i> -Fragment ab Codon G21	diese Arbeit
pUT18- <i>tatB</i> (CT)- <i>strep</i>	Amp ^R	pUT18- <i>tatA-strep</i> -Derivat NdeI/BamHI klonierten <i>tatB</i> -Fragment ab Codon Q47E	diese Arbeit
pUT18- <i>tatB</i> (NT)- <i>strep</i>	Amp ^R	pUT18- <i>tatA-strep</i> -Derivat NdeI/BamHI klonierten <i>tatB</i> -Fragment bis Codon G21	Schöttmer (2011)

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pUT18- <i>tatC-strep</i>	Amp ^R	pUT18- <i>tatA-strep</i> -Derivat BamHI klonierten <i>tatC</i>	NdeI/- diese Arbeit
pUT18- <i>tatE-strep</i>	Amp ^R	pUT18- <i>tatA-strep</i> -Derivat BamHI klonierten <i>tatE</i>	NdeI/- diese Arbeit
pUT18-18AS- <i>pspA-strep</i>	Amp ^R	pUT18-Derivat mit BamHI/KpnI klonierten <i>pspA-strep</i>	diese Arbeit
pUT18-18AS- <i>pspA-(GGGS)₃</i>	Amp ^R	pUT18- <i>pspA-strep</i> -Derivat mit (GGGS) ₃ - <i>linker</i> anstelle des <i>Strep</i> -tagsII	diese Arbeit
pUT18-18AS- <i>pspA(NT)-(GGGS)₃</i>	Amp ^R	pUT18-18AS- <i>pspA-(GGGS)₃</i> -Derivat mit BamHI/KpnI klonierten <i>pspA</i> -Fragment bis Codon F187	diese Arbeit
pUT18-18AS- <i>pspA(CT)-(GGGS)₃</i>	Amp ^R	pUT18-18AS- <i>pspA-(GGGS)₃</i> -Derivat mit BamHI/KpnI klonierten <i>pspA</i> -Fragment ab Codon L40	diese Arbeit
pUT18- <i>tatA-strep</i>	Amp ^R	pUT18-7AS- <i>tatA-strep</i> -Derivat mit freiem N-Terminus von <i>tatA</i>	diese Arbeit
pUT18- <i>tatA(HC)-strep</i>	Amp ^R	pUT18- <i>tatA-strep</i> -Derivat mit freiem N-Terminus von <i>tatA</i> -Fragment ab Codon F20S	diese Arbeit
pUT18- <i>tatA(CT)-strep</i>	Amp ^R	pUT18- <i>tatA-strep</i> -Derivat mit freiem N-Terminus von <i>tatA</i> -Fragment ab Codon K41	diese Arbeit
pUT18- <i>pspA-(GGGS)₃</i>	Amp ^R	pUT18-18AS- <i>pspA-(GGGS)₃</i> -Derivat mit freiem N-Terminus von <i>pspA</i>	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pUT18C- <i>pspA-strep</i>	Amp ^R	pUT18C-Derivat mit BamHI/KpnI klonierten <i>pspA-strep</i>	diese Arbeit
pKNT25-7AS- <i>tatA-strep</i>	Kan ^R	pKNT25-Derivat mit HindIII/KpnI klonierten <i>tatA-strep</i>	diese Arbeit
pKNT25-7AS- <i>tatA(HC)-strep</i>	Kan ^R	pKNT25-Derivat mit HindIII/KpnI klonierten <i>tatA-strep</i> -Fragment ab Codon F20S	diese Arbeit
pKNT25-7AS- <i>tatA(CT)-strep</i>	Kan ^R	pKNT25-Derivat mit HindIII/KpnI klonierten <i>tatA-strep</i> ab Codon 41	diese Arbeit
pKNT25- <i>tatA(NT)-strep</i>	Kan ^R	pKNT25- <i>tatA-strep</i> -Derivat mit HindIII/BamHI klonierten <i>tatA-strep</i> bis Codon F20	diese Arbeit
pKNT25-7AS- <i>tatA(F20S)-strep</i>	Kan ^R	pKNT25- <i>tatA-strep</i> -Derivat Codon-Austausch F20S in <i>tatA</i>	diese Arbeit
pKNT25- <i>tatA</i> -(G21)- <i>strep</i>	Kan ^R	pKNT25-Derivat mit HindIII/KpnI klonierten <i>tatA-strep</i> ab Codon G21	diese Arbeit
pKNT25- <i>tatA</i> -(T22)- <i>strep</i>	Kan ^R	pKNT25-Derivat mit HindIII/KpnI klonierten <i>tatA-strep</i> ab Codon T22	diese Arbeit
pKNT25- <i>tatA</i> -(K23)- <i>strep</i>	Kan ^R	pKNT25-Derivat mit HindIII/KpnI klonierten <i>tatA-strep</i> ab Codon K23	diese Arbeit
pKNT25- <i>tatA</i> -(K24)- <i>strep</i>	Kan ^R	pKNT25-Derivat mit HindIII/KpnI klonierten <i>tatA-strep</i> ab Codon K24	diese Arbeit
pKNT25- <i>tatB-strep</i>	Kan ^R	pKNT25- <i>tatA-strep</i> -Derivat NdeI/BamHI klonierten <i>tatB</i>	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pKNT25- <i>tatB</i> (HC)- <i>strep</i>	Kan ^R	pKNT25- <i>tatA-strep</i> -Derivat NdeI/BamHI klonierten <i>tatB</i> -Fragment ab Codon 21	diese Arbeit
pKNT25- <i>tatB</i> (CT)- <i>strep</i>	Kan ^R	pKNT25- <i>tatA-strep</i> -Derivat NdeI/BamHI klonierten <i>tatB</i> -Fragment ab Codon Q47E	diese Arbeit
pKNT25- <i>tatC-strep</i>	Kan ^R	pKNT25- <i>tatA-strep</i> -Derivat NdeI/BamHI klonierten <i>tatC</i>	diese Arbeit
pKNT25- <i>tatE-strep</i>	Kan ^R	pKNT25- <i>tatA-strep</i> -Derivat NdeI/BamHI klonierten <i>tatE</i>	diese Arbeit
pKNT25-18AS- <i>pspA-strep</i>	Kan ^R	pKNT25-Derivat mit BamHI/KpnI klonierten <i>pspA-strep</i>	diese Arbeit
pKNT25-18AS- <i>pspA</i> - (GGGS) ₃	Kan ^R	pKNT25-18AS- <i>pspA-strep</i> -Derivat mit (GGGS) ₃ - <i>linker</i> anstelle des <i>Strep</i> - tagsII	diese Arbeit
pKNT25-18AS- <i>pspA</i> (NT)-(GGGS) ₃	Kan ^R	pKNT25-18AS- <i>pspA</i> -(GGGS) ₃ -Derivat mit BamHI/KpnI klonierten <i>pspA</i> - Fragment bis Codon F187	diese Arbeit
pKNT25-18AS- <i>pspA</i> (CT)-(GGGS) ₃	Kan ^R	pKNT25-18AS- <i>pspA</i> -(GGGS) ₃ -Derivat mit BamHI/KpnI klonierten <i>pspA</i> - Fragment ab Codon L40	diese Arbeit
pKNT25- <i>tatA-strep</i>	Kan ^R	pKNT25-7AS- <i>tatA-strep</i> -Derivat mit freien N-Terminus von <i>tatA</i>	diese Arbeit
pKNT25- <i>tatA</i> (HC)- <i>strep</i>	Kan ^R	pKNT25- <i>tatA-strep</i> -Derivat mit freiem N-Terminus von <i>tatA</i> -Fragment ab Co- don F20S	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pKNT25- <i>tatA</i> (CT)- <i>strep</i>	Kan ^R	pKNT25- <i>tatA-strep</i> -Derivat mit freiem N-Terminus von <i>tatA</i> -Fragment ab Codon K41	diese Arbeit
pKNT25- <i>pspA</i> -(<i>GGGS</i>) ₃	Kan ^R	pKNT25-18AS- <i>pspA</i> -(<i>GGGS</i>) ₃ -Derivat mit freiem N-Terminus von <i>pspA</i>	diese Arbeit
pKT25- <i>pspA-strep</i>	Kan ^R	pKT25-Derivat mit BamHI/KpnI klonierten <i>pspA-strep</i>	diese Arbeit
pKT25- <i>tatA-strep</i>	Kan ^R	pKT25-Derivat mit PstI/KpnI klonierten <i>tatA-strep</i>	diese Arbeit
pKT25- <i>tatA</i> (NT)- <i>strep</i>	Kan ^R	pKT25-Derivat mit PstI/KpnI klonierten <i>tatA-strep</i> -Fragment bis Codon F20	diese Arbeit
pKT25- <i>tatA</i> (HC)- <i>strep</i>	Kan ^R	pKT25- <i>tatA-strep</i> -Derivat mit NdeI/BamHI klonierten <i>tatA-strep</i> -Fragment ab Codon F20S	diese Arbeit
pKT25- <i>tatA</i> (CT)- <i>strep</i>	Kan ^R	pKT25- <i>tatA-strep</i> -Derivat mit NdeI/BamHI klonierten <i>tatA-strep</i> -Fragment ab Codon K41	diese Arbeit
pKT25- <i>tatA</i> -T22- <i>strep</i>	Kan ^R	pKT25- <i>tatA-strep</i> -Derivat mit NdeI/BamHI klonierten <i>tatA-strep</i> -Fragment ab Codon T22	diese Arbeit
pKT25- <i>tatB-strep</i>	Kan ^R	pKT25- <i>tatA-strep</i> -Derivat mit NdeI/BamHI klonierten <i>tatB</i>	diese Arbeit
pKT25- <i>tatC-strep</i>	Kan ^R	pKT25- <i>tatA-strep</i> -Derivat mit NdeI/BamHI klonierten <i>tatC</i>	diese Arbeit
pKT25- <i>tatE-strep</i>	Kan ^R	pKT25- <i>tatA-strep</i> -Derivat mit NdeI/BamHI klonierten <i>tatE</i>	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pUL- <i>ptat-tatA-strep-T18</i>	Cam ^R	pUL- <i>ptat-tatA-strep</i> -Derivat mit NdeI/HindIII klonierten <i>tatA-strep-T18</i>	diese Arbeit
pUL- <i>ptat-tatA(HC)-strep-T18</i>	Cam ^R	pUL- <i>ptat-tatA-strep-T18</i> -Derivat mit NdeI/BamHI klonierten <i>tatA</i> -Fragment ab Codon F20S	diese Arbeit
pUL- <i>ptat-tatA(CT)-strep-T18</i>	Cam ^R	pUL- <i>ptat-tatA-strep-T18</i> -Derivat mit NdeI/BamHI klonierten <i>tatA</i> -Fragment ab Codon K41	diese Arbeit
pUL- <i>ptat-tatA(NT)-strep-T18</i>	Cam ^R	pUL- <i>ptat-tatA-strep-T18</i> -Derivat mit NdeI/BamHI klonierten <i>tatA</i> -Fragment bis Codon F20	diese Arbeit
pUL- <i>ptat-tatB-strep-T18</i>	Cam ^R	pUL- <i>ptat-tatA-strep-T18</i> -Derivat mit NdeI/BamHI klonierten <i>tatB</i>	diese Arbeit
pUL- <i>ptat-tatC-strep-T18</i>	Cam ^R	pUL- <i>ptat-tatA-strep-T18</i> -Derivat mit NdeI/BamHI klonierten <i>tatC</i>	diese Arbeit
pUL- <i>ptat-tatE-strep-T18</i>	Cam ^R	pUL- <i>ptat-tatA-strep-T18</i> -Derivat mit NdeI/BamHI klonierten <i>tatE</i>	diese Arbeit
pUL- <i>ptat-T18</i>	Cam ^R	pUL- <i>ptat-tatA-strep-T18</i> -Derivat T18 (Negativkontrolle)	diese Arbeit

2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.1 Plasmid-Minipräparation

Zur Gewinnung von reiner Plasmid-DNA von *E. coli* aus 4 ml einer Übernachtskultur wurde der peqGOLD *E.N.Z.A.*© bzw. *Plasmid Miniprep Kit 1* (peqlab, Erlangen)

benutzt. Die Plasmid-DNA wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ von der Silicagel-Membran eluiert und für weitere molekulargenetische Arbeiten verwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden horizontale Flachbettapparaturen (EASY-CAST™ *Electrophoresis-System*, Owl Separation Systems, Portsmouth, USA) 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 aufgekochten Agarose wurde entweder vor dem Gel-Lauf $0,6\ \mu\text{g}$ Ethidiumbromid/ml 1x TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA) zugesetzt oder die Gele wurden im nachhinein in $1\ \mu\text{g}$ Ethidiumbromid/ml 1x TAE-Puffer geschwenkt (Celloshaker Variospeed, BIOTEC-FISCHER, Reiskirchen). Das Probenvolumen für analytische Gele betrug $5\ \mu\text{l}$ und für präparative Gele $50\ \mu\text{l}$ (PCR-Ansatz) bzw. $100\ \mu\text{l}$ (DNA-Restriktion). Vor dem Beladen der Gele wurden die Proben 1:20 mit Probenpuffer (50% (v/v) Glycerin, 200 mM EDTA, 0,2% Xylencyanol oder Bromphenolblau) gemischt. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1x TAE- bzw. 1 TBE-Puffer bei 120 V ohne Stromlimitierung (*Phero-stab.300*, BIOTEC FISCHER, Reiskirchen oder *Electrophoresis Power Supply EPS 320* GE Healthcare,). Als Größenstandard wurden 3-5 μl der *Gene Ruler™ 1kb Ladder* oder *Gene Ruler™ 100bp Ladder* (Fermentas, Schwerte) mitgeführt. Die DNA-Banden wurden anschließend unter UV-Licht mittels *TFX-20.M* (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) oder *Intas-UV-System* (Intas Science Imaging Instruments, Göttingen) detektiert.

2.2.3 DNA-Restriktion

Bei Bedarf wurden DNA-Fragmente oder Plasmide mit Restriktionsenzymen (NEB, Frankfurt am Main; Fermentas, Schwerte) nach Herstellerangaben verdaut. Analytische Verdauungen wurden in einem Volumen von $20\ \mu\text{l}$ und präparative Verdauungen in $80\ \mu\text{l}$ durchgeführt. Die Verdauungen erfolgten bei der für die Enzyme spezifischen Temperatur im *Thermomixer 5436* (Fisher Scientific, Schwerte) bzw. Thermoshaker (SCHUTRON, Emersacker) für eine (analytisch) bzw. bis zu vier Stunden (präparativ). Die daraus resultierenden DNA-Fragmente wurden daraufhin mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.2) gereinigt.

2.2.4 Reinigung von DNA-Fragmenten

Restriktions- bzw. PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* (Qiagen, Hilden) bzw. *NucleoSpin® Extract II Kit* (Machery-Nagel, Düren) gereinigt. Alle Arbeitsschritte wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Auf der Silicagel-Membran gebundene DNA-Fragmente wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ eluiert und für weitere Schritte bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu reinigenden DNA-Fragmente wurden in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt. Nach Ethidiumbromid-Färbung der DNA konnten die entsprechenden Banden im UV-Licht (*2011 Macrovue Transilluminator, Magnifax 4*) lokalisiert und mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten werden. Das weitere Vorgehen erfolgte gemäß dem Protokoll des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden) bzw. *NucleoSpin® Extract II Kit* (Machery-Nagel, Düren). Die DNA wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ eluiert und für weitere Schritte bei -20°C aufbewahrt.

2.2.6 Dephosphorylierung

Um eine Religation verdauter Vektoren zu verhindern, wurden diese dephosphoryliert. Hierbei wurde dem Restriktionsansatz $1\ \mu\text{l}$ Shrimps Alkalische Phosphatase (NEB, Frankfurt am Main) bzw. FastAP® Thermosensitive Alkalische Phosphatase (Fermentas, Schwerte) zugesetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von geschnittenen DNA-Fragmenten und Vektoren erfolgte in einem Endvolumen von $20\ \mu\text{l}$ über Nacht bei 16°C im *Thermomixer 5436* (Fisher Scientific, Schwerte). Für die Ligation wurden 400 U ($1\ \mu\text{l}$) T4-DNA-Ligase und der entsprechende T4-DNA-Ligase-Puffer eingesetzt (NEB, Frankfurt am Main; Fermentas, Schwerte). Das Verhältnis zwischen Vektor- zu Fragmentkonzentration wurde zuvor mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.2) abgeschätzt.

2.2.8 Herstellung kompetenter Zellen

2.2.8.1 Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl₂-Methode wurden 50 ml LB-Medium mit 1 ml Übernachtskultur beimpft. Die Kultur wurde bei 200 U/min und 37 °C inkubiert und bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden die Zellen (Hettich *Zentrifuge Universal 30 RF*, 10 min bei 4 °C und 3800 g) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 15 ml 70 mM CaCl₂, 20 mM MgSO₄ resuspendiert und 45 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 10 min bei 4 °C und 3800 g. Das erhaltene Pellet wurde wieder in 5 ml 70 mM CaCl₂, 20 mM MgSO₄ resuspendiert und erneut 45 min auf Eis inkubiert. Für die Aufbewahrung der Zellen wurden diese mit 300 µl 86%igen Glycerin versetzt, kurz gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und schließlich in 200-µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen wurden im Anschluss bei -80 °C gelagert.

2.2.8.2 Herstellung ultrakompetenter Zellen nach Sambrook und Russell (2001)

Das Protokoll von Sambrook und Russell (2001) wurde teilweise modifiziert. Für die Herstellung von ultrakompetenten Zellen wurden 100 ml LB-Medium mit 2 ml Übernachtskultur beimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C schüttelnd (200 Upm) angezogen und bei einer OD₆₀₀ von 0,55 wurden die Zellen 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 10 min bei 4 °C und 3800 g (Hettich *Zentrifuge Universal 30 RF*) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 32 ml Transformationspuffer (55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl in 10 mM PIPES pH 6,7) resuspendiert und erneut 10 min bei 4 °C und 3800 g sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 8 ml Transformationspuffer aufgenommen, mit 600 µl DMSO¹ versetzt, kurz gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und schließlich in 200-µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die ultrakompetenten Zellen wurden im Anschluss bei -80 °C gelagert.

¹Dimethylsulfoxid

2.2.8.3 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 50 ml LB-Medium mit 1 ml Übernachtskultur beimpft und bei 30 bzw. 37 °C schüttelnd (200 Upm) inkubiert. Wenn die Zellkultur eine OD₆₀₀ von 0,55 erreichte, wurden die Zellen 10 min auf Eis inkubiert und im Anschluss 10 min bei 4 °C und 4500 g abzentrifugiert (Kühlzentrifuge *5804R*, Fisher Scientific). Das Zellpellet wurde zweimal mit 50 ml eiskaltem sterilen H₂O_{bidest} gewaschen und danach in 6 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin aufgenommen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (10 min, 4 °C, 4500 g) wurde das Zellpellet in 0,75 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin resuspendiert und in 40- μ l-Aliquots in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die elektrokompetenten Zellen wurden im Anschluss bei -80 °C gelagert.

2.2.9 Entsalzung von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA effizient in elektrokompetente Zellen transformieren zu können, muss diese zuvor entsalzt werden. Dafür wurden 5 μ l Plasmid-DNA mit H₂O_{bidest} auf 50 μ l aufgefüllt und 500 μ l Butanol hinzugefügt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 20800 g (Tischzentrifuge *5417C*, Fisher Scientific) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das restliche Butanol 5 min in der *SpeedVac® SDP 111* (Fisher Scientific, Schwerte) entfernt. Das unsichtbare Pellet wurde daraufhin in 5 μ l H₂O_{bidest} aufgenommen.

2.2.10 Elektroporation

Für die Elektroporation wurden 2 μ l entsalztes Plasmid-DNA mit 40 μ l elektrokompetenten Zellen versetzt und in eine sterile Elektroporationsküvette (peqlab, Erlangen) überführt. Bei 2,44 kV, 200 Ω und 25 μ F wurde die Elektroporation durchgeführt (ELECTRO CELL MANIPULATOR®600, BTX® Elektroporation-System, Holliston, USA). Nach Ende des Impulses wurde der Ansatz mit 1 ml vorgewärmtem LB- bzw. SOC-Medium versetzt und im Anschluss eine Stunde bei 37 °C inkubiert (Thermomixer *5436*, Fisher Scientific). Vor dem Ausplattieren auf Selektions-Platten wurden die Zellen bei 2700 g abzentrifugiert (Zentrifuge *5417C*, Fisher Scientific) und im Rücklauf resuspendiert.

2.2.11 Transformation CaCl_2 - bzw. ultrakompetenter Zellen

Für die Transformation wurden 100 μl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 5 μl Plasmid oder Ligationsansatz gemischt. Nach einem 30-minütigen Inkubationsschritt auf Eis schloss sich ein kurzer Hitzeschock (1 min) bei 42 °C an. Die Zellen wurden daraufhin für 2 min auf Eis inkubiert und danach mit 1 ml vorgewärmtem LB-Medium (42 °C) versetzt. Der Ansatz wurde nach 1 h Inkubation bei 30 bzw. 37 °C und unter Schütteln (Eppendorf-Thermoblock) bei 4000 Upm (Fisher-Scientific Tischzentrifuge) abzentrifugiert. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Selektions-Platten ausplattiert.

2.2.12 Fast-Transformation

Es konnte vorkommen, dass Plasmid-DNA nur einmalig in bestimmte kompetente Zellen transformiert werden musste und das Anlegen eines Vorrates an kompetenten Zellen nicht notwendig war. In diesem Falle wurde die Methode der Fast-Transformation genutzt. Dafür wurden 5 ml LB-Medium mit 100 μl Übernachtskultur beimpft und bei 30 °C bzw. 37 °C schüttelnd (200 Upm) inkubiert. Wenn die Zellkultur eine OD_{600} von 0,4 erreichte, wurden die Zellen 10 min auf Eis inkubiert und im Anschluss 10 min bei 4 °C und 3000 Upm abzentrifugiert (Tischzentrifuge, Fisher-Scientific). Das Zellpellet wurde in 1/10 Volumen eiskaltem TSS-Puffer (LB-Medium pH 6,5, 10 % PEG 6000, 5 % DMSO, 33 mM MgSO_4) resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden entweder bei -80 °C gelagert oder für eine anschließende Transformation verwendet (siehe 2.2.11).

2.2.13 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.13.1 Standard-PCR

Für die Amplifikation von Genen oder die Einführung von Restriktionsschnittstellen wurde die Polymerasekettenreaktion genutzt. Die lyophilisierten Primer (Metabion, Martinsried) wurden zunächst laut den Herstellerangaben zu 100 pmol/ μl in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst. Für eine PCR-Reaktion wurde eine Endkonzentration von 25 pmol/ μl eingesetzt. In Tabelle 4 sind alle verwendeten Primer aufgeführt:

Tabelle 4: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
<i>tatA</i> -NdeI-F	GAA C <u>A</u> c aTA <u>TGG</u> GTG GTA TCA GTA TTT GGC	Amplifikation von <i>tatA</i> aus pABS- <i>tatABC</i> (bindet am Translationsstart)
<i>tatA</i> -BamHI-R	AAC AC <u>G</u> GAT <u>cc</u> C ACC TGC TCT TTA TCG TGG	Amplifikation von <i>tatA</i> aus pABS- <i>tatABC</i> (bindet am Stopp-Codon)
<i>tatB</i> -NdeI-F	TGT AA <u>c</u> ata <u>TGT</u> TTG ATA TCG GTT TTA GCG AAC	Amplifikation von <i>tatB</i> aus pABS- <i>tatABC</i> (bindet am Translationsstart)
<i>tatB</i> -BamHI-R	AGA CA <u>g</u> Ga <u>T</u> <u>cc</u> C GGT TTA TCA CTC GAC GAA G	Amplifikation von <i>tatB</i> aus pABS- <i>tatABC</i> (bindet am Stopp-Codon)
<i>tatA</i> -HC-NdeI-F	CTG TAC ata T <u>g</u> a gtG GCA CCA AAA AGC TCG GCT CC	Amplifikation von <i>tatA</i> Codon F20S aus pABS- <i>tatABC</i>
<i>tatA</i> -CT-NdeI-F	GAA CT <u>c</u> aTA <u>tg</u> A AAG CAA TGA GCG ATG ATG AAC C	Amplifikation von <i>tatA</i> ab dem Codon K41 aus pABS- <i>tatABC</i>
<i>tatA</i> -Bam-R	TGA TT <u>G</u> GAT <u>cc</u> C ACC TGC TCT TTA TCG TGG CGC	Amplifikation von <i>tatA</i> aus pABS- <i>tatABC</i> (bindet hinter dem Stopp-Codon)
<i>tatA</i> -BamHI-behind-R	TCA A <u>g</u> <u>gat</u> <u>cc</u> T TAC ACC TGC TCT TTA TCG TG	Amplifikation von <i>tatA</i> mit Stopp-Codon aus pABS- <i>tatABC</i> (bindet vor das <i>Strep</i> -tagII)
<i>tatA</i> -HC-BglIII-F	ATA TA <u>a</u> <u>gat</u> <u>ct</u> A GTG GCA CCA AAA AGC TCG G	Amplifikation von <i>tatA</i> ab Codon F20S für pBW- <i>mat-hip-strep</i>

Tabelle 4: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
<i>tatA</i> -BglII-F	GGA ACA <u>aGa tct</u> GGT GGT ATC AGT ATT TTG CAG	Amplifikation von <i>tatA</i> für pBW- <i>mat-hip-strep</i> (bindet am Translationsstart)
<i>mat-hip</i> -BglII-F	ATA TAa <u>gat ctT</u> CCG CTC CCG CCA ATG	Amplifikation von <i>mat-hip</i> für pBW- <i>tatA-strep</i> (bindet ab maturen Bereich von Hi-PIP)
<i>hip</i> -BamHI-R-we	AAC GGG <u>GAT CCG</u> CCG GCC TTC AGG GTC CAG	Amplifikation von <i>mat-hip</i> für pBW- <i>tatA-strep</i> (bindet vor Stopp-Codon)
<i>tatE</i> -NdeI-F	AGG TAc <u>aTA TGG</u> GTG AGA TTA GTA TTA CC	Amplifikation von <i>tatE</i> aus chromosomaler <i>E. coli</i> -DNA (bindet am Translationsstart)
<i>tatE</i> -BamHI-R	TCG CCg <u>gaT CcC</u> TCT TTA TGA GAG AGC TTT TC	Amplifikation von <i>tatE</i> aus chromosomaler <i>E. coli</i> -DNA (bindet vor Stopp-Codon)
a-wt-F	ATA TAC ATA <u>TGG</u> GTG GTA TCA GTA TTT CGA CGG GTG GGG GCA GTA	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)-Fragment (Codons 7 – 21 durch STGGG- <i>repeat</i> ersetzt)
neg.-Kon/a-wt-R	AGC TTG <u>GAT CCG</u> CCC CCA CCC GTA CTC CCG CCA CCA GTA CTG CC	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)-Fragment (Codons 2/7 – 21 durch STGGG- <i>repeat</i> ersetzt)

Tabelle 4: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
b-wt-F	ATA TAC ATA TGA GTA CCG GTG GTG GGT GGC AGT TAT TGA TTA GTA C	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)-Fragment (Codons 2 – 6, 12 – 21 durch STGGG ersetzt)
b-wt-R	AGC TTG GAT CCG CCC CCA CCC GTA CTC CCG CCA CCA GTA CTA ATC	
neg.-Kon/c-wt-F	ATA TAC ATA TGA GTA CCG GTG GTG GGT CGA CGG GTG GGG GCA GTA C	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)-Fragment (Codons 2 – 21/16 durch STGGG-repeat ersetzt)
c-wt-R	AGC TTG GAT CCG CCA AAA AGC AGT ACC CCG CCA CCA GTA CTG CC	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)-Fragment (Codons 2 – 16 durch STGGG-repeat ersetzt)
bc-wt-F	ATA TAC ATA TGA GTA CCG GCG GTG GGT GGC AGT TAT TGA TTA TTG	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)-Fragment (Codons 2 – 6 durch STGGG ersetzt)
bc-wt-R	AGC TTG GAT CCG CCA AAA AGC AGT ACA ACG ATG ACG GCA ATA ATC	
b-I-wt-F	ATA TAC ATA TGA GTA CCG GTG GTA TTT GGC AGT TAT TGA TTA GTA C	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)-Fragment (Codons 2 – 5, 12 – 21 durch STGGG ersetzt)
b-SI-wt-F	ATA TAC ATA TGA GTA CCG GTA GTA TTT GGC AGT TAT TGA TTA GTA C	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)-Fragment (Codons 2 – 4, 12 – 21 durch STGGG ersetzt)
b-ISI-wt-F	ATA TAC ATA TGA GTA CCA TCA GTA TTT GGC AGT TAT TGA TTA GTA C	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)-Fragment (Codons 2 – 3, 12 – 21 durch STGGG ersetzt)

Tabelle 4: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
bc-I-wt-F	ATA <u>TAC ATA TGA</u> GTA CCG GCG GTA TTT GGC AGT TAT TGA TTA TTG	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)- Fragment (Codons 2–5 durch STGG ersetzt)
bc-SI-wt-F	ATA <u>TAC ATA TGA</u> GTA CCG GCA GTA TTT GGC AGT TATTGA TTA TTG	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)- Fragment (Codons 2–4 durch STG ersetzt)
bc-ISI-wt-F	ATA <u>TAC ATA TGA</u> GTA CCA TCA GTA TTT GGC AGT TAT TGA TTA TTG	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)- Fragment (Codons 2–3 durch ST ersetzt)
bc- <i>tatA</i> -D7D8-F	ATA <u>TAC ATA TGG</u> GTG GTA TCA GTA TTG ATG ACT TAT TGA TTA TTG	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)- Fragment (Codon-Austausch zu D7D8)
bc- <i>tatA</i> -K7K8-F	ATA <u>TAC ATA TGG</u> GTG GTA TCA GTA TTA AAA AGT TAT TGA TTA TTG	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)- Fragment (Codon-Austausch zu K7K8)
bc- <i>tatA</i> -K6K7K8-F	ATA <u>TAC ATA TGG</u> GTG GTA TCA GTA AGA AAA AGT TAT TGA TTA TTG	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)- Fragment (Codon-Austausch zu K6K7K8)
bc- <i>tatA</i> -K7K8K9-F	ATA <u>TAC ATA TGG</u> GTG GTA TCA GTA TTA AAA AGA AAT TGA TTA TTG	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)- Fragment (Codon-Austausch zu K7K8K9)
bc- <i>tatA</i> -I6 > A6-F	ATA <u>TAC ATA TGG</u> GTG GTA TCA GTG CGT GGC AGT TAT TGA TTA TTG	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)- Fragment (Codon-Austausch I6A)
bc- <i>tatA</i> -I6 > D6-F	ATA <u>TAC ATA TGG</u> GTG GTA TCA GTG ATT GGC AGT TAT TGA TTA TTG	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)- Fragment (Codon-Austausch I6D)

Tabelle 4: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
<i>bc-tatA-I6 > F6-F</i>	ATA TAC <u>ATA TGG</u> GTG GTA TCA GTT TTT GGC AGT TAT TGA TTA TTG	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)- Fragment (Codon-Austausch I6F)
<i>bc-tatA-I6 > K6-F</i>	ATA TAC <u>ATA TGG</u> GTG GTA TCA GTA AAT GGC AGT TAT TGA TTA TTG	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)- Fragment (Codon-Austausch I6K)
<i>bc-tatA-I6 > S6-F</i>	ATA TAC <u>ATA TGG</u> GTG GTA TCA GTA GCT GGC AGT TAT TGA TTA TTG	Amplifikation von <i>tatA</i> (NT)- Fragment (Codon-Austausch I6S)
<i>tatA-BssHII-R</i>	ATA TAg <u>cgc gcT</u> TAT TTT TCG AAC TGC GGG	Amplifikation von <i>tatA</i> (bin- det nach Stopp-Codon)
<i>tatA-BssHII-F</i>	TAT ATg <u>cgc gcG</u> GTG GTA TCA GTA TTT GGC AG	Amplifikation von <i>tatA-strep</i> für pDP804
<i>tatA/pspF/A- BglII-R</i>	TAT ATA GaT <u>ctT</u> TAT TTT TCG AAC TGC GGG TGG	
<i>tatA-AgeI-F</i>	ATA TAA <u>Ccg gTG</u> GGT GGT ATC AGT ATT TGG C	Amplifikation von <i>tatA-strep</i> für pMS604
<i>tatA/pspF/A- XhoI-R</i>	TAT ATc tCg <u>agT</u> TAT TTT TCG AAC TGC GGG TGG	
<i>pspA-MluI-F</i>	TAT ATA <u>Cgc gtG</u> GTA TTT TTT CTC GCT TTG CCG	Amplifikation von <i>pspA-strep</i> für pDP804
<i>pspA-AgeI-F</i>	TAT ATa <u>cCg gTG</u> GGT ATT TTT TCT CGC TTT GC	Amplifikation von <i>pspA-strep</i> für pMS604
<i>tatA(HC)-AgeI-F</i>	ATA TAA <u>Ccg gTG</u> AGT GGC ACC AAA AAG CTC	Amplifikation von <i>tatA-strep</i> ab Codon F20S für pMS604

Tabelle 4: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
<i>tatA</i> (CT)-AgeI-F	ATA TAA Ccg gTG AAA GCA ATG AGC GAT GAT G	Amplifikation von <i>tatA-strep</i> ab Codon K41 für pMS604
<i>tatA-H6</i> -XhoI-R	TAT ATC TCg AGT tAA TGA TGA TGA TGA TGA TGG G	Amplifikation von <i>tatA-H6</i> für pMS604
AgeI-H6-stop- <i>tatA</i> (HC)-F	ATA TAA Ccg gTG cat cat cat cat cat cat taa AGT GGC ACC AAA AAG CTC GGC TCC	Amplifikation von His- tag und Stopp-Codon vor <i>tatA</i> (HC) für pMS604
<i>tatA-strep</i> -HindIII- F	ATA TAA agc tTG GGT GGT ATC AGT ATT TGG C	Amplifikation von <i>tatA-strep</i> für pUT18/pKNT25
<i>tatA-strep</i> -KpnI-R	TAT ATG gTa ccc gTT TTT CGA ACT GCG GGT GG	
<i>pspA</i> -BamHI-F	TAT ATg gat ccc GGT ATT TTT TCT CGC TTT GCC	Amplifikation von <i>pspA-strep</i> für pUT18/ pUT18C/ pKNT25/ pKT25
<i>pspA</i> -KpnI-R	ATA TAg gta Ccc gTT ATT TTT CGA ACT GCG GG	
<i>tatA</i> (HC)- <i>strep</i> - HindIII-F	ATA TAA agc tTG AGT GGC ACC AAA AAG CTC	Amplifikation von <i>tatA- strep</i> ab Codon F20S für pUT18/pKNT25
<i>pspA</i> -(GGGS) ₃ - XhoI-F	CCG CAC TCG AGg gtg gcg gta gcg gcg gtg gct cgg g	Amplifikation von (GGG) ₃ - <i>linker</i> zwischen <i>pspA</i> und T18/ T25
<i>pspA</i> -(GGGS) ₃ - KpnI-R	AGC TCG GTA CCC Gac tac cgc cac ccg agc cac cgc c	
<i>tatA</i> (CT)- <i>strep</i> - HindIII-F	TAT ATa agc ttg AAA GCA ATG AGC GAT GAT GAA C	Amplifikation von <i>tatA- strep</i> ab Codon K41 für pUT18/pKNT25

Tabelle 4: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
<i>tatA</i> -K24- <i>strep</i> -HindIII-F	ATA TA <u>a</u> AgC ttg AAG CTC GGC TCC ATC GG	Amplifikation von <i>tatA-strep</i> ab Codon K24 für pUT18/pKNT25
<i>tatA</i> -F20-HindIII-F	ATA TAA agc tTg TTT GGC ACC AAA AAG CTC G	Amplifikation von <i>tatA-strep</i> ab Codon F20 für pUT18/pKNT25
<i>tatA</i> -G21-HindIII-F	ATA TAA agc TTg GGC ACC AAA AAG CTC GGC	Amplifikation von <i>tatA-strep</i> ab Codon G21 für pUT18/pKNT25
<i>tatA</i> -T22-HindIII-F	ATA TA <u>a</u> agc ttg ACC AAA AAG CTC GGC TCC	Amplifikation von <i>tatA-strep</i> ab Codon T22 für pUT18/pKNT25
<i>tatA</i> -K23-HindIII-F	ATA TA <u>a</u> aGC ttg AAA AAG CTC GGC TCC ATC G	Amplifikation von <i>tatA-strep</i> ab Codon K23 für pUT18/pKNT25
<i>tatA</i> (NT)-2H-BamHI-R	ATA TAG Gat CCA AAA AGC AGT ACA ACG ATG AC	Amplifikation von <i>tatA</i> -Fragment für pUT18- <i>tatA-strep</i> / pKNT25- <i>tatA-strep</i> (bindet nach Codon F20)
<i>pspA</i> -CT-BamHI-F	TAT ATg GAT cCc CTG GTT GAA GTA CGT TCT ACT TCG	Amplifikation von <i>pspA</i> -Fragment ab Codon L40 (C-Terminus)
<i>pspA</i> -(NT)-XhoI-R	TAT ATc Tcg agG AAG CTG TGG CTT TCT GCT TC	Amplifikation von <i>pspA</i> -Fragment bis Codon F187 (N-Terminus)

Tabelle 4: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
pKNT/pUT- <i>tatA</i> -NdeI-F	ATA TAc <u>ata TGG</u> GTG GTA TCA GTA TTT GG	Amplifikation des gesamten Vektors (für Entfernung klonierungsbedingter
pKNT/pUT-NdeI-R	ATA TAc <u>ATA tgT</u> GTT TCC TGT GTG AAA TTG TTA TC	21 Basen vor <i>tatA</i>)
pKNT/pUT- <i>pspA</i> -NdeI-F	ATA TAc ATa <u>tgG</u> GTA TTT TTT CTC GCT TTG CC	Amplifikation des gesamten Vektors (für Entfernung klonierungsbedingter 54 Basen vor <i>pspA</i>)
<i>tatC</i> -NdeI-F-ks	AAG AAc <u>AtA TGT</u> CTG TAG AAG ATA CTC AAC CGC	Amplifikation von <i>tatC</i> für pUT18- <i>tatA-strep</i> /
<i>tatC</i> -BamHI-R-ks	AAG AAg <u>gaT ccT</u> TCT TCA GTT TTT TCG CTT TCT GC	pKNT25- <i>tatA-strep</i>
T18-HindIII-R	ATA TAa <u>Agc Tta</u> TTA TAT CGA TTG GCG TTC CAC	Amplifikation der T18-Domäne der Adenylatzyklase für pUL- <i>ptat-tatA-strep</i>
T18-NdeI-F	TAT ATC <u>ATA TGT</u> GTT CCT CTG TGG TAG ATG ATG	Amplifikation des gesamten Vektors (Entfernung von <i>tatA-strep</i> aus
T18-NdeI-R	TAT ATc <u>AtA tgC</u> GGG TAC CGA GCT CGA ATT CAG	pUL- <i>ptat-tatA-strep</i>)
<i>tatB</i> -AgeI-F	ATA TAA Ccg <u>gTG</u> TTT GAT ATC GGT TTT AGC G	Amplifikation von <i>tatB</i> für pMS604
<i>tatB</i> -BssHIII-F	TAT ATg <u>cgc gcT</u> TTG ATA TCG GTT TTA GCG AAC	Amplifikation von <i>tatB</i> für pDP804
<i>tatC</i> -AgeI-F	ATA TAA Ccg <u>gTG</u> TCT GTA GAA GAT ACT CAA CC	Amplifikation von <i>tatC</i> für pMS604

Tabelle 4: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
<i>tatC</i> -BssHII-F	TAT ATg <u>cgc gcT</u> CTG TAG AAG ATA CTC AAC CG	Amplifikation von <i>tatC</i> für pDP804
<i>tatE</i> -AgeI-F	ATA TAA <u>Ccg gTG</u> GGT GAG ATT AGT ATT ACC AAA C	Amplifikation von <i>tatE</i> für pMS604
<i>tatE</i> -BssHII-F	TAT ATg <u>cgc gcG</u> GTG AGA TTA GTA TTA CCA AAC TG	Amplifikation von <i>tatE</i> für pDP804
<i>tatA</i> (HC)-BssHII-F	TAT ATg <u>cgc gcA</u> GTG GCA CCA AAA AGC TC	Amplifikation von <i>tatA</i> ab Codon F20S für pDP804
<i>tatA</i> (CT)-BssHII-F	TAT ATg <u>cgc gcA</u> AAG CAA TGA GCG ATG ATG	Amplifikation von <i>tatA</i> ab Codon K41 für pDP804
<i>tatA</i> (NT)-AgeI-F	ATA TAA <u>Ccg gTG</u> GGT GGT ATC AGT ATT TGG CAG TTA TTG ATT ATT GCC GTC ATC GTT GT	Amplifikation von <i>tatA</i> -Fragment bis Codon F20 für pDP804 (N-Terminus)
<i>tatA</i> (NT)-XhoI-R	ATA TAc <u>tcg agt</u> Tat ttt tCG Aac tgc ggG tGg cTc caG Gat CCA AAA AGC AGT ACA AC	
<i>tatA</i> (NT)-BssHII-F	ATA ATg <u>cgc gcG</u> GTG GTA TCA GTA TTT GGC AGT TAT TGA TTA TTG CCG TCA TCG TTG T	Amplifikation von <i>tatA</i> -Fragment bis Codon F20 für pMS604 (N-Terminus)
<i>tatA</i> (NT)-BglII-R	ATA TAA <u>gat ctt</u> Tat ttt tCG Aac tgc ggG tGg cTc caG Gat CCA AAA AGC AGT ACA AC	
<i>tatA</i> -PstI-NdeI-F	GCA GGc <u>tGc AGG</u> gtc gAc tCA TAT GGG TGG TAT CAG TAT TTG	Amplifikation von <i>tatA</i> nach kurzen <i>linker</i> für pKT25
<i>tatA</i> -T22-NdeI-F	GTA GCc <u>aTa tgA</u> CCA AAA AGC TCG GCT CC	Amplifikation von <i>tatA</i> ab Codon T22 für pKT25

Tabelle 4: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
P1-single-copy	GGC ATC ACG GCA ATA TAC	Testprimer für Single-copy-Integration
P2-single-copy	ACT TAA CGG CTG ACA TGG	Testprimer für Single-copy-Integration
P3-single-copy	ACG AGT ATC GAG ATG GCA	Testprimer für Single-copy-Integration
P4-single-copy	TCT GGT CTG GTA GCA ATG	Testprimer für Single-copy-Integration
k1	CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT	Testprimer für Entfernung der Kanamycin-Kassette
k2	CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC	Testprimer für Entfernung der Kanamycin-Kassette
kt	CGG CCA CAG TCG ATG AAT CC	Testprimer für Entfernung der Kanamycin-Kassette

Die Schnittstellen sind unterstrichen und Basenaustausche sind klein geschrieben. F steht für *forward*-, R für *reverse*-Primer.

Ein PCR-Ansatz mit einem Endvolumen von 50 μl bestand aus folgenden Komponenten:

1 x	Pfu-Polymerase-Puffer
10-100 ng	<i>template</i>
je 25 pmol	Primer F/R
5 pmol	dNTPs (10 mM)
2,5 U	DNA-Polymerase
+/-2,5 μl	DMSO
ad 50 μl	H ₂ O _{bidest}

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

Schritt 1:	2 min	96 °C
Schritt 2:	30 s	96 °C
Schritt 3:	1 min	<i>Annealing</i> -Temperatur
Schritt 4:	x min	72 °C (<i>Extension</i>)
Schritt 4	→ Schritt 2	33 x
Schritt 5:	Pause	4 bzw. 8 °C

Die *Annealing*-Temperatur wurde der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer angepasst. Die Extensionsdauer im Schritt 4 hing von der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz ab (ca. 2 min pro 1000 Basenpaare).

2.2.13.2 QuikChange©-Multi Site-Directed Mutagenesis (Agilent, Waldbronn)

Mit Hilfe dieser Methode wurden gezielt Basenaustausche und Insertionen in verschiedene Plasmide eingeführt. Hierbei wurden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotidprimer eingesetzt, die in Tabelle 5 aufgeführt sind.

Tabelle 5: Verwendete Primer für die QuikChange©-*Multi Site-Directed Mutagenesis*

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
<i>tatA</i> +G23n-F	CTG CTT TTT GGC ACC ggc AAA AAG CTC GGC TCC ATC	Insertion eines Glycins nach Position 22 in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> +G23n-R	GAT GGA GCC GAG CTT TTT gcc GGT GCC AAA AAG CAG	
<i>tatA</i> +G23,24n-F	CTG CTT TTT GGC ACC ggc gcc AAA AAG CTC GGC TCC ATC GG	Insertion von zwei Glycinen nach Position 22 in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> +G23,24n-R	CCG ATG GAG CCG AGC TTT TTg ccg ccG GTG CCA AAA AGC AG	
<i>tatA</i> +ProGly-F	CCA AAA AGC TCG GCT CCc cgg gcA TCG GTT CCG ATC TTG GTG	Insertion von eines Prolins und eines Glycins nach Position 27 in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> +ProGly-R	CAC CAA GAT CGG AAC CGA Tgc ccg gGG AGC CGA GCT TTT TGG	
<i>tatA</i> -BamHI- hinter- <i>hinge</i> -F	GTT GTA CTG CTT TTT GGC gga tcc AAG CTC GGC TCC ATC GGT TC	Einführen einer BamHI-Schnittstelle nach Codon G21 in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> -BamHI- hinter- <i>hinge</i> -R	GAA CCG ATG GAG CCG AGC TTg gat ccG CCA AAA AGC AGT ACA AC	
<i>tatA</i> (NT)-G3D-F	GGA GAT ATA CAT ATG GGT GaT ATC AGT ATT TGG CAG TTA TTG	Codon-Austausch G3D in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> (NT)-G3D-R	GCAA TAA CTG CCA AAT ACT GAT AtC ACC CAT ATG TAT ATC TCC	
<i>tatA</i> (NT)-W7A-F	ATG GGT GGT ATC AGT ATT gcG CAG TTA TTG ATT ATT GCC GTC	Codon-Austausch W7A in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> (NT)-W7A-R	GAC GGC AAT AAT CAA TAA CTG Cgc AAT ACT GAT ACC ACC CAT	

Tabelle 5: Verwendete Primer für die QuikChange[®]-Multi Site-Directed Mutagenesis

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
<i>tatA</i> (NT)-Q8L-F	GGT GGT ATC AGT ATT TGG ttG TTA TTG ATT ATT GCC GTC ATC	Codon-Austausch Q8L in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> (NT)-Q8L-R	GAT GAC GGC AAT AAT CAA TAA Caa CCA AAT ACT GAT ACC ACC	
<i>tatA</i> (NT)-W7Q8 > A7L8-F	GTA TGG GTG GTA TCA GTA TTg cGT TGT TAT TGA TTA TTG CCG TC	Codon-Austausch W7Q8 zu A7L8 in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> (NT)-W7L8 > A7L8-R	GAC GGC AAT AAT CAA TAA CAA Cgc AAT ACT GAT ACC ACC CAT AC	
pBW- <i>tatA</i> -BglII-F	GTA CTG CTT TTT GGC Aga tct AAG CTC GGC TCC ATC G	Einführen einer BglII-Schnittstelle nach
pBW- <i>tatA</i> -BglII-R	CGA TGG AGC CGA GCT Tag atc TGC CAA AAA GCA GTA C	Codon G21 in <i>tatA</i>
<i>pspA</i> -silent-XhoI-F	CTT GCG GCC GCA CTt GAG GTC GAC CTG CAG G	Entfernen einer BglII-Schnittstelle in <i>pspA</i>
<i>pspA</i> -silent-XhoI-R	CCT GCA GGT CGA CCT CaA GTG CGG CCG CAA G	
<i>tatA</i> -I6>TAG-F	CAT ATG GGT GGT ATC AGT tag TGG CAG TTA TTG ATT ATT GCC G	Codon-Austausch von I6 zum Stopp-Codon TAG in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> -I6>TAG-R	CGG CAA TAA TCA ATA ACT GCC Act aAC TGA TAC CAC CCA TAT G	
<i>tatA</i> -W7>TAG-F	CAT ATG GGT GGT ATC AGT ATT TaG CAG TTA TTG ATT ATT GCC G	Codon-Austausch von W7 zum Stopp-Codon TAG in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> -W7>TAG-R	CGG CAA TAA TCA ATA ACT GcT AAA TAC TGA TAC CAC CCA TAT G	

Tabelle 5: Verwendete Primer für die QuikChange®-*Multi Site-Directed Mutagenesis*

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
<i>tatA</i> -Q8>TAG-F	GGG TGG TAT CAG TAT TTG GtA GTT ATT GAT TAT TGC CGT C	Codon-Austausch von Q8 zum Stopp-Codon TAG in
<i>tatA</i> -Q8>TAG-R	GAC GGC AAT AAT CAA TAA CTa CCA AAT ACT GAT ACC ACC C	<i>tatA</i>
<i>tatA</i> -L9>TAG-F	GTG GTA TCA GTA TTT GGC AGT agT TGA TTA TTG CCG TCA TCG	Codon-Austausch von L9 zum Stopp-Codon TAG in
<i>tatA</i> -L9>TAG-R	CGA TGA CGG CAA TAA TCA Act ACT GCC AAA TAC TGA TAC CAC	<i>tatA</i>
<i>tatA</i> -L10>TAG-F	GTA TCA GTA TTT GGC AGT TAT aGA TTA TTG CCG TCA TCG TTG	Codon-Austausch von L10 zum Stopp-Codon TAG in
<i>tatA</i> -L10>TAG-R	CAA CGA TGA CGG CAA TAA TCt ATA ACT GCC AAA TAC TGA TAC	<i>tatA</i>
<i>tatA</i> -I11>TAG-F	CAG TAT TTG GCA GTT ATT Gta gAT TGC CGT CAT CGT TGT ACT GC	Codon-Austausch von I11 zum Stopp-Codon TAG in
<i>tatA</i> -I11>TAG-R	GCA GTA CAA CGA TGA CGG CAA Tct aCA ATA ACT GCC AAA TAC TG	<i>tatA</i>
<i>tatA</i> -I12>TAG-F	GTA TTT GGC AGT TAT TGA TTt agG CCG TCA TCG TTG TAC TGC	Codon-Austausch von I12 zum Stopp-Codon TAG in
<i>tatA</i> -I12>TAG-R	GCA GTA CAA CGA TGA CGG Cct aAA TCA ATA ACT GCC AAA TAC	<i>tatA</i>
<i>tatA</i> -A13>TAG-F	GGC AGT TAT TGA TTA TTt agG TCA TCG TTG TAC TGC TTT TTG G	Codon-Austausch von A13 zum Stopp-Codon TAG in
<i>tatA</i> -A13>TAG-R	CCA AAA AGC AGT ACA ACG ATG ACc taA ATA ATC AAT AAC TGC C	<i>tatA</i>

Tabelle 5: Verwendete Primer für die QuikChange®-Multi Site-Directed Mutagenesis

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
<i>tatA</i> -V14>TAG-F	GGC AGT TAT TGA TTA TTG CCt agA TCG TTG TAC TGC TTT TTG GC	Codon-Austausch von V14 zum Stopp-Codon TAG in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> -V14>TAG-R	GCC AAA AAG CAG TAC AAC GAT cta GGC AAT AAT CAA TAA CTG CC	<i>tatA</i>
<i>tatA</i> -A15>TAG-F	GTT ATT GAT TAT TGC CGT Cta gGT TGT ACT GCT TTT TGG CAC	Codon-Austausch von A15 zum Stopp-Codon TAG in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> -A15>TAG-R	GTG CCA AAA AGC AGT ACA ACc taG ACG GCA ATA ATC AAT AAC	<i>tatA</i>
<i>tatA</i> -L18>TAG-F	GAT TAT TGC CGT CAT CGT TGT Ata GCT TTT TGG CAC CAA AAA G	Codon-Austausch von L18 zum Stopp-Codon TAG in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> -L18>TAG-R	CTT TTT GGT GCC AAA AAG Cta TAC AAC GAT GAC GGC AAT AAT C	<i>tatA</i>
<i>tatA</i> -F20>TAG-F	GTC ATC GTT GTA CTG CTT Tag GGC ACC AAA AAG CTC GGC	Codon-Austausch von F20 zum Stopp-Codon TAG in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> -F20>TAG-R	GCC GAG CTT TTT GGT GCC ctA AAG CAG TAC AAC GAT GAC	<i>tatA</i>
<i>tatA</i> -I28>TAG-F	CCA AAA AGC TCG GCT CCt agG GTT CCG ATC TTG GTG C	Codon-Austausch von I28 zum Stopp-Codon TAG in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> -I28>TAG-R	GCA CCA AGA TCG GAA CCc taG GAG CCG AGC TTT TTG G	<i>tatA</i>

Die eingeführten Basenaustausche sind klein geschrieben.

Ein Ansatz für eine Rundum-PCR mit einem Endvolumen von 50 µl bestand aus folgenden Komponenten und wurde entweder mit der Pfu-Polymerase oder der Phusion™-High-Fidelity-DNA-Polymerase (Fisher Scientific) durchgeführt:

1 x	Polymerase-Puffer
10-100 ng	<i>template</i>
je 5 pmol	Primer F/R
5 pmol	dNTPs (10 mM)
2,5 U	DNA-Polymerase
2,5 μ l	DMSO
ad 50 μ l	H ₂ O _{bidest}

Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Schema (Tabelle 6) in einem Trio-Thermoblock™ oder Thermocycler *Tpersonal*™ (Biometra, Göttingen) durchgeführt:

Tabelle 6: Komponenten für den Rundum-PCR-Ansatz

Pfu-Polymerase			Phusion-Polymerase		
2 min	96 °C	Schritt 1	2 min	98 °C	
30 s	96 °C	Schritt 2	30 s	98 °C	
1 min	<i>Annealing</i> - Temperatur	Schritt 3	30 s	<i>Annealing</i> - Temperatur	
x min	68 °C	Schritt 4 (<i>Extension</i>)	x min	68 °C	
	19 x	Schritt 4 → Schritt 2		19 x	
Pause	4 bzw. 8 °C	Schritt 6	10 min	72 °C	
-	-	Schritt 6	Pause	4 bzw. 8 °C	

Die *Annealing*-Temperatur wurde der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer angepasst. Die Extensionsdauer im Schritt 4 hing von der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz ab (ca. 2 min pro 1000 Basenpaare bzw. 30 s/kb (Phusion)).

Im Anschluss wurde der Ansatz mindestens 1 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut und direkt in superkompetente XLI-Blue-Zellen transformiert. Auf den Schritt der Ligation wurde verzichtet, da in *E. coli* der lineare Vektor über Reparatursysteme rezirkularisiert wird.

2.2.13.3 Kolonie-PCR

Dazu wurde ein Teil einer Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in 20 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ resuspendiert. Der PCR-Ansatz bestand aus 1 x Pfu-Puffer, 5 μl Zellsuspension, 1 μl dNTPs, je 1 μl der Primerkombinationen (10 pmol/ μl) und 1 μl Pfu-Polymerase bei 25 bzw. 50 μl Gesamtvolumen und wurde zumeist unter Standard-Bedingungen (Primer-*Annealing* 50 °C, 1 min, Extension 500 bp/min) in einem Thermocycler *Tpersonal* (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

2.2.14 DNA-Sequenzierung

Zur Kontrolle von Nukleotidbasen-Austauschen und Klonierungen wurden die jeweiligen Plasmide sequenziert. Die Sequenzanalyse erfolgte mittels Kettenabbruchverfahren nach Sanger *et al.* (1977) und wurde mit dem automatisierten Laser-Fluoreszenz-Sequenzierer *ABI PRISM™ 377* (Applied Biosystems, Weiterstadt) oder durch die Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt.

Ein Sequenzierungsansatz enthielt folgende Komponenten:

Eigene Sequenzierung		Seqlab
6 μl	Plasmid	6 μl
2 μl (5 pmol)	Sequenzierungsprimer	1 μl (20 pmol)
2 μl	<i>ABI-Sequencing-Mix</i> ²	-

Der Ansatz wurde entweder zu Seqlab (Göttingen) geschickt oder wie folgt im *Trio-Thermoblock™* (Biometra, Göttingen) weiterbearbeitet:

Schritt 1:	30 s	95 °C
Schritt 2:	15 s	50 °C
Schritt 3:	2 min	60 °C
Schritt 3	→ Schritt 1	30 x
Schritt 4:	Pause	4 °C

Durch Zugabe von 2 μl 3M Natriumacetat pH 5,2 und 60 μl 95%igem (v/v) Ethanol wurde die DNA gefällt. Im darauf folgenden Zentrifugationsschritt (20 min, RT,

²Amersham Biosciences, Freiburg

13000 Upm, Tischzentrifuge) wurde die DNA sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und bei RT, 13000 Upm für 10 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und bei -20 °C aufbewahrt. Der Sequenzieransatz wurde mit dem zuvor genannten Sequenzierer analysiert und die gewonnenen Sequenzdaten mit Hilfe des Programms *ABI Sequencing Analysis 3.4* (Applied Biosystems, Weiterstadt) ausgewertet. Für die weitere Auswertung stand das Computerprogramm *Chromas Lite* (Griffith University, Southport, Australien, <http://www.technelysium.com/au>) zur Verfügung. Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe von *ClustalW* vom *European Biotechnology Institut* (EBI) erstellt (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/).

2.2.15 Single-copy-Integration

Um physiologisch relevante Bedingungen zu untersuchen und Artefakte zu vermeiden, wurde es notwendig, Gene singularär ins *E. coli*-Genom zu integrieren (Haldimann und Wanner, 2001). Zunächst wurde ein *conditional-replication, integration and modular* (CRIM)-Plasmid (pAH120) mit Interessen-Gen hergestellt und in den *E. coli*-pir⁺-Stamm BW23473 (Haldimann und Wanner, 2001) transformiert. CRIM-Plasmide integrieren dabei durch *site-specific* Rekombination in das Genom und nutzen dafür die *λ-attachment-site*.

Für die eigentliche Integration wurden 50 ml SOB-Medium mit 1 ml Übernachtskultur eines *E. coli*-pir⁻-Stamm beimpft, der das CRIM-Helfer-Plasmid pINT-ts (Hasan *et al.*, 1994) beherbergt. Dem Ansatz wurde Ampicillin für das Helfer-Plasmid zugesetzt und bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Anschließend wurden elektrokompente Zellen hergestellt (siehe 2.2.8.3) und das CRIM-Plasmid mittels Elektroporation (siehe 2.2.10) in diese Zellen transformiert. Dabei wurde den Zellen 1 ml SOC-Medium ohne Ampicillin zugefügt, zunächst eine Stunde bei 37 °C und danach 30 min bei 42 °C inkubiert (Verlust des Helfer-Plasmids) und im Anschluss auf Selektions-Medium (10 µg/ml Kanamycin) ausplattiert. Die bei 37 °C erhaltenen Transformanten wurden einmalig ohne Antibiotikum vereinzelt und daraufhin auf den Verlust des Helfer-Plasmids, die Antibiotika-Resistenz und die Kopienzahl getestet. Kolonien, die nicht auf Ampicillin wuchsen (Verlust des Helfer-Plasmides), normales Wachstum

auf Platten mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und eingeschränktes Wachstum bei 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin aufwiesen, wurden mittels Kolonie-PCR (siehe 2.2.13.3) näher auf die Kopienzahl untersucht. Es wurden 4 verschiedene Primerkombinationen genutzt: P1 und P2, P1 und P4, P2 und P3, sowie P3 und P4. Nachfolgend wurden die Kolonie-PCRs mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe 2.2.2) 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.

2.2.16 Entfernung einer Antibiotika-Resistenz aus dem Genom

Für Genexpressionsstudien kann es notwendig sein, dass chromosomale Antibiotikaresistenzen entfernt werden, damit der Stamm mit gleicher Resistenz durch das Plasmid transformiert werden kann.

Zuerst wurde das Helfer-Plasmid pCP20 (Cherepanov und Wackernagel, 1995) in den Kanamycin-resistenten *E. coli*-Stamm JWK1297 (Baba *et al.*, 2006) transformiert. Es besitzt eine Temperatur-sensitive Replikation und eine Temperatur-abhängige Synthese der FLP-Rekombinase (Datsenko und Wanner, 2000). Die bei 30 °C erhaltenen Ampicillin-resistenten Transformanten wurden einmalig ohne Antibiotikum vereinzelt (43 °C) und daraufhin auf den Verlust des Helfer-Plasmids und der Antibiotika-Resistenz getestet.

Kolonien, die nicht auf Ampicillin (Verlust des Helfer-Plasmides) und nicht auf Kanamycin (Verlust der chromosomalen Resistenz-Kassette) wuchsen, wurden mittels Kolonie-PCR (siehe 2.2.13.3) näher untersucht. Es wurden zwei verschiedene Primerkombinationen genutzt: k1 und k2, sowie k2 und kt (siehe Tabelle 4). Nachfolgend wurden die Kolonie-PCRs mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe 2.2.2) und der Klon nur dann als richtig gewertet, wenn bei der Primerkombinationen k2 und kt kein PCR-Produkt im Agarose-Gel detektiert wurde.

2.2.17 Erstellung der benötigten Plasmide für das BACTH-System

Für das BACTH-System werden 4 verschiedene Vektoren zur Verfügung gestellt, in denen das T25- bzw. das T18-Adenylatzyklasefragment entweder C- bzw. N-terminal fusioniert werden kann. Zur Erstellung der Hybridproteine für das BACTH-System wurden zunächst *tatA* und *pspA* mittels PCR amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen HindIII, KpnI (*tatA*) und BamHI, KpnI (*pspA*) inkubiert und im Anschluss mit

den entsprechenden Enden der geschnittenen Vektoren pUT18, pKNT25 für *tatA* bzw. mit allen 4 Ausgangsplasmiden für *pspA* ligiert. Alle Fusionsproteine besaßen einen C-terminalen *Strep*-tag. Für eine PspA-Variante wurde dieser *tag* gegen einen (GGGS)₃-*linker* ausgetauscht. Für Klonierung in das pKT25-Plasmid diente erneut die TatA-Variante als Ausgangsplasmid für alle weiteren Tat-Komponenten. Zunächst wurde *tatA* mittels PCR amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen PstI und KpnI inkubiert und mit den entsprechenden Schnittstellen des Vektors pKT25 ligiert. Durch die verwendeten Primer wurde nach der verwendeten PstI-Schnittstelle eine NdeI-Schnittstelle eingeführt, die, wie schon für die N-terminalen Hybridproteine beschrieben, für alle zukünftigen Klonierungen der Tat-Komponenten genutzt werden konnte. Die Insertion dieser NdeI-Schnittstelle könnte aber auch ein Nachteil sein, weil CATATG (Basenfolge der NdeI-Schnittstelle) in diesem Fall zu Histidin und Methionin umgesetzt werden und die Hybridproteine deshalb an dieser Stelle einen zweiten Translationsstart aufweisen könnten.

Zur Herstellung des *low-copy*-Plasmides mit dem T18-Adenylatfragment wurde zunächst *tatA* mit dem 3'-fusionierten T18-Fragment mittels PCR amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen NdeI und KpnI inkubiert und im Anschluss mit den entsprechenden Schnittstellen des linearisierten pUL-*ptat*-Plasmides ligiert. Das daraus hervorgegangene Plasmid, pUL-*ptat-tatA-strep*-T18, konnte danach sehr einfach durch die vorhandenen NdeI- und BamHI-Schnittstellen für die Klonierungen der anderen Tat-Komponenten genutzt werden.

2.3 Kultivierungsbedingungen

2.3.1 Nährmedien und Zusätze

Die aerobe Anzucht von *E. coli* erfolgte in der Regel in LB-Medium (Tabelle 7). Zur Herstellung fester Medien (LB-Agar-Platten) wurde diesen zusätzlich 1,5 % (w/v) Bactoagar vor dem Autoklavieren zugesetzt. Für anaerobes Wachstum wurde zur Vorbereitung auf das TMAO-Wachstum M9-Minimal-Medium (Tabelle 9) verwendet. SOB- bzw. SOC-Medium (Tabelle 7) wurden für die Herstellung und Verwendung von kompetenten Zellen angewandt (siehe 2.2.8.3).

Tabelle 7: Luria-Bertani (LB)-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

10 g	tryptisch verdautes Pepton
10 g	NaCl
5 g	Hefeextrakt
ad 1 l	H ₂ O _{bidest}

Tabelle 8: SOB/SOC-Medium

20 g	tryptisch verdautes Pepton
0,5 g	NaCl
5 g	Hefeextrakt
pH 7,0	
ad 1 l	H ₂ O _{bidest}

Um das SOB-Medium zu komplementieren, mussten nach dem Autoklavieren noch 100 mM sterilfiltriertes MgCl₂ und für das SOC-Medium zusätzlich noch 20 mM Glukose zum SOB-Medium zugegeben werden.

Tabelle 9: M9-Minimal-Medium

200 ml	5 x M9-Salze
1 mM	MgSO ₄
0,001 %	Thiamin
0,5 %	Glukose
0,2 mM	CaCl ₂
1 ml	SL12 (bei Bedarf)
ad 1 l	H ₂ O _{bidest}

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

Tabelle 10: 5 x M9-Salze

170 mM	Na ₂ HPO ₄
110 mM	KH ₂ PO ₄
94 mM	NH ₄ Cl
43 mM	NaCl
ad 1 l	H ₂ O _{bidest}

Tabelle 11: SL12-Spurenelementlösung

8 mM	EDTA – Na ₂
3,5 mM	FeSO ₄
300 μM	ZnCl ₂
250 μM	MnCl ₂
4,9 mM	H ₂ BO ₃
800 μM	CoCl ₂
10 μM	CuCl ₂
100 μM	NiCl ₂
70 μM	Na ₂ MoO ₄
ad 1 l	H ₂ O _{bidest}

Je nach Bedarf wurden den Medien Antibiotika zugegeben. Die Stammlösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt. In Tabelle 12 sind alle verwendeten Antibiotika aufgeführt:

Tabelle 12: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Resistenz	Konzentration der Stammlösung (1 : 1000)	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	Amp ^R	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	100 μg/ml
Chloramphenicol	Cam ^R	25 mg/ml in Methanol	25 μg/ml
Kanamycin	Kan ^R	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	50 μg/ml
Nalidixinsäure	Nal ^R	30 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	30 μg/ml
Tetracyclin	Tet ^R	12 mg/ml in 70 % Ethanol	12 μg/ml

2.3.2 Anzucht und Zellernte

Die Zellen wurden in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten über Nacht bei 30 bzw. 37 °C im Brutraum angezogen. Aerob kultivierte *E. coli*-Stämme wurden in Zentrifugenröhrchen oder Erlenmeyerkolben mit Schikane bei ca. 200 Upm kultiviert, wobei zur Selektion die entsprechenden Antibiotika zugegeben wurden.

Das Wachstum der Zellen konnte anhand der Optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) mit Hilfe des UV/Vis-Spektralphotometers *Uvikon 941* (Kontron Instruments, Mai-

land, Italien) bzw. *BioPhotometer* (Fisher Scientific, Schwerte) bestimmt werden und erfolgte bis zu einer OD_{600} von 0,6 bis 0,8. Als Leerwert diente dabei nicht beimpftes Medium oder Wasser.

Die Induktion der Genexpression erfolgte in Abhängigkeit vom Induktorsystem mit Endkonzentrationen von 0,1 % (w/v) Arabinose, 0,1 % (w/v) Rhamnose und 0,5 mM IPTG³ für das BACTH-System bzw. 1 mM IPTG für das LexA-basierte 2-Hybrid-System, wenn nicht anders angegeben.

Im Fall konstitutiver Expressionssysteme (pABS-*tatABC*-Derivate und Vektoren mit P_{tac} -abhängiger Expression) erfolgte die Zellernte bei einer OD_{600} von 0,8 bis 1,2.

Die Zellen wurden mittels Zentrifugation in der Eppendorf Tischzentrifuge *5415C* (14000 Upm, 1 bzw. 5 min), der Hettich *Universal Zentrifuge 30 RF* (3800 g, 10 min, 4 °C, Andreas Hettich, Tuttlingen) oder der Sorvall *RC-5C PLUS* (6800 g, 15 min, 4 °C) geerntet (siehe auch 2.8.1).

2.3.3 Stammhaltung

E. coli-Stämme wurden auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen kultiviert. Nach Inkubation bei 30 °C oder bei 37 °C erfolgte die Lagerung der Platten bei 4 °C. Nach Vereinzeln wurden Glycerinkulturen zur Verwahrung der *E. coli*-Stämme angelegt. Hierfür wurden jeweils 400 μ l der Übernachtskultur 1 : 1 mit LB-Medium + 30 % Glycerin versetzt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinbestimmung nach Lowry

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

Reagenz A:	1 %	Kupfersulfat
Reagenz B:	2 %	Natrium-Kaliumtartrat
Reagenz C:	0,2 M	Natriumhydroxid

³Isopropyl- β -thiogalactopyranosid

Reagenz D: 4% Natriumcarbonat

Reagenz E wurde täglich frisch im Verhältnis A : B : C : D = 49 : 49 : 1 : 1 hergestellt. 200 μ l einer geeigneten Verdünnung der Proteinprobe wurden mit 1 ml Lösung E versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l Folin-Ciocalteu-Reagenz (verdünnt 1:1 mit H₂O_{bidest}) zugegeben und die Ansätze weitere 30 min Licht geschützt bei RT inkubiert. Die Extinktion der Probe wurde bei 750 nm bestimmt.

Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurden Verdünnungen einer BSA-Stamm-lösung (0-200 μ g/ml) gleichzeitig mitgeführt. Aus diesen Messdaten konnte eine Eichgerade erstellt werden.

2.4.2 Proteinbestimmung mit Roti®-Nanoquant

Die Roti®-Nanoquant-Proteinkonzentrationsbestimmung (Carl Roth, Karlsruhe) ist eine Modifikation des Bradford-Assays (Bradford, 1976; Zor und Selinger, 1996) und wurde entsprechend den Herstellerangaben angewendet.

2.4.3 Präparation von löslichen (cytoplasmatischen) Proteinen und Membranproteinen

Für die Präparation löslicher und membrangebundener Proteine wurden die Zellkulturen der Stämme MC4100 ara^R, JARV16 und DADE aerob angezogen. Nach der Zellernte (10 min, 4 °C, 4500 g) wurde das Pellet in 3 bzw. 10 ml Aufschlusspuffer resuspendiert. Vor dem Zellaufschluss wurde den Proben jeweils eine Spatelspitze DNaseI und 1 mM PMSF (Stammlösung: 100 mM in DMSO) zugesetzt. Die Zellen wurden mit der *French® Pressure Cell Press* (2 Passagen bei ca. 620 kPa für die Mini-Zelle bzw. bei ca. 869 kPa für die 20K-Zelle, SLM Instruments Inc., Silver Springs, USA) aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss schloss sich ein Zentrifugationsschritt (Hettich *Universal 30-RF*) von 10 min bei 4 °C und 4500 g an. Mit Hilfe eines Ultrazentrifugationsschrittes (Sorvall *Discovery M120SE*) von 30 min bei 4 °C und 170000 g wurden Cytoplasma- und Membranfraktion voneinander getrennt. Der Überstand enthielt die cytoplasmatischen Proteine, das Pellet die Membranproteine. Das Membranpellet wurde in 3 ml Aufschlusspuffer gelöst und bis zum weiteren Gebrauch auf Eis aufbewahrt.

Zur Kontrolle des Aufschlusses und der Lokalisation der Proteine wurden jeweils 70 μ l der Zelltrümmer-, Cytoplasma- und Membranfraktion 1 : 1 mit SDS-Probenpuffer versetzt.

2.4.4 Solubilisierung von Membranproteinen

Zur Solubilisierung von Membranproteinen wurden die nicht-ionischen Detergenzien n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) bzw. C12E9 verwendet. Die jeweilige Probe wurde 1:1 mit Solubilisierungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl und 1 % DDM bzw. C12E9) versetzt und 1 h auf Eis gerührt. Ungelöste Proteine wurden im anschließenden Zentrifugationsschritt (Sorvall *Discovery M120SE* oder Beckman *Optima™ L-80XP*) bei 130000 g, 4°C für 30 min entfernt. Der Überstand wurde als solubilierte Membranfraktion für weitere Experimente eingesetzt.

2.4.5 Strep-Tactin®-Affinitätschromatographie

Um ein bestimmtes Protein zu reinigen, ist es sehr hilfreich, wenn man das Protein spezifisch anreichern kann. Dazu wurde das Protein mit einem *Strep*-tagII versehen, das aus acht Aminosäuren besteht (*Strep*-tagII-Sequenz = WSHPQFEK). Die zu Grunde liegenden Arbeitsschritte wurden dem *Strep*-tagII® *Purification Protocol* (IBA, Göttingen) nach Voss (1997) entnommen. Die zur Reinigung verwendeten Puffer wurden bezüglich ihrer Zusammensetzung mit Ausnahme des Regenerierungspuffers wie folgt verändert:

Puffer W: 50 mM Tris-HCl pH 8,0
250 mM NaCl

Puffer E: 50 mM Tris-HCl pH 8,0
250 mM NaCl
2,5 mM Desthiobiotin

Die Strep-Tactin®Superflow®Säulen (IBA, Göttingen) mit einem Volumen von 0,5 bzw. 1 ml wurden mit Cytoplasma bzw. +/- solubilierten Membranfraktionen beladen. Im Falle solubilisierter Membranen wurde den Puffern zusätzlich 0,01 % DDM bzw. 0,02 % C12E9 zugesetzt und vor dem Säulenlauf 1:5 mit Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl) verdünnt. Die einzelnen Wasch- bzw. Elutionsfrak-

tionen wurden in 1,5 ml - Reaktionsgefäßen aufgefangen. Von den Elutionsfraktionen, der letzten Waschfraktion und dem Durchlauf wurden je 70 μ l abgenommen und 1:1 mit SDS-Probenpuffer für die SDS-PAGE (siehe 2.4.10) versetzt. Der Rest wurde im Kühlraum auf Eis aufbewahrt.

2.4.6 Ni-Chelat-Affinitätschromatographie

Eine andere Möglichkeit, Proteine zu reinigen, besteht in der Nickelchelate-Chromatographie (Ni-IMAC, *immobilized metal affinity chromatography*). Bei dieser Methode wurde das Protein mit sechs aufeinander folgenden Histidinen (His-tag (H_6)) fusioniert, wodurch es eine hohe Affinität zum Säulenmaterial aufweist, das aus Ni^{2+} -Ionen besteht.

Die Ni-IMAC wurde im Zuge dieser Arbeit nicht eigenständig angewendet, sondern war Bestandteil eines Pull-down-Experimentes. Den verwendeten Elutionsfraktionen der *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie wurde dem Volumen entsprechend 20 mM Imidazol hinzugefügt und im Anschluss direkt auf eine vorher mit 10 Säulenvolumina equilibrierte His-tag-Säule (Poly-Prep Chromatography Columns, Bio-Rad Laboratories, München) aufgetragen. Das Säulenvolumen betrug 200 μ l Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden). Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit 6 Volumina Waschlösung (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gewaschen und im Anschluss die Proben mit 4 x 1/2 Säulenvolumen und 3 x 1 Säulenvolumen des Elutionspuffers (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 250 mM Imidazol) von der Säule eluiert und auf Eis gelagert. Von den Elutionsfraktionen, der letzten Waschfraktion und dem Durchlauf wurden je 70 μ l abgenommen und 1 : 1 mit SDS-Probenpuffer für die SDS-PAGE (siehe 2.4.10) versetzt.

2.4.7 *In-vivo*-Crosslinking

Es besteht die Möglichkeit, dass Proteine nur kurzfristig miteinander interagieren oder nur eine sehr fragile Bindung ausbilden, sodass der Nachweis dieser Interaktion eventuell kompliziert ist. Ziel des *in-vivo*-Crosslinking ist es, Komplexe und deren molekularen Interaktionen in ihrer natürlichen Umgebung zu fixieren. In dieser Arbeit wurde zunächst an gezielt gewählten Positionen die Primärsequenz durch das Amber-Stopp-Codon TAG ersetzt, wodurch es an dieser Stelle zu einem Abbruch der Translation kam. Wurde dem Medium jetzt die unnatürliche Aminosäure p-Benzoyl-L-Phenylalanin

(pBpa, Bachem, Kauer *et al.*, 1986) zugesetzt, so wurde im Zuge der Translation durch ein orthogonales Aminoacyl-tRNA-Synthetase/tRNA-Paar pBpa an diese spezifischen Positionen inkorporiert (Chin und Schultz, 2002). Die Amber-Suppressor-tRNA (tRNA_{UAG}) und die mutierte Tyrosyl-tRNA-Synthetase sind auf dem Helfer-Plasmid (pEVOL, Young *et al.*, 2010) codiert, das durch die Zugabe von Arabinose induziert wird.

Dafür wurden 100 ml LB-Medium mit 4 ml Übernachtskultur der *E. coli*-Stämme beimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen. An diesen Punkt wurde die Genexpression auf dem Helfer-Plasmid mit 100 µM Arabinose und 1 mM pBpa in 0,5 mM NaOH induziert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut für 3 h bei 37 °C inkubiert und nachfolgend 10 min auf Eis abgekühlt. Danach wurden die Zellkulturen 30 min bei ca. 350 nm bestrahlt, wodurch die Benzophenon-Gruppe des pBpa mit den C-H-Bindungen in ihrer Umgebung reagierte. Zu Kontrollzwecken wurde dieser Schritt zusätzlich bei einigen Proben nicht ausgeführt.

Die TatA-Derivate wurden anschließend mittels Strep-Tactin®-Affinitätschromatographie (siehe 2.4.5) gereinigt. Allen Puffern wurde 0,5% (w/v) SDS zugesetzt und falls notwendig die Elutionsfraktionen 2 und 3 durch TCA gefällt (siehe 2.4.8).

2.4.8 TCA-Fällung von Proteine

Für einige Analysen kann es notwendig sein Proteine zu fällen, da ihre Konzentration unter der Nachweisgrenze liegt. Die zu fällenden Elutionsfraktionen wurden mit 15 % (w/v) TCA⁴ versetzt, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben bei max. Geschwindigkeit (Tischzentrifuge) sedimentiert und der Überstand im Anschluss vollständig abgenommen. Dem erhaltenen Pellet wurde 1 ml 100 % Aceton zugegeben, invertiert und erneut bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, konnte das Pellet getrocknet werden. Daraufhin wurde es direkt in 50 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und für die SDS-PAGE aufbewahrt.

⁴Trichloressigsäure

2.4.9 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (SDZ)

Zur Auftrennung von TatA, seinen Interaktionspartnern und zur Abtrennung von Lipidvesikeln von der Probe wurde die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (SDZ) genutzt, bei der sich aufgetragene Proteine anhand ihrer Partikeldichte auftrennen. Es wurden kontinuierliche Dichtegradienten von 10-50% (w/v) Saccharose in 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl genutzt, die mit Hilfe einer Gradientenmischapparatur hergestellt wurden. Das Gesamtvolumen der Gradienten im Zentrifugenröhrchen betrug 4 ml. Der Gradient wurde mit der aufzutrennenden Probe überschichtet (ca. 400 μ l) und für 16 h bei 4 °C und 75000 g abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient in zumeist 12 Fraktionen (je 1/12 des Gradientenvolumens, ca. 350 μ l) von oben (10% Saccharose) nach unten (50% Saccharose) abgenommen. Der Abnahme der letzten Fraktion folgend wurde durch Zugabe eines Fraktionsvolumens Puffer ein eventuell entstandenes Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens resuspendiert. Die Proben der Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (siehe 2.4.10) analysiert.

2.4.10 SDS-PAGE

Für die Auftrennung von Proteinen wurden lineare diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gele nach Laemmli (1970) genutzt. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde mit Hilfe einer Mini ProteanIII-Apparatur der Firma Bio-Rad (München) bzw. Biometra gegossen. Es wurden Trenngele mit einer Konzentration von 15 % T⁵ bzw. 10 % T verwendet, die mit einem 4,5% T Sammelgel überschichtet wurden. Die Komponenten sind nachfolgend aufgeführt (Tab. 13 und 14):

⁵(% T) = Gesamtmonomerkonzentration (w/v)

Tabelle 13: Komponenten der SDS-PAGE für zwei Gele (Bio-Rad)

Bestandteil	Trenngel (15 % T)	Trenngel (10 % T)	Sammelgel (4,5 % T)
30 % Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid	6 ml	4 ml	0,75 ml
H ₂ O _{bideest}	3 ml	5 ml	3 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,3% SDS	3 ml	3 ml	
0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4% SDS	-	-	1,25 ml
10 % APS	100 μ l	100 μ l	50 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	5 μ l

Tabelle 14: Komponenten der SDS-PAGE für zwei Gele (Biometra)

Bestandteil	Trenngel (15 % T)	Trenngel (10 % T)	Sammelgel (4,5 % T)
30 % Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid	7,5 ml	5 ml	1,25
H ₂ O _{bideest}	3,45 ml	5,95 ml	4,25 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	-	1,9 ml
10% SDS	150 μ l	150 μ l	75 μ l
10 % APS	150 μ l	150 μ l	75 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	5 μ l

Zunächst wurde das Trenngel luftblasenfrei gegossen und mit einer Schicht von $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ überschichtet. Nach ca. 30 min wurde die Wasserschicht entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Nach der Polymerisation wurden die Gele in die Elektrophoresekammern (Bio-Rad, München bzw. Biometra, Göttingen) eingespannt und der Anoden- und Kathodenraum mit 1x SDS-Laufpuffer (10x SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,2 M Glycin, 0,1% (w/v) SDS) aufgefüllt. Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben 1:1 mit SDS-Probenpuffer (8 ml 0,5 M Tris-HCl pH 8,8, 10 ml Glycerin, 1,54 mg DTT, 2 g SDS, 12 mg Bromphenolblau, ad 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) versetzt und 10 min bei 90 °C bzw. bei TatC nur 5 min bei 37 °C denaturiert. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde der Proteinstandard *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (11-170 kDa) bzw. *PageRuler™ Prestained Plus Protein Ladder* (10-250 kDa) von Fermentas (Schwerte) mitgeführt. Die Elektrophorese wurde bei 120 V und ohne Stromlimitierung (*PHERO-stab.300*, BIOTEC-FISCHER, Reiskirchen bzw. *Standard Power Pack P25*, Biometra, Göttingen) durchgeführt.

2.4.11 STORM bzw. TYPHOON

Mittels STORM-Fluoreszenzscanner bzw. TYPHOON (GE Healthcare, Freiburg) wurden SDS-PAGE-Gele bzw. ganze Kolonien auf Platten auf fluoreszierende Bereiche hin untersucht (GFP oder eYFP). Für diese Untersuchung wurden die SDS-Proben jedoch nicht erhitzt, da sonst das GFP-Fluorophor zerstört wird. Der Scan erfolgte vor der Färbung des Gels. Die Platten wurden mit kurzwelligem Licht (488 nm) angeregt und die Emission wurde im längerwelligen Bereich (520 nm) detektiert.

2.4.12 Auftrennung von Membranproteinkomplexen mittels *Blue-Native-PAGE*

Für die Auftrennung von Membranproteinkomplexen in ihrer nativen Form wurde die Methode der *Blue-Native-PAGE* (BN-PAGE, Schägger *et al.*, 1994) angewandt. Mit Hilfe eines Gradientenmischers wurde ein kontinuierlicher Acrylamid-Gradient von 5% bis 13,5% als Trenngel gegossen, das nach einer Polymerisation von 2 Stunden mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet wurde. Für diese Methode wurde das Höfer-System (GE-Healthcare, München) genutzt. Die Komponenten der Gele sind nachfolgend aufgeführt (Tabelle 15):

Zellkulturen wurden bis zu einer OD_{600} von 1,0 angezogen und bei 4 °C, 4500 g für

Tabelle 15: Zusammenstellung aller Komponenten der *Blue-Native*-PAGE für ein Gel

Bestandteil	Trenngel (5 % T)	Trenngel (13,5 % T)	Sammelgel (4 % T)
49,5 % Acrylamid	0,212 ml	0,573 ml	0,121 ml
3 x Gelpuffer ⁶	0,7 ml	0,7 ml	0,5 ml
75 % Glycerin	0,14 ml	0,28 ml	-
H ₂ O _{bidest}	1,028 ml	0,247	0,86 ml
5 % APS	11 μ l	11 μ l	16 μ l
TEMED	2 μ l	2 μ l	3 μ l
in Gradienten-Mischer	1,88 ml	1,8 ml	-

10 min mit der Hettich-Zentrifuge sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Aufschlusspuffer (50 mM Bis Tris-HCl pH 7,0, 20% Saccharose, 10 mM MgCl₂) resuspendiert und mit 25 μ l DNaseI (Stammlösung: 10 mg/ml) versetzt. Kurz vor dem Aufschluss mittels *French® Pressure Cell Press* (SLM Instruments Inc., Silver Springs, USA) bei ca. 620 kPa (1 Passage) wurde 2 mM PMSF (Stammlösung: 100 mM in DMSO) zugegeben. Bei dem sich anschließenden Zentrifugationsschritt (5 min, 4 °C, 10000 Upm, Hettich) wurden die Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand (1 ml) wurde einer Ultrazentrifugation (Sorvall *Discovery M120SE*) bei 4 °C, 130000 g für 30 min unterzogen. Das sedimentierte Membranpellet wurde in 200 μ l Aufschlusspuffer resuspendiert.

Die Hälfte der Probe wurde 1:1 mit Solubilisierungspuffer (Aufschlusspuffer + 1 % Detergenz) versetzt und für 1 h unter leichtem Schütteln bei 4 °C inkubiert. Zur Solubilisierung der Membranen wurde das sehr milde Detergenz Digitonin verwendet. Nach einem Zentrifugationsschritt (30 min, 4 °C, 130000 g, Sorvall *Discovery M120SE*) wurden 80 μ l des Überstandes mit 8 μ l Probenpuffer (5 % Serva G250 (Coomassie), 100 mM Bis Tris-HCl pH 7,0, 500 mM 6-Aminocaprinsäure, 30% Saccharose) versetzt. Zur Größenbestimmung der Proben wurde ein Proteinstandard (je 1 mg Protein/200 μ l Aufschlusspuffer) aus Ferritin-Dimer (880 kDa) bzw. Ferritin-Monomer (440 kDa), Tyroglobulin (667 kDa) und Aldolase (158 kDa) mitgeführt. Dem Standard wurde 1:10 Probenpuffer zugesetzt. Zur Kontrolle der Proteinkonzentration wurden Aliquots der Membranfraktion vor und nach der Solubilisierung 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt. Nach der Polymerisation der Gele wurden diese in Elektrophorese-Kammern gespannt

und 1 x Anodenpuffer (5 x Puffer: 0,25 M Bis Tris-HCl pH 7,0) bzw. 1 x Kathodenpuffer (10 x Puffer: 0,5 M Tricin, 150 mM Bis Tris-HCl pH 7,0, 0,01% Serva G250 Coomassie) in die entsprechenden Elektrodenräume gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für ca. sechs Stunden. Nach dem halben Lauf wurde der Kathodenpuffer gegen Kathodenpuffer ohne Coomassie ausgetauscht. Zur Kontrolle der Proteinpräparation wurde vor und nach dem Solubilisieren Proben für die SDS-PAGE abgenommen.

2.4.13 Coomassie-Färbung von Proteinen

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Coomassie-Färbelösung (0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 20% Methanol, 10% Essigsäure) sichtbar gemacht. Die Proteingele wurden für mindestens eine Stunde in dieser Lösung geschwenkt. Zur Entfernung der Hintergrundfärbung wurden die Gele anschließend im Entfärberbad (20% Methanol, 10% Essigsäure) geschwenkt.

2.4.14 Trocknung von Proteingelen

Zur Trocknung der Coomassie-gefärbten SDS-Gele wurden diese in Gel Trocknungspuffer (40% Methanol, 10% Essigsäure, 3% Glycerin) äquilibriert und zwischen zwei Cellophanfolien, die ebenfalls mit dem Puffer äquilibriert wurden, auf eine Gel Trocknungsapparatur gespannt. Das Gel wurde hierbei luftblasenfrei aufgelegt und für mindestens einen Tag bei Raumtemperatur getrocknet.

2.4.15 Western-Blot und Proteindetektion

2.4.15.1 Semi-Dry Western-Blot

Der Transfer von einem Proteingel auf eine Nitrocellulosemembran (*parablot NCP*, Porenweite 0,45 μm , Macherey-Nagel, Düren) erfolgte mit Hilfe der Blot-Apparatur *Trans-Blot® Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad, München) bzw. *Fast-blot B 43* (Biometra®, Göttingen). SDS-Gele wurden 10 min in Towbin-Puffer (25 mM Tris, 170 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) und BN-Gele für 10 min in Towbin-Puffer mit 0,1% SDS äquilibriert. Sechs Lagen *Whatman-3MM*-Filterpapier und die Nitrocellulosemembran wurden auf Gelgröße zugeschnitten und ebenfalls im Towbin-Puffer äquilibriert. Auf die Anode der Blot-Apparatur wurden drei Lagen Filterpapier, die

Nitrocellulosemembran, das Gel und wieder drei Lagen Filterpapier luftblasenfrei aufgelegt. Den Abschluss bildete die Kathode der Apparatur. Der Proteintransfer erfolgte für 1 h bei 15 V und 250 mA für das Bio-Rad-System und bei 43 mA pro SDS-PAGE-Gel beim Biometra-System.

2.4.15.2 Proteinnachweis mittels Immunopräzipitation

Für den Nachweis der Proteine mittels Immunopräzipitation wurde die Nitrocellulosemembran für mindestens 3 h in 1 x PBS (10 x PBS: 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 4 mM Na₂HPO₄, mM KH₂PO₄) mit 5 % (w/v) Magermilchpulver bei Raumtemperatur geschwenkt.

Der Nachweis beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Ein Antikörper (AK) erkennt sein spezifisches Antigen (hier das zu detektierende Protein), welches auf der Oberfläche der Nitrocellulosemembran gebunden wurde. Ein zweiter AK mit gekoppelter Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) bindet an diesen Immunkomplex. Die Peroxidase erlaubt nun den Nachweis der gebildeten Komplexe durch eine Lichtreaktion.

Im Falle der Detektion vom *Strep*-tagII wurde ein Strep-Tactin®-HRP-Konjugat verwendet, das den Nachweis in einem Schritt erlaubt (IBA, Göttingen). Aufgrund der schwachen Signale des *Strep*-tagII bei Durchführung des Protokolls laut Hersteller wurde eine veränderte Detektionsmethode angewandt. Nach dem Blocken der Membran wurde diese mit 1 x PBS dreimal für 5 min gewaschen und 1 h schwenkend mit dem Primär-Antikörper (in 1 x PBS, 0,5% BSA und 0,02% (w/v) Azid) oder mit dem Strep-Tactin®-HRP-Konjugat (1:4000 in 1 x PBS) inkubiert.

Im Anschluss wurde die Nitrocellulosemembran erneut dreimal für 5 min mit 1 x PBS gewaschen und, falls erforderlich, 1 h schwenkend mit dem Anti-IgG-HRP-Konjugat (1:5000 in 1 x PBS und 0,5% BSA) inkubiert. Den folgenden Waschsritten (3 x 5 min mit 1 x PBS) schloss sich der Nachweis der Immunkomplexe an. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 16 aufgeführt:

Tabelle 16: Verwendete Antikörper

Antikörper	AK-Typ	Antigen	Verdünnung	Herkunft
Anti-GFP-AK	Rekombinant	GFP	1:3000	
Anti-HiPIP-AK	Kaninchen-IgG (Serum)	<i>precursor</i> -HiPIP	1:1000	Brüser <i>et al.</i> (1998)
Anti-His-tag-AK	Maus-IgG (Serum)	<i>precursor</i> -HiPIP		
Anti-TatA-AK	Kaninchen-IgG (Serum)	TatA/E	1:1000	Yahr und Wickner (2001)
Anti-TatB-AK	Kaninchen-IgG (Serum)	TatB	1:1000	Yahr und Wickner (2001)
Anti-TatC-AK	Kaninchen-IgG (Serum)	TatC	1:1000	Alami <i>et al.</i> (2002)
Anti-PspA-AK	Kaninchen-IgG (Serum)	PspA	1:5000	Laborbestand
Strep-Tactin®-HRP-Konjugat	Rekombinant	<i>Strep</i> -tagII	1:4000	IBA, Göttingen
<i>Goat</i> -Anti- <i>Rabbit</i> -IgG-HRP-Konjugat	Ziegen-IgG (Serum)	Kaninchen-IgG	1:5000	Bio-Rad, München

Im Zuge der Arbeit verwendete Antikörper.

2.4.15.3 Depletion der PspA-Antikörper

Die Detektion von Proteinen mit Hilfe der Immunopräzipitation kann bisweilen kompliziert sein, wenn die Antikörper zu viele unspezifische Reaktionen aufweisen. Auch im Fall der α -PspA wurden diese „unspezifischen“ Bindungen beobachtet, die eventuell auf die Immunisierung von Kaninchen mit gereinigtem PspA-H₆ zurückzuführen sind. So erkennen die Antikörper eventuell Interaktionspartner von PspA, die nach der Reinigung an PspA-H₆ gebunden hatten. Aus diesem Grund wurden die α -PspA mit dem *pspA*-Deletionsstamm JWK1297 depletiert. Für zwei Ansätze wurden 5 g pelletierte Zellen in 20 ml 1 x PBS resuspendiert und eine Spatelspitze DNaseI zugesetzt. Kurz vor dem Aufschluss mittels *French® Pressure Cell Press* (SLM Instruments Inc., Silver Springs, USA) bei ca. 869 kPa (2 Passagen) wurde 1 mM PMSF (Stammlösung: 100 mM in DMSO) zugegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 5000 U/min und 4 °C, Hettich) wurde das Zelltrümmerpellet verworfen und der Überstand 1 : 5 mit 1 x PBS verdünnt. Diese verdünnte Proteinlösung wurde 20 min bei 121 °C autoklaviert, abgekühlt und im Anschluss wurde dem Ansatz ein α -PspA-Aliquot (1 : 5000 Endkonzentration) zugeführt. In der Folge wurde die PspA-Antikörper-Lösung 1 bis 2 Tage im Kühlraum bei 8 °C über Kopf invertiert und erneut abzentrifugiert (15 min, 5000 U/min und 4 °C, Hettich). Schließlich wurde der Überstand filtriert (45 μ m,), mit 0,02 % (v/v) Natrium-Azid versetzt und die depletierten α -PspA auf ihre veränderte Bindungsaffinität getestet.

2.4.15.4 Detektion mittels ECL-System

Für den Nachweis der Immunokomplexe mit Hilfe des *enhanced-chemiluminescence* (ECL)-Systems wurden jeweils 5 ml folgender Lösungen genutzt: Lösung A (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,4 mM p-Coumarinsäure (Stammlösung in DMSO), 2,5 mM Lumi-nol (Stammlösung in DMSO)) und Lösung B (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,018% H₂O₂). Die Detektion der Signale erfolgte entweder mit Hilfe des BIO-*Imaging*-Systems *MF-ChemiBIS 3.2* (Berthold, Barsinghausen) oder in der Dunkelkammer mit Röntgenfilmen. Die Lösungen wurden gemischt und auf die Nitrocellulosemembran gegeben. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurde die Membran direkt auf den Träger im *Imaging*-System oder zwischen zwei Folien in die Fotokassette gelegt. Aufnahmen der Chemilumineszenz wurden mit einer 3 Megapixel Kamera durch das *Gel Capture* Programm

(Berthold, Barsinghausen) für 30 s oder 20 min getätigt. In der Dunkelkammer wurde jetzt ein Lumi-Film (*Chemiluminescent Detection Film*, Roche Diagnostics, Mannheim) für 10 s bis 30 min aufgelegt. Der Film wurde bis zum Sichtbarwerden der Banden im Entwicklerbad (Entwickler T32, Calbe Chemie, Stadtfeld) inkubiert, anschließend kurz in Wasser geschwenkt und ins Fixierbad (Fixierer Z32-5, Calbe Chemie, Stadtfeld) überführt. Schließlich wurde der Film unter Wasser von restlichen Fixierrückständen gereinigt und an der Luft getrocknet.

2.4.16 MALDI-TOF (matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisations - *time-of-flight* - Spektrometrie)

Zur Identifikation von Proteinen mit Hilfe der Massenspektrometrie wurden die zu untersuchenden Banden aus der Coomassie-gefärbten SDS-PAGE ausgeschnitten und von Frau Dr. Angelika Schierhorn (Max-Planck-Institut für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) analysiert. Die ausgeschnittenen Fragmente wurden 3x mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer und Acetonitril gewaschen und danach geschrumpft. Für den proteolytischen Verdau des Proteins wurden die Fragmente über Nacht bei 37°C im genannten Puffer mit der Protease Trypsin inkubiert. Die gewonnenen Peptide wurden extrahiert und auf eine nano-HPLC-Säule ($75\ \mu\text{m} \times 5\ \text{cm}$, $3\ \mu\text{m}$ C18 100 PepMap™ Säule, Dionex, Idstein) gegeben. Mit Hilfe des MS/MS-Massenspektrometers *QTOF II* (Waters, Manchester, UK) wurden die Peptide online analysiert. Nichtinterpretierbare Fragmentationsspektren wurden gegen eine Proteindatenbank mit der über das Internet zugänglichen Suchmaschine *MASCOT* (Matrix Science, London, UK) (<http://www.matrixscience.com>) ermittelt.

2.5 Funktionalitäts-Tests

2.5.1 *In-vivo*-Translokationsanalyse: Periplasmafraktionierung ohne Lysozym

Für die Periplasmafraktionierung wurden 50 ml LB-Medium mit 2 ml einer Übernachtskultur beimpft. Die Kultur wurde bis zu einer OD_{600} von 0,8 bis 1,0 bei 37°C unter Schütteln (200 U/min) angezogen und für 8 min bei 4°C und 3800 g abzentrifugiert (Hettich). Das Zellpellet wurde in 20 ml TES-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA pH 8,0 und 20% Saccharose) resuspendiert und für 10 min bei Raumtempera-

tur inkubiert. Das Pellet wurde im Anschluss an einen weiteren Zentrifugationsschritt (8 min, 4 °C, 3800 g) in 1 ml eiskaltem 5 mM MgSO₄ resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert.

Im darauf folgenden Zentrifugationsschritt (10 min, 4 °C, 13000 U/min) wurde der Überstand (Periplasma) vom Pellet getrennt. Für die SDS-PAGE wurden 100 µl des Periplasmas abgenommen und 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt. Das Pellet wurde erneut in 1 ml 5 mM MgSO₄ resuspendiert und 1 min mittels Ultraschall (*Desintegrator UW 60* und Netzgerät *GM 60 HD*, UniEquip, Martinsried) auf Eis aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurde die Cytoplasma-Membranfraktion durch erneutes Zentrifugieren (10 min, 4 °C, 23000 g) von den Zelltrümmern getrennt. Die Fraktionierung der beiden Kompartimente erfolgte mittels Ultrazentrifugation (*Sorvall Discovery M120SE*) des Überstandes für 30 min bei 4 °C und 170000 g. Die Cytoplasmafraktion (Überstand) wurde abgenommen und das Membranpellet in 900 µl 5 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert. Von beiden Fraktionen wurden je 100 µl für die nachfolgende SDS-PAGE abgenommen und 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt (siehe 2.4.10).

2.5.2 SDS-Sensitivitätsmessung

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

Um den Einfluss von SDS auf verschiedene Bakterienstämme zu untersuchen, wurden 100 µl einer Übernachtskultur in 5 ml LB mit 6 verschiedenen SDS-Konzentrationen (0-4% (w/v)) überführt. Es wurden für jede Kultur Dreifachbestimmungen durchgeführt, um genauere Aussagen über die SDS-Sensitivität treffen zu können. Die Zellen wurden zunächst für 3 h bei etwa 200 U/min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte bei 600 nm mit Hilfe des UV/Vis-Spektrophotometers *Uvikon 941* (Kontron Instruments, Mailand, Italien) bestimmt.

Anhand dieser Daten wurden für jede Kultur der Mittelwert in Prozent und die Standardabweichung berechnet. Der Anteil überlebender Zellen wurde gemäß Ize *et al.* (2003) als Verhältnis der OD₆₀₀ bei unterschiedlichen SDS-Konzentrationen relativ zur OD₆₀₀ der Kultur ohne SDS definiert.

2.5.3 TMAO-Wachstum

Das Verfolgen des Wachstums auf TMAO ist ein weiterer Test, der zeigt, wie gut der Tat-Transport funktioniert. Unter anaeroben Bedingungen wird den Zellen nur TMAO als einzige Energiequelle zur Verfügung gestellt. Da die TMAO-Reduktase (TorA) ein Tat-Substrat ist, ist ein Wachstum nur möglich, wenn TorA Tat-abhängig transportiert wird (Santini *et al.*, 1998).

Von den zu testenden Stämmen wurden Übernachtskulturen auf M9-Minimalmedium angezogen. Vollständig mit TMAO-Medium (M9-Minimalmedium, $1 \mu\text{M Na}_2\text{SeO}_3$, $0,1 \text{ M TMAO}$ (Trimethyl-amin-N-oxid-dihydrat) $\text{C}_3\text{H}_9\text{NO} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$) gefüllte Hungate-Röhrchen (ca. 15 ml) wurden mit $20 \mu\text{l}$ der Übernachtskultur beimpft, fest verschlossen und bei 37°C inkubiert. Das Wachstum wurde über mehrere Tage mittels des Spektrophotometers *Genesys 20* (Thermo Scientific, Schwerte) bei 600 nm verfolgt.

2.6 Mikroskopische Techniken

2.6.1 Durchlicht-Mikroskopie

Die Funktionalität des Tat-Systems lässt sich auch mikroskopisch nachweisen. Wie schon für die SDS-Sensitivitätsmessung (siehe 2.5.2) beruht der Test auf das Transportvermögen der Amidasen (AmiA und AmiC). Falls eine Störung im Tat-System vorliegt, werden die Tat-Substrate nicht mehr bzw. eingeschränkt transportiert und infolgedessen sind die Zellen, in ihrer Fähigkeit sich nach der Zellteilung voneinander zu lösen, gehemmt (Ketten-Phänotyp).

Es wurden 5 ml LB-Medium mit $200 \mu\text{l}$ Übernachtskultur beimpft und bei 37°C und 200 U/min bis zu einer OD_{600} von 0,6 angezogen. Falls notwendig, wurde die Genexpression mit 0,1% Rhamnose induziert und Kulturen für weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Für die Durchlicht-Mikroskopie wurde ein Axioskop 50 (Carl Zeiss, Jena) mit einem 63x oder 100x Ölimmersionsobjektiv oder ein Biozero-Fluoreszenzmikroskop (Keyence) mit einem 20x oder 40x Objektiv verwendet. Bilder wurden mit einer aufmontierten Camedia C-4040 Zoom Digitalkamera (Olympus, Hamburg) aufgenommen.

2.6.2 Elektronen-Mikroskopie

Eine Methode zur Fixierung von Zellen bot das *negative staining* genannte Verfahren der Fixierung mittels Uranylacetat (UA). Das Verfahren beruht auf der Kontrastierung

der Probe durch die Adsorption und anschließende Eintrocknung von Schwermetallsalzen.

Im Anschluss an die Strep-Tactin®-Affinitätschromatographie und die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe 2.4.5 und 2.4.9) wurden gereinigte Protein-Komplexe an Kohlefolie für die Dauer von ca. 30 Sekunden adsorbiert und mit gesättigter Uranylacetat-Lösung negativ kontrastiert. Nach Lufttrocknung wurden sie im elastischen Hellfeld-Modus mit einem integriertem Energie-Filter Transmission-Elektronenmikroskop (Zeiss Libra120 Plus; Zeiss, Oberkochen) bei einer Primärvergrößerung von x20000 bis x40000 untersucht (Spaltweite: 10 eV; Objektiv-Aperture: 60 μm), wie dies im Detail bei Winkler *et al.* (1996) beschrieben worden ist. Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit einer 2048x2048 14Bit CCD-Kamera (Sharp:Eye, Fa. Tröndle, Moorenweis) aufgezeichnet.

2.7 Enzymologische Methoden

2.7.1 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität mit ganzen Zellen nach Miller (1992) mod.

Schon über Nacht wurden den drei Zellkulturen von jedem Ansatz 0,5 bzw. 1 mM IPTG zugesetzt. Die Dreifachbestimmung der Kulturen erfolgte mit 3 Übernachtskulturen, die im Anschluss separat behandelt und nur einmal gemessen wurden. Für die Zellan-zucht wurden 5 ml LB-Medium mit IPTG (0,5 bzw. 1 mM) mit 200 μl einer Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,8 schüttelnd bei 30 bzw. 37 °C inkubiert. Nach 20 minütigem Abkühlen auf Eis erfolgte die Ernte in je 1-ml-Aliquots durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 4500 g). Die Zellpellets wurden in 4 ml Z-Puffer (60 mM Na_2HPO_4 pH 7,0, 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 2,7 g β -Mercaptoethanol) resuspendiert und von 1 ml der Verdünnung die OD_{600} bestimmt.

Anschließend wurden 80 μl Chloroform (100 % (v/v)) und 40 μl 0,1 % (w/v) SDS zu 1 ml verdünnter Zellkultur hinzugegeben und ca. 10 s gevortext. Nach einer Inkubation von 3 min bei 28 °C wurde die Reaktion mit der Zugabe von 100 μl 0,4% ONPG in Z-Puffer gestartet. Zwischen Zugabe des ONPGs und Zugabe von 500 μl 1 M Na_2CO_3 zum Abstoppen der Reaktion (Gelbfärbung) wurde das Zeitintervall gemessen. Nachfolgend wurden die Proben 10 min bei 14000 U/min abzentrifugiert und die Extinktion

von 1 ml Überstand bei 420 nm gemessen.

Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach dieser Formel:

$$A[U] = \frac{1000 * OD_{420}}{t * V * OD_{600}}$$

V = Volumen der Kultur im Assay (1 ml)

t = Zeit in min

Eine internationale Enzymeinheit (U) entspricht dem Umsatz von 1 μ mol Substrat pro Minute.

2.7.2 Interaktionsassay auf festem Medium

Ein schneller Vortest auf Interaktionen zwischen Proteinen bietet das Wachstum auf LB-Platten mit 40 μ g/ml X-Gal ⁷. Dabei dient X-Gal als chromogenes Substrat der β -Galaktosidase, welches durch eine Blaufärbung sichtbar wird.

Für den Assay wurden 10 μ l einer Übernachtskultur auf X-Gal/LB-Platten getropft, getrocknet und bei 30 °C inkubiert. Die Platten wurden nachfolgend mit dem Twain Scanner eingescannt.

2.8 Chemikalien und Geräte

2.8.1 Zentrifugen und Rotoren

Alle verwendeten Zentrifugen mit den entsprechenden Rotoren sind in Tabelle 17 aufgeführt:

Außerdem wurden die Tischzentrifugen *Zentrifuge 5415C* (Eppendorf) bzw. *Hermle Z160M* mit variablen Geschwindigkeiten von 4000 – 14000 U/min eingesetzt.

⁷5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Tabelle 17: Verwendete Zentrifugen

Zentrifuge	Rotor	max. Volumen	U/min	RCF in g (für r_{mittel} bei U_{max}/min)
Beckman Coulter <i>L8-70M</i>	<i>Ti50</i>	12 x 13,5 ml	40000	145000
	<i>SW55 – Ti</i>	6 x 5 ml	25000	76000
Beckman <i>Optima™ L-80XP</i>	<i>70.1Ti</i>	12 x 13,5 ml	40000	145000
	<i>SW55 – Ti</i>	6 x 5 ml	25000	76000
Beckman <i>Optima™ MAX-XP</i>	<i>TLA – 55</i>	12 x 1,5 ml	52600	170000
	<i>TLA – 110.1</i>	8 x 4 ml	56000	170000
Eppendorf Centrifuge <i>5804R</i>	<i>A – 4 – 44</i>	4 x 50 ml 16 x 15 ml	5000	4500
Heraeus <i>Cryofuge 5000</i>		12 x 50 ml 48 x 15 ml	5000	5168
Hettich <i>Universal</i> <i>30 – RF</i>	<i>1424A</i>	4 x 50 ml	5000	3800
	<i>1412</i>	24 x 2 ml	15000	23000
Sorvall <i>RC – 5C</i> <i>Plus</i>	<i>GSA</i>	6 x 250 ml	5000	4068
	<i>SLA – 3000</i>	6 x 500 ml	5000	4200
	<i>SS – 34</i>	16 x 30 ml	10000	12000
Sorvall Discovery <i>M120SE</i>	<i>S100 – AT4</i>	6 x 3 ml	56000	170000

Alle verwendeten Zentrifugen und Rotoren in dieser Dissertation.

2.8.2 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht gesondert aufgeführt, stammen alle Chemikalien von folgenden Firmen:

- AppliChem (Darmstadt)
- Bachem (Weil am Rhein)
- Carl Roth (Karlsruhe)
- Merck (Darmstadt)
- Serva Electrophoresis (Heidelberg)
- Sigma Aldrich Chemie (Fluka, Taufkirchen)

Die Enzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen:

- Fisher Scientific (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- New England BioLabs (Frankfurt am Main)

3 Ergebnisse

3.1 Interaktion von TatA mit PspA

Von TatA ist bekannt, dass es mit Membranen sedimentiert und gemeinsam mit TatB und TatC die Tat-Translokase bildet, die in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist. Das Tat-System wird allein durch die protonenmotorische Kraft energetisiert, die sich aus dem pH-Gradienten und dem Membranpotential zusammensetzt. Unter verschiedensten Stressbedingungen (Ethanol, osmotischer Schock und blockiertes Sec-Translokon) wird PspA verstärkt synthetisiert und soll bei der Aufrechterhaltung der PMF, *proton motive force*, mitwirken (Kleerebezem *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 2007; Engl *et al.*, 2009).

Kerstin Standar konnte in ihrer Diplomarbeit (2004) zum Thema PspA in unserem Labor erstmals zeigen, dass TatA bei einer Affinitätschromatographischen Reinigung von PspA-strep mit diesem Protein coeluiert. Die Proteine mussten aber mit Hilfe von Aceton gefällt werden, da ein Nachweis im Western-Blot aufgrund der sehr geringen Mengen an TatA sonst nicht möglich gewesen wäre. In dieser Arbeit wurde die Herangehensweise umgekehrt. Zunächst sollte TatA angereichert und im Anschluss die Elutionsfraktionen auf die Anwesenheit von PspA hin untersucht werden.

3.1.1 Rekombinant produziertes TatA interagiert mit PspA

Die hydrophoben Eigenschaften des N-Terminus von TatA legen eine Membranlokalisation des Proteins nahe. Auch wenn es zu den Standardprozeduren gehört, Membranproteine mittels Detergenzien aus Membranfraktionen zu reinigen, wurde hier darauf verzichtet, da bereits bekannt war, dass TatA-strep auch aus nicht-solubilisierten Membranen und aus der löslichen Fraktion angereichert werden kann (Mehner, 2006). Es erfolgte eine Anreicherung aus der löslichen Fraktion und der Membranfraktion ausgehend von Zellen einer 100-ml-Kultur des Stammes MC4100 *ara^R pBW-tatA-strep*. Aufgrund des bereits bekannten ungewöhnlichen Laufverhaltens von TatA (Sargent *et al.*, 1998b) wurde TatA-strep durch Coomassie nach der SDS-PAGE nicht bei 9,6 kDa, sondern bei ca. 17 kDa angefärbt (Abb. 3.1). Der Anteil von TatA war in der löslichen Fraktion signifikant geringer als in der Membranfraktion (Vergleich Abb. 3.1A, B). Diese Ergebnisse stimmten mit der bereits bekannten Lokalisation von TatA im

Wildtypstamm MC4100 *ara^R* überein, wo TatA ebenfalls in der löslichen Fraktion nachweisbar war (Mehner, 2006).

Während der Reinigungsversuche konnte mittels Coomassie-Färbung ein coelulierendes Protein bei ca. 25 kDa ermittelt werden (Abb. 3.1). Zur Identifikation wurde die Proteinbande ausgeschnitten und durch MALDI-TOF-Analyse als PspA bestimmt (Mehner, 2006). Die Detektion von PspA in der Membran und der löslichen Fraktion entsprach der postulierten Lokalisation des Proteins (Brissette *et al.*, 1990; Kleerebezem und Tommassen, 1993). Dabei zeigte PspA ein von TatA abhängiges Elutionsverhalten, d.h. PspA wurde nur in den Elutionsfraktionen detektiert, in denen auch TatA-strep nachgewiesen werden konnte (Mehner, 2006).

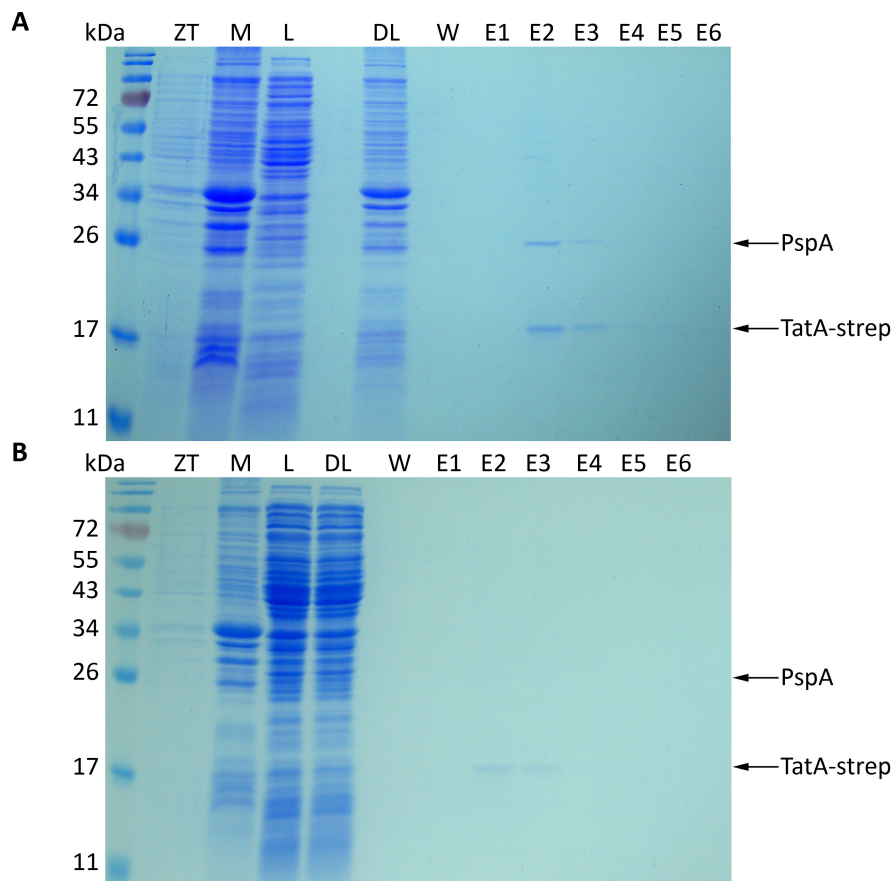


Abbildung 3.1: Anreicherung von TatA-strep aus der **[A]** Membranfraktion sowie der **[B]** löslichen Fraktion des Stammes MC4100 *ara^R* pBW-*tatA-strep* mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen, Coomassiefärbung; **ZT** – Zelltrümmerpellet, **M** – Membranfraktion, **L** – lösliche Fraktion, **DL** – Durchlauf der Affinitätssäule, **W** – Letzte Waschfraktion, **E1**, . . . , **E6** – Elutionsfraktionen 1 bis 6.

Um zu überprüfen, ob PspA TatA-unabhängig an die Affinitätsmatrix binden kann, wurden Zellen einer 100-ml-Kultur des Stammes MC4100 *ara^R* angezogen und die Mem-

branen ohne Solubilisierung gereinigt. Zur Kontrolle wurde die Elutionsfraktion 2 aus der Reinigung von TatA-strep (siehe Abb. 3.1A) ebenfalls auf ein SDS-Gel aufgetragen.

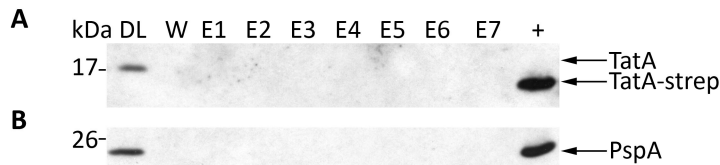


Abbildung 3.2: Identifikation von PspA nach Anreicherung aus der Membranfraktion des Stammes MC4100 mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. [A] α -TatA, [B] α -PspA; 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, $3\mu\text{l}$ Marker-/ $10\mu\text{l}$ Probenvolumen; **ZT** – Zelltrümmerpellet, **M** – Membranfraktion, **L** – lösliche Fraktion, **DL** – Durchlauf der Affinitätssäule, **W** – Letzte Waschfraktion, **E1, . . . , E7** – Elutionsfraktionen 1 bis 7, + – Positivkontrolle mit TatA-strep.

Im Wildtyp-Stamm konnte TatA im Durchlauf, jedoch nicht in den Elutionsfraktionen detektiert werden (Abb. 3.2). Bei der Überexpression von *tatA-strep* hingegen konnte ein Signal bei etwa 17 kDa erhalten werden. Gleichmaßen wie TatA wurde PspA im Wildtyp-Stamm nur im Durchlauf mit einem Molekulargewicht von etwa 25 kDa detektiert (Abb. 3.2B). Auffällig war außerdem, dass ohne *tatA*-Überexpression deutlich weniger PspA detektiert wurde (Abb. 3.2B, Vergleich der Spuren DL und +). Eine unspezifische Bindung von PspA an die Affinitätsmatrix konnte damit ausgeschlossen werden, da PspA in den Elutionsfraktionen nicht nachgewiesen wurde (Abb. 3.2).

Um zu prüfen, ob PspA nur nach *tatA*-Überexpression an die Affinitätsmatrix binden kann, wurden Zellen einer 100-ml-Kultur des Stammes MC4100 *ara^R pBW-tatA* angezogen und die lösliche sowie die Membranfraktion präpariert. Dabei ist zu beachten, dass TatA keinen C-terminalen *Strep*-tag aufwies und deshalb nicht an die Affinitätsmatrix binden konnte (Abb. 3.3).

TatA wies weder in der Membranfraktion noch in der löslichen Fraktion ein distinktes Elutionsprofil auf, sondern wurde von der Matrix nur leicht retardiert (Abb. 3.3A, C). PspA wurde nicht als eluierendes Protein detektiert (Abb. 3.3B, D), was nachwies, dass PspA zuvor ausschließlich TatA-strep-abhängig an der Säulenmatrix gebunden hatte. Durch Auftragen von Proben von angereichertem TatA-strep in der letzten Spur des analytischen Gels wurde sichergestellt, dass die Mengen an TatA mit und ohne *Strep*-tag ungefähr gleich waren.

3.1.2 Rekombinant produziertes TatE interagiert mit PspA

Von TatA existiert ein monocistronisch codiertes paraloges Protein in *E. coli*, TatE, welches TatA funktionell ersetzen kann (Sargent *et al.*, 1998b). Bedeutet dieser funktionelle

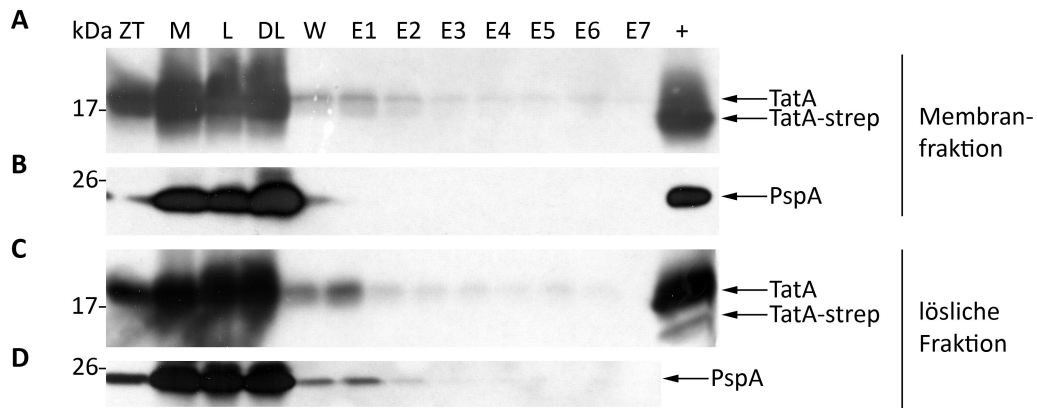


Abbildung 3.3: Anreicherung von TatA aus der [A-B] Membranfraktion sowie der [C-D] löslichen Fraktion des Stammes MC4100 pBW-*tatA* mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. [A, C] α -TatA, [B, D] α -PspA; 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; ZT – Zelltrümmerpellet, M – Membranfraktion, L – lösliche Fraktion, DL – Durchlauf der Affinitätssäule, W – Letzte Waschfraktion, E1, . . . , E7 – Elutionsfraktionen 1 bis 7, + – Positivkontrolle mit TatA-strep.

Zusammenhang auch, dass TatE mit PspA interagieren könnte? Um dies zu untersuchen, wurde zunächst ein Sequenzvergleich zwischen TatA und TatE aus *E. coli* durchgeführt (Abb.3.4).

```

TatA  MGGISIWQLLIIAVIVVLLFGTKKLGSI GSDLGASIKGFKKAMSDDEPKQDKTSQDADFT 60
TatE  MGEISITKLLVVAALVVLLFGTKKLR T LGGDLGAAIKGFKKAMNDDD-AAAKKGADVLDQ 59
**  ***  :*:::*.:*****  ::*.****:*****.***:  *..*.*:

TatA  AKTIADKQADTNQEQAKTEDAKRHDKEQV 89
TatE  AEKLSHKE----- 67
*:.:..*.:

```

Abbildung 3.4: Sequenzvergleich der Tat-Komponenten TatA/E aus dem *E. coli*-Stamm K-12. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms *CLUSTALW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) vom *European Biotechnology Institut* (EBI) verglichen. Die Transmembranhelix und die amphipathische Helix wurden farbig hervorgehoben. (*) – identisch in allen Sequenzen, (:) – sehr ähnlich, (.) – ähnlich.

Aufgrund des Sequenzvergleiches wird ersichtlich, dass TatE im N-terminalen Bereich starke Ähnlichkeiten mit TatA aufweist und einen kürzeren, unstrukturierten C-Terminus besitzt. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wurde im nächsten Schritt eine affinitätschromatographische Reinigung von TatE-strep aus 100 ml Zellkultur des Stammes MC4100 *ara^R* pBW-*tatE-strep* durchgeführt (Abb. 3.5).

Wie schon TatA (Abb. 3.1) wies auch TatE ein ungewöhnliches Laufverhalten auf und wurde in der SDS-PAGE nicht bei 7 kDa, sondern bei ca. 13 kDa durch Commassie angefärbt (Abb. 3.5). Der TatE-Anteil in der löslichen Fraktion (Abb. 3.5 B, Spuren E2 und E3) war signifikant geringer als in der Membranfraktion (Abb. 3.5 A, Spuren

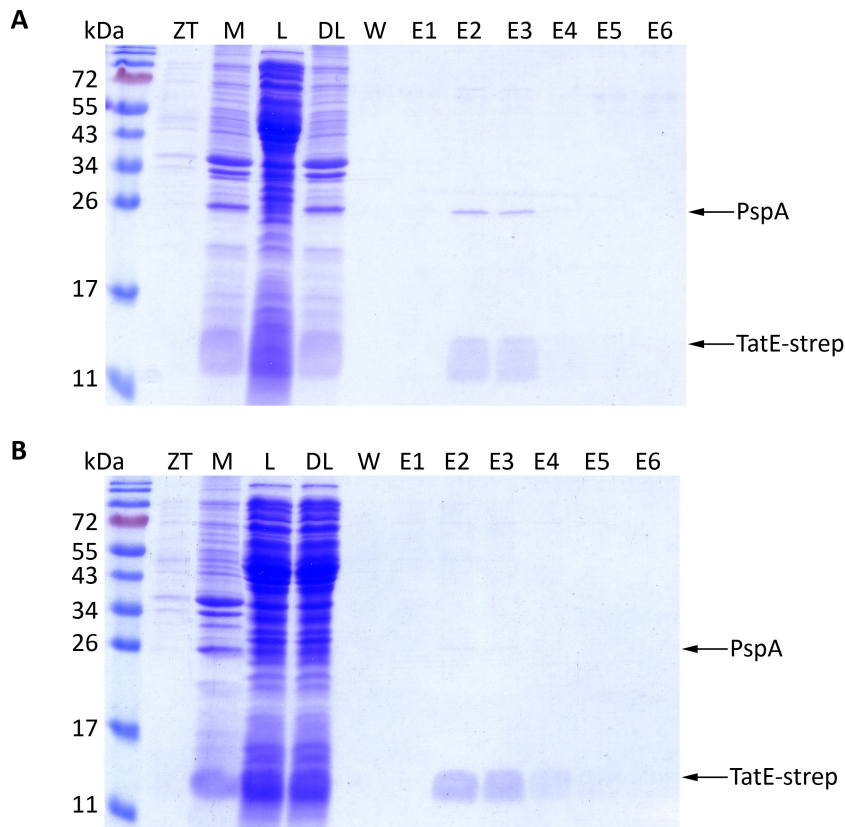


Abbildung 3.5: Anreicherung von TatE-strep aus der **[A]** Membranfraktion sowie der **[B]** löslichen Fraktion des Stammes MC4100 ara^R pBW-*tatE-strep* mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, $3\mu\text{l}$ Marker-/ $10\mu\text{l}$ Probenvolumen, Coomassiefärbung; **ZT** – Zelltrümmerpellet, **M** – Membranfraktion, **L** – lösliche Fraktion, **DL** – Durchlauf der Affinitätssäule, **W** – Letzte Waschfraktion, **E1**, . . . , **E6** – Elutionsfraktionen 1 bis 6.

E2 und E3). Auch für TatE geht man aufgrund der hydrophoben N-terminalen Transmembranhelix von einem membranständigen Protein aus, das hier aus der löslichen Fraktion und der Membranfraktion angereichert wurde. TatE eluierte in den Fraktionen 2 und 3, in denen auch PspA erneut durch Coomassie angefärbt wurde (Abb. 3.5 Spur E2, E3).

3.1.3 PspA interagiert nicht mit der hydrophilen Domäne von TatA

Da gezeigt wurde, dass Vollängen-TatA mit PspA interagiert (Abb. 3.1), wurden im nächsten Schritt definierte Bereiche von TatA auf ihre Interaktionsfähigkeit untersucht. $TatA_d$ aus *Bacillus subtilis* besitzt einen α -helikalen Transmembrandurchgang bis Aminosäure 21, der von einer kurzen Scharnier-Region (*hinge*), einer amphipathischen Helix und einem unstrukturierten Bereich gefolgt wird (Hu *et al.*, 2010; Walther *et al.*, 2010). Für TatA aus *E. coli* existieren zwar bis jetzt noch keine vollständigen Strukturdaten, es kann aber angenommen werden, dass sich $TatA_d$ und TatA in ihrer Struktur kaum

unterscheiden. Das in dieser Arbeit verwendete Konstrukt codierte die gesamte hydrophile Region, beginnend an der sogenannten *hinge*-Region und wurde mit „tatA(HC)“ gekennzeichnet („HC“ steht dabei für „hinge bis zum C-Terminus“).

Die Reinigung von TatA ohne Transmembranhelix (TatA(HC)-strep) erfolgte ausgehend von Zellen einer 100-ml-Kultur. TatA(HC)-strep sollte aufgrund des fehlenden Membranankers nur noch als lösliches Protein vorliegen (De Leeuw *et al.*, 2001). Deshalb erfolgte nur die Reinigung aus der löslichen Fraktion (Abb. 3.6).

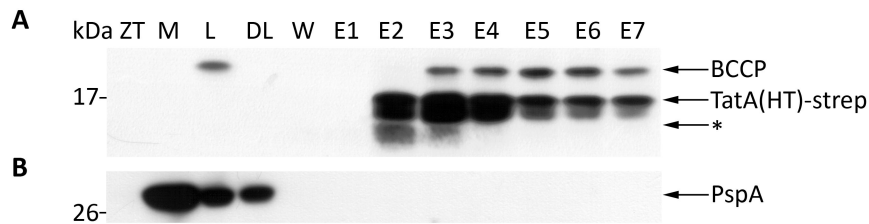


Abbildung 3.6: Anreicherung von TatA(HC)-strep aus der löslichen Fraktion des Stammes MC4100 *ara^R pBW-tatA(HC)-strep* mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. **[A]** *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat, **[B]** α -PspA; 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, $3\mu\text{l}$ Marker-/ $10\mu\text{l}$ Probenvolumen; **ZT** – Zelltrümmerpellet, **M** – Membranfraktion, **L** – lösliche Fraktion, **DL** – Durchlauf der Affinitätssäule, **W** – Letzte Waschfraktion, **E1**, . . . , **E7** – Elutionsfraktionen 1 bis 7, * – Abbau, **BCCP** – Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein.

Bei ca. 16 kDa in der SDS-PAGE laufend konnte TatA(HC)-strep aus der löslichen Fraktion angereichert werden (Abb. 3.6). Dabei wurden in den Elutionsfraktionen 2 und 3 weitere Signale des Proteins mit dem *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat detektiert, was auf ein instabiles Protein hindeutet, das teilweise abgebaut wurde (Abb. 3.6A; E2 und E3). PspA befand sich nur im Durchlauf und konnte daher nicht von der Affinitätsmatrix TatA-abhängig eluiert werden (Abb. 3.6B). Aufgrund des Ausbleibens einer Coelution von PspA mit TatA(HC)-strep wurde im Anschluss besonderer Augenmerk auf den N-Terminus (Aminosäuren 1 bis 21) von TatA gelegt.

3.1.4 Der N-Terminus von TatA ist ausreichend für die Interaktion mit PspA

Der N-Terminus von TatA dient als Transmembrananker und ist nur etwa 2 kDa groß. Um Studien mit diesen Bereich von TatA überhaupt ausführen zu können, musste zunächst der N-Terminus an ein anderes Protein, in diesem Fall matures HiPIP (HiPIP ohne Signalpeptid), fusioniert werden. Der hier verwendete N-Terminus umfasst die Aminosäuren 1 bis 21 und wird als TatA(NT) bezeichnet. Zur Herstellung des Genkonstruktes wurde zunächst eine BamHI-Schnittstelle nach der für den *hin*-

ge codierenden Region in den Vektor pBW-*tatA-strep* eingebracht und dieser im Anschluss mit dem Enzym BamHI verdaut. Nachfolgend wurde das mit den Enzymen BamHI und BglIII verdaute, PCR-amplifizierte *mat-hip*-Fragment mit dem geschnittenen Vektor ligiert. Durch diese Genfusion wurde das *hip*-Fragment zwischen das 3'-Ende von *tatA*(NT) und das 5'-Ende des *strep*-tag gesetzt. Die Anreicherung des Transmembranhelix-Fusionsproteins aus der Membran- und der löslichen Fraktion erfolgte wiederum ausgehend von Zellen einer 100-ml-Kultur (Abb. 3.7).

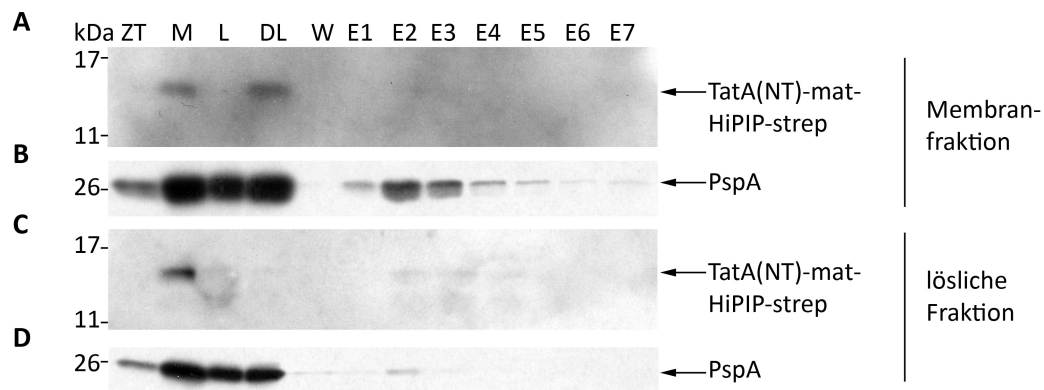


Abbildung 3.7: Anreicherung von TatA(NT)-mat-HiPIP-strep aus der [A-B] Membranfraktion sowie der [C-D] löslichen Fraktion des Stammes MC4100 *ara^R* pBW-*tatA*(NT)-*mat-hip-strep* mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. [A, C] α -HiPIP, [B, D] α -PspA; 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; ZT – Zelltrümmerpellet, M – Membranfraktion, L – lösliche Fraktion, DL – Durchlauf der Affinitätssäule, W – Letzte Waschfraktion, E1, . . . , E7 – Elutionsfraktionen 1 bis 7.

Obwohl TatA(NT)-mat-HiPIP-strep noch die ersten 21 Aminosäuren von TatA aufweist und hauptsächlich in der Membranfraktion detektiert wurde, konnte es nicht in den Elutionsfraktionen der Membran nachgewiesen werden (Abb. 3.7A). Im Vergleich zu TatA(NT) wurde in den Elutionsfraktionen hingegen eine signifikante Menge an PspA detektiert. Dies lässt darauf schließen, dass TatA(NT) doch in ausreichender Menge vorhanden war, um PspA auf der Affinitätsmatrix zurückzuhalten und dann gezielt TatA(NT)-abhängig zu eluieren (Abb. 3.7B). TatA(NT) wurde auch aus der löslichen Fraktion gereinigt und eluierte auch hier wieder gemeinsam mit PspA (Abb. 3.7C, D). In allen Versuchen mit dem TatA(NT)-Derivate konnte der TatA-Antikörper zur Detektion des Proteins nicht verwendet werden, da nur Epitope des C-Terminus von jenem erkannt werden. Im Vergleich zum PspA-Antikörper beruht die schwache Detektion des Fusionsproteins wahrscheinlich auf der geringeren Sensitivität des HiPIP-Antikörpers, der weniger HiPIP-Epitope erkennt.

Um zu prüfen ob PspA matures HiPIP binden kann, wurde dieses aus der löslichen

Fraktion einer 100 ml-Zellkultur des Stammes MC4100 *ara^R* angereichert (Abb. 3.8).

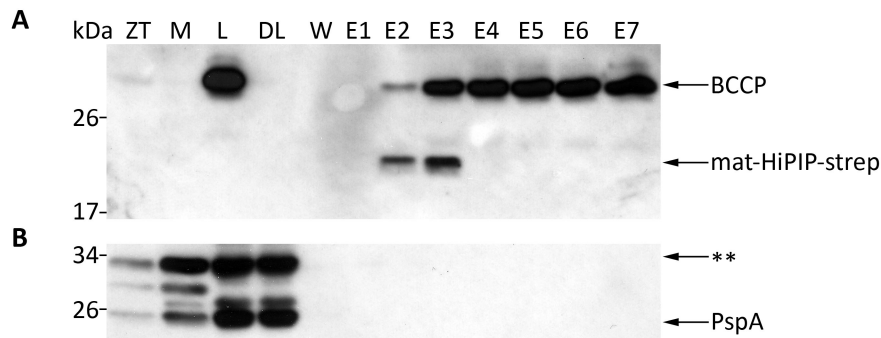


Abbildung 3.8: Anreicherung von maturem HiPIP-strep aus der löslichen Fraktion des Stammes MC4100 pBW-mat-*hip-strep* mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. **[A]** *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat, **[B]** α -PspA; 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; **ZT** – Zelltrümmerpellet, **M** – Membranfraktion, **L** – lösliche Fraktion, **DL** – Durchlauf der Affinitätssäule, **W** – Letzte Waschfraktion, **E1, . . . , E7** – Elutionsfraktionen 1 bis 7, ****** – unspezifische Bindung der Antikörper, **BCCP** – Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein.

Matures HiPIP wurde von der Affinitätsmatrix in den Fraktionen 2 und 3 eluiert. Es konnten jedoch keine PspA-Signale in den Elutionsfraktionen detektiert werden (Abb. 3.8A, B). Deshalb kann man davon ausgehen, dass PspA nicht an den maturen Bereich von HiPIP bindet und infolgedessen der N-Terminus von TatA ausreichend für die Interaktion mit PspA ist (Abb. 3.7).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der N-Terminus für die PspA-Interaktion frei zugänglich sein muss, oder diese durch N-terminale Fusion mit anderen Domänen blockiert wird. Dafür wurde zuerst *tatA* mittels PCR amplifiziert, mit den Enzymen BamHI und BglII verdaut und mit dem BamHI-verdauten Vektor pBW-mat-*hip-strep* ligiert, sodass das 3'-Ende der maturen *hip*-Sequenz mit dem 5'-Ende von *tatA* fusioniert ist. Das daraus resultierende TatA-Fusionsprotein mat-HiPIP-TatA-strep besitzt nun einen durch HiPIP blockierten N-Terminus. Nach einer Anreicherung des Fusionsproteins aus einer 100 ml-Zellkultur des Stammes JARV16 wurde nur ein geringer Anteil des TatA-Derivates in den Elutionsfraktionen der Membran, jedoch eine signifikante Menge in der löslichen Fraktion detektiert (Abb. 3.9A, C).

Die verstärkte Lokalisation des TatA-Derivates in der löslichen Fraktion ist wahrscheinlich durch den maturen Bereich von HiPIP zu erklären, der eventuell die Membranintegration von TatA ver- bzw. behindert. Zusätzlich zum Fusionsprotein wurden mit dem HiPIP-Antikörper noch andere Protein(abbau)signale von ca. 13-20 kDa detektiert, der gegen mehrere Epitope des HiPIPs gerichtet ist (Abb. 3.9C, *- Markierungen). Wo ge-

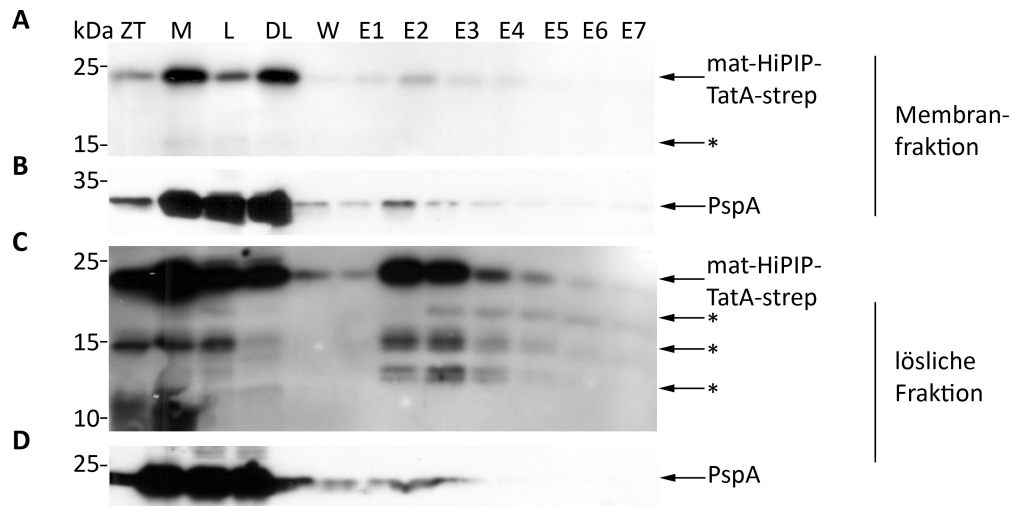


Abbildung 3.9: Anreicherung von maturem HiPIP-TatA-strep aus der [A-B] Membranfraktion sowie der [C-D] löslichen Fraktion des Stammes JARV16 pBW-mat-*hip-tatA-strep* mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. [A, C] α -HiPIP, [B, D] α -PspA; 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; ZT – Zelltrümmerpellet, M – Membranfraktion, L – lösliche Fraktion, DL – Durchlauf der Affinitätssäule, W – Letzte Waschfraktion, E1, . . . , E7 – Elutionsfraktionen 1 bis 7, * – Abbau.

nau der Proteaseangriff stattfand, konnte nicht geklärt werden.

3.1.5 Die TatA-PspA-Interaktion ist nicht von einer einzelnen Aminosäure im N-Terminus von TatA abhängig

Für die bekannte PspA-PspF-Interaktion ist nur das Tryptophan an Position 67 im PspF essentiell (Elderkin *et al.*, 2005). Da durch die bisherigen Ergebnisse deutlich wurde, dass der N-Terminus von TatA ausreichend für die PspA-Interaktion ist, wurde im Anschluss analysiert, ob auch die TatA-PspA-Interaktion nur von einer einzigen oder wenigen Aminosäuren-Positionen abhängig ist. Für diese Untersuchungen wurden zu Beginn insbesondere die Aminosäuren um Position 7 des TatAs ausgewählt, da TatA dort ein Tryptophan besitzt, welches (wie in PspF) von einem Glutamat gefolgt wird. Wie schon bei Elderkin *et al.* (2005) für PspF durchgeführt, wurde das Tryptophan gegen ein Alanin ausgetauscht. In PspF hat dieser Austausch den Verlust der Bindung an PspA zur Folge. In TatA hat die nachfolgende Position 8 (Q8) einen Einfluss auf die Oligomerisierungsfähigkeit von TatA und die Funktionalität des Tat-Systems (Greene *et al.*, 2007; Warren *et al.*, 2009) und wurde gegen die unpolare, hydrophobe Aminosäure Leucin ausgetauscht. Um die eventuelle Membranintegration zu stören, wurden außerdem zusätzliche negative Ladungen an den Positionen 3 und 6 eingeführt. Insgesamt wurden im N-Terminus von TatA 5 Positionen ausgewählt, die einen möglichen

Einfluss auf die Fähigkeit mit PspA zu interagieren hatten (Abb. 3.10).

TatA	1	MGGISIWQLLLIIAVIVVLLFG	21
TatA (NT-G3D)	1	MGDISIWQLLLIIAVIVVLLFG	21
TatA (NT-W7A)	1	MGGISIAQLLLIIAVIVVLLFG	21
TatA (NT-Q8L)	1	MGGISIWLLLLIIAVIVVLLFG	21
TatA (NT-A7L8)	1	MGGISIALLLLIIAVIVVLLFG	21
TatA (I6D)	1	MGGISDWQLLLIIAVIVVLLFG	21

Abbildung 3.10: Übersicht über die ersten 21 N-terminalen Aminosäuren von TatA in *E. coli*. Veränderte Aminosäureaustausche sind rot hervorgehoben.

Trotz einer negativen Ladung an Position 3 in bzw. kurz vor der Transmembranhelix wurde TatA(NT-G3D)-mat-HiPIP-strep sowohl aus der löslichen Fraktion als auch aus der Membranfraktion angereichert (Abb. 3.11A, C). Der Anteil des TatA-Derivates in den Elutionsfraktionen der löslichen Proteine war dabei signifikant höher als in den Elutionsfraktionen der Membranen, obwohl mehr TatA in der Membran- als in der löslichen Fraktion vorhanden war. Eine TatA-abhängige Coelution von PspA wurde abermals nachgewiesen (Abb. 3.11B, D).

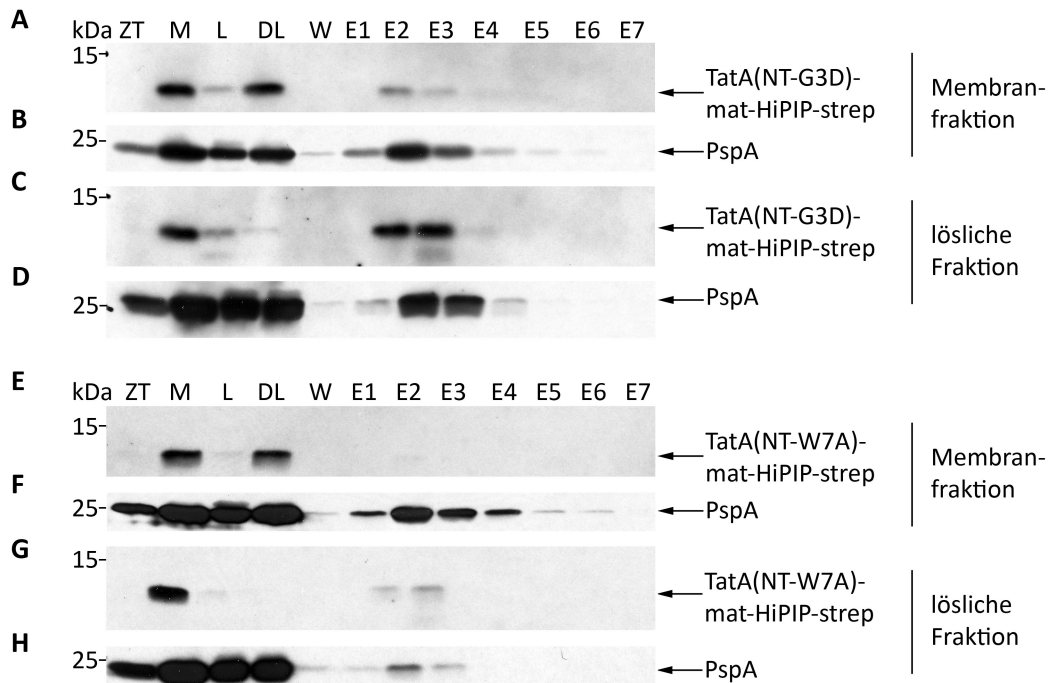


Abbildung 3.11: Anreicherung von [A-D] TatA(NT-G3D)-mat-HiPIP-strep bzw. [E-H] TatA(NT-W7A)-mat-HiPIP-strep aus der Membranfraktion sowie der löslichen Fraktion der Stämme MC4100 *ara^R* pBW-*tatA*(NT-G3D)-mat-*hip*-strep bzw. pBW-*tatA*(NT-W7A)-mat-*hip*-strep mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. [A, C, E, G] α -HiPIP, [B, D, F, H] α -PspA; 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; ZT – Zelltrümmerpellet, M – Membranfraktion, L – lösliche Fraktion, DL – Durchlauf der Affinitätssäule, W – Letzte Waschfraktion, E1, . . . , E7 – Elutionsfraktionen 1 bis 7.

Für den Aminosäureaustausch W7A in TatA wurde im Gegensatz zur PspF-PspA-

Bindung die TatA-PspA-Interaktion nicht unterbunden (Abb. 3.11F, H), weshalb TatA höchstwahrscheinlich nicht über einen vergleichbaren Mechanismus mit PspA interagiert wie PspF. Im Vergleich zu allen anderen Einzelaustauschen im N-Terminus von TatA wurden für das W7A-Derivat die schwächsten Signale detektiert (Abb. 3.11 und 3.12). Die schwache Detektion könnte auch auf die geringe Sensitivität des HiPIP-Antikörpers zurückzuführen sein.

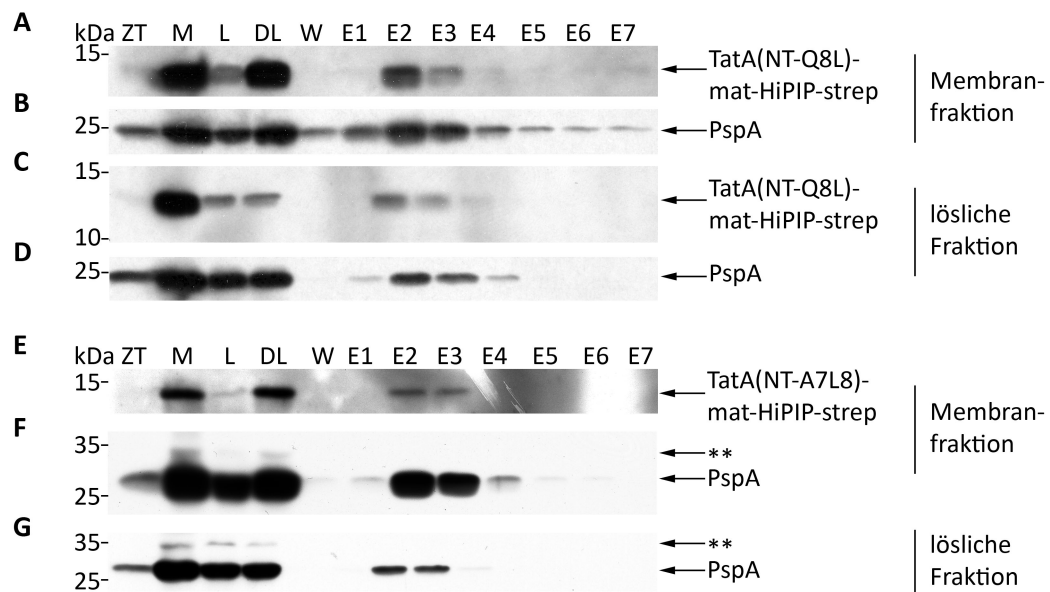


Abbildung 3.12: Anreicherung von [A-D] TatA(NT-Q8L)-mat-HiPIP-strep bzw. [B] TatA(NT-W7A,Q8L)-mat-HiPIP-strep aus der Membranfraktion sowie der löslichen Fraktion der Stämme MC4100 *ara^R* pBW-*tatA*(NT-Q8L)-mat-*hip-strep* bzw. pBW-*tatA*(NT-W7A,Q8L)-mat-*hip-strep* mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. [A, C, E] α -HiPIP, [B, D, F, G] α -PspA; 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; ZT – Zelltrümmerpellet, M – Membranfraktion, L – lösliche Fraktion, DL – Durchlauf der Affinitätssäule, W – Letzte Waschfraktion, E1, . . . , E7 – Elutionsfraktionen 1 bis 7, ** – unspezifische Bindung der Antikörper.

Obwohl der polare Rest Q8 bedeutend für die Oligomerisierung von TatA ist (Greene *et al.*, 2007), hatte die Substitution gegen ein Leucin keine Auswirkung auf das Elutionsverhalten von (und damit die Interaktion mit) PspA (Abb. 3.12B, D). Auch die Kombination in beiden Positionen 7 und 8 (W7Q8>A7L8) im TatA-Derivat führte nicht zum Interaktionsverlust mit PspA (Abb. 3.12F, G), obwohl es im PspF auch ein WQ-Motiv gibt, über das die Bindung mit PspA vermittelt wird.

Die stärkste Beeinflussung der Lokalisation von TatA wurde durch den Aminosäureaustausch I6D erreicht (Abb. 3.13).

Das Verhältnis an detektierbarem TatA-Derivat in der Membranfraktion verschob sich

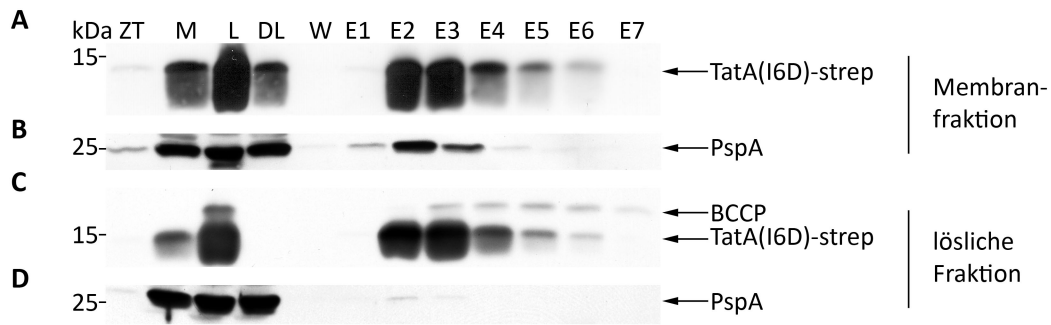


Abbildung 3.13: Anreicherung von TatA(I6D)-strep aus der [A-B] Membranfraktion sowie der [C-D] löslichen Fraktion des Stammes MC4100 ara^R pBW-*tatA(I6D)-strep* mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. [A] α -TatA, [B, D] α -PspA, [C] *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat; 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, $3\mu\text{l}$ Marker-/ $10\mu\text{l}$ Probenvolumen; ZT – Zelltrümmerpellet, M – Membranfraktion, L – lösliche Fraktion, DL – Durchlauf der Affinitätssäule, W – Letzte Waschfraktion, E1, . . . , E7 – Elutionsfraktionen 1 bis 7, BCCP – Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein

in Richtung der löslichen Fraktion (Vergleiche M und L in Abb. 3.13C). Wenngleich auch bei der G3D-Variante eine negative Ladung in die Transmembranhelix eingebracht wurde, so blieb doch die generelle TatA-Verteilung bestehen (Abb. 3.11A, C). In diesem Fall wurde jedoch mehr TatA-Derivat in der löslichen Fraktion als in der Membranfraktion detektiert (Abb. 3.13). PspA wurde nicht entsprechend der veränderten subzellulären Lokalisation von TatA verstärkt in der löslichen Fraktion detektiert, wodurch auf eine deutlich schwächere Interaktion von PspA mit TatA in der löslichen Fraktion geschlossen werden kann (Vergleich Abb. 3.13B, D mit Abb. 3.11B, D).

3.1.6 TatA interagiert auch mit rekombinalem PspA

Alle bisherigen Versuche beruhten auf der Untersuchung der Interaktion von rekombinalem TatA mit chromosomalem PspA. Deshalb wurde geprüft, ob die Proteine auch nach rekombinanter Produktion beider Proteine miteinander interagieren können. Um ausschließen zu können, dass TatA mit chromosomalem statt rekombinalem PspA interagiert, wurde der *pspA*-Deletionsstamm JWK1297 verwendet. Zunächst wurde das Zellpellet aufgeschlossen und TatA-strep wurde aus der Membran- und der löslichen Fraktion angereichert (Abb. 3.14A-D). Im nächsten Schritt wurden die Elutionsfraktionen 2 bis 4 der Membran- bzw. der löslichen Fraktion getrennt voneinander vereint und mit Hilfe der Ni-IMAC (siehe 2.4.6) wurde PspA-H6 angereichert (Abb. 3.14 E-H).

PspA-H6 konnte nach der *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie nur durch seine Bindung an TatA-strep von der Säulenmatrix eluieren (Abb. 3.14B, D), da es durch den C-terminal fusionierten His-tag nicht die Fähigkeit besitzt, an die *Strep*-Tactin-Matrix

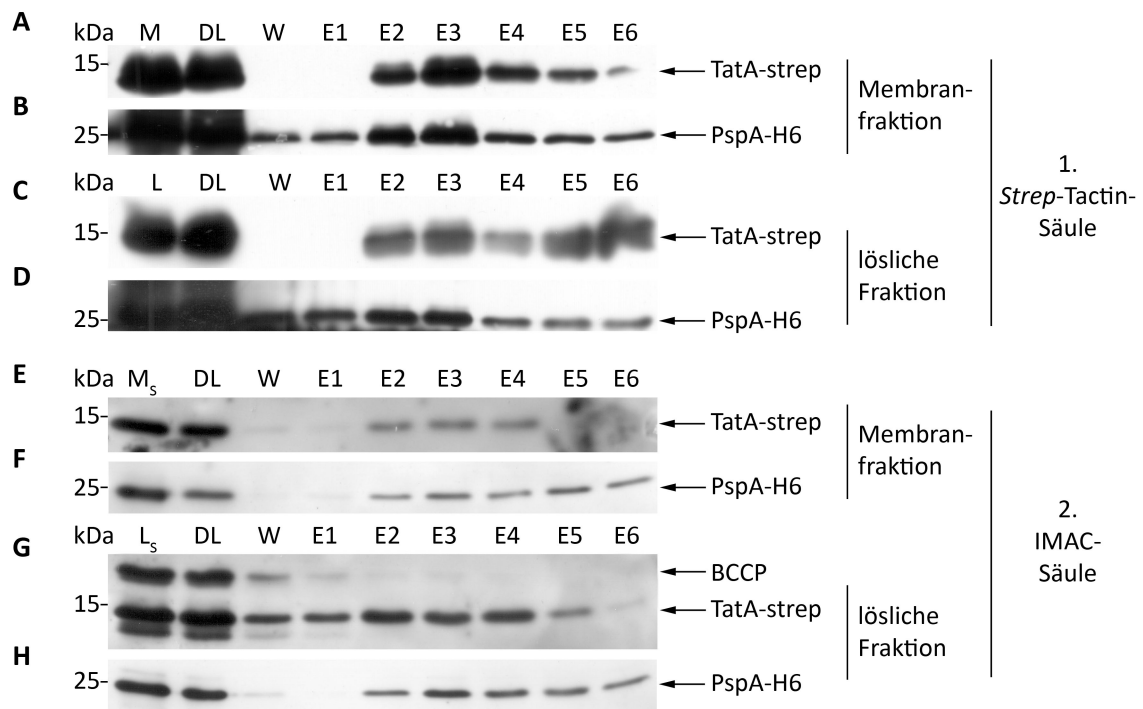


Abbildung 3.14: Reziproker Pull-Down von TatA-strep mit PspA-H6 aus der [A-B, E-F] Membranfraktion sowie der [C-D, G-H] löslichen Fraktion des Stammes JWK1297 Δ *pspA* pABS-*ptat-tatA-strep*, pBAD-*pspA-H6*. Zunächst wurde im ersten Schritt TatA mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie und im 2. Schritt PspA mit Hilfe der Ni-IMAC angereichert. [A, C, E] α -TatA [B, D, F, H] α -PspA und [G] *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat; 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; ZT – Zelltrümmerpellet, M – Membranfraktion, L – lösliche Fraktion, DL – Durchlauf der Affinitätssäule, W – Letzte Waschfraktion, E1, . . . , E6 – Elutionsfraktionen 1 bis 6, M_s – vereinigte E2 bis E4 aus der Membranfraktion der *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie, L_s – vereinigte E2 bis E4 aus der löslichen Fraktion der *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie, BCCP – Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein.

zubinden. Daraufhin wurden die Eigenschaften des PspA-H6 genutzt, das im Gegensatz zu TatA-strep an die Ni-IMAC-Matrix binden kann. Es zeigte sich, dass beide Proteine miteinander von den Säulenmatrizes eluieren, was auf eine Interaktion auch der rekombinant produzierten Proteine schließen lässt (Abb. 3.14E, G). In jedem Fall ist jedoch zu bemerken, dass ein signifikanter Anteil an TatA auch im Durchlauf der Ni-IMAC detektiert wurde (Abb. 3.14 DL in E, G) was eventuell im Dissoziieren vom PspA begründet war.

3.1.7 TatA interagiert auch ohne Überproduktion mit PspA

Um untersuchen zu können, ob die TatA-PspA-Interaktion ein Überexpressionsartefakt ist (da bisher immer mit TatA-Konzentrationen oberhalb des WT-Niveaus gearbeitet wurde), wurde *tatA-strep* mit Hilfe der *single-copy*-Integration nach Haldimann und Wanner (2001) in die *λ-attachment-site* gesetzt und entsprechend dem Protokoll zur Anreicherung mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie behandelt. Dabei wurde neben der löslichen Fraktion und der unbehandelten Membranfraktion, die Hälfte der Membranen mit 1% DDM bzw. 2% C12E9 solubilisiert eingesetzt (die Anreicherung von TatA mit C12E9 ist im Anhang zu finden). Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte beobachtet werden, dass Detergenzien TatA- und PspA-Komplexe zerstören. Trotz der Zugabe von Detergenzien (DDM und C12E9) wurde allerdings kein Einfluss auf das Vermögen zur PspA-Interaktion festgestellt (Abb. 3.15B, D, F oder Abb. A.1). Also ist die TatA-PspA-Interaktion unabhängig von der Komplexbildung beider Proteine.

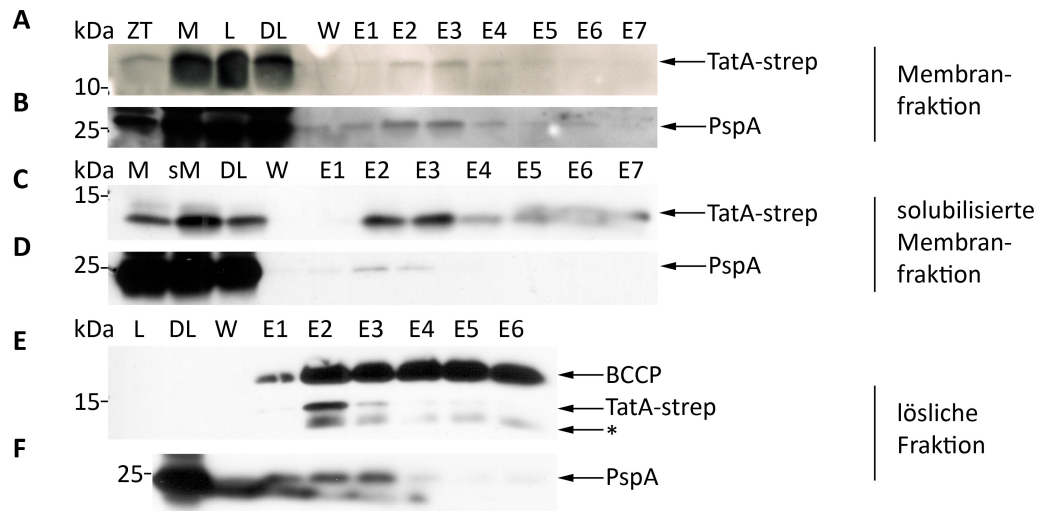


Abbildung 3.15: Anreicherung von TatA-strep aus der [A-B] Membranfraktion, [C-D] mit 1% DDM solubilisierter Membranfraktion sowie der [E-F] löslichen Fraktion des Stammes JARV16 attB::tatA-strep mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. [A, C] α -TatA, [B, D, F] α -PspA, [E] *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat; 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; ZT – Zelltrümmerpellet, M – Membranfraktion, L – lösliche Fraktion, sM – mit 1% DDM solubilierte Membranfraktion, DL – Durchlauf der Affinitätssäule, W – Letzte Waschfraktion, E1, ..., E7 – Elutionsfraktionen 1 bis 7, * – unspezifische Bindung der Antikörper, BCCP – Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein.

Auch ohne Überexpression wurde TatA-strep aus der löslichen Fraktion angereichert (Abb. 3.15E). Dieser Zustand spricht dafür, dass auch unter natürlichen Bedingungen ein geringer Anteil der TatA-Population neben der membranintegrierten Form als lösliches Protein vorliegt.

3.1.8 Populationsspezifische Sedimentation von TatA

Schon Standar *et al.* (2008) nutzten eine Saccharosegradientenzentrifugation, um PspA von Lipiden abzutrennen. Da auch TatA große homo-oligomere Komplexe bildet (Porcelli *et al.*, 2002) und aus der Membranfraktion gereinigt wurde, konnte mit dieser Methode getestet werden, ob sich TatA gemeinsam mit PspA in den gleichen Saccharosegradientenfraktionen befindet (was eine weitere Bestätigung der Interaktion wäre) und ob TatA mit Lipiden sedimentiert. Dazu wurden lineare 10% bis 50% (w/v) Saccharosegradienten mit Elutionsfraktionen von TatA-strep überschichtet und nach erfolgter Zentrifugation in einzelnen Fraktionen abgenommen (siehe hierfür 2.4.9). Wie die Auswertung der SDS-PAGE von Proben der Gradientenfraktionen ergab, sedimentierte TatA-strep aus der Membranfraktion in einem breiten Bereich (Spuren 3 bis 12 in Abb. 3.16A, C). Dabei befand sich das Sedimentationsmaximum um die Fraktion 7 in der Mitte des Gradienten (Spur 7 in Abb. 3.16A, C). Die detektierten Maxima können nur

einen ersten Hinweis auf das Sedimentationsverhalten geben, da minimale Unterschiede in den jeweiligen Saccharosegradienten auftreten können. Übereinstimmend mit Standard *et al.* (2008) wurde PspA hauptsächlich in der Mitte des Gradienten detektiert und sedimentierte in diesem Fall gemeinsam mit TatA-strep aus der Membranfraktion (Abb. 3.16B, D).

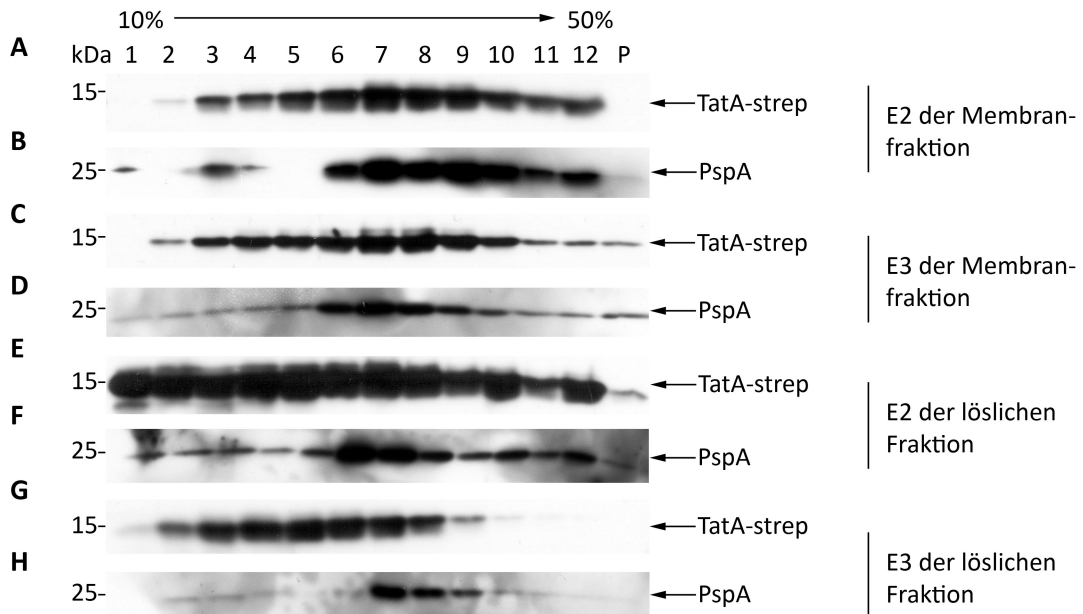


Abbildung 3.16: Auftrennung von TatA-strep aus der [A-D] Membranfraktion und der [E-H] löslichen Fraktion des Stammes MC4100 *ara^R pBW-tatA-strep* im Saccharosegradienten. TatA-strep wurde zunächst mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie angereichert (Elutionsfraktionen E2 und E3). [A, C, E, G] α -TatA, [B, D, F, H] α -PspA; 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; 10 %, 50 % – Sacchrosegehalt der Fraktion (w/v), 1, . . . , 12 – Gradientenfractionen 1 bis 12, P – Pellet des Gradienten.

Für das Sedimentationsverhalten von TatA-strep aus der löslichen Fraktion konnte eine Verschiebung nach links, also Richtung geringer Dichte, ermittelt werden (Spur 2 bis 10 in Abb. 3.16E, G). In der löslichen Fraktion stimmte das Elutionsprofil von PspA mit dem der Membranfraktion überein, da das Maximum in Fraktion 7 detektiert wurde (Abb. 3.16B, F). Es wurden jedoch keine Gemeinsamkeiten mit TatA-strep aus der löslichen Fraktion festgestellt (Abb. 3.16E-H). Man kann daher davon ausgehen, dass verschiedene TatA-Populationen in der Membran und im Cytoplasma existieren, die verschiedene Affinitäten zu PspA besitzen.

Mittels EFTEM wurde im Anschluss untersucht, ob die sich aus den Ergebnissen der Saccharosegradientenzentrifugation andeutende TatA-PspA-Interaktion elektronenmikroskopisch sichtbar ist und ob es einen Unterschied zwischen löslicher Fraktion und

Membranfraktion im Saccharosegradienten gibt. Dafür wurden Proben des Maximums

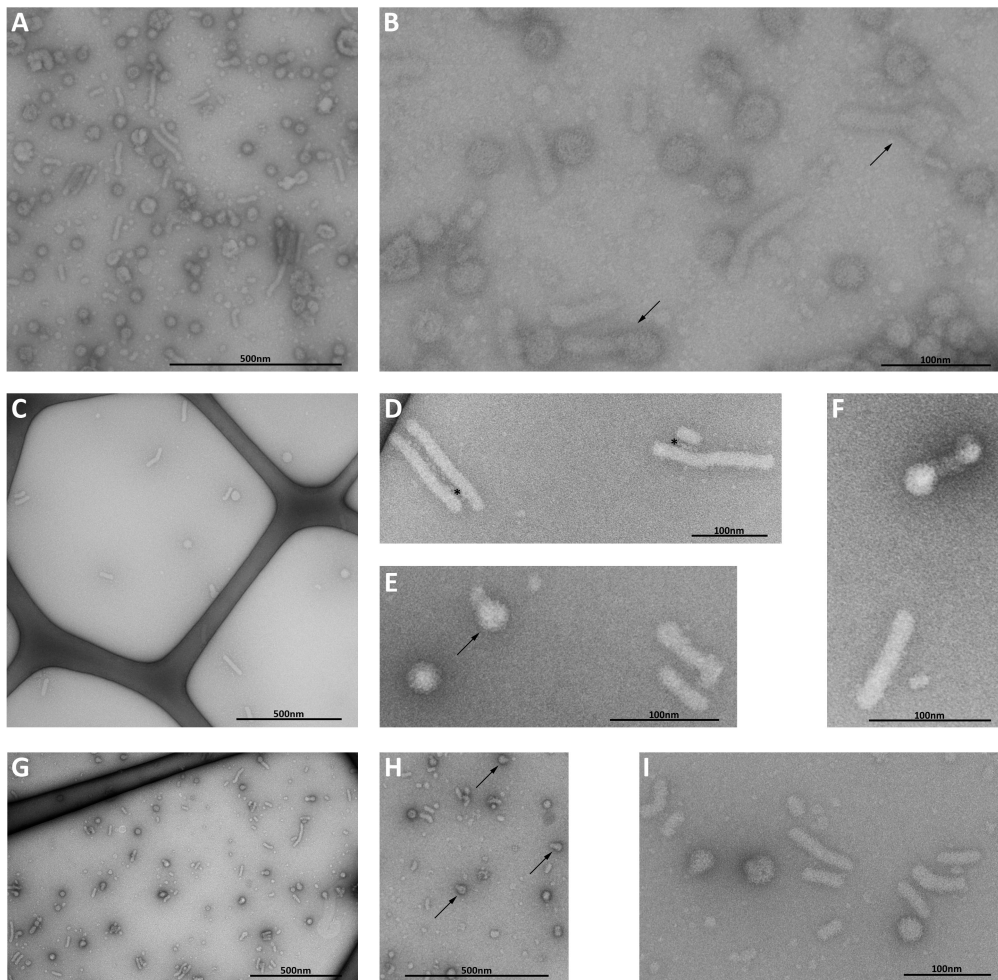


Abbildung 3.17: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von TatA-strep aus unterschiedlichen Saccharosegradientenfractionen. In jeder Reihe befinden sich links eine Übersichtsaufnahme und rechts vergrößerte Detailaufnahmen der selben Fraktion; [A, B] TatA aus der Elutionsfraktion 2 der Membranen vor dem Saccharosegradienten, [C-F] TatA aus der 7. Fraktion der Elutionsfraktion 3 der Membranen (Maximum); [G-H] TatA aus der 7. Fraktion der Elutionsfraktion 2 der löslichen Proteine (Maximum); EFTEM (*elastic bright field mode*), Kontrastierung mittels Uranylacetat; → zeigen auf eventuelle PspA-TatA-Komplexe und * – kleine elektronendichte Strukturen.

aus den Membranen (Fraktion 7 Abb. 3.16 C) und des Maximums aus der löslichen Fraktion (Fraktion 7 Abb. 3.16 E) herangezogen.

Um einen generellen Überblick über die zu erwartenden Komplexe zu erlangen, wurde zunächst eine Probe der Elutionsfraktion 2 aus den Membranen der *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie untersucht. Neben TatA-Röhren, die zuerst von Berthelmann *et al.* (2008) gezeigt werden konnten, wurden auch „kugelige“ Strukturen und TatA-Fragmente beobachtet (Abb. 3.17 A, B). PspA bildet Strukturen, die wie offene oder geschlossene „Kugeln“ aussehen (Standar *et al.*, 2008; Osadnik, 2009). Neben diesen bisher bekannten Formen wurden aber auch Verbindungen zwischen „Röhren“ und „Ku-

geln“ identifiziert, die als eine direkte Interaktion zwischen TatA und PspA gedeutet werden konnten (mit einem Pfeil gekennzeichnet in Abb. 3.17 B). In den Fraktionen des Saccharosegradienten wurde ähnliche Komplexe gefunden, die aufgrund des Gradienten aber stark verdünnt waren (Abb. 3.17 C, G). So konnten nur kürzere TatA-PspA-Strukturen und TatA-“Zwillinge“ beobachtet werden (Abb. 3.17 E, F, D). Zu bemerken ist, dass sich zwischen diesen TatA-Strukturen noch kleine elektronendichte Strukturen befanden (durch einen Stern in Abb. 3.17 D gekennzeichnet), die zuvor noch nicht beobachtet werden konnten. Zwischen Proteinen aus der Membran- und löslichen Fraktion konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, außer dass in den Proben der Membranfraktion ein größerer Anteil von TatA disassembliert in kleinen Fragmenten vorlag (Abb. 3.17 C, G, H). Dieser Umstand könnte aber auch an der etwas höheren Proteinkonzentration der löslichen Fraktion liegen.

3.2 PspA-Induktionsstudien

Das Zusammenspiel zwischen Aufrechterhalten des Membranpotentials und gleichzeitigem Transport von Substraten über die Cytoplasmamembran ist ein schmaler Grad. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass das Tat- mit dem Psp-System in Verbindung gebracht wurde, da das Tat-System durch den ΔpH -Gradient energetisiert wird und demzufolge Protonen verbraucht, während das Psp-System zur Aufrechterhaltung der PMF beiträgt. PspA wurde bei der starken Produktion des Phagenproteins pIV entdeckt (Brissette *et al.*, 1990). Das Secretin pIV bildet bei starker Überexpression eine Pore in der Membran, wodurch Membranstress entsteht und infolgedessen *pspA* induziert wird. Aus diesem Grund untersuchten Jones *et al.* (2003) verschiedene Sekretionssysteme (Sec, YidC, Tat) der Cytoplasmamembran, um einen generell gültigen Mechanismus der *pspA*-Induktion zu identifizieren. Deletionen in *tatA* und *tatC* führten allerdings nicht zur Induktion des fusionierten *pspA*-Promotors mit dem Reportergen *lacZ* im *E. coli*-Stamm MC4100. Diesen Ergebnissen widersprachen DeLisa *et al.* (2004), die ihrerseits eine Induktion von *pspA* infolge eines blockierten Tat-Systems konstatierten. In dieser Dissertation konnte neben der beschriebenen Interaktion von TatA mit PspA (siehe Abschnitt 3.1) auch eine TatA-abhängige Induktion von *pspA* festgestellt werden, die im Folgenden thematisiert wird.

3.2.1 TatA induziert *pspA*-Expression

Der Effekt der rekombinanten TatA-Produktion auf die Menge an detektiertem PspA ließ darauf schließen, dass die Expression von *tatA* einen direkten Einfluss auf das Stressprotein PspA haben könnte. Um dies zu überprüfen, wurden Zellen von 50-ml-Kulturen verschiedener Stämme in lösliche Proteine und Membranen fraktioniert und auf das Vorkommen von TatA und PspA untersucht (Abb. 3.18). Neben dem *tat*-Wildtyp-Stamm MC4100 *ara*^R und dem Stamm MC4100 *ara*^R pBW-*tatA-strep* wurde auch der Stamm JWK1297 Δ *pspA* analysiert, der eine *pspA*-Deletion im *E. coli*-Genom aufweist (Baba *et al.*, 2006). Außerdem wurde dessen parentaler Stamm BW25113 (Datsenko und Wanner, 2000) mit in das Experiment einbezogen.

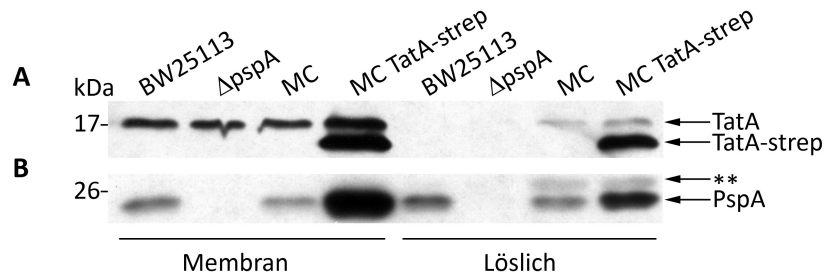


Abbildung 3.18: Vergleich der Induktion von *pspA* nach *tatA*-Expression in Membranfraktion sowie löslicher Fraktion der Stämme BW25113, JWK1297 Δ *pspA*, MC4100 *ara*^R und MC4100 *ara*^R pBW-*tatA-strep*. 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; [A] α -TatA, [B] α -PspA; Δ *pspA* – JWK1297 Δ *pspA*; MC – MC4100 *ara*^R, MC TatA-strep – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA-strep*, ** – unspezifische Bindung der Antikörper.

Die Überexpression von *tatA-strep* korrelierte mit einem starken Anstieg der PspA-Konzentration in Cytoplasma und in den Membranen (Abb. 3.18A, B). Verglichen mit der löslichen Fraktion war die Anreicherung von PspA in der Membranfraktion jedoch stärker und in der *pspA*-Deletionsmutante wurde, wie erwartet, kein PspA nachgewiesen (Abb. 3.18B). Zusätzlich zum rekombinant produzierten TatA-strep wurde auch verstärkt chromosomales TatA in allen Membranfraktionen und etwas weniger in den löslichen Fraktionen der MC-Derivate bei ca. 17 kDa detektiert (Abb. 3.18A).

Nachdem eine TatA-abhängige Induktion von *pspA* gezeigt werden konnte, wurde im Folgenden untersucht, ob die Stärke der *pspA*-Induktion von der Menge des gebildeten TatAs abhängig ist. In dem für die Studien verwendeten System unterliegt *tatA* einem Rhamnose-abhängigen Promotor P_{rhaBAD} , sodass unterschiedliche Rhamnosekonzentrationen gewählt werden konnten, um die *pspA*-Induktion zu verfolgen. Es wurde dabei ab einer Rhamnosekonzentration von 0,01 % eine (Abb. 3.19) Anreicherung von

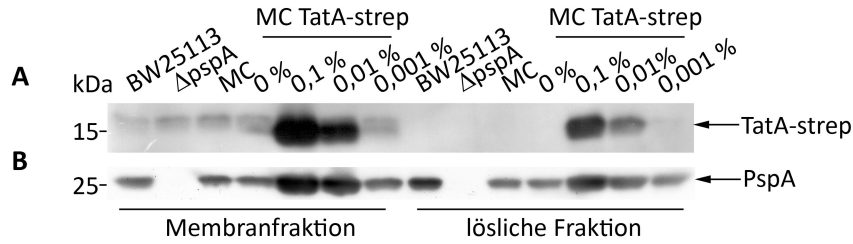


Abbildung 3.19: Vergleich der Induktion von *pspA* nach unterschiedlicher *tatA*-Expression in Membranfraktion sowie löslicher Fraktion der Stämme BW25113, JWK1297Δ*pspA*, MC4100 *ara*^R und MC4100 *ara*^R pBW-*tatA-strep*. 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3μl Marker-/10μl Probenvolumen; **[A]** α-TatA, **[B]** α-PspA; Die *tatA*-Expression wurde durch unterschiedliche L-Rhamnose-Konzentrationen (0 %; 0,001 %; 0,01 % und 0,1 %) induziert. Δ*pspA* – JWK1297 Δ*pspA*; MC – MC4100 *ara*^R, MC TatA-strep – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA-strep*,

PspA beobachtet, die direkt mit der verwendeten Rhamnosekonzentration und damit der TatA-Menge korrelierte (Abb. 3.19).

3.2.2 Der N-Terminus von TatA ist ausreichend für die *pspA*-Induktion.

Nachdem bekannt war, dass TatA einen direkten Einfluss auf die *pspA*-Induktion hat, wurde im Folgenden analysiert, ob ein bestimmter struktureller Bereich von TatA existiert, der diese Induktion vermittelt. Für die PspA-Interaktion mit TatA wurde dieser Bereich bereits auf den N-Terminus eingegrenzt (siehe dazu 3.1.4). Wie schon teilweise beschrieben (siehe Abschnitt 3.1.4), wurden Fusionsproteine mit dem murenen Bereich von HiPIP erstellt, indem HiPIP entweder N- oder C-terminal an Vollängen-TatA oder verschiedene TatA-Derivate fusioniert wurde (Abb. 3.20). Verbindungen mit dem N-Terminus von TatA haben dabei vermutlich zur Folge, dass dieser nicht mehr frei zugänglich und wahrscheinlich die Membraninsertion gestört ist.

Für die Analyse wurden jeweils 50 ml der verschiedenen Zellkulturen angezogen, aufgeschlossen und in Membranen und lösliche Proteine fraktioniert (Abb. 3.21). Zur besseren Übersicht wurde in der Abbildung 3.21 auf die vollständige Beschriftung der Spuren mit den jeweiligen TatA-Derivaten verzichtet und stattdessen die graphischen Repräsentationen aus Abb. 3.20 verwendet.

Chromosomales TatA wurde in allen Spuren, außer bei den *tat*-Deletionsstämmen DA-DE und JARV16, bei ca. 17 kDa detektiert (Abb. 3.21A, B). Entsprechend seiner Lokalisation in der Zelle wurde TatA wieder verstärkt in Membranen und mit geringem Prozentsatz in der löslichen Fraktion nachgewiesen. Wie bereits zuvor beobachtet,

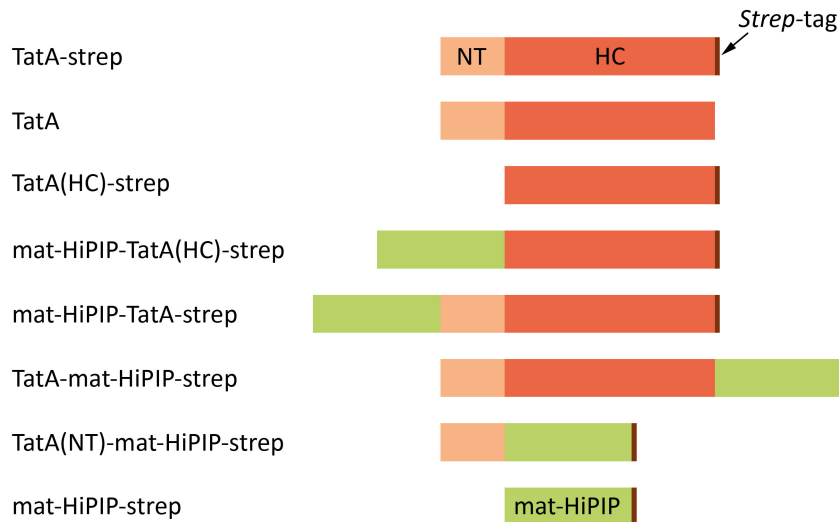


Abbildung 3.20: Übersicht über eine Sammlung von TatA-Derivaten zur *pspA*-Induktion. Dabei sind die verschiedenen Domänen unterschiedlich farbig dargestellt. **Pastell-orange** – NT-Domäne N-Terminus von TatA (AS 1-20), **rot** – HC-Domäne *hinge* bis zum C-Terminus von TatA (AS 21-89), **grün** – matures HiPIP und **braun** – das *Strep*-tag.

wurde TatA mit *Strep*-tag bei ca. 15 kDa anstelle von 17 kDa detektiert (Spur 4 in Abb. 3.21A). Wenn der N-Terminus von TatA fehlte, konnte keine Membraninsertion erfolgen und TatA(HC) bzw. mat-HiPIP-TatA(HC) wurden nur in der löslichen Fraktion nachgewiesen (Spuren 6 und 7 in Abb. 3.21C). Auffallend war allerdings, dass die C-terminale Fusion von HiPIP an TatA destabilisierend auf das Protein wirkte und Abbaubanden zwischen 25 kDa und 17 kDa (entspricht vermutlich der Größe von TatA) festgestellt wurden (Spur 10 in Abb. 3.21A, C). Nicht erwartet wurde die Detektion von TatA(NT)-mat-HiPIP bei ca. 15 kDa, was darauf hinwies, dass der gegen den C-Terminus von TatA gerichtete TatA-Antikörper eine schwache Kreuzreaktion mit HiPIP zeigt (Spuren 10 und 11 in Abb. 3.21A, C).

Die *tatA*-Überexpression korrelierte unabhängig vom *tag* mit einer starken Akkumulation von PspA im Cytoplasma und in den Membranen (Abb. 3.21B, D). Verglichen mit der löslichen Fraktion war die Anreicherung von PspA in der Membranfraktion jedoch erneut stärker und in der *pspA*-Deletionsmutante wurde, wie erwartet, kein PspA nachgewiesen (Spur 2 in Abb. 3.21B, D). Es fiel jedoch auf, dass nur dann *pspA* induziert wurde, wenn der N-Terminus von TatA frei zugänglich lag und nicht durch matures-HiPIP abgeschirmt wurde (Spuren 8, 9 und 10 in Abb. 3.21B, D). Wie schon bei der PspA-Interaktion gesehen (Abb. 3.8), reichte auch hier HiPIP nicht aus, um PspA anzureichern (Spur 11 in Abb. 3.21B, D). Übereinstimmend mit DeLisa *et al.* (2004) wurde *pspA* im *tat*-Deletionsstamm DADE geringfügig induziert (Vergleich Spu-

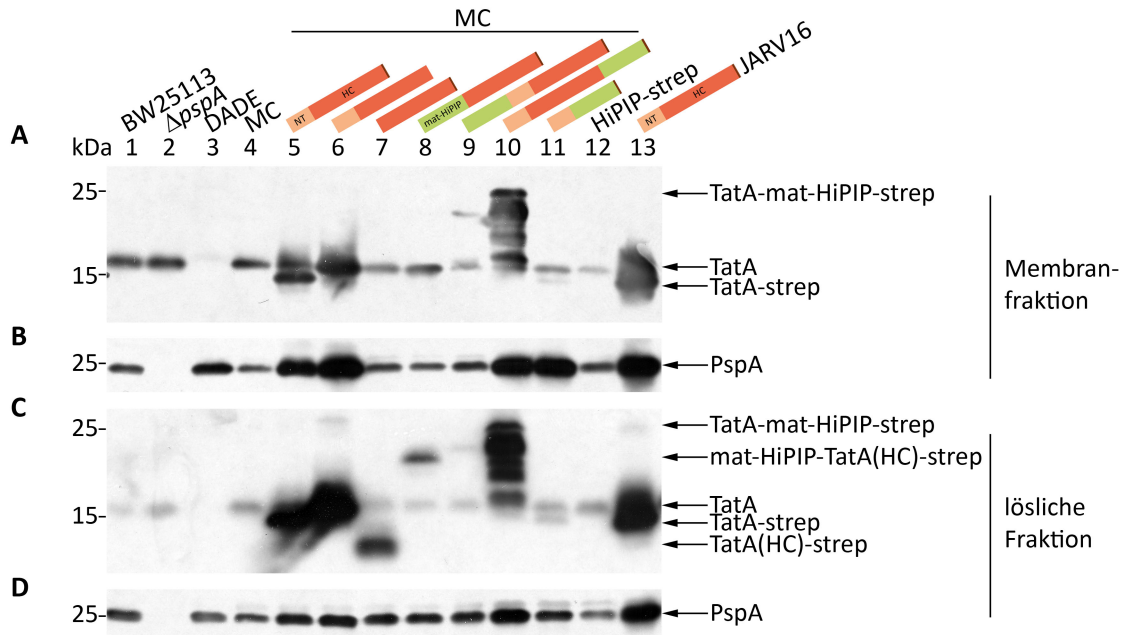


Abbildung 3.21: Vergleich der Induktion von *pspA* nach Synthese von TatA-Fusionen in Membranfraktion sowie löslicher Fraktion der Stämme BW25113, JWK1297 Δ *pspA*, MC4100, MC4100 *ara*^R und JARV16. 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; [A, C] α -TatA, [B, D] α -PspA; (1) – BW25113, (2) – JWK1297 Δ *pspA*, (3) – DADE, (4) – MC4100 *ara*^R, (5) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA-strep*, (6) – MC4100 pBW-*tatA*, (7) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA(HC)-strep*, (8) – MC4100 *ara*^R pBW-*mat-hip-tatA(HC)-strep*, (9) – MC4100 *ara*^R pBW-*mat-hip-tatA-strep*, (10) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA-mat-hip-strep*, (11) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA(NT)-mat-hip-strep*, (12) – MC4100 *ara*^R pBW-*hip-strep* und (13) – JARV16 pBW-*tatA-strep*; Der Übersicht halber sind verschiedene Domänen unterschiedlich farbig dargestellt. **Pastell-orange** – N-Terminus von TatA (AS 1-20), **rot** – HC-Domäne *hinge* bis zum C-Terminus von TatA (AS 21-89), **grün** – matures HiPIP und **braun** – das *Strep*-tag.

ren 3 und 4 in Abb. 3.21A), wobei sich die Verteilung des Proteins zwischen Membran und Cytoplasma deutlich zur Membran hin verschob. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von TatA allein ausreichend für eine *pspA*-Induktion war.

3.2.3 Die *pspA*-Induktion ist nicht von einer einzelnen Aminosäure im N-Terminus von TatA abhängig.

Wie schon für die PspA-Interaktion wurde im Anschluss geklärt, ob bestimmte Positionen im N-Terminus von TatA die *pspA*-Induktion hervorriefen. Dafür wurden die zuvor erwähnten TatA-mat-HiPIP-Fusionen verwendet (siehe Abb. 3.10), die alle noch mit PspA interagierten (siehe 3.1.5).

Die Detektion von TatA(NT)-mat-HiPIP bzw. TatA(NT-W7A)-mat-HiPIP gestaltete sich eher schwierig, da es in dieser geblotteten SDS-PAGE nicht durch die HiPIP-AK detektiert wurde (Spur 4 in Abb. 3.22A, C). Man konnte aber davon ausgehen, dass das Fusionsprotein synthetisiert wurde, da eine starke *pspA*-Induktion in den Mem-

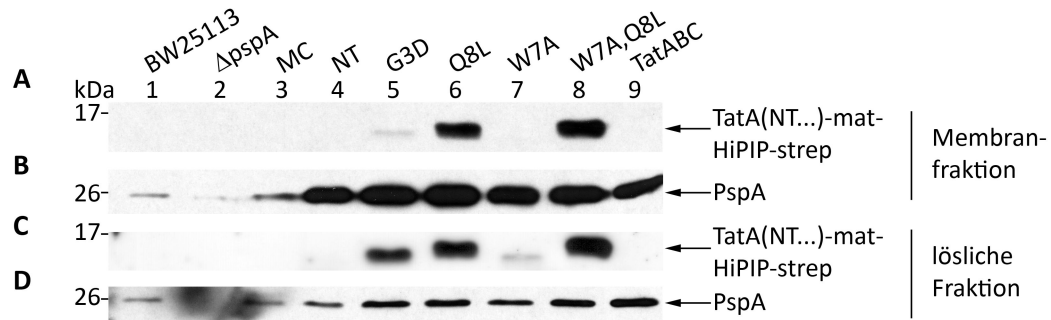


Abbildung 3.22: Vergleich der Induktion von *pspA* nach Synthese von TatA-Fusionen in Membranfraktion sowie löslicher Fraktion der Stämme BW25113, JWK1297 $\Delta pspA$ und MC4100 *ara^R*. 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; [A, C] α -HiPIP, [B, D] α -PspA; (1) – BW25113, (2) – JWK1297 $\Delta pspA$, (3) – MC4100 *ara^R*, (4) – MC4100 *ara^R* pBW-*tatA*(NT)-mat-*hip-strep*, (5) – MC4100 *ara^R* pBW-*tatA*(NT-G3D)-mat-*hip-strep*, (6) – MC4100 *ara^R* pBW-*tatA*(NT-Q8L)-mat-*hip-strep*, (7) – MC4100 *ara^R* pBW-*tatA*(NT-W7A)-mat-*hip-strep*, (8) – MC4100 *ara^R* pBW-*tatA*(NT-W7A,Q8L)-mat-*hip-strep* und (9) – MC4100 *ara^R* pBW-*tatABC*.

branen beobachtet wurde (Spur 4 in Abb. 3.22A, C). Gleichzeitig gab es keine großen Unterschiede im Induktionsvermögen der untersuchten TatA-Derivate mit Aminosäureaustausch, obwohl z.B. das G3D-Fusionsprotein verstärkt in der löslichen Fraktion akkumulierte und wahrscheinlich nicht mehr in die Membran insertierte (Spur 5 in Abb. 3.22A, C). In der affinitätschromatographischen Reinigung des Proteins wurde diese Verschiebung in der Lokalisation auch schon beobachtet (Abb. 3.11A-D). In der letzten Spur der SDS-PAGE konnte mit den HiPIP-AK kein Protein detektiert werden, da weder TatA, TatB noch TatC durch diese Antikörper erkannt werden. In diesem Zusammenhang konnte damit auch gezeigt werden, dass die *pspA*-Induktion nicht von der TatBC-Synthese abhängig war, da hier gleichermaßen PspA angereichert wurde (Spur 9 in Abb. 3.22).

3.2.4 Der Austausch größerer Bereiche im N-Terminus von TatA verhindert die *pspA*-Induktion

Da einzelne AS-Austausche nicht die *pspA*-Induktion beeinflussten und somit größere Bereiche des N-Terminus als für die PspA-Induktion relevant angesehen werden müssen, wurde der N-terminale Bereich TatAs in 4 größere Bereiche zu je 5 AS eingeteilt und diese Bereiche durch einen STGGG-*repeat* ersetzt. Zur Kontrolle wurde der gesamte N-Terminus durch 4 *repeats* ausgetauscht, sodass diese TatA-Variante nicht mehr mit der Membran interagieren konnte und in der löslichen Fraktion lokalisiert sein sollte. Alle verwendeten TatA-Derivate sind in Abb. 3.23 dargestellt und benannt.

Die zweitstärkste Veränderung des N-terminalen Bereichs (nach dem vollständigen Aus-

TatA-strep WT	1	MGGISIWQLLIIVVLLFG	21
TatA(neg.-Kon)-strep	1	MSTGGGSTGGGSTGGGSTGGG	21
TatA(a)strep	1	MGGISISTGGGSTGGGSTGGG	21
TatA(b)-strep	1	MSTGGGWQLLIISTGGGSTGGG	21
TatA(c)-strep	1	MSTGGGSTGGGSTGGGVLLFG	21
TatA(bc)-strep	1	MSTGGGWQLLIIVVLLFG	21

Abbildung 3.23: Vergleich der TatA-Derivate im Bezug auf die ersten 21 AS. Die TatA-Wildtyp-Sequenz von AS 1 bis 21 ist schwarz dargestellt und alle Veränderungen durch den STGGG-repeat sind rot hervorgehoben.

tausch gegen 4 *repeats*) wurde für TatA(a)-strep erreicht, in dem nur noch die die ersten 6 AS dem TatA-Wildtyp entsprachen und danach drei *repeats* folgten. Für TatA(c)-strep war die Reihenfolge ähnlich, nur dass in diesen Fall die drei *repeats* von 5 AS des WT-TatAs gefolgt wurden. TatA(b)-strep war in dem Sinne verändert, dass nur die AS 7-12 unverändert waren und der Rest mit STGGG ersetzt wurde. Die geringste Veränderung wurde für das TatA(bc)-Derivat vorgenommen, bei dem nur die ersten 6 AS durch STGGG ersetzt wurden und der Rest dem TatA-WT entsprach.

Für die Analyse wurden jeweils 50 ml der verschiedenen Zellkulturen angezogen, aufgeschlossen und in Membranen und lösliche Proteine fraktioniert (Abb. 3.24).

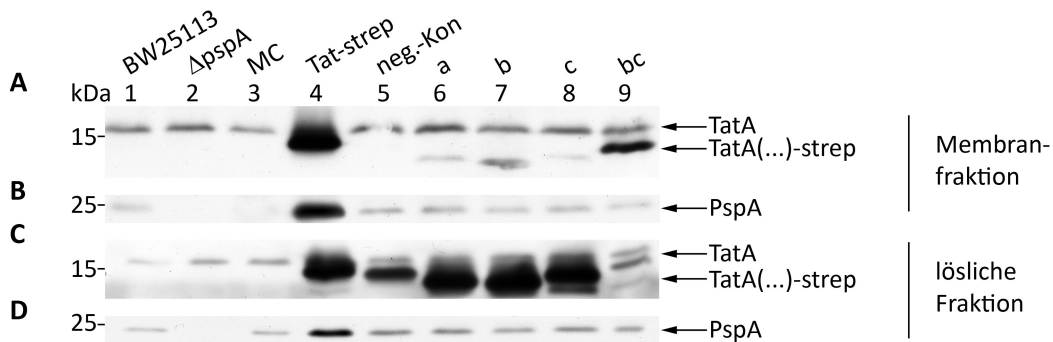


Abbildung 3.24: Vergleich der Induktion von *pspA* nach Synthese von TatA-Fusionen in Membranen sowie löslicher Fraktion der Stämme BW25113, JWK1297 Δ *pspA* und MC4100 *ara*^R. 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; [A, C] α -TatA, [B, D] α -PspA; (1) – BW25113, (2) – JWK1297 Δ *pspA*, (3) – MC4100 *ara*^R, (4) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*-strep, (5) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(neg.-Kon)-strep, (6) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(a)-strep, (7) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(b)strep, (8) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(c)-strep und (9) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(bc)-strep.

Entsprechend den Erwartungen wurde TatA(neg.-Kon)-strep aufgrund des veränderten N-Terminus nur in der löslichen Fraktion detektiert, da keine hydrophoben Aminosäuren für eine Membraninsertion mehr vorhanden waren (Spur 5 in Abb. 3.24A, C).

Gleichzeitig wurde *pspA* auch nicht induziert, da der N-Terminus in seiner ursprünglichen Form nicht existierte bzw. eine Membraninsertion die *pspA*-Induktion hervorruft (Spur 5 in Abb. 3.24B, D). TatA(a), TatA(b) und TatA(c) waren hauptsächlich lösliche Proteine und nur ein geringer Anteil wurde in der Membranfraktion nachgewiesen (Spuren 6 bis 8 in Abb. 3.24A, C). Wahrscheinlich konnte in allen drei Fällen keine Transmembranhelix aufgebaut werden, da der Abschnitt hydrophober Aminosäuren viel zu klein war. Dieser Fakt spiegelte sich auch im Wildtyp-Level an PspA wider (Abb. 3.24B, D). Obwohl im Gegensatz zu den anderen TatA-Derivaten TatA(bc) in signifikanter Menge in der Membranfraktion detektiert wurde, bewirkte diese Lokalisation keine Induktion von *pspA* (Spur 9 in Abb. 3.24). Eventuell reichen 13 Aminosäuren aus, um die Cytoplasmamembran zu durchspannen und eine Transmembranhelix auszubilden, jedoch nicht, um die Psp-Antwort auszulösen.

3.2.5 Die *pspA*-Induktion wird durch Isoleucin 6 in TatA beeinflusst.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die *pspA*-Expression durch TatA(bc)-strep nicht beeinflusst wird, obwohl nur die ersten 5 AS durch den STGGG-repeat ersetzt waren, wurden im Anschluss jeweils 1 bzw. bis zu 3 AS an TatA(bc)-strep oder TatA(b)-strep N-terminal angehängt, sodass nur 4 bzw. 2 AS noch verändert waren (Abb.3.25).

TatA-strep WT	1 MGGISIWQLLIIAVIVVLLFG 21
TatA(b)-strep	1 MSTGGGWQLLI STGGGSTGGG 21
TatA(b-l)strep	1 MSTGGIWQLLI STGGGSTGGG 21
TatA(b-SI)-strep	1 MSTGSIWQLLI STGGGSTGGG 21
TatA(b-ISI)-strep	1 MSTISIWQLLI STGGGSTGGG 21
TatA(bc)-strep	1 MSTGGGWQLLIIAVIVVLLFG 21
TatA(bc-l)-strep	1 MSTGGIWQLLIIAVIVVLLFG 21
TatA(bc-SI)-strep	1 MSTGSIWQLLIIAVIVVLLFG 21
TatA(bc-ISI)-strep	1 MSTISIWQLLIIAVIVVLLFG 21

Abbildung 3.25: Vergleich der TatA-Derivate im Bezug auf die ersten 21 AS. Die TatA-Wildtyp-Sequenz von AS 1 bis 21 ist schwarz dargestellt und alle Veränderungen durch den STGGG-repeat sind rot hervorgehoben.

Um die *pspA*-Expression zu untersuchen, wurden 50 ml der verschiedenen Zellkulturen angezogen, aufgeschlossen und in Membranen und lösliche Proteine fraktioniert (Abb. 3.26). Zu Kontroll- und Vergleichszwecken wurden erneut der *pspA*-Deletionstamm, der *tat*-Wildtypstamm MC4100 ara^R und überproduziertes TatA mit aufgetragen. Obwohl

der Transmembranhelix-Bereich der TatA(b)-Derivate um Isoleucin, Serin-Isoleucin bzw. Isoleucin-Serin-Isoleucin verlängert wurde, konnte keine erhöhte *pspA*-Expression detektiert werden (Spuren 6 bis 8 in Abb. 3.26B, D). Wahrscheinlich war die für einen Membrandurchgang erforderliche Länge noch nicht erreicht, da die TatA(b)-Derivate hauptsächlich als lösliche Proteine vorlagen (Spuren 6 bis 8 in Abb. 3.26A, C). Nur ein ganz geringer Anteil wurde in der Membranfraktion bei ca. 15 kDa detektiert. Diese Tatsache könnte eventuell im Überlaufen der Taschen beim Auftragen der Proben für die SDS-PAGE begründet sein.

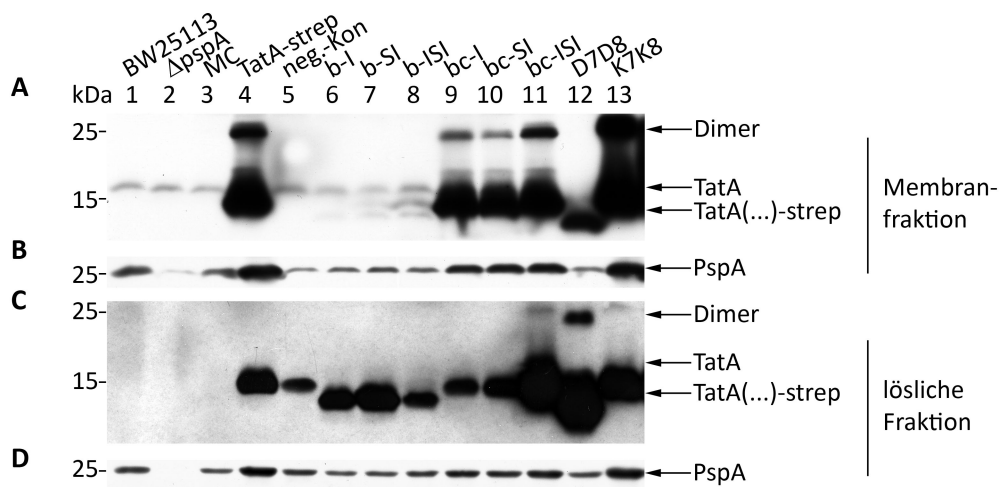


Abbildung 3.26: Vergleich der Induktion von *pspA* nach Synthese von TatA-Fusionen in Membranen sowie löslicher Fraktion der Stämme BW25113, JWK1297 Δ *pspA* und MC4100 *ara*^R. 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; [A, C] α -TatA, [B, D] α -PspA; (1) – BW25113, (2) – JWK1297 Δ *pspA*, (3) – MC4100 *ara*^R, (4) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA-strep*, (5) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(neg.-Kon)-*strep*, (6) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(b-I)-*strep*, (7) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(b-SI)-*strep*, (8) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(b-ISI)-*strep*, (9) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(bc-I)-*strep*, (10) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(bc-SI)-*strep*, (11) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(bc-ISI)-*strep*, (12) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(D7D8)-*strep* und (13) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(K7K8)-*strep*.

Bemerkenswerterweise hatte die Veränderung des TatA(bc)-Derivates um nur wenige Aminosäuren deutliche Auswirkungen auf die Induktion von *pspA*. Im Moment, in dem TatA(bc) um nur ein Isoleucin N-terminal verlängert wurde, konnte eine verstärkte PspA-Akkumulation in der Membranfraktion detektiert werden, die sich durch ein Verlängern um Serin-Isoleucin bzw. Isoleucin-Serin-Isoleucin nochmals verstärkte (Spuren 9 bis 11 in Abb. 3.26B, D). Gleichzeitig änderte sich auch die Lokalisation von TatA, sodass ein der *tatA*-Überexpression entsprechendes Verhältnis aufgebaut wurde (Spuren 9 bis 11 in Abb. 3.26A, C). So könnte die Position 6 (I6) eine entscheidende Rolle in der TatA-abhängigen *pspA*-Induktion spielen. Zugleich könnte die detektierte

pspA-Induktion auch nur auf die Membraninsertion von TatA zurückzuführen sein. Um diesen Punkt auszuschließen, wurden erneut spezifische AS-Austausche um I6 ausgeführt. Das Einbringen von positiven Ladungen sollte die Membraninsertion blockieren. Dieser erhoffte Effekt konnte jedoch nicht bestätigt werden, da TatA(K7K8) im gleichen Verhältnis wie TatA-strep in der Membranfraktion, aber auch in der löslichen Fraktion angereichert wurde (Spuren 13 und 14 in Abb. 3.26A, C). Ob diese Lokalisation jedoch transmembran war oder ob sich TatA nur an die negativ geladenen Phospholipide der Cytoplasmamembran anlagerte, kann daraus nicht abgeleitet werden. Das genaue Gegenteil wurde durch negative Ladungen in der Helix erreicht. Wie schon für TatA(G3D) wurde die Lokalisation durch Aspartat in der Art beeinflusst, dass TatA(D7D8) hauptsächlich als lösliches Protein detektiert wurde. Allerdings wurde es auch zu ca. 20% in den Membranen nachgewiesen und unterband eine verstärkte *pspA*-Expression (Spur 12 in Abb. 3.26).

Da eine N-terminale Verlängerung von TatA(bc)-strep um Isoleucin 6 die *pspA*-Induktion wieder hervorrief, könnte eventuell diese einzelne Aminosäure der bisher unbekannte *Trigger* für die TatA-abhängige *pspA*-Induktion sein. So wurde Isoleucin sowohl durch eine negative Ladung (Aspartat), als auch eine positive Ladung (Lysin), eine kleinere hydrophobe AS (Alanin), eine hydrophile AS (Serin) und sogar durch einen aromatischen Rest (Phenylalanin) ersetzt. Ferner wurde anstelle der Aminosäuren I6, W7 und Q8 bzw. W7, Q8 und L9 ein Dreifach-Lysin gesetzt, weil ein Zweifach-Austausch (K7K8) noch keinen offensichtlichen Einfluss auf die Lokalisation von TatA und die Induktion von *pspA* besaß (Spur 13 in Abb. 3.26). Zu beobachten war, dass PspA durch die *Triple*-Lysine stark erhöht nachgewiesen konnte, und auch die Insertion von positiven Ladungen veränderte nichts an der Proteindetektion bei ca. 15 kDa in der Membranfraktion, die den Triple-Lysinen entsprach (Spuren 13 und 14 in Abb. 3.27 A, B).

Der Übersicht halber wurden erneut Proben der Membran- und löslichen Fraktionen von TatA(bc) und TatA(bc-I) mit für die SDS-PAGE verwendet, weil in vorherigen Abbildungen beide Proteine nicht direkt miteinander verglichen werden konnten (siehe Abb. 3.24 und Abb. 3.26). Anhand der Proteinbande bei ca. 15 kDa wird zweifellos deutlich, dass I6 zur Induktion von *pspA* beiträgt (Spuren 6 und 7 in Abb. 3.27). Wurde sich im folgenden Schritt jedoch nur auf die Position 6 bezogen, fiel auf, dass das Isole-

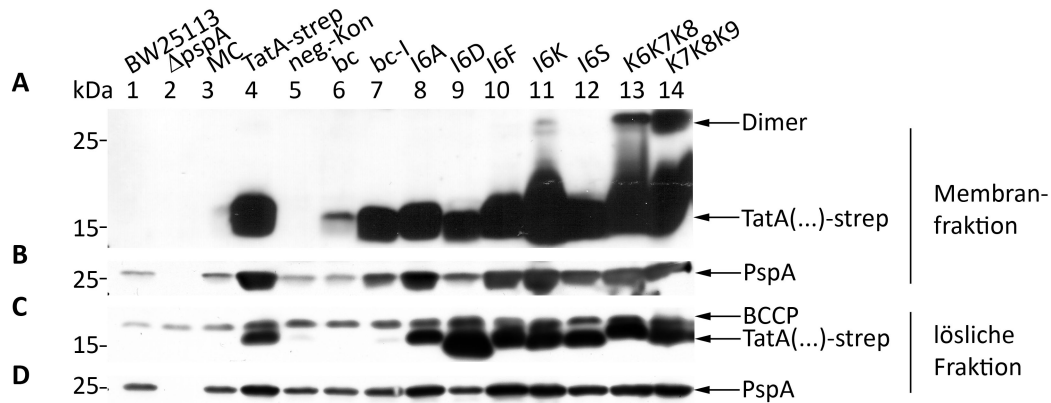


Abbildung 3.27: Vergleich der Induktion von *pspA* nach Synthese von TatA-Fusionen in Membranen sowie löslicher Fraktion der Stämme BW25113, JWK1297 Δ *pspA* und MC4100 *ara*^R. 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; [A] α -TatA, [B, D] α -PspA, [C] *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat; (1) – BW25113, (2) – JWK1297 Δ *pspA*, (3) – MC4100 *ara*^R, (4) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA-strep*, (5) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(neg.-Kon)-*strep*, (6) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(bc)-*strep*, (7) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(bc-I)-*strep*, (8) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(I6A)-*strep*, (9) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(I6D)-*strep*, (10) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(I6F)-*strep*, (11) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(I6K)-*strep*, (12) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(I6S)-*strep*, (13) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(K6K7K8)-*strep* und (14) – MC4100 *ara*^R pBW-*tatA*(K7K8K9)-*strep*; BCCP – Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein.

ucin wahrscheinlich nicht allein für verstärkte *pspA*-Expression verantwortlich war. So wurde die *pspA*-Induktion in den Membranen weder durch eine positive Ladung (I6K) noch durch einen hydrophilen Rest (I6S), einen aromatischen Rest (I6F) oder durch eine kleinere, hydrophobere AS (I6A) auf Wildtyp-Niveau abgesenkt (Spuren 8, 10–12 in Abb. 3.27B). Die einzige Ausnahme bildete TatA(I6D), das entsprechend früherer Beobachtungen hauptsächlich in der löslichen Fraktion detektiert wurde (siehe Abb. 3.13 und Spur 7 in Abb. 3.27A, C). Dass der Anteil an nachgewiesenem TatA(I6D) in der Membranfraktion ca. 40% statt 10% betrug, lässt sich durch die verwendeten Antikörper (α -TatA und *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat) erklären, die unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den jeweiligen Proteinen besitzen. Daher kann man das Verhältnis zwischen löslichen Proteinen und Membranproteinen nicht direkt miteinander vergleichen.

Anhand der vielen verschiedenen Austausche von einzelnen Resten bzw. größeren Bereichen in TatA wird deutlich, dass nicht ein einzelner Rest für die *pspA*-Induktion verantwortlich ist.

3.2.6 Die *pspA*-Induktion benötigt wahrscheinlich Psp-Komponenten

Alle bisherigen Untersuchungen im Bezug auf PspA beschränkten sich auf nur eine Komponente des Psp-Regulons. Es stellte sich die Frage, ob die TatA-abhängige *pspA*-

Induktion eventuell durch andere Psp-Komponenten vermittelt würde. Experimente in Bezug auf die Frage sind insofern einfach, als dass durch Baba *et al.* (2006) hergestellte *psp*-Deletionsstämme existieren, die zur Keio-Kollektion gehören und in jeweils einem Gen des Regulons deletiert sind. Um den Einfluss TatAs auf die PspA-Konzentration in den verschiedenen Deletionsstämmen einschätzen zu können, wurde jeweils ein Ansatz ohne und einer mit *tatA*-Expression untersucht.

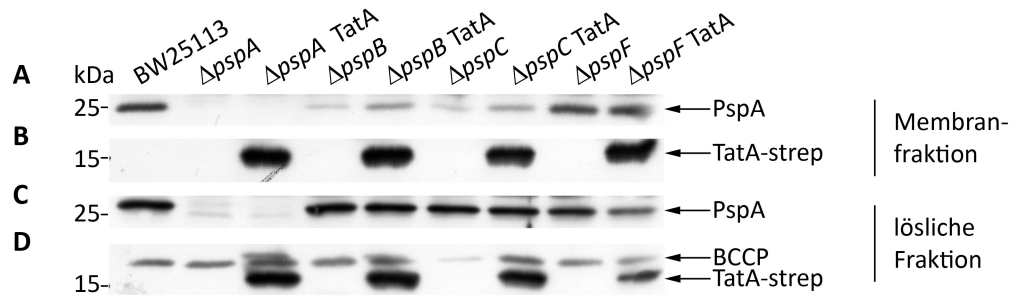


Abbildung 3.28: Vergleich der Induktion von *pspA* mit und ohne *tatA*-Expression in Membranen sowie löslicher Fraktion der Stämme BW25113, JWK1297 $\Delta pspA$, JWK1298 $\Delta pspB$, JWK1299 $\Delta pspC$ und JWK1299 $\Delta pspF$. 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; [A, C] α -PspA, [B, D] *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat; (BW25113) – BW25113, ($\Delta pspA$) – JWK1297 $\Delta pspA$, ($\Delta pspA$ TatA) – JWK1297 $\Delta pspA$ pBW-*tatA-strep*, ($\Delta pspB$) – JWK1298 $\Delta pspB$, ($\Delta pspB$ TatA) – JWK1298 $\Delta pspB$ pBW-*tatA-strep*, ($\Delta pspC$) – JWK1299 $\Delta pspC$, ($\Delta pspC$ TatA) – JWK1299 $\Delta pspC$ pBW-*tatA-strep*, ($\Delta pspF$) – JWK1296 $\Delta pspF$ und ($\Delta pspF$ TatA) – JWK1296 $\Delta pspF$ pBW-*tatA-strep*, BCCP – Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein.

Der *E. coli*-Parentalstamm BW25113 gab den Grundlevel an PspA vor und wie zu erwarten war, wurde im *pspA*-Deletionsstamm kein Protein bei ca. 25 kDa detektiert (Abb. 3.28). Ein verlässlicher Cytoplasmamarker ist das Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein, BCCP, das spezifisch durch das *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat erkannt wird. In der SDS-PAGE konnte es bei ca. 20 kDa mit ungefähr gleicher Bandenintensität festgestellt werden, die für eine gleichmäßige Fraktionierung in Membranen und lösliche Proteine sprach (Abb. 3.28D). Genauso wurde TatA überall mit gleicher Intensität detektiert, wo *tatA* auch vom Plasmid transkribiert wurde (Abb. 3.28B, D). Wenn die membranintegrateden Proteine PspB bzw. PspC nicht synthetisiert wurden, konnte automatisch auch weniger PspA in der Membran nachgewiesen werden, da PspA nun nicht mehr von PspF abgelöst wurde (Spuren 4 und 6 in Abb. 3.28A, C). Falls jetzt in diesen Stämmen TatA produziert wurde, erhöhte sich auch geringfügig die Bandenintensität von PspA in der Membran (Spuren 5 und 7 in Abb. 3.28A, C). Lösliches PspA wurde durch die Abwesenheit von PspB bzw. PspC nicht beeinflusst. Detektierte Proteine im *pspF*-Deletionsstamm spiegelten die Hintergrund-Expression von *pspA* wider, die σ^{54} -unabhängig auf einem sehr schwachen Niveau abläuft. Ein TatA-abhängiges Ansteigen

der PspA-Konzentration im *E. coli*-Stamm ohne PspF wurde nicht beobachtet (Spur 9 in Abb. 3.28A).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die *tatA*-Expression einen direkten Einfluss auf die *pspA*-Induktion besitzt. Dabei spielt erneut der N-Terminus von TatA eine entscheidende Rolle.

3.3 Interaktionsstudien von TatA mit Hilfe von bakteriellen 2-Hybrid-Systemen

TatA bildet große homo-oligomere Komplexe (Oates *et al.*, 2005), die nach Substratbindung an den TatBC-Komplex rekrutiert werden (Mori und Cline, 2001; Alami *et al.*, 2003). Bis heute wurden verschiedenste Methoden angewendet, um diese Wechselwirkungen zwischen den Tat-Komponenten oder den Tat-Komponenten mit Substraten nachzuweisen. Exemplarisch sind hier einige Methoden aufgeführt: chemische und photoaktivierbare Crosslinker (Alami *et al.*, 2003; Dabney-Smith und Cline, 2009; Maurer *et al.*, 2010; Panahandeh und Müller, 2010), Cysteine-Scanning-Mutagenese (Lee *et al.*, 2006b; Punginelli *et al.*, 2007; Greene *et al.*, 2007), Co-Immunopräzipitation (Bolhuis *et al.*, 2000; Pop *et al.*, 2003; McDevitt *et al.*, 2006) und FRET (*fluorescence resonance energy transfer*, Li und Turner 2009). Eine elegante Methode sind auch 2-Hybrid-(2H)-Systeme, die zunächst nur für Hefen (Chien *et al.*, 1991) und später auch für Bakterien entwickelt wurden. Alle 2H-Systeme basieren auf Fusionsproteinen, die wiederum spezifische Reportergene im Organismus an- bzw. abschalten. Dubini und Sargent konnten erstmals 2003 mit Hilfe eines 2H-Systems die Interaktion zwischen den Chaperonen HyaE und HybE und dem *precursor* der [NiFe]-Hydrogenasen nachweisen.

Für die Interaktionsstudien dieser Arbeit standen das Adenylatzyklase-basierte (BACTH; Karimova *et al.*, 1998) und das LexA-basierte 2-Hybrid-System (Dmitrova *et al.*, 1998) zur Verfügung. Mit beiden Systemen sollten mögliche Interaktionen von TatA mit PspA, den restlichen für den Transport wichtigen Tat-Komponenten (TatB, TatC und TatE) und mit sich selbst untersucht und die Ergebnisse beider Systeme miteinander verglichen werden.

3.3.1 Strategie des BACTH-Systems

Das *Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid-System* Kit (BACTH, Euromedex, Souffelweyersheim, Frankreich) beruht auf einer interaktionsvermittelten Rekonstitution der Adenylatzyklaseaktivität in *E. coli* (Karimova *et al.*, 1998).

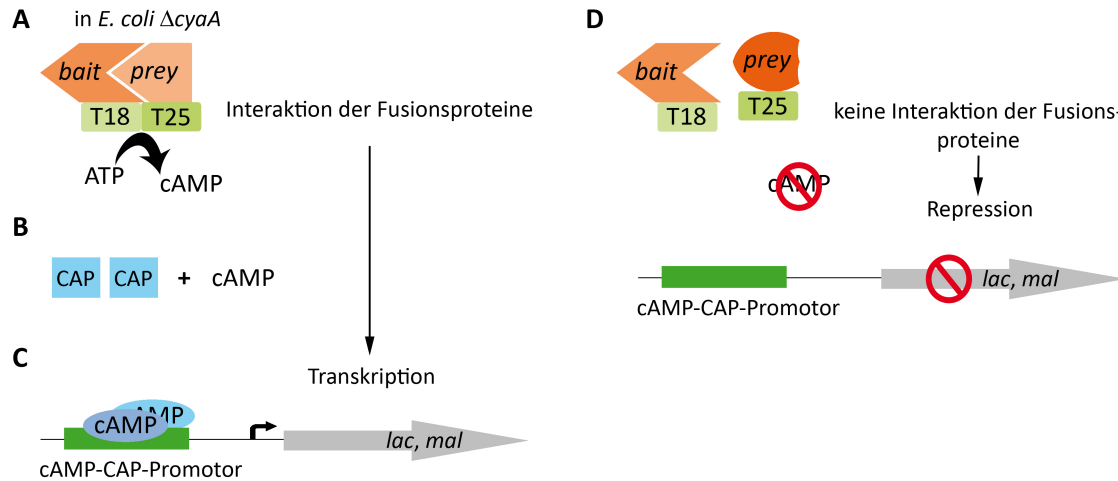


Abbildung 3.29: Darstellung der Funktionsweise des Adenylatzyklase-basierten 2H-Systems nach Euromedex. [A] Durch *prey-bait*-Interaktion wird eine funktionsfähige Adenylatzyklase gebildet, die ATP zu cAMP umsetzt. [B] cAMP bindet an das Katabolit-Aktivator-Protein (CAP) und [C] nach Bindung an cAMP-CAP-Promotorbereiche aktiviert dieser cAMP/CAP-Komplex die Transkription verschiedener Operone (z. B. Maltose und Laktose). [D] Falls keine Interaktion der untersuchten Proteine stattfindet, wird die Adenylatzyklase nicht rekonstituiert und die Reportergene werden reprimiert.

Die katalytische Domäne der Adenylatzyklase aus *Bordetella pertussis* besteht aus zwei komplementären Untereinheiten (Ladant und Ullmann, 1999), T18 und T25, die separat voneinander keine Aktivität aufweisen (Abb. 3.29D). Falls die Proteine von Interesse miteinander interagieren, können T18 und T25 die funktionsfähige Adenylatzyklase rekonstituieren und ATP wird zu cAMP umgesetzt (Abb. 3.29A). Dabei sind die T18- bzw. T25-Fragmente Translationsfusionen mit dem zu untersuchenden Protein. Zyklisches AMP kann daraufhin vom Katabolit-Aktivator-Protein gebunden werden (Abb. 3.29B) und den cAMP/CAP-Komplex bilden, der danach als Transkriptionregulator in *E. coli* agiert (Abb. 3.29C). Diese induzierten Gene befähigen den Organismus somit bestimmte Energiequellen, wie Maltose und Laktose, als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Im *lac*-Operon ist das erste Strukturgen, *lacZ*, codiert, sodass die Reporter-gen-Aktivität durch die Menge an gemessener β -Galaktosidase in ganzen Zellen quantifiziert werden kann (Miller, 1992).

Zur Synthese der Hybridproteine stehen nach Anleitung des BACTH-Kits 4 verschiedene Plasmide zur Verfügung, die sich nur durch ihre Kopienzahl und durch C- bzw. N-terminale Fusionen der T18- bzw. T25-Fragmente der Adenylatzyklase an das Interessenprotein unterscheiden (Karimova *et al.*, 2001, 2005). Um den Überblick über die hier beschriebenen Plasmide nicht zu verlieren und spätere Beschreibungen der jeweiligen Konstrukte zu vereinfachen, sind in Abb. 3.30 die wichtigsten Eigenschaften zusammengefasst aufgeführt.

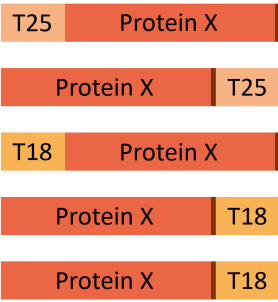




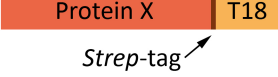
A	Bezeichnung	Kopienzahl	Position T18/ T25		zukünftige Beschriftung
	pKT25	<i>mid-copy</i>	N-Terminus		T25-
	pKNT25	<i>mid-copy</i>	C-Terminus		-T25
	pUT18C	<i>high-copy</i>	N-Terminus		T18-
	pUT18	<i>high-copy</i>	C-Terminus		-T18
	pUL- <i>ptat</i> -T18	<i>low-copy</i>	C-Terminus		low-T18
B	klonierungsbedingte Verlängerung des N-Terminus von TatA				7AS-TatA-T18/T25
	klonierungsbedingte Verlängerung des N-Terminus von PspA				18AS-PspA-T18/T25

Abbildung 3.30: Übersicht zu den verwendeten Plasmiden und deren wichtigsten Eigenschaften. **[A]** Zusammenfassung der für das BACTH-System verwendeten Plasmide und deren zukünftigen Abkürzungen, **[B]** Bezeichnung der TatA- bzw. PspA-Derivate, die durch die klonierungsbedingte MCS in den Vektoren pUT18 und pKNT25 keinen freien N-Terminus besitzen.

Das T25-Adenylatzyklase-Fragment wird durch die Plasmide pKT25 und pKNT25 codiert, die beide *mid-copy*-Plasmide mit 15-20 Kopien pro Zelle sind. Beide Plasmide besitzen einen Kanamycin-Resistenzmarker und unterscheiden sich nur hinsichtlich ihrer Anordnung der MCS und der daraus resultierenden Fusionen der T25-Fragmente mit den Testproteinen. Im pKT25-Plasmid werden Proteine von Interesse C-terminal und im pKNT25-Plasmid N-terminal an das T25-Fragment fusioniert, sodass im Falle des pKT25-Plasmids der N-Terminus des fusionierten Proteins durch T25 abgeschirmt ist. Bei Verwendung der *high-copy*-Plasmide konnten entsprechend der Position der MCS wieder N-terminale, pUT18, bzw. C-terminale Fusionen, pUT18C, mit den Proteinen von Interesse erzeugt werden. Beide Plasmide codieren für ein Resistenzgen gegen Ampicillin, besitzen einen *ColE1-origin* und sind mit bis zu 50 Kopien pro Zelle vertreten. Die Erstellung der einzelnen Plasmide ist im Material-und-Methoden-Teil ausführlicher erläutert (2.2.17).

Alle mit dem BACTH analysierten Proteine wiesen einen C-terminalen *Strep*-tag auf, jedoch wurde während der Untersuchungen mit Hilfe des BACTH-Systems vermutet, dass das *tag* PspA eventuell destabilisierte. Deshalb wurde das *Strep*-tag durch einen Dreifach-(GGG)-*linker* ersetzt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die TatA-PspA-Interaktion wahrscheinlich vom TatA-N-Terminus abhängig ist. Jedoch befanden sich bedingt durch die MCS der Plasmide pUT18 und pKNT25 im Falle des TatAs 7 Aminosäuren vor dem eigentlichen Translationsstart und sogar 18 AS vor dem Translationsstart des PspAs. Da man bei beiden Proteinen jetzt nicht mehr von einem freien N-Terminus sprechen konnte, wurden die Plasmide soweit verändert, dass diese zusätzlichen 7 bzw. 18 AS durch eine PCR entfernt und gleichzeitig eine NdeI-Schnittstelle eingebracht wurde. Ein Vorteil dieser Veränderung der Plasmide war, dass jetzt im Anschluss alle anderen Tat-Komponenten, die zumeist auf pBW-Plasmiden codiert sind, sehr einfach mit einem NdeI/BamHI Restriktionsverdau in die BACTH-Plasmide umkloniert werden konnten. Zusätzlich zu den N-terminalen Hybridproteinen wurden auch C-terminale Fusionen hergestellt, die klonierungsbedingt einen eventuellen zweiten Translationsstart aufweisen könnten.

Die drei für *E. coli* essentiellen Tat-Komponenten werden gemeinsam mit einem weiteren Gen, *tatD*, im *tatABCD*-Operon codiert. Sie unterliegen der Kontrolle des *tatA*-Promotors und das Verhältnis von *tatA* zu *tatB* zu *tatC* in *E. coli* wird meist mit 50:2:1 angegeben (Jack *et al.*, 2001). Auf Proteinebene wurde durch quantitative Western-Blots auf einen etwa 19-fachen Überschuss von TatA gegenüber TatB geschlossen (Sargent *et al.*, 2001). Durch die Verwendung von IPTG-induzierbaren Systemen könnte das für eine Bindung zwischen zwei Tat-Komponenten benötigte Verhältnis gestört werden, sodass keine oder nur eine geringe β -Galaktosidase-Aktivität messbar wäre. Deshalb wurde neben den hier erläuterten Plasmiden ein selbst konstruierter *low-copy*-Vektor, pUL-*ptat*-T18, hergestellt. Auf dem Plasmid wird ein Resistenzgen gegen Chloramphenicol, ein pSC101-*origin* und ein C-terminales T18-Fragment der Adenylatzyklase codiert. Der Vorteil des pUL-Systems ist, dass nur 3 Kopien pro Zelle vorhanden sind und dass alle Gene unter Kontrolle des *tatA*-Promotors stehen.

Neben dem Volllängen-TatA wurden auch verschiedene TatA-Derivate untersucht. Zum besseren Verständnis der Abkürzungen der TatA-Derivate werden diese hier erneut näher beschrieben. TatA(NT) steht für die ersten 21 Aminosäuren des TatA, die der Transmembranhelix entsprechen (Sargent *et al.*, 1998a). TatA(HC) beinhaltet die am-

phipathische Helix und den hydrophilen C-Terminus (Aminosäuren 21 bis 89, **HC - hänge** bis **C-Terminus**) und liegt als lösliches Protein vor (Porcelli *et al.*, 2002). Hinter TatA(**CT**) verbirgt sich der unstrukturierte **C-Terminus** von TatA (Aminosäuren 41 bis 89).

Für das BACTH-System wurden jeweils ein T18- und ein T25-Hybridprotein codierendes Plasmid in den Adenylatzyklase-defizienten *E. coli*-Stamm DHM1 cotransformiert. Falls sich Kolonien nach Inkubation bei 30 °C auf den Selektivmedien (McConkey-Agar bzw. X-Gal/LB-Agar) blau oder grünlich färbten, konnte direkt auf eine vorhandene Interaktion der Testproteine geschlossen werden. Bei Ausbleiben einer Interaktion wurden Kolonien weiß bis hellblau-schimmernd gefärbt. Bei längerer Inkubation im Kühlschrank verstärkte sich diese Bläufärbung. Die Färbung der Kolonien beruht auf der enzymatischen Spaltung von X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid) zu 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol durch das induzierte Reporterprotein LacZ. Im nächsten Schritt wird 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol aufgrund der Oxidation durch den Luftsauerstoff nach Dimerisierung zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo umgesetzt, welcher in Kombination mit dem gelblich gefärbten LB-Agar die Kolonien grünlich erscheinen lässt.

Zum Einordnen der ermittelten β -Galaktosidaseaktivität wurden jeweils zwei kompatible Leervektoren (Negativkontrolle) bzw. die Vektoren pUT18C-zip und pKT25-zip (Positivkontrolle), die interagierende Bereiche des eukarotischen GCN4 Leucin-Zippers aufweisen, mitgeführt (Karimova *et al.*, 1998). Dabei entspricht die gemessene β -Galaktosidaseaktivität der Intensität der Interaktion zweier Proteine. Für einen besseren Überblick über alle möglichen Interaktions-Kombinationen wurden die Ergebnisse der Funktionalitätsstudien und der β -Galaktosidaseaktivitäten in einer Tabelle am Ende des Abschnittes zusammengefasst (siehe Tabelle18).

3.3.2 Funktionalität der BACTH-Fusionen

Zunächst wurden die Hybridproteine auf ihre Fähigkeit der Komplementation des Tat-Systems getestet. Dafür wurden die verschiedenen Plasmide in die entsprechenden *E. coli-tat*-Deletionsstämme transformiert und auf den Transport der Tat-Substrate TorA und AmiA bzw. AmiC untersucht. Für den TorA-Assay wurden Zellkulturen über Nacht in M9-Minimalmedium inkubiert und danach in TMAO-Medium überführt (sie-

he 2.3.1 und 2.5.3). Nach einem entsprechenden Zeitintervall wurde die Optische Dichte bei 600 nm gemessen. Eine Zunahme der OD_{600} , die mit dem Zellwachstum korreliert, entspricht der Fähigkeit anaeroben Stoffwechsel zu betreiben und das Tat-Substrat TorA ins Periplasma zu transportieren. Zusätzlich zum TorA-Transport wurden auch die Amidasen untersucht. Dafür wurden Zellkulturen über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag die Zellteilung mit Hilfe der Lichtmikroskopie analysiert. AmiA und AmiC sind beides Tat-Substrate, die für die Zellteilung bedeutend sind (Ize *et al.*, 2003; Bernhardt und De Boer, 2003). Falls das Tat-System nicht durch plasmidcodierte Tat-Komponenten komplementiert wird, bleiben die Zellen nach der Zellteilung aneinander haften, wodurch sie im Lichtmikroskop als Kette sichtbar werden. Der Einfachheit halber wurden die Ergebnisse in Tabellen zusammengefasst (Abb. 3.31C, 3.32C, 3.33C und 3.34C).

Auf die Überprüfung der TatA-Derivate TatA(HC), TatA(CT) und TatA(NT) wurde verzichtet, da bekannt ist, dass TatA ohne Transmembranhelix nicht mehr funktionell ist bzw. dass das Entfernen von bis zu 20 Aminosäuren am C-Terminus von TatA keinen Effekt auf das TMAO-Wachstum hat (Lee *et al.*, 2002; De Leeuw *et al.*, 2001). In allen Fällen wurde während der Versuche zu Kontrollzwecken der *tat*-WT-Stamm MC4100 *ara*^R und die verschiedenen *tat*-Deletionsstämme JARV16, BØD und B1LKO mitgeführt.

Zunächst wurde das anaerobe Wachstum auf TMAO der T25-TatA bzw. TatA-T25-Hybridprotein enthaltenden *E. coli*-JARV16-Stämme untersucht. Es zeigte sich, dass keine erkennbaren Wachstumsunterschiede zwischen beiden Stämmen existierten (Abb. 3.31A). Obwohl man annehmen könnte, dass das N-terminale T25-Fragment eine Membraninsertion von TatA verhindert, wurde ein dem WT ähnliches Wachstum bestimmt. Beide TatA-Derivate konnten vollständig oder zu einem gewissen Anteil den Phänotyp des *tat*-Deletionsstammes komplementieren, sodass mit Hilfe des Lichtmikroskopes Einzel- bzw. Zweier-Zellen sichtbar waren (Abb. 3.31C). Im Gegensatz dazu hatten die C-terminalen T18-Fusionen einen größeren Einfluss auf den TorA-Transport. So unterschied sich das Wachstum von Zellkulturen mit einem freien N-Terminus stark von Kulturen, in denen vor dem TatA-Translationsstart 7 klonierungsbedingte Aminosäuren waren (Abb. 3.31B). Das Wachstum der letzteren Kultur mit 7AS-TatA-T18 stagnierte sogar nach etwa 48 h bei der Hälfte der sonst üblich Optischen Dichte. Eine

Verschiebung des Zellwachstum um 24 h wurde für den *E. coli*-Stamm ermittelt, bei dem die *tatA*-Expression durch seinen natürlichen Promotor kontrolliert wird (TatA-low-T18). Bei allen restlichen Plasmiden steht die *tatA*-Expression unter Kontrolle des *lac*-Promotors und es sind *high*- bzw. *mid-copy*-Vektoren. Im Gegensatz zu den beiden TatA-T18-Fusionen wurden die Tat-Substrate AmiA und AmiC nur im Fall des *low-copy*-Systems in das Periplasma transportiert (Abb. 3.31C). Der verminderte TorA- bzw. der Amidasen-Transport könnte sowohl auf geringere TatA-Konzentrationen in der Übernacht- als auch in der Hauptkultur zurückzuführen sein.

Im Vergleich zu TatA wurde kein TorA- bzw. Amidasen-Transport mit N-terminalem T25-Fragment an TatE nachgewiesen (Vergleich Abb. 3.32 und 3.31A, C).

Wurde das T25- bzw. T18-Fragment allerdings C-terminal an TatE fusioniert, konnte der Phänotyp des Tat-Systems mit gewissen Abstrichen komplementiert werden (Abb. 3.32 A, B). Durch das geringe Expressionsniveau des *low-copy*-Plasmides wurde TorA erst nach ca. 80 h in ausreichender Menge transportiert, sodass ein Wachstum auf TMAO möglich war (Abb. 3.32 B). Weil diese Verschiebung auch zum gewissen Anteil bei TatA beobachtet wurde, kann man davon ausgehen, dass Veränderungen in TatE einen größeren Einfluss auf den TorA-Transport besitzen als Veränderungen in TatA und dass zumindest in diesen Fall die Komplementation des *tat*⁻-Phänotyps vom Expressions-Level abhängt. Für die TatE-T18-Fusionen konnte auch kein Transport der Amidasen festgestellt werden (Abb. 3.32 C).

Neben TatA und TatE wurden auch die Komponenten des TatBC-Komplexes untersucht. Unabhängig vom Expressionssystem konnten für die TatC-Hybridproteine keine Defekte im TorA- bzw. Amidasen-Transport festgestellt werden (Abb. 3.33). Die einzige Ausnahme bildete TatC-T18, das auf einem *ColE1*-Vektor codiert war und den Phänotyp des Tat-Systems nicht vollständig komplementieren konnte (Abb. 3.33 C). Aufgrund der erhöhten Kopienzahl des Plasmides wurde das von Jack *et al.* (2001) beschriebene TatA:TatB:TatC-Verhältnis von 50:2:1 gestört. Auf Grundlage dieser Ergebnisse muss die TatBC-Komplex-Bildung vollkommen unabhängig vom N- bzw. C-Terminus von TatC sein, weil die T25- bzw. T18-Fragmente an diesen Positionen fusioniert sind. Gleichzeitig muss TatC in der Membran lokalisiert sein, da sonst der Tat-Transport blockiert wäre.

Im Gegensatz zu TatC konnte N-terminal fusioniertes TatB erst nach 72 h den Transport von TorA vermitteln (Abb. 3.34 A), sodass Veränderungen am N- bzw. C-Terminus

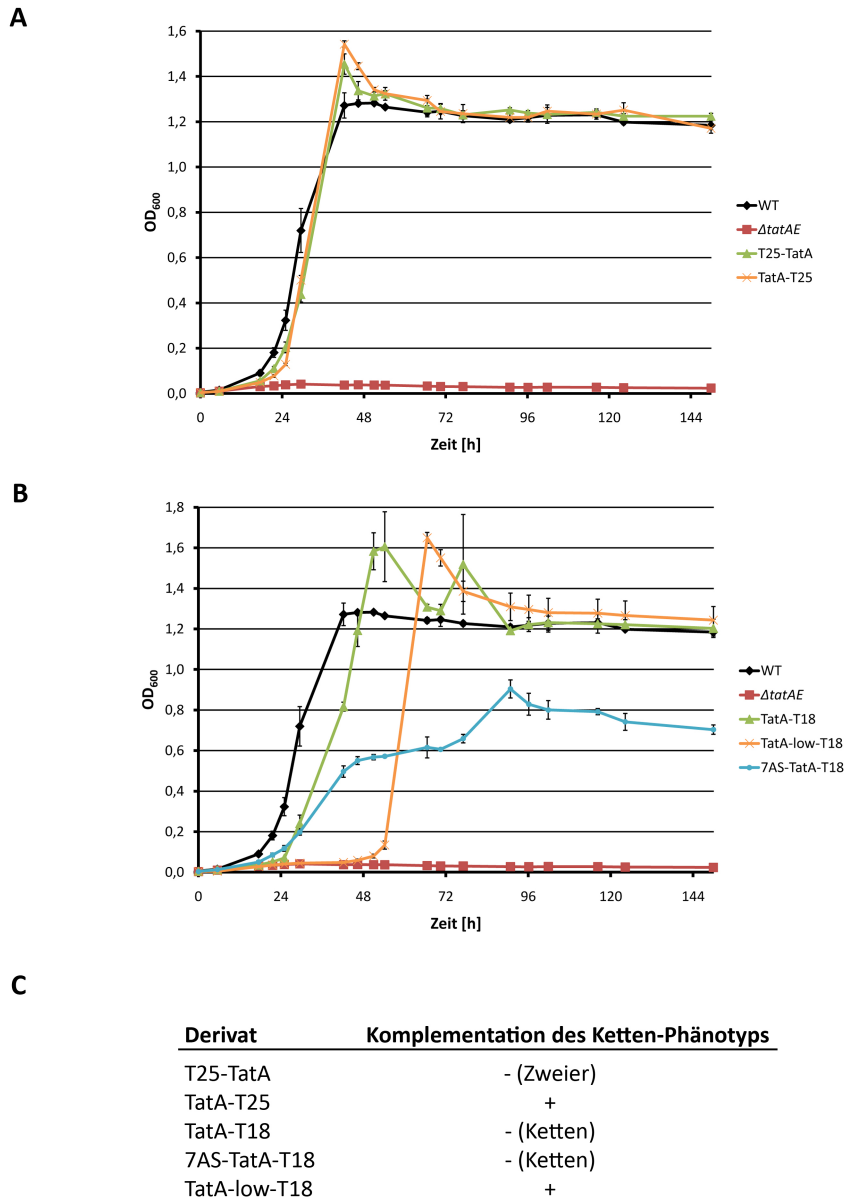


Abbildung 3.31: Einfluss der TatA-Hybridproteine auf den TorA- und Amidasen-Transport. Wachstum der *E. coli*-Stämme in TMAO-Medium **[A]** mit dem T25-Adenylatzyklasefragment **[B]** mit dem T18-Adenylatzyklasefragment. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung ist mit Fehlerbalken erfasst. **[C]** Wachstum der *E. coli*-Stämme in LB-Medium; Komplementation des Tat-Systems (Ketten-Phänotyp); **WT** – MC4100 *ara^R*, **Δ tatA** – JARV16, **T25-TatA** – JARV16 pKT25-*tatA-strep*, **TatA-T25** – JARV16 pKNT25-*tatA-strep*, **TatA-T18** – JARV16 pUT18-*tatA-strep*, **TatA-low-T18** – JARV16 pUL-*ptat-tatA-strep*-T18 und **7AS-TatA-T18** – JARV16 pUT18-7AS-*tatA-strep*.

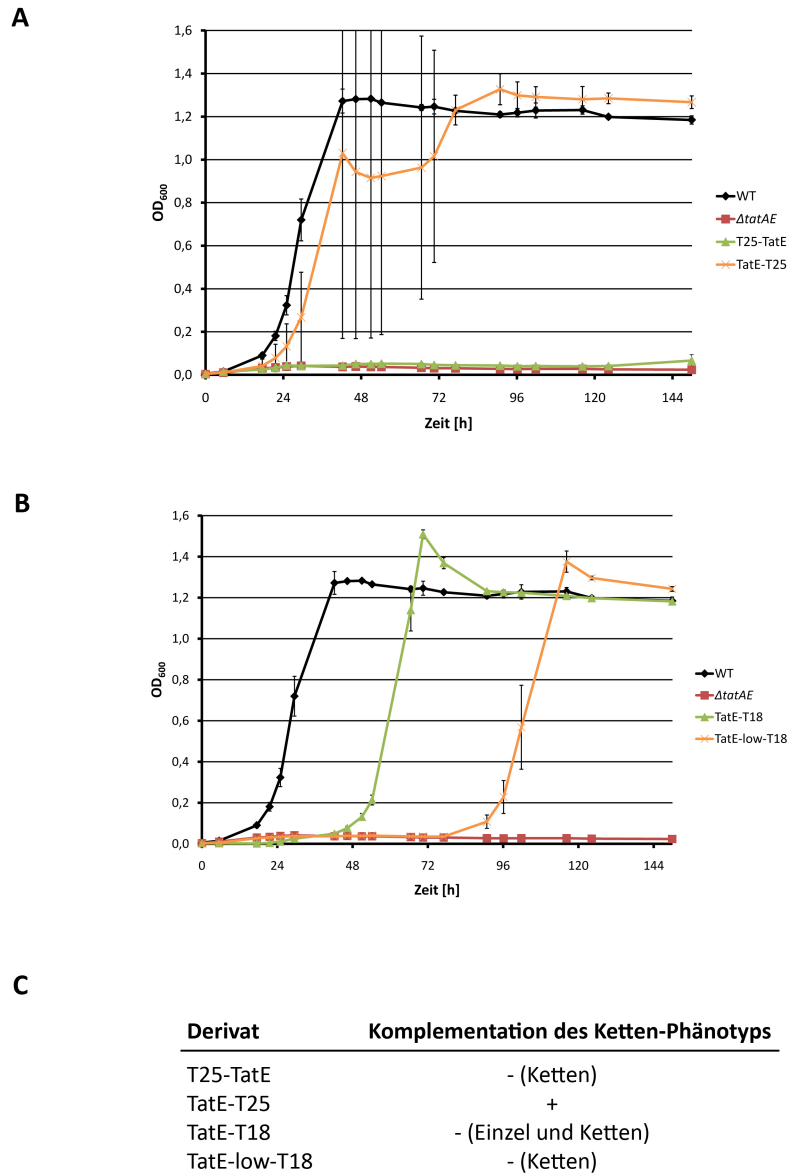


Abbildung 3.32: Einfluss der TatE-Hybridproteine auf den TorA- und Amidasen-Transport. Wachstum der *E. coli*-Stämme in TMAO-Medium **[A]** mit dem T25-Adenylatzyklasefragment **[B]** mit dem T18-Adenylatzyklasefragment. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung ist mit Fehlerbalken erfasst. **[C]** Wachstum der *E. coli*-Stämme in LB-Medium; Komplementation des Tat-Systems (Ketten-Phänotyp); **WT** – MC4100 *ara^R*, **Δ tatE** – JARV16, **T25-TatE** – JARV16 pKT25-*tatE-strep*, **TatE-T25** – JARV16 pKNT25-*tatE-strep*, **TatE-T18** – JARV16 pUT18-*tatE-strep* und **TatE-low-T18** – JARV16 pUL-*ptat-tatE-strep*-T18.

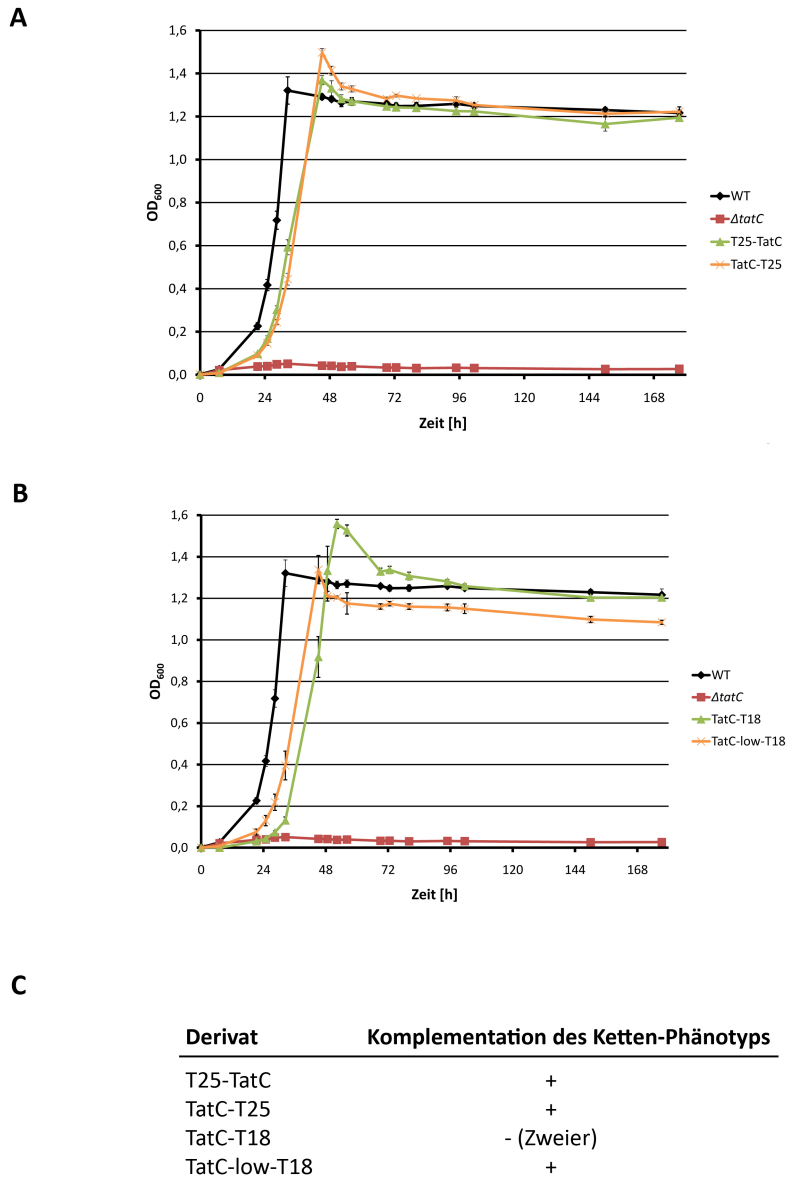


Abbildung 3.33: Einfluss der TatC-Hybridproteine auf den TorA- und Amidasen-Transport. Wachstum der *E. coli*-Stämme in TMAO-Medium **[A]** mit dem T25-Adenylatzyklasefragment **[B]** mit dem T18-Adenylatzyklasefragment. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung ist mit Fehlerbalken erfasst. **[C]** Wachstum der *E. coli*-Stämme in LB-Medium; Komplementation des Tat-Systems (Ketten-Phänotyp); **WT** – MC4100 *ara^R*, **Δ tatC** – B1LKO, **T25-TatC** – B1LKO pKT25-*tatC-strep*, **TatC-T25** – B1LKO pKNT25-*tatC-strep*, **TatC-T18** – B1LKO pUT18-*tatC-strep* und **TatC-low-T18** – B1LKO pUL-*ptat-tatC-strep-T18*.

von TatB wahrscheinlich einen starken Einfluss auf die Assemblierung des TatBC-Komplexes und die Substratbindung besitzen. Im Falle des TatB-low-T18-Derivates müsste der Versuch wiederholt werden, weil bereits nach wenigen Stunden Wachstum auf TMAO festgestellt wurde und dieser Verlauf im Vergleich zum WT-Stamm zu einer schnelleren Komplementation führte (Abb. 3.34 A). Man kann davon ausgehen, dass C-terminale Fusionen von T18 bzw. T25 an TatB den TorA-Transport behindern, da das verzeichnete Wachstum eher auf Mutationen zurückzuführen sein könnte, und das Wachstum der Populationen auf TMAO-Medium dadurch einen untypischen Verlauf nimmt. Im Vergleich zum TorA-Transport wurden nur für das T25-TatB- und das TatB-low-T18-Derivat einzelne Zellen beobachtet (Abb. 3.34 C). Demnach konnten beide den Phänotyp des Tat-Systems komplementieren, was für einen Transport der Amidasen spricht.

Komplementieren konnten alle TatC-Fusionsproteine, N-terminal fusionierte TatA/TatE-T25-Varianten und Fusionsproteine, die auf dem *low-copy*-Plasmid codiert wurden (bis auf TatE). Eine eingeschränkte Effizienz des Tat-Systems wiesen die Fusionsproteine T25-TatA, TatE-T18 und T25-TatB auf, wobei TatB-T25, TatB-T18, beide TatA-T18-Fusionen und T25-TatE den tat^- -Phänotyp des Tat-Systems nicht komplementieren konnten.

3.3.3 Die Interaktion von TatA und PspA ist mit dem BACTH-System nicht nachzuweisen.

Nachdem geklärt war, dass abhängig vom Expressionssystem einige Fusionsproteine den Phänotyp des Tat-Systems komplementieren konnten und daher funktionell waren, sollte im Anschluss geprüft werden, ob die bereits mittels EM und Affinitätschromatographie gezeigte TatA-PspA-Interaktion auch mit Hilfe des BACTH-Systems nachweisbar ist. Dafür wurden jeweils ein C- bzw. N-terminales T18-Fusionsprotein mit einem C- bzw. N-terminalen T25-Fusionsprotein gemeinsam im *E. coli*-Stamm DHM1 synthetisiert und die β -Galaktosidaseaktivität nach Miller (1992) bestimmt. Um die Intensität der Interaktion abschätzen zu können, wurden die gemessenen Werte der Fusionsproteine mit den im BACTH-System-Kit enthaltenen Positiv- und Negativkontrollen verglichen.

Zunächst wurde die Interaktion von PspA mit sich selbst untersucht, da bekannt ist,

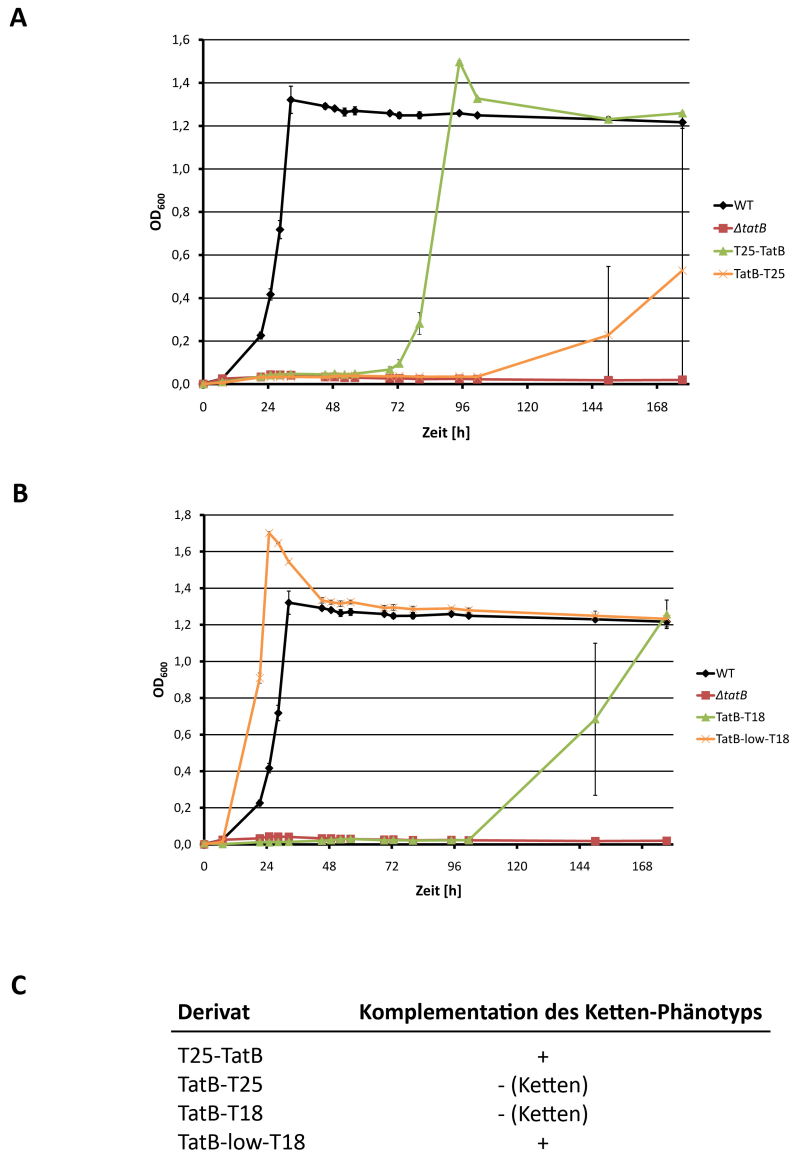
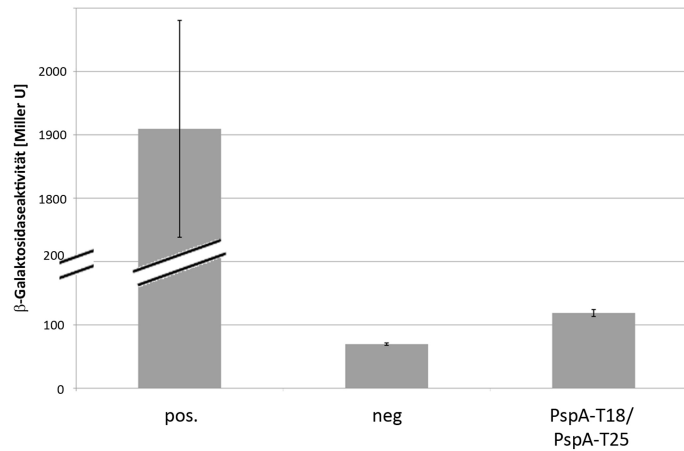


Abbildung 3.34: Einfluss der TatB-Hybridproteine auf den TorA- und Amidasen-Transport. Wachstum der *E. coli*-Stämme in TMAO-Medium **[A]** mit dem T25-Adenylatzyklasefragment **[B]** mit dem T18-Adenylatzyklasefragment. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung ist mit Fehlerbalken erfasst. **[C]** Wachstum der *E. coli*-Stämme in LB-Medium; Komplementation des Tat-Systems (Ketten-Phänotyp); **WT** – MC4100 *ara^R*, **Δ tatB** – BØD, **T25-TatB** – BØD pKT25-*tatB-strep*, **TatB-T25** – BØD pKNT25-*tatB-strep*, **TatB-T18** – BØD pUT18-*tatB-strep* und **TatB-low-T18** – BØD pUL-*ptat-tatB-strep*-T18.

dass es große homo-oligomere Komplexe ausbilden kann (Standar *et al.*, 2008). Der Nachweis dieser Selbstinteraktion von PspA gestaltete sich weitaus schwieriger als gedacht. In allen bisherigen Interaktionsstudien zu PspA, oder dessen homologen Proteinen VIPP1 im Chloroplasten oder Cyanobakterien (Kroll *et al.*, 2001; Westphal *et al.*, 2001) oder LiaH in *Bacillus subtilis*, wurde sich immer auf die PspA-PspF-, PspA-PspB- oder PspA-PspC-Bindung beschränkt. Eine PspA-PspA-Bindung wurde mit Hilfe eines 2H-Systems nur durch Jovanovic *et al.* (2010) gezeigt. Die Arbeitsgruppe um Thorsten Mascher konnte bisher auch keine Selbstinteraktion für das PspA-Homolog LiaH mit Hilfe des BACTH-Systems nachweisen (Diana Wolf, VAAM-Tagung 2011 in Karlsruhe). Im Falle des BACTH-Systems hatte das Adenylatzyklasefragment fast das gleiche Molekulargewicht wie PspA (18 bzw. 25 kDa zu 26 kDa), sodass die Ausbildung von PspA-Oligomeren durch diese Fusion gestört werden und dadurch im Assay nicht nachweisbar sein könnte.

Obwohl 15 verschiedene PspA-Kombinationen untersucht wurden, konnte nur für eine Interaktion, PspA-T18/ PspA-T25, eine geringe β -Galaktosidasaktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.35).

A



B

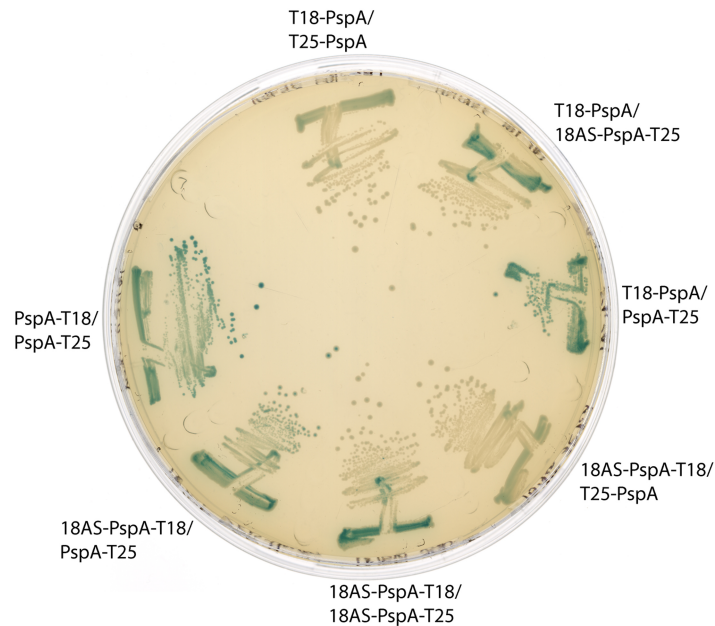


Abbildung 3.35: Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität **[A]** und **[B]** Interaktionsassay auf X-Gal/LB-Medium der PspA-Selbstinteraktion. Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität in Miller-Units im *E. coli*-Stamm DHM1. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung ist mit Fehlerbalken erfasst. Wachstum der *E. coli*-Stämme DHM1 mit T18-/ T25-Fusionsproteinen auf LB-Medium mit X-Gal nach Inkubation (2 d) bei 30 °C. **pos.** – DHM1 pUT18C-*zip*, pKT25-*zip*; **neg.** – DHM1 pUT18, pKNT25; **PspA-T18/ PspA-T25** – DHM1 pUT18C-*pspA*-(GGGS)₃, pKNT25-*pspA*-(GGGS)₃; **T18-PspA/ T25-PspA** – DHM1 pUT18C-*pspA-strep*, pKT25-*pspA-strep*; **T18-PspA/ 18AS-PspA-T25** – DHM1 pUT18C-*pspA-strep*, pKNT25-18AS-*pspA-strep*; **T18-PspA/ PspA-T25** – DHM1 pUT18C-*pspA-strep*, pKNT25-*pspA*-(GGGS)₃; **18AS-T18-PspA/ T25-PspA** – DHM1 pUT18-*pspA-strep*, pKT25-*pspA-strep*; **18AS-T18-PspA/ 18AS-PspA-T25** – DHM1 pUT18-*pspA-strep*, pKNT25-18AS-*pspA-strep* und **18AS-T18-PspA/ PspA-T25** – DHM1 pUT18-*pspA-strep*, pKNT25-*pspA-strep*.

Um ein erstes Indiz für eine potenzielle Interaktion zu erhalten, wurden die verschiedenen PspA-Kombinationen direkt nach der Transformation auf Selektionsmedium (X-Gal/LB-Medium) ausplattiert. Dabei dient X-Gal als chromogenes Substrat der β -Galaktosidase, welches durch eine Blaufärbung sichtbar wird. Die Stärke einer Interaktion zweier Proteine korreliert dabei mit der Blaufärbung der Kolonien. Exemplarisch wurden 7 verschiedene PspA-Kombinationen dargestellt, die sich in ihrer Blaufärbung stark unterscheiden (Abb. 3.35 B). Für die PspA-Selbstinteraktion wurde eine Blaufärbung der Kolonien nur dann festgestellt, wenn die klonierungsbedingten 18 Aminosäuren der MCS am N-Terminus von PspA entfernt wurden und *pspA* vom *mid-copy*-Plasmid pKNT25 exprimiert wurde. Es ist jedoch zu bedenken, dass sich das Wachstum auf festen Medien vom Wachstum in Flüssigkultur unterscheidet und blaue Kolonien keine oder nur eine geringe Aktivität aufweisen können.

Das eigentliche Ziel war mit Hilfe des BACTH-Systems die PspA-TatA-Interaktion nachzuweisen. Erste Analysen auf dem Selektionsmedium sprachen jedoch dafür, dass sich diese Methode nicht für diesen Bindungsnachweis eignet (siehe Anhang A.2). Alle untersuchten Kombinationen waren weiß oder leicht bläulich. Es wurde aber keine direkte Interaktion nachgewiesen, sodass im Anschluss auf die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität verzichtet wurde.

3.3.4 Die Interaktionen der Tat-Komponenten kann mit dem BACTH-System nachgewiesen werden.

Neben der TatA-PspA-Interaktion sollten auch die Tat-Komponenten TatA, TatB, TatC und TatE auf ihre Selbstinteraktion und die Bindung untereinander untersucht werden. Für die eigentliche Translokation sind die Bindungen der einzelnen Tat-Komponenten essentiell, da schon die Substratbindung vom TatBC-Komplex bewerkstelligt wird und erst im Anschluss TatA-Komplexe rekrutiert werden. Alle Ergebnisse sind am Ende nochmals zusammengefasst aufgeführt (Abschnitt 3.3.5).

Zum besseren Verständnis und zu Überblickszwecken wurden die einzelnen Kombinationen der verschiedenen ÜNK bei 30 °C inkubiert und im Anschluss jeweils 10 μ l (angeglichen auf gleiche Optischen Dichte) auf X-Gal/LB-Medium getropft und für ein bis zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Im Falle einer Proteininteraktion färbte sich der Tropfen (*E. coli*-Kolonien) durch den Umsatz des chromogenes Substrates X-Gal blau (Abb. A.3 und A.4), wobei die Färbung aufgrund des gelblichen Agarhintergrun-

des grün erscheint. Anhand der Übersicht wird deutlich, dass TatC unabhängig vom Expressionssystem mit sich selbst interagieren kann. Stärkere Interaktionen (sichtbar durch stärkere Blaufärbung der Kolonie) wurden hauptsächlich bei Proteinen mit freien N-Termini gesehen. Wurde der N-Terminus durch die Adenylatzyklasefragmente blockiert, konnte vermehrt keine Blaufärbung festgestellt werden. Es ist allerdings fraglich, ob Proteine aufgrund ihrer C-terminalen Fusion in ihrer natürlichen Konformation vorliegen können.

Die Interaktionsassays auf festem Medium stellten ein erstes Indiz auf die zu erwartende Interaktion dar, die durch die β -Galaktosidaseaktivität im Anschluss indirekt überprüft wurde. Zunächst wurden die einzelnen Komponenten auf ihre Selbstinteraktion getestet. Die ermittelten β -Galaktosidasaktivitäten der TatA-TatA-Interaktion waren größer als die der Positivkontrolle und unabhängig vom Expressionsniveau des T18-Fragmente-Gens (Abb. 3.36). Obwohl für das *low-copy*-System weniger TatA detektiert wurde als für das pUT18-Plasmid, so hatte dieser Mengenunterschied keinen Einfluss auf die Interaktionsstärke. Beide TatA-Varianten wiesen eine β -Galaktosidaseaktivität von ca. 1500 Miller-Units auf.

Allerdings wurde keine TatA-Interaktion nachgewiesen, sobald der N-Terminus durch das T25-Adenylatzyklasefragment blockiert war (Vergleich T25- und -T25 in Abb. 3.36). Es muss aber auch in Betracht gezogen werden, dass dieses Fusionsprotein den Kettenphänotyp des Tat-Systems nur bedingt komplementieren konnte und eventuell abgebaut wird. Dadurch wäre die örtliche Nähe der zwei Adenylatzyklasefragmente gestört, sodass nur noch der Negativkontrolle ähnliche Aktivitäten messbar sind. Gleiches könnte auch auf die TatE-TatE-Interaktion zutreffen. Obwohl wie schon bei TatA der N-Terminus von TatE frei zugänglich war, konnte keine Galaktosidaseaktivität und folglich auch keine Interaktion nachgewiesen werden.

3.3.4.1 TatA und TatE können gemischte Komplexe ausbilden

TatE kann TatA funktionell ersetzen und ist wahrscheinlich durch eine kryptische Genverdopplung entstanden (Sargent *et al.*, 1998b; Jack *et al.*, 2001). Beide Proteine weisen eine bis zu 60%ige Sequenzidentität auf, die im N-terminalen Bereich deutlich hervortritt (Abb. 3.4). Folglich müsste es möglich sein, TatE in TatA-Komplexe zu integrieren. Die stärkste messbare Interaktion beider Proteine wurde für das *low-copy*-System be-

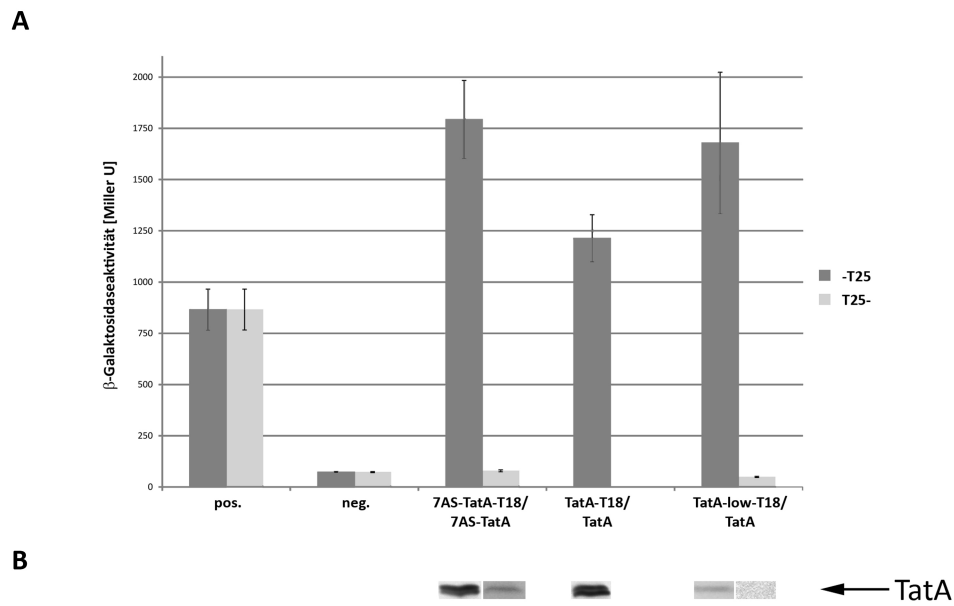


Abbildung 3.36: Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität und Proteinnachweis der TatA-Selbstinteraktion. **[A]** Die β -Galaktosidaseaktivität wurde in Miller-Units im *E. coli*-Stamm DHM1 mit T18-/ T25-Fusionsproteinen bestimmt. Im Säulendiagramm wurden die N-terminal fusionierten T25-Fragmente hellgrau (T25-) und die C-terminal fusionierten T25-Fragment dunkelgrau (-T25) dargestellt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung ist mit Fehlerbalken erfasst. **[B]** Nachweis von TatA in ganzen Zellen mit α -TatA mittels 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; **pos.** – DHM1 pUT18C-zip, pKT25-zip (Positivkontrolle); **neg.** – DHM1 pUT18, pKNT25 (Negativkontrolle); **7AS-TatA-T18/7AS-TatA** – DHM1 pUT18-7AS-*tatA-strep*, pKNT25-7AS-*tatA-strep* bzw. pKT25-*tatA-strep*; **TatA-T18/TatA** – DHM1 pUT18-*tatA-strep*, pKNT25-*tatA-strep* und **TatA-low-T18/TatA** – DHM1 pUL-*ptat-tatA-strep*-T18, pKNT25-*tatA-strep* bzw. pKT25-*tatA-strep*.

stimmt (TatE-low-T18/ TatA), allerdings nie in Kombination mit den N-terminalen Fusionsproteinen (Abb. 3.37 A). Wie schon bei der Selbstinteraktion von TatA gesehen, blockierte das T25-Fragment die Bindung beider Proteine, sodass keine Aktivität messbar war (Vergleich Abb. 3.36 A mit Abb. 3.37 A).

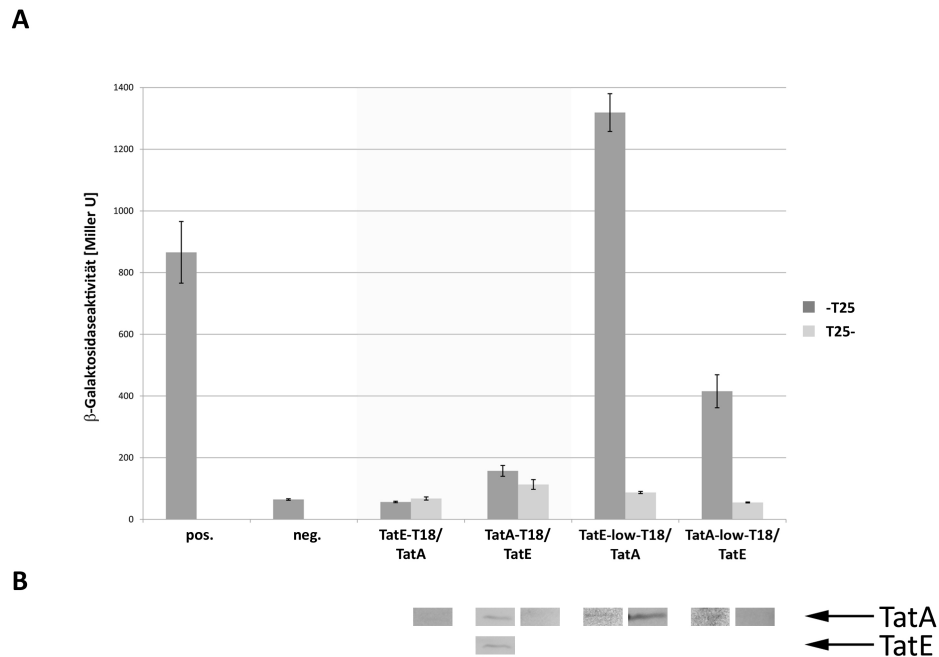


Abbildung 3.37: Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität und Proteinnachweis der TatA-TatE-Interaktion. **[A]** Die β -Galaktosidaseaktivität wurde in Miller-Units im *E. coli*-Stamm DHM1 mit T18-/ T25-Fusionsproteinen bestimmt. Im Säulendiagramm wurden die N-terminal fusionierten T25-Fragmente hellgrau (T25-), die C-terminal fusionierten T25-Fragment dunkelgrau (-T25) dargestellt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung ist mit Fehlerbalken erfasst. **[B]** Nachweis von TatA und TatE in ganzen Zellen mit α -TatA bzw. *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat mittels 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; **pos.** – DHM1 pUT18C-*zip*, pKT25-*zip*; **neg.** – DHM1 pUT18, pKNT25; **TatE-T18/ TatA** – DHM1 pUT18-*tatE-strep*, pKNT25-*tatA-strep* bzw. pKT25-*tatA-strep*; **TatA-T18/ TatE** – DHM1 pUT18-*tatA-strep*, pKNT25-*tatE-strep* bzw. pKT25-*tatE-strep*; **TatE-low-T18/ TatA** – DHM1 pUL-*ptat-tatE-strep*-T18, pKNT25-*tatA-strep* bzw. pKT25-*tatA-strep* und **TatA-low-T18/ TatE** – DHM1 pUL-*ptat-tatA-strep*-T18, pKNT25-*tatE-strep* bzw. pKT25-*tatE-strep*.

Ferner war die Detektion beider Proteine sehr schwierig, da TatE nicht durch den α -TatA-AK erkannt wird und somit nur des *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat zur Verfügung stand. TatA konnte mit beiden Antikörpern nachgewiesen werden (Abb. 3.37B). Obwohl viel mehr TatA bei der (TatE-low-T18/T25-TatA)-Kombination als bei der C-terminalen Fusion detektiert werden konnte, wurden entgegengesetzte Aktivitäten gemessen.

3.3.4.2 TatB interagiert über die Transmembranhelix mit TatC

TatB und TatC bilden zusammen den TatBC-Komplex (Bolhuis *et al.*, 2001), der die Signalsequenz der Tat-Substrate erkennt (Cline und Mori, 2001; Alami *et al.*, 2003). Mit Hilfe der (*bimolecular fluorescence complementation*) BiFC-Methode bestätigten Kostecki *et al.* (2010), dass sowohl TatC als auch TatB miteinander interagieren. Dabei ist es von großem Interesse über welchen Bereich von TatB diese Interaktion mit TatC entsteht. In Pull-down-Experimenten schränkten Maldonado *et al.* (2011b) diese Interaktionsstelle auf die ersten 55 Aminosäuren von TatB ein. Für die Interaktionsstudien mittels des BACTH-Systems wurde das T18-Adenylatzyklasefragment C-terminal mit dem TatB-N-Terminus (AS 1-21) fusioniert (Schöttmer, 2011). Das TatB(NT)-Fusionsprotein interagiert nur mit TatB, wenn TatB N-terminal mit dem T25-Adenylatzyklasefragment fusioniert wurde (Abb. 3.38 TatB(NT)/ TatB). Für die Interaktion des N-Terminus von TatB mit freiem N- bzw. C-Terminus von TatC konnte kein signifikanter Unterschied in der gemessenen β -Galaktosidaseaktivität ermittelt werden (Abb. 3.38 TatB(NT)/ TatC).

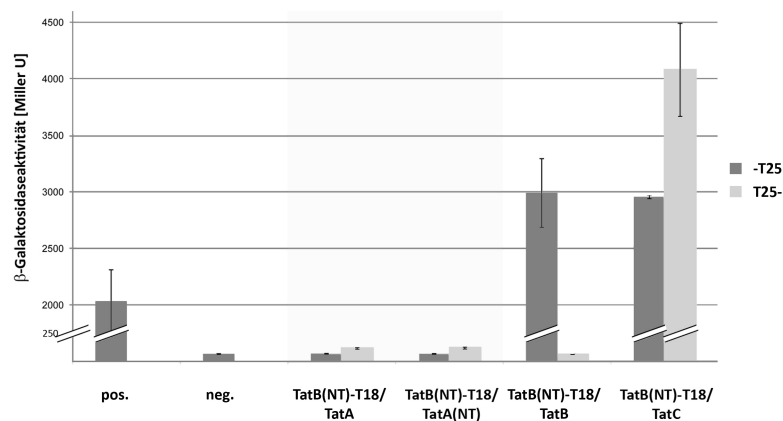


Abbildung 3.38: Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität der TatB(NT)-Interaktion mit den Tat-Komponenten. [A] Die β -Galaktosidaseaktivität wurde in Miller-Units im *E. coli*-Stamm DHM1 mit T18-/ T25-Fusionsproteinen bestimmt. Im Säulendiagramm wurden die N-terminal fusionierten T25-Fragmente hellgrau (T25-), die C-terminal fusionierten T25-Fragment dunkelgrau (-T25) dargestellt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung ist mit Fehlerbalken erfasst. **pos.**– DHM1 pUT18C-*zip*, pKT25-*zip*; **neg.**– DHM1 pUT18, pKNT25; **TatB(NT)-T18/ TatA**– DHM1 pUT18-*tatB(NT)-strep*, pKNT25-*tatA-strep* bzw. pKT25-*tatA-strep*; **TatB(NT)-T18/ TatA(NT)**– DHM1 pUT18-*tatB(NT)-strep*, pKNT25-*tatA(NT)-strep* bzw. pKT25-*tatA(NT)-strep*; **TatB(NT)-T18/ TatB**– DHM1 pUT18-*tatB(NT)-strep*, pKNT25-*tatB-strep* bzw. pKT25-*tatB-strep* und **TatB(NT)-T18/ TatC**– DHM1 pUT18-*tatB(NT)-strep*, pKNT25-*tatC-strep* bzw. pKT25-*tatC-strep*.

Obwohl die gemessenen Galaktosidaseaktivitäten der TatA-Fusionsproteine mit dem

N-Terminus von TatB signifikant oberhalb der Negativkontrolle lagen, waren sie im Vergleich zu den Interaktionen von TatB(NT) mit TatB bzw. TatB(NT) mit TatC deutlich schwächer. Gleichzeitig konnte allerdings Vollängen-TatB mit TatA interagieren, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die TatA-TatB-Interaktion nicht über den N-Terminus von TatB vermittelt wird (Vergleich Abb. A.5 und Abb. 3.38 Interaktion von TatB(NT)-T18 mit T25-TatA). Für die TatA-TatB-Interaktion war es jedoch von großer Bedeutung, dass der N-Terminus von TatB frei zugänglich war (Abb. A.5). Dies bestätigten auch die sehr schwachen Aktivitäten der TatA- und TatA(NT)-Fusionsproteine, sobald der C-Terminus von TatA frei zugänglich war und der N-Terminus durch das T25-Fragment abgeschirmt wurde (Abb. 3.38 TatB(NT)/TatA bzw. TatA(NT)).

3.3.4.3 Der C-Terminus von TatC ist für eine stärkere Interaktion mit TatE wichtig

TatA-Komplexe werden an den TatBC-Komplex rekrutiert, nachdem das Substrat von TatC erkannt wurde (Mori und Cline, 2002; Alami *et al.*, 2003; Dabney-Smith *et al.*, 2006). Bislang konnten Kostecki *et al.* (2010) mit Hilfe der BiFC-Methode zeigen, dass die TatA-TatC-Interaktion stärker ist als die Interaktion von TatA mit TatB. Jedoch fehlen bislang Erkenntnisse, welche Bereiche von TatC bzw. TatA für diese Bindung bedeutend sind. Für die Bindung TatAs an TatC reichte nicht allein der N-Terminus von TatA aus, da die gemessene β -Galaktosidaseaktivität für das Vollängen-TatA ca. 7fach größer war als für den N-Terminus (AS 1-21) allein (Abb. 3.39A, TatA-low-T18/ TatC und TatA(NT)-low-T18/ TatC). Die N-Termini der TatA- bzw. TatE-Fusionsproteine mussten frei zugänglich sein bzw. durften durch die Adenylatzyklasefragmente nicht blockiert werden, damit eine messbare Interaktion mit TatC ermittelt werden konnte (Abb. 3.39). Im Unterschied zu TatA wurden die stärksten Bindungen von TatE mit TatC beobachtet, wenn der carboxyterminale Bereich nicht blockiert war (Abb. 3.39 Vergleich TatC-T18/ TatE und TatE-T18/ TatC). Für die TatE-TatC-Interaktion war der C-Terminus wichtig aber nicht essentiell.

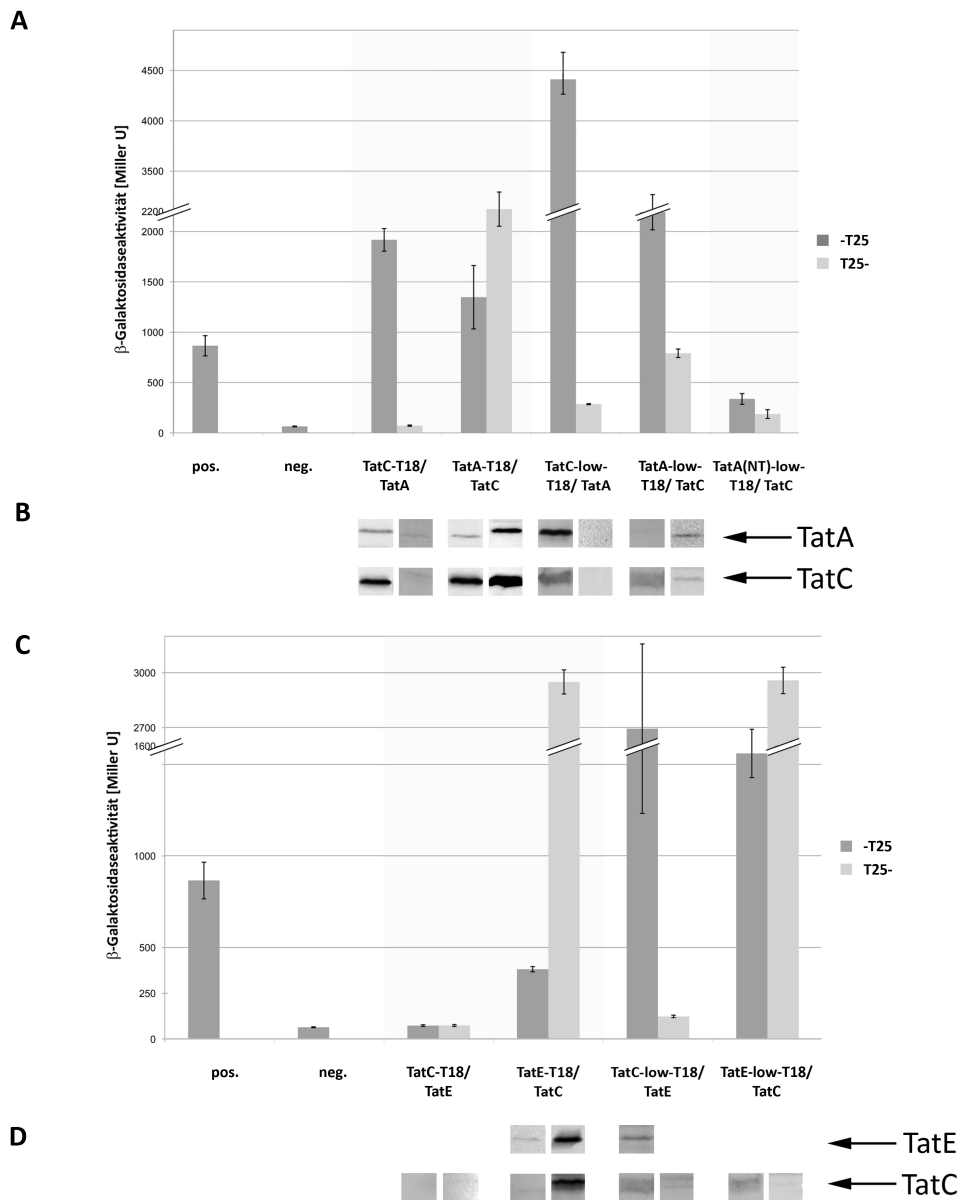


Abbildung 3.39: Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität von TatB mit [A] TatA und [C] mit TatE. [A, C] Die β -Galaktosidaseaktivität wurde in Miller-Units im *E. coli*-Stamm DHM1 mit T18-/ T25-Fusionsproteinen bestimmt. Im Säulendiagramm wurden die N-terminal fusionierten T25-Fragmente hellgrau (T25-), die C-terminal fusionierten T25-Fragment dunkelgrau (-T25) dargestellt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung ist mit Fehlerbalken erfasst. [B, D] Nachweis von TatA, TatE und TatB in ganzen Zellen mit α -TatA, α -TatC bzw. *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat mittels 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; **pos.** – DHM1 pUT18C-*zip*, pKT25-*zip*; **neg.** – DHM1 pUT18, pKNT25; **TatC-T18/ TatA** – DHM1 pUT18-*tatC-strep*, pKNT25-*tatA-strep* bzw. pKT25-*tatA-strep*; **TatA-T18/ TatC** – DHM1 pUT18-*tatA-strep*, pKNT25-*tatC-strep* bzw. pKT25-*tatC-strep*; **TatC-low-T18/ TatA** – DHM1 pUL-*ptat-tatC-strep*-T18, pKNT25-*tatA-strep* bzw. pKT25-*tatA-strep*; **TatA-low-T18/ TatC** – DHM1 pUL-*ptat-tatA-strep*-T18, pKNT25-*tatC-strep* bzw. pKT25-*tatC-strep*; **TatA(NT)-low-T18/ TatC** – DHM1 pUL-*ptat-tatA(NT)-strep*-T18, pKNT25-*tatC-strep* bzw. pKT25-*tatC-strep*; **TatC-T18/ TatE** – DHM1 pUT18-*tatC-strep*, pKNT25-*tatE-strep* bzw. pKT25-*tatE-strep*; **TatE-T18/ TatC** – DHM1 pUT18-*tatE-strep*, pKNT25-*tatC-strep* bzw. pKT25-*tatC-strep*; **TatB-low-T18/ TatE** – DHM1 pUL-*ptat-tatC-strep*-T18, pKNT25-*tatE-strep* bzw. pKT25-*tatE-strep* und **TatE-low-T18/ TatC** – DHM1 pUL-*ptat-tatE-strep*-T18, pKNT25-*tatC-strep* bzw. pKT25-*tatC-strep*.

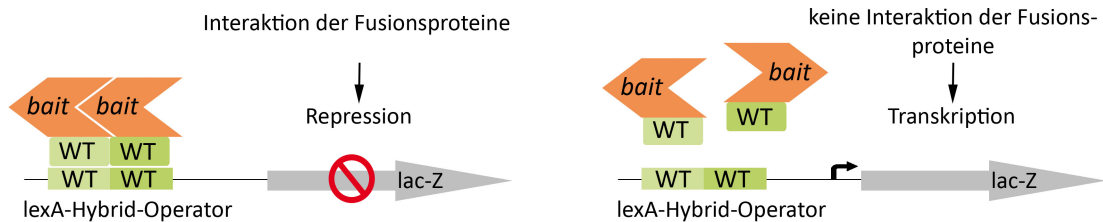
3.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse des BACTH-Systems

In der folgenden Tabelle sind alle mittels des BACTH-Systems erhaltenen Interaktionsergebnisse zusammengefasst.

3.3.6 Strategie des LexA-basierten 2-Hybrid-Systems

Mit Hilfe des LexA-basierten 2-Hybrid-Systems kann sowohl Heterodimer-Bildung zweier verschiedener Proteine als auch die Homodimer-Bildung eines einzelnen Proteins identifiziert werden. Grundlage dieses Systems sind die Translationsfusionen des zu untersuchenden Proteins mit der auf dem Plasmid pMS604 codierten DNA-Bindedomäne des LexA(WT)-Repressors und des zweiten Proteins mit einer in ihrer Spezifität veränderten DNA-Bindedomäne des LexA(408)-Repressors, die von dem Plasmid pDP804 codiert wird (Abb.3.40).

A *E. coli* Reporterstamm SU101 (Homodimer-Bildung)



B *E. coli* Reporterstamm SU202 (Heterodimer-Bildung)

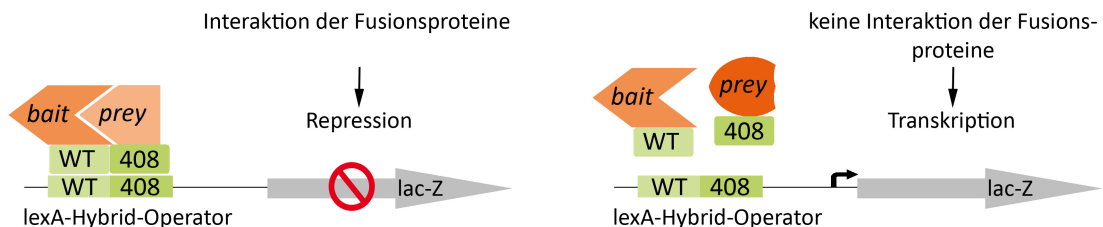


Abbildung 3.40: Darstellung der Funktionsweise des LexA-basierten 2H-Systems in den *E. coli*-Reporterstämmen SU101 [A] und SU202 [B]. Dargestellt ist der *upstream* des Reportergens (*lacZ*) gelegene Operatorbereich, bestehend aus zwei WT-*lexA*-Operator-Hälften im *E. coli*-Reporterstamm SU101 und aus je einer WT-*lexA*-Operatorhälfte und einer mutierten *lexA*-Operatorhälfte im *E. coli*-Reporterstamm SU202. [A] Durch Homodimer-Bildung wird ein funktionsfähiger WT-LexA-Repressor gebildet, der an den WT-Hybrid-Operator bindet und dadurch die Repression des Reportergens bewirkt. [B] Interaktion von *prey* und *bait* führen zur Bildung des WT/408-LexA-Repressors, der an den *lexA*-Hybrid-Operator bindet und somit zur Repression der Transkription *lacZ*s beiträgt.

Die Transkriptionskontrolle erfolgt in beiden Fällen durch den IPTG-induzierbaren lacUV5-Promotor, der entweder wie im Reporterstamm SU202 durch einen *lexA*-Hybrid-Operator, bestehend aus einer mutierten (CCGT) und einer WT-Hälfte (CTCG), oder wie im Stamm SU101 durch einen *lexA*-Hybrid-Operator, bestehend aus zwei WT-Hälften (CTCG), zusammengesetzt ist (Dmitrova *et al.*, 1998). In beiden Fällen nähern sich bei erfolgreicher Interaktion die LexA-Repressor-Domänen der zu untersuchenden Fusionsproteine an, wodurch der funktionelle Repressor an den spezifischen

Operator binden kann und die Transkription des konstitutiv exprimierten Reportergens, *lacZ*, reprimiert wird. Im Stamm für Homodimer-Bildung können demzufolge nur LexA-Repressoren an den Operator binden, die aus zwei WT-Hälften bestehen und im Heterodimer-Stamm SU202 muss der Repressor aus einer WT- und einer mutierten Hälfte bestehen. Interagieren die untersuchten Proteine nicht, wird kein funktioneller Repressor gebildet, sodass keine Bindung an den Operator stattfindet und *lacZ* weiter konstitutiv exprimiert wird. Die Reportergen-Aktivität kann durch die Menge an gemessener β -Galaktosidase in ganzen Zellen quantifiziert werden (Miller, 1992).

Zur Konstruktion der Fusionsproteine stehen die zwei zuvor erwähnten Vektoren pMS604 und pDP804 zur Verfügung. Dabei ist zu beachten, dass in beiden Fällen klonierungsbedingt nur C-terminale Fusionen an den LexA-Repressor erfolgen konnten. Das verwendete pDP804-Plasmid besitzt eine mutierte LexA(408)-Jun-Zipper-Fusion, einen *p15-origin* und eine Tetracyclin-Resistenzkassette (Dmitrova *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu kodiert das pMS604-Plasmid für eine Ampicillin-Resistenz, einen *ColE1-origin* und das LexA(WT)-Fos-Zipper-Fusionsprotein (Porte *et al.*, 1995). Für die Synthese der Fusionen wurden *tatB*, *tatC*, *tatE*, *tatA* und *tatA*-Derivate mittels PCR amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen AgeI, XhoI für pMS604 und BssHIII, BglIII für pDP804 inkubiert und im Anschluss mit den entsprechenden Schnittstellen der zuvor linearisierten Vektoren ligiert. Da *pspA* schon eine XhoI-Schnittstelle in seiner Sequenz aufwies, wurde diese zuerst durch QuikChange©-*Multi Site-Directed Mutagenesis* entfernt und die Gene danach wie zuvor erwähnt behandelt. Zum besseren Verständnis der Abkürzungen der TatA-Derivate werden diese hier erneut näher beschrieben. TatA(NT) steht für die ersten 21 Aminosäuren TatAs, den Transmembrananker (Sargent *et al.*, 1998a). TatA(HC) beinhaltet die postulierte amphipathische Helix und den hydrophilen C-Terminus (Aminosäuren 21 bis 89, HC - *hinge* bis C-Terminus) und liegt als lösliches Protein vor (Porcelli *et al.*, 2002). Hinter TatA(CT) verbirgt sich der unstrukturierte C-Terminus von TatA (Aminosäuren 41 bis 89).

Um Homodimere zu untersuchen, wurden nur pMS-Derivate in den *E. coli*-Reporterstamm SU101 transformiert. Für Heterodimere musste jeweils ein pMS- mit einem pDP-Derivat in den *E. coli*-Reporterstamm SU202 transformiert werden. Als Kontrolle dienten dabei die Ausgangsplasmide, die für einen Fos- und einen Jun-Zipper codieren und Untereinheiten des Transkriptionsfaktors AP1 sind. Sie gehören zur Familie der basischen Leucin-Zipper (bZIP-Motiv, Landschulz *et al.*, 1988) und kommen stets als

Dimere vor (Homodimer Jun/Jun oder Heterodimer Fos/Jun). Alle Fusionsproteine besaßen einen C-terminalen *Strep*-tagII und werden im Reporterstamm SU202 zum besseren Verständnis entweder als LexA(WT)-Protein X oder LexA(408)-Protein X bezeichnet.

3.3.7 Funktionalität der LexA-Fusionen

Durch die in den Vektoren vorgegebene *multiple cloning site* (MCS) wurden die Tat-Komponenten stets C-terminal fusioniert, wodurch der N-Terminus durch den LexA-Repressor blockiert und eine Insertion in die Membran fraglich ist. Deshalb wurde zunächst mit TMAO-Wachstum und Kettenphänotyp getestet, ob die LexA-Tat-Fusionsproteine den entsprechenden Deletionsstamm komplementieren können. Für das TMAO-Wachstum, also die Fähigkeit TorA über die Cytoplasmamembran transportieren zu können, wurden Zellkulturen über Nacht in M9-Minimalmedium inkubiert und danach in TMAO-Medium überführt. Nach einem entsprechenden Zeitintervall wurde die Optische Dichte bei 600 nm gemessen. Eine Zunahme der OD₆₀₀, also Zellwachstum, entsprach der Fähigkeit, TMAO-Atmung zu betreiben und das Tat-Substrat TorA ins Periplasma zu transportieren. Auf die Überprüfung der TatA-Derivate wurde, wie schon im Abschnitt 3.3.2 näher erläutert, verzichtet.

Die Komplementation des Tat-Systems durch die LexA-Hybridproteine spiegelte teilweise die Ergebnisse des BACTH-System wider. Allerdings stand in diesem Fall kein *low-copy*-Plasmid zur Verfügung. Sowohl für Fusionen mit TatA und TatE als auch mit TatB wurde kein Zellwachstum auf TMAO nachgewiesen (Abb. 3.41 A). Die einzige Tat-Komponente, die in ihrer Fähigkeit TorA zu transportieren nur schwach beeinträchtigt wurde, war erneut TatC (Abb. 3.41B). Mit Hilfe des *mid-copy*-Plasmides pDP wurde die Komplementation zu 100 Prozent erreicht und die Verschiebung im TMAO-Wachstum um ca. 72 h für die LexA(WT)-Fusion könnte auf der hohen Kopienzahl des verwendeten Vektors (pMS) beruhen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man annehmen, dass die TatA-, TatE- und TatB-Hybridproteine wahrscheinlich in ihrer Membraninsertion und in der daraus resultierenden Komplementation des Tat-System beeinträchtigt werden und dass Fusionen am N- oder C-Terminus weniger Einfluss auf die TatC-vermittelte Komplementation haben.

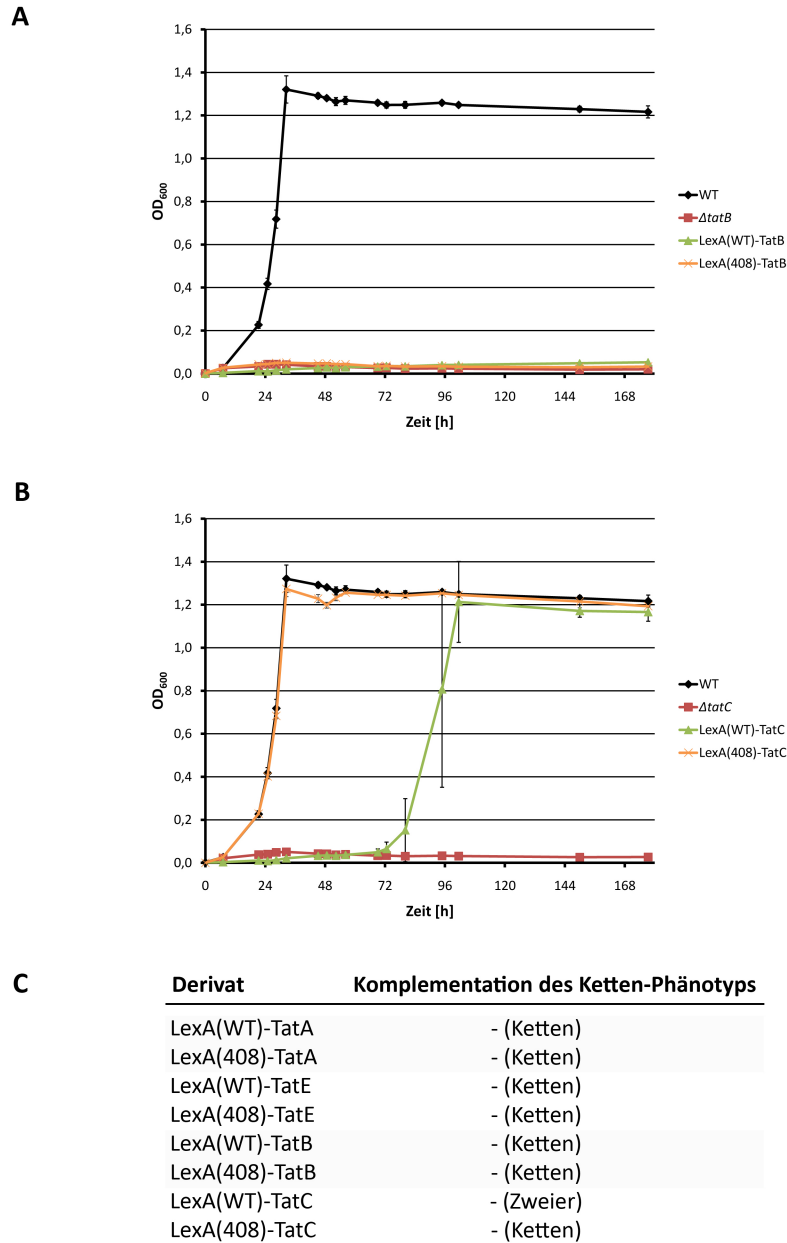


Abbildung 3.41: Einfluss der **[A]** LexA-TatB- bzw. **[B]** LexA-TatC-Hybridproteine auf den TorA- und Amidasen-Transport. Exemplarisch wurden nur Fusionen mit TatB aufgeführt. Es wurde das Zellwachstum in TMAO-Medium mit einer Dreifachbestimmung durchgeführt und die Standardabweichung ist mit Fehlerbalken erfasst. **[C]** Wachstum der *E. coli*-Stämme in LB-Medium; Komplementation des Tat-Systems (Ketten-Phänotyp). **WT** – MC4100 *ara^R*, **ΔtatB** – BØD, **LexA(WT)-TatB** – BØD pMS-*tatB-strep*, **LexA(408)-TatB** – BØD pDP-*tatB-strep*, **ΔtatC** – B1LKO, **LexA(WT)-TatC** – B1LKO pMS-*tatC-strep*, **LexA(408)-TatC** – B1LKO pDP-*tatC-strep*, **LexA(WT)-TatA** – JARV16 pMS-*tatA-strep*, **LexA(408)-TatA** – JARV16 pDP-*tatA-strep*, **LexA(WT)-TatE** – JARV16 pMS-*tatE-strep* und **LexA(408)-TatE** – JARV16 pDP-*tatE-strep*.

3.3.8 Bei allen Tat-Komponenten bis auf TatC können Homodimere mit Hilfe des LexA-basierten 2H-Systems nachgewiesen werden

Mit Hilfe des LexA-basierten 2H-Systems wurden zunächst alle Tat-Komponenten, TatA-Derivate und PspA auf Homodimerbildung untersucht (Abb. 3.42). Dafür wurden die entsprechenden Proteine mit dem LexA(WT)-Repressor fusioniert und in dem für Homodimerbildung geeigneten *E. coli*-Reporterstamm SU101 synthetisiert. Im Gegensatz zum BACTH-System würde eine Repression der β -Galaktosidaseaktivität auf eine Interaktion der Fusionsproteine hinweisen. Falls die Fusionsproteine nicht miteinander interagieren, würde eine der Negativkontrolle entsprechende Aktivität ermittelt werden.

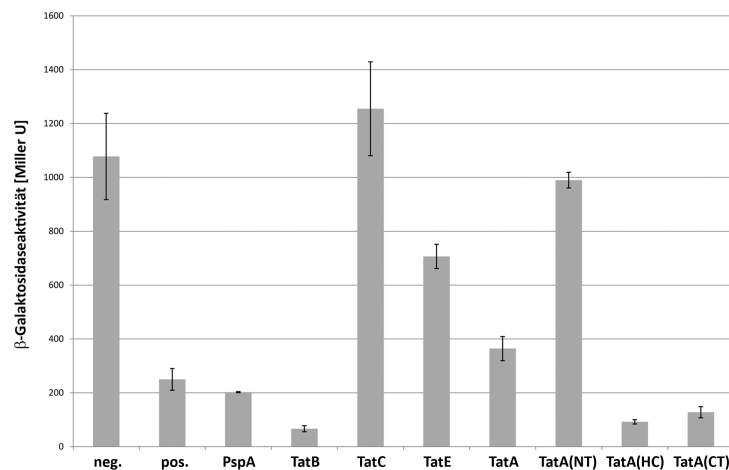


Abbildung 3.42: Der N-Terminus von TatA ist für die TatA-Oligomerisierung unwichtig. Induktion der Genexpression mit 1 mM IPTG; Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität der LexA-Fusionsproteine im *E. coli*-Reporterstamm SU101 durch eine Dreifachbestimmung; die Standardabweichung ist mit Fehlerbalken erfasst; **neg.** – SU101 (Negativkontrolle), **pos.** – SU101 pMS604 (Positivkontrolle), **PspA** – SU101 pMS-*pspA-strep*, **TatB** – SU101 pMS-*tatB-strep*, **TatC** – SU101 pMS-*tatC-strep*, **TatE** – SU101 pMS-*tatE-strep*, **TatA** – SU101 pMS-*tatA-strep*, **TatA(NT)** – SU101 pMS-*tatA(NT)-strep*, **TatA(HC)** – SU101 pMS-*tatA(HC)-strep* und **TatA(CT)** – SU101 pMS-*tatA(CT)-strep*.

Der Nachweis einer Selbstinteraktion von PspA mit Hilfe eines 2H-Systems ist sehr kompliziert, da Osadnik (2009) in seiner Diplomarbeit zeigen konnte, dass GFP-Fusionen destabilisierend auf PspA wirken. Im Fall des LexA-basierten 2H-Systems wurde jedoch eine starke Homodimerbildung für PspA nachgewiesen (Abb. 3.42), die sogar stärker als die Aktivität des Leucin-Zipper-Paares (Positivkontrolle) ist. Im Vergleich zum Vollängen-TatA wurde eine geringere β -Galaktosidaseaktivität für TatA-Fusionsproteine bestimmt, denen der N-Terminus bzw. der N-Terminus und die amphipathische Helix fehlte (Abb. 3.42). Demzufolge behindert der TatA-N-Terminus die Homodimer-

bildung, da dieser Bereich allein gesehen überhaupt keine Repression aufwies (Abb. 3.42). TatE entspricht in seinen strukturellen Eigenschaften TatA. So könnte die geringe Repression von gerade mal 30 Prozent wie schon bei TatA auf das Vorhandensein des N-Terminus zurückzuführen sein. Für das TatB-Hybridprotein wurde die stärkste und für TatC die schwächste Repression der β -Galaktosidaseaktivität ermittelt. Es wurde für TatC sogar ein Wert über dem der Negativkontrolle erhalten (jedoch im Rahmen der Standardabweichung). Dabei unterscheidet sich die Negativkontrolle von den untersuchten Stämmen auch darin, dass Plasmide fehlen (Leervektoren sind nicht im System vorgesehen), sodass z. B. keine entsprechenden Antibiotikazusätze gemacht werden können.

3.3.9 Die Interaktion von TatA mit PspA war mit dem LexA-basierten 2-Hybrid-System nicht nachzuweisen

Nachdem die Homodimerbildung untersucht wurde, sollte im Anschluss die Fähigkeit zur Heterodimerbildung geprüft werden. Dies konnte nicht im gleichen Reporterstamm untersucht werden, weil die LexA-Repressorbindestelle aus einer Wildtyp- und einer mutierten Halbseite bestehen muss, da sich sonst die ermittelte β -Galaktosidaseaktivität aus Werten für die Homo- und Heterodimerbildung zusammensetzen würde. Obwohl gezeigt werden konnte, dass sowohl TatA als auch PspA Homodimere bilden können und dass im Prinzip das LexA-2H-System im Reporterstamm SU101 funktioniert, so konnte keine Heterodimerbildung für beide Proteine nachgewiesen werden. Auch die Interaktionsstudien zu den Tat-Komponenten untereinander zeigten keine Heterodimere, sodass man vermuten könnte, dass sich dieses System für die Untersuchung von Membranproteinen nicht eignet und dass der Reporterstamm bzw. das pDP-Plasmid (codierend für den LexA(408)-Repressor) nicht richtig funktioniert haben.

3.4 *In-vivo*-Crosslinking von TatA

Das Ziel einer Vielzahl von Methoden ist es, Protein-Protein-Interaktionen möglichst innerhalb intakter Komplexe nachzuweisen. Affinitätschromatographische Anreicherungen bergen immer auch das Risiko, dass eventuelle Bindungspartner nur transiente oder zeitlich begrenzte Interaktionen eingehen und dissoziieren, sodass sie im Anschluss eventuell nicht mehr nachweisbar sind. Aus diesem Grund wurden positionsspezifische Crosslinker entwickelt, die Komplexe in ihrer natürlichen Umgebung fixieren

können. In dieser Arbeit wurde der photoaktivierbare Crosslinker pBpa (p-Benzoyl-L-Phenylalanin) verwendet (Kauer *et al.*, 1986), der an zuvor gezielt ausgewählten Positionen in der Transmembranhelix von TatA anstelle des Amber-Stopp-Codons TAG *in vivo* inkorporiert wurde (Chin und Schultz, 2002). Dabei stellt die unnatürliche Aminosäure pBpa eine Erweiterung des genetischen Codes von *E. coli* dar (Chin und Schultz, 2002). Während der Translation wird pBpa mit Hilfe einer mutierten Tyrosyl-tRNA-Synthetase und einer Amber-Suppressor-tRNA aus *Methanococcus jannaschii* anstelle des Amber-Stopp-Codons in die Primärsequenz eingebaut. Das orthogonale Aminoacyl-tRNA-Synthetase/tRNA-Paar ist auf dem Helferplasmid pEVOL codiert, dessen Genexpression durch die Zugabe von 1 μ M Arabinose induziert wird (Young *et al.*, 2010). Nach der Zellanzucht wurden die *E. coli*-Kulturen 30 min bei ca. 350 nm bestrahlt, wodurch die Benzophenon-Gruppe des pBpa mit den C-H-Bindungen in ihrer Umgebung reagierte. Erst jetzt wurden die Zellen aufgeschossen und die interagierenden Komplexe identifiziert.

Mit Hilfe dieser Methode sollte die eventuelle Bindungsstelle des PspAs in der Transmembrandomäne von TatA näher charakterisiert werden. Die Positionen innerhalb der TMH von TatA ergaben sich daraus, dass möglichst hydrophobe Aminosäuren gegen pBpA ausgetauscht werden sollten. Insgesamt wurden 13 verschiedene Positionen untersucht (Abb. 3.43).

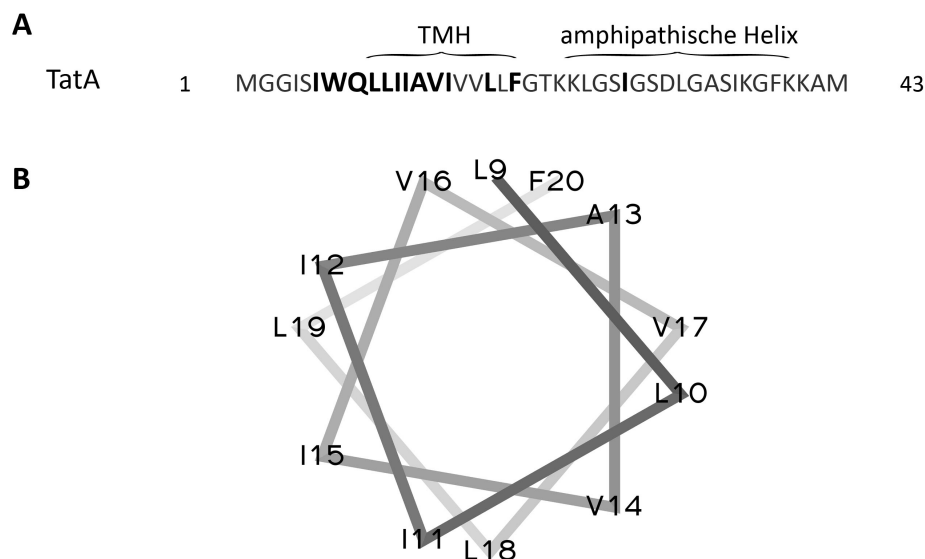


Abbildung 3.43: Schematische Übersicht **[A]** der Positionen der verwendeten Stopp-Codons in TatA und **[B]** Anordnung der Reste innerhalb der TMH. Innerhalb der Übersicht der TMH und der amphipathischen Helix von TatA (AS 1-43) sind die Aminosäurereste rot markiert, die durch das Amber-Stopp-Codons TAG ersetzt wurden. Darstellung des *helical wheel* der AS L9 bis F20 der TMH von TatA (<http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>)

Dabei wurde der Bereich zwischen den Aminosäuren I6 bis I15 vollständig abgedeckt. Die Positionen L18 und F20 sind am carboxyterminalen Ende der Transmembranhelix lokalisiert und als Kontrolle wurde das Isoleucin 28 in der amphipathischen Helix untersucht, da in den Interaktionsanalysen gezeigt werden konnte (Abb. 3.7), dass der N-Terminus von TatA ausreichend für eine Interaktion mit PspA ist. Alle 13 TatA-Varianten wurden auf einem *high-copy*- sowie einem *low-copy*-Expressionsniveau untersucht, welches etwa dem chromosomalen Level an TatA entspricht. Die Proteinbiosynthese wurde entweder durch 0,1 % Rhamnose induziert (pBW-Plasmid) oder konstitutiv durch den *tatA*-Promotor (pAH-Plasmid) reguliert. Für die annähernd chromosomale Synthese der TatA-Derivate wurden zunächst das Amber-Stopp-Codon an die entsprechenden Positionen durch Mutagenese eingeführt und danach durch Single-copy-Integration anstelle der λ -*attachment-site* in das *E. coli*-Genom inkorporiert (siehe Abschnitt 2.2.15).

Für die Untersuchung der verschiedenen TatA-Derivate wurden zunächst die Membranproteine mit 0,5 % SDS solubilisiert, affinitätschromatographisch angereichert und die Elutionsfraktionen der *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie wurden im Anschluss mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit den entsprechenden Antikörpern auf kovalent gecrosslinkte Proteine analysiert. TatA konnte entweder mit dem α -TatA oder dem *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat nachgewiesen werden. Für die Detektion des chromosomalen PspAs wurde ein depletierter PspA-Antikörper verwendet, der nur an PspA-spezifische Epitope binden sollte. Da alle untersuchten Positionen innerhalb der Transmembranhelix oder der amphipathischen Helix lagen und TatA große oligomere Komplexe in der CPM ausbildet (Oates *et al.*, 2005), wurden hauptsächlich kovalent gecrosslinkte TatA-Protomere nachgewiesen. Je nachdem wie hochauflösend die SDS-PAGE war, konnten sowohl Monomere als auch Heptamer-TatA-Komplexe detektiert werden. Das Hauptaugenmerk lag allerdings auf fixierten TatA-PspA-Komplexen, die infolge der rekombinanten Produktion der TatA-Derivate gecrosslinkt vorliegen sollten.

Für die TatA-Varianten I6, L9, L10-I12, L18, F20 und I28 wurden Proteine mit dem α -PspA detektiert, die nicht auf Höhe des PspA-Monomers bei ca. 25 kDa lagen. Exemplarisch für alle anderen wurden nur die Anreicherungen der rekombinanten TatA-Derivate I6, F20 und I28 aufgeführt (Abb. 3.44 und Abb. A.6). Sowohl für die Position 6 als auch für die Position 20 wurden TatA-Protomere zwischen 15 kDa und ca. 100 kDa

nachgewiesen. Dabei fiel auf, dass das TatA-Derivat vor dem UV-Crosslink als Einzelbande bei ca. 15 kDa nachgewiesen wurde und nach der Solubilisierung der Membranen diese Proteinbande verschwand bzw. ein kleiner *shift* in Richtung 17 kDa vollzogen wurde und jetzt eine Doppelbande detektiert wurde (Abb. 3.44A, B Spur Ind. und M). Diese Doppelbanden könnten an TatA gecrosslinkte Lipide darstellen, wodurch sich das Laufverhalten TatAs nur geringfügig veränderte. Chromosomales PspA wurde vor allem in Proben der solubilisierten Membranfraktion und dem Durchlauf der *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie bei ca. 25 kDa nachgewiesen (Abb. 3.44B). In den Elutionsfraktionen wurde es nur leicht retardiert, wodurch monomeres PspA nicht als eluiertes Protein angesehen werden konnte. Es wurden allerdings bei ca. 38 kDa und bei 60 kDa eluierende Proteine nachgewiesen, die sowohl durch das *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat als auch den α -PspA erkannt wurden (Abb. 3.44A, B durch einen * gekennzeichnet). Diese Proteine könnten gecrosslinkte TatA-PspA-Komplexe darstellen.

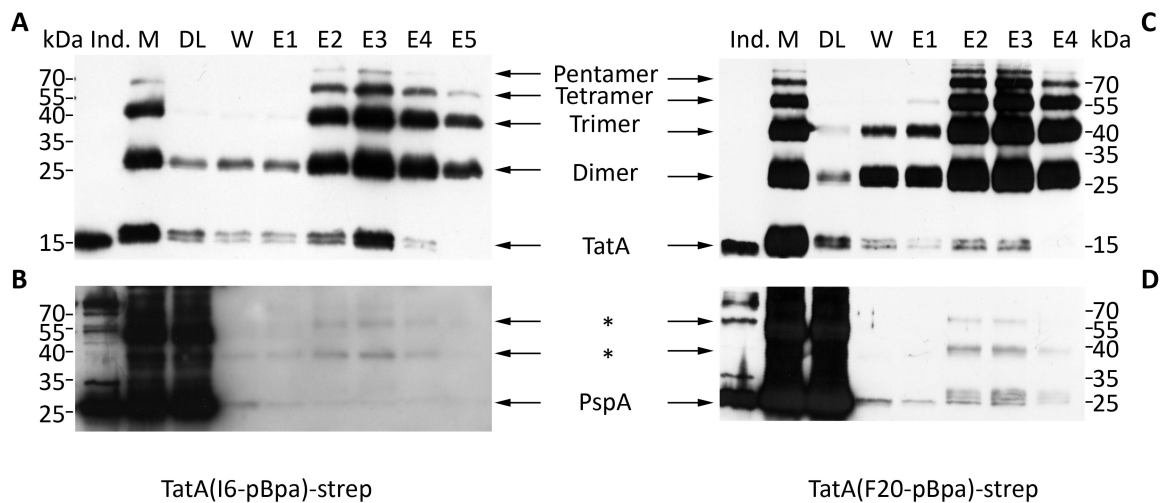


Abbildung 3.44: Anreicherung der TatA-Derivaten aus 0,5% SDS solubilisierten Membranen der Stämme [A-B] JARV16 ara^R pBW-*tatA*(I6-pBpa)-*strep*, pEVOL bzw. [C-D] JARV16 ara^R pBW-*tatA*(F20-pBpa)-*strep*, pEVOL mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. [A, C] *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat, [B, D] α -PspA; 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; Ind. – Probe vor UV-Crosslink, M – mit 0,5% SDS solubilierte Membranfraktion, DL – Durchlauf der Affinitätssäule, W – Letzte Waschfraktion, E1, . . . , E5 – Elutionsfraktionen 1 bis 5, * – möglicher Crosslink zwischen TatA und PspA.

Die erhaltenen Komplexe könnten auch Artefakte der rekombinanten Produktion der TatA-Derivate sein. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen mit single-copy-integrierten TatA-Derivaten erneut durchgeführt (Abb. 3.45). Aufgrund des niedrigen Expressionsniveaus wurde TatA zumeist nur sehr schwach von ca. 15 kDa bis 60 kDa in den Elutionsfraktionen nachgewiesen (Abb. 3.45A). Wie schon zuvor bei rekombi-

nantem TatA beobachtet, konnten erneut eventuelle Lipidcrosslinks bei ca. 17-20 kDa mit dem α -TatA detektiert werden. PspA-spezifische Proteinbanden konnten nur für die TatA-Derivate F20 und I28 detektiert werden. Chromosomales PspA wurde vor allem in Proben der solubilisierten Membranfraktion und dem Durchlauf der *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie bei ca. 25 kDa nachgewiesen (Abb. 3.45B). In den Elutionsfraktionen wurde es nur leicht retardiert, wodurch monomeres PspA nicht als eluiertes Protein angesehen werden konnte. Es wurden allerdings bei ca. 38 kDa und bei 60 kDa eluierende Proteine nachgewiesen, die sowohl durch das *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat als auch den α -PspA erkannt wurden (Abb. 3.45A, B durch einen * gekennzeichnet). Die Bandenintensitäten der PspA-Komplexe waren für das TatA-attB(I28)-Derivat stärker als für TatA-attB(F20).

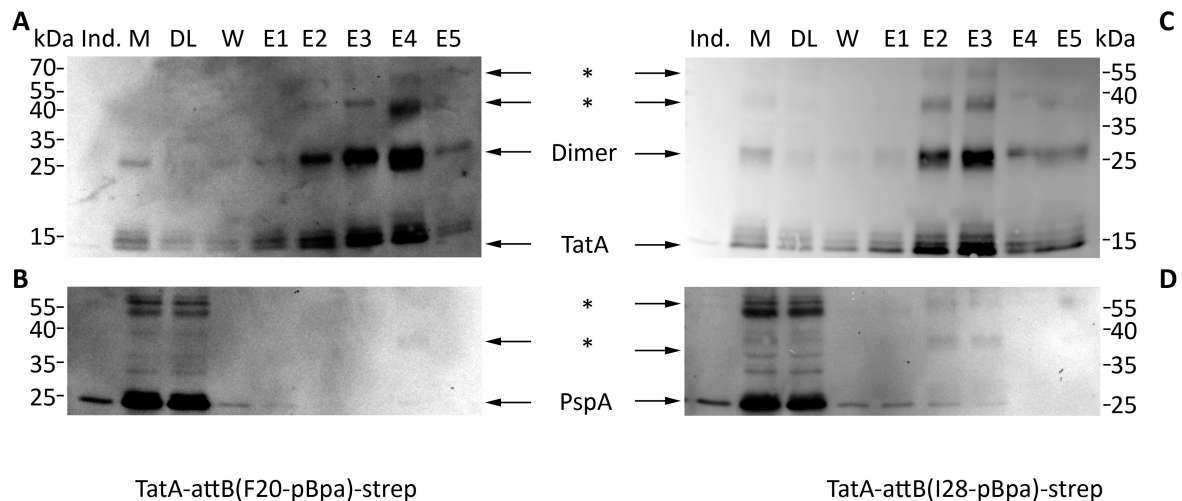


Abbildung 3.45: Anreicherung der TatA-Derivaten aus 0,5 % SDS solubilisierten Membranen der Stämme [A-B] JARV16 *ara^R attB::tatA(F20-pBpa)-strep* bzw. [C-D] JARV16 *ara^R attB::tatA(I28-pBpa)-strep* mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. [A, C] α -TatA, [B, D] α -PspA; 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; **Ind.** – Probe vor UV-Crosslink, **M** – mit 0,5 % SDS solubilisierte Membranfraktion, **DL** – Durchlauf der Affinitätssäule, **W** – Letzte Waschfraktion, **E1, . . . , E5** – Elutionsfraktionen 1 bis 5, * – möglicher Crosslink zwischen TatA und PspA.

Da sowohl nach rekombinanter Produktion als auch unter annähernd chromosomalen Bedingungen TatA mit PspA kovalent gecrosslinkt werden konnten, stellt diese Methode eine weitere Bestätigung für die Interaktion von PspA mit TatA dar.

3.5 Funktionalitätsanalysen von mutierten Tat-Systemen

In *E. coli* existieren drei Tat-Komponenten (TatA, TatB und TatC), die für den Tat-Transport essentiell sind (Sargent *et al.*, 1998b, 1999; Weiner *et al.*, 1998; Bogesch *et al.*,

1998). Für die Funktion des Tat-Systems sind höchstwahrscheinlich konservierte Positionen in den Tat-Komponenten von großer Bedeutung, durch die überhaupt erst Interaktionen der Untereinheiten ermöglicht werden. Veränderungen in diesen Bereichen können sowohl strukturelle als auch mechanistische Auswirkungen nach sich ziehen. Der strukturelle Aufbau von TatA und TatB ist sehr ähnlich. Beide Proteine weisen eine N-terminale Transmembranhelix auf, gefolgt von einer flexiblen *hinge*-Region, einer amphipathischen Helix und einem unstrukturierten C-Terminus (Sargent *et al.*, 1998b; Chanal *et al.*, 1998). In TatA befinden sich konservierte Bereiche vor allem im Übergang zwischen dem C-terminalen Ende der Transmembranhelix und der *hinge*-Region (FG) und am C-terminalen Ende der amphipathischen Helix (F39K40, Hou und Brüser, 2011). Auch für TatB wurde ein konservierter Bereich um den *hinge* (FPxxLP) bestimmt, wobei TatB im Unterschied zu TatA an Position 21 kein Glycin sondern ein Prolin aufweist (Hu *et al.*, 2010). Innerhalb dieser Arbeit wurden ausgesuchte Bereiche in der Transmembranhelix (Abschnitt 3.5.1), im *hinge* und der amphipathischen Helix (Abschnitt 3.5.2) untersucht.

3.5.1 Funktionsanalysen von mutierten Tat-Systemen in der Transmembranhelix

Mit Hilfe von Interaktions- und Induktionsstudien zu PspA wurde gezeigt, dass Veränderungen (Ladungen, Hydrophobizität) im N-Terminus von TatA (AS 1-20) Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisation von TatA haben (siehe Abschnitt 3.1 und 3.2). Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Position 8 (Q8) gelegt, da dieser Rest für die Tat-Funktion wichtig aber nicht essentiell sein soll (Greene *et al.*, 2007; Warren *et al.*, 2009). N-terminal von Q8 sind zumeist nur hydrophobe Reste, weshalb hier der Übergang zur Transmembranhelix sein könnte. Die Positionen der untersuchten AS-Austausche innerhalb der Transmembranhelix sind in der Abbildung 3.46 schematisch dargestellt.

Ob diese Mutationen Auswirkungen auf die Effizienz des Tat-Systems haben, wurde mit Hilfe von Transportassays für die Tat-Substrate HiPIP, AmiA und AmiC sowie TorA untersucht.

Die veränderten TatA-N-Termini wurden stets vom *high-copy*-Plasmid pBW codiert und die Proteinbiosynthese wurde durch die Zugabe von 0,1% Rhamnose induziert. Als Negativkontrolle diente der Leervektor pBW22 und als Positivkontrolle wurde das

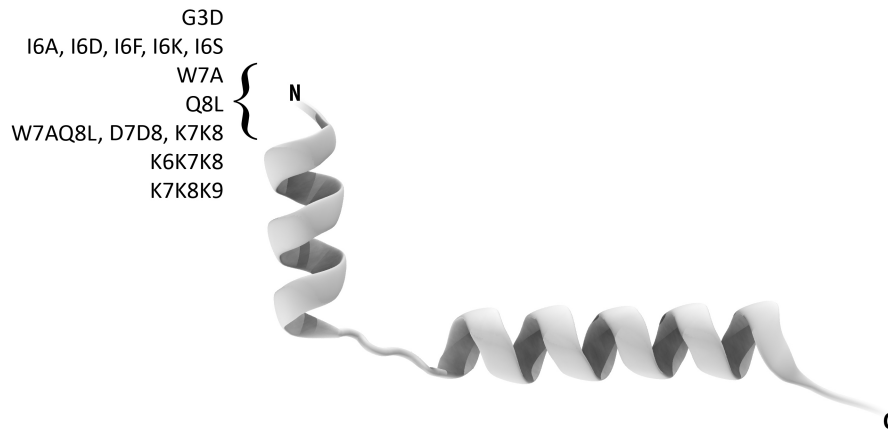


Abbildung 3.46: Schematisch sind alle untersuchten AS-Austausche innerhalb der Transmembranhelix von TatA dargestellt.

Plasmid pBW-*tatA-strep* verwendet.

3.5.1.1 Funktionalitätsanalysen von TatA-Derivaten mit dem Substrat HiPIP

HiPIP, das *high potential iron-sulfur protein*, ist ein periplasmatisches Protein aus *Allochromatium vinosum* und weist ein Molekulargewicht von 9 kDa auf. Für die Transportstudien wurde das Plasmid pRK-*hip* verwendet, bei dem die Genexpression unter der Kontrolle des konstitutiven *tatA*-Promotors steht (Brüser *et al.*, 2003). Subzelluläre Fraktionierungen wurden in einem Δ *tatABCDE*-Hintergrund (DADE) durchgeführt, wobei TatB und TatC durch das konstitutive pABS-Plasmid rekombinant produziert wurden. Durch dieses Plasmid wird auch TatA codiert, jedoch wurde das Start-Codon durch eine MfeI-Schnittstelle ersetzt, sodass *tatA* nicht mehr transkribiert werden kann (Behrendt, Dissertation in Vorbereitung). HiPIP liegt im Cytoplasma als *precursor* mit einem N-terminalen Signalpeptid vor. Während des Transportes über die Cytoplasmamembran ins Periplasma wird das Signalpeptid entfernt, sodass nur das mature Protein im Periplasma vorliegen sollte.

Für alle Stämme wurden subzelluläre Fraktionierungen durchgeführt. Die verschiedenen zellulären Kompartimente, Cytoplasma (CP), Membranen (M) und Periplasma (PP), wurden im Anschluss mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Die Lokalisation des Tat-Substrates HiPIP wurde mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Als Kontrolle der Fraktionierung wurde für jede Fraktion die Verteilung des Biotin-Carboxyl-Carrier-Proteins untersucht. Dieses cytoplasmatische Protein sollte nur im CP und nicht im PP nachgewiesen werden. Eine periplasmatische Lokalisation des BCCP deutet daher auf eine Kontamination des Periplasmas durch das Cytoplasma hin, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, ob in der PP-Fraktion sichtbares, matures HiPIP durch eine Verunreinigung mit abgebautem cytoplasmatischen HiPIP entstanden ist, oder es sich um tatsächlich während eines erfolgreichen Transportvorganges prozessiertes matures HiPIP handelt. Gleichzeitig wurde die subzelluläre Lokalisation der TatA-Varianten durch das *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat bestimmt.

Um eindeutige Aussagen über das Transportverhalten treffen zu können, wurden zunächst die Kontrollen analysiert (Abb. 3.47A, linke und mittlere Fraktionierung). Bei rekombinanter Produktion von TatA-strep (Positivkontrolle) wurde die *tat*-Deletion im Stamm DADE wie erwartet komplementiert und HiPIP transportiert. Der *precursor* konnte nur im Cytoplasma bei ca. 16 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3.47A Mitte, Spur CP). Matures HiPIP wurde bei ca. 13 kDa signifikant im Periplasma nachgewiesen (Abb. 3.47A, mittlere Fraktionierung, Spur PP). In der Negativkontrolle wurde HiPIP im CP als *precursor* und auf maturaer Größe nachgewiesen (Abb. 3.47A, linke Fraktionierung). Matures HiPIP konnte nicht im PP detektiert werden, da der Transport aufgrund des fehlenden TatAs blockiert wurde.

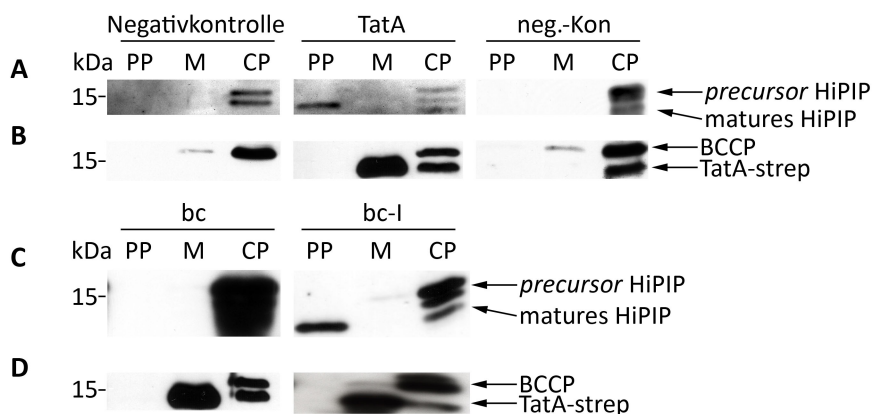


Abbildung 3.47: *In-vivo*-Translokationsanalyse der mutierten Tat-Systeme TatA(neg.-Kon), TatA(bc) und TatA(bc-I) für HiPIP 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; [A, C] α -HiPIP und [B, D] *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat; Analyse subzellulärer Fraktionen der Stämme **Negativkontrolle** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW22; **TatA** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW-*tatA-strep* (Positivkontrolle); **neg.-Kon** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW-*tatA*(neg.-Kon)-*strep* (4fach STGGG-*linker* anstatt N-Terminus von TatA; **bc** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW-*tatA*(bc)-*strep* (AS 2-6 STGGG-*linker*) und **bc-I** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW-*tatA*(bc-I)-*strep* (AS 2-5 STGG-*linker*) nach Expression von *hip* (pRK-*hip*); Periplasma (PP), Membranen (M), Cytoplasma (CP) und Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein (BCCP).

Eine ähnliche Kontrolle stellte das TatA(neg.-Kon)-Derivat dar. Wie zuvor schon näher beschrieben (siehe Abb. 3.23), wurde der gesamte N-Terminus durch einen vierfachen STGGG-*linker* ausgetauscht, sodass TatA nicht mehr in der Membran sondern in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.47B, rechte Fraktionierung). Auch in diesem Fall wurde der Tat-Transport blockiert. Veränderte man den N-Terminus von TatA so, dass nur die Positionen 2 bis 5 durch einen *linker* ausgetauscht wurden, konnte matures HiPIP im CP detektiert werden (Abb. 3.47C, rechte Fraktionierung). Wurde auch die Position 6 substituiert, akkumulierte HiPIP im CP (Abb. 3.47C, linke Fraktionierung). Somit konnte mit diesen Ergebnissen zum ersten Mal gezeigt werden, dass im Falle des kleinen Proteins HiPIP der Transport nicht an die subzelluläre Lokalisation von TatA gekoppelt ist, da beide TatA-Derivate in der Membran nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.47D).

Die Position I6 ist in TatA nicht konserviert. Es wurde aber erst ein Transport des HiPIPs nachgewiesen, sobald die Transmembranhelix aus ihren natürlicherweise vorkommenden AS 6-20 bestand. Deshalb wäre es denkbar, dass Veränderungen der Größe, der Hydrophobizität und der Ladung innerhalb dieser Position einen Effekt auf das Tat-System haben könnten (Abb. 3.48).

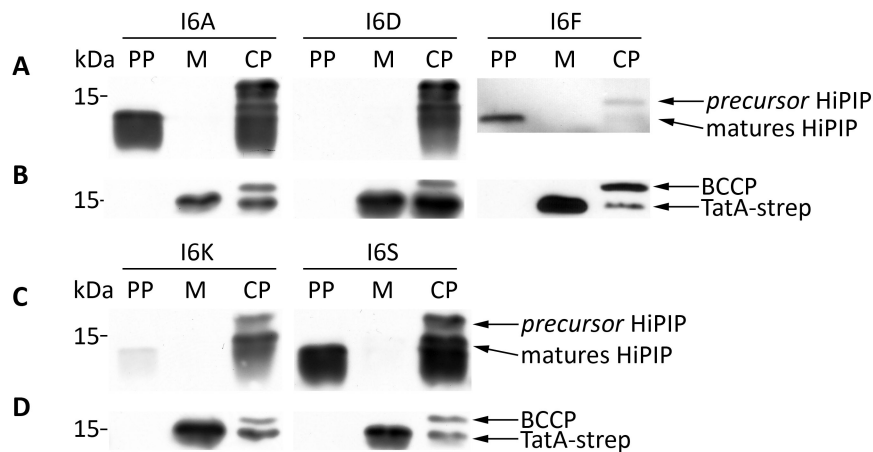


Abbildung 3.48: *In-vivo*-Translokationsanalyse der mutierten Tat-Systeme TatA(I6A), TatA(I6D), TatA(I6F), TatA(I6K) und TatA(I6S) für HiPIP 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; [A, C] α -HiPIP und [B, D] *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat; Analyse subzellulärer Fraktionen der Stämme **I6A** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW-*tatA*(I6A)-*strep*; **I6D** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW-*tatA*(I6D)-*strep*; **I6F** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW-*tatA*(I6F)-*strep*; **I6K** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW-*tatA*(I6K)-*strep* und **I6S** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW-*tatA*(I6S)-*strep* nach Expression von *hip* (pRK-*hip*); Periplasma (PP), Membranen (M), Cytoplasma (CP) und Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein (BCCP).

An Position 6 hatten sowohl die polare AS Serin (I6S), die leicht unpolare AS Ala-

nin (I6A) als auch die hydrophobe AS Phenylalanin (I6F) keinen Einfluss auf den Transport des *precursor* in das PP (Abb. 3.48A, C). In allen drei Fraktionierungen wurde TatA sowohl in den Membranen als auch im CP nachgewiesen (Abb. 3.48B, D). Für das TatA(I6F)-Derivat wurde weniger akkumuliertes HiPIP in der Cytoplasmafraktion nachgewiesen, als für TatA(I6A) (Abb. 3.48A, linke und rechte Fraktionierung). Ein Austausch von I6 gegen Lysin (I6K) brachte den Translokationsvorgang bis auf eine noch zu verzeichnende leichte Restaktivität nahezu vollständig zum Erliegen (Abb. 3.48C, linke Fraktionierung). Obwohl etwa die gleiche TatA-Bandenintensität für TatA(I6A) und TatA(I6K) in der Membran detektiert wurde, konnte HiPIP nur als sehr schwache Bande bei ca. 13 kDa nachgewiesen werden. Eine Kontamination des PP durch das CP wurde ausgeschlossen, weil das BCCP nur im Cytoplasma detektierbar war. Der Austausch des Isoleucins gegen eine negative Ladung hatte zur Folge, dass kein matures HiPIP im PP nachgewiesen wurde, und dass TatA etwa zu gleichen Teilen in der Membran und im CP vorlag (Abb. 3.48A, B mittlere Fraktionierung). Allerdings ist dieser Funktionsverlust erstaunlich, da im TatA in der Thylakoidmembran auch eine negative Ladung (E10) in der Transmembranhelix natürlicherweise vorkommt.

Wenn man davon ausgeht, dass die Transmembranhelix erst ab dem Leucin 9 beginnt, dann würde der Position 8 eine entscheidende Rolle zufallen. Q8 soll für die Oligomerisierung von TatA bedeutend sein (Greene *et al.*, 2007). Dies konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden, da nur ein sehr schwaches HiPIP-Signal im PP detektiert wurde (Abb. 3.49A, B Q8L). Eine Kontamination des PP wurde ausgeschlossen, obwohl sehr schwache Banden des *precursor* in der PP-Fraktion detektierbar waren.

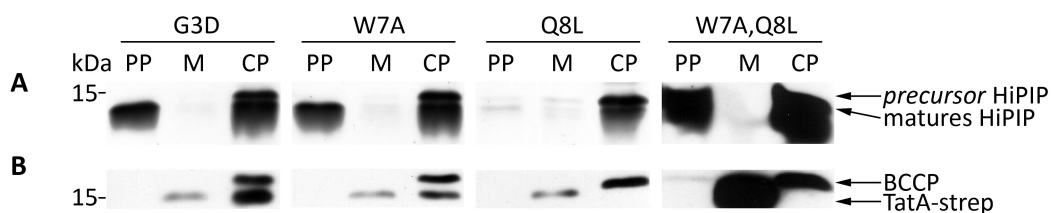


Abbildung 3.49: *In-vivo*-Translokationsanalyse der mutierten Tat-Systeme TatA(G3D), TatA(W7A), TatA(Q8L) und TatA(W7A,Q8L) für HiPIP 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; [A] α -HiPIP und [B] Strep-Tactin-HRP-Konjugat; Analyse subzellulärer Fraktionen der Stämme **G3D** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW-*tatA*(G3D)-*strep*; **W7A** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW-*tatA*(W7A)-*strep*; **Q8L** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW-*tatA*(Q8L)-*strep* und **W7A,Q8L** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW-*tatA*(W7A,Q8L)-*strep* nach Expression von *hip* (pRK-*hip*); Periplasma (PP), Membranen (M), Cytoplasma (CP) und Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein (BCCP).

Wurde allerdings die stark hydrophobe AS Tryptophan gegen die kleine AS Alanin aus-

getauscht, hatte dies keine Auswirkungen auf das Tat-System. Erst eine Kombination beider Positionen blockierte den Transport vollständig (Abb. 3.49A W7A, Q8L). Die Verlängerung des hydrophoben Bereiches hatte demzufolge negative Auswirkungen auf den Tat-Transport. Gleichzeitig schien es von Bedeutung zu sein, an welcher Position im N-Terminus eine negative Ladung war. So wurde der HiPIP-Transport vollständig blockiert, wenn ein Isoleucin gegen ein Glutamat an Position 6 ausgetauscht wurde. Im Falle des Austausches an Position 3 wurde HiPIP ungehindert im PP nachgewiesen (Abb. 3.49B, Q8L), obwohl auch hier mehr TatA im CP als in den Membranen nachweisbar war.

Natürlicherweise kommen in TatB an Position 8 ein Glutamat und in TatE an gleicher Position ein Lysin vor. Wurden jedoch analog dazu in TatA zwei oder drei AS im Übergangsbereich der Transmembranhelix (Positionen 6-9) gegen negative bzw. positive Ladungen ausgetauscht, konnte kein Transport des HiPIPs nachgewiesen werden (Abb. 3.50A). Alle vier TatA-Derivate konnten den *tat*-Deletionsstamm nicht komplementieren, obwohl ausreichend TatA in den Membranen detektiert wurde (Abb. 3.50B).

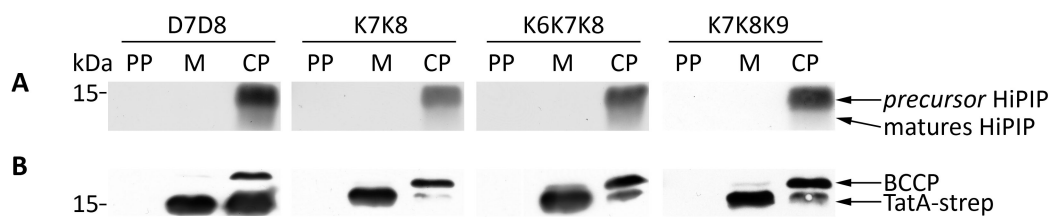


Abbildung 3.50: *In-vivo*-Translokationsanalyse der mutierten Tat-Systeme TatA(D7D8), TatA(K7K8), TatA(K6K7K8) und TatA(K7K8K9) für HiPIP 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; [A] α -HiPIP und [B] *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat; Analyse subzellulärer Fraktionen der Stämme **D7D8** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW-*tatA*(D7D8)-*strep*; **K7K8** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW-*tatA*(K7K8)-*strep*; **K6K7K8** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW-*tatA*(K6K7K8)-*strep* und **K7K8K9** – DADE pABS-*tatA*(MfeI>ATG)BC, pBW-*tatA*(K7K8K9)-*strep* nach Expression von *hip* (pRK-*hip*); Periplasma (PP), Membranen (M), Cytoplasma (CP) und Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein (BCCP).

3.5.1.2 Einfluss der TatA-Derivate auf die Zellteilung

In *E. coli* werden neben Cofaktor-haltigen auch Cofaktor-freie Tat-Substrate transportiert. Zu ihnen zählen die Amidasen AmiA und AmiC (Bernhardt und De Boer, 2003; Ize *et al.*, 2003), die an der Auflösung des Mureinseptums zwischen den Tochterzellen nach einer Zellteilung beteiligt sind. In *E. coli* existiert eine weitere Amidase AmiB, die jedoch Sec-abhängig transportiert wird (Ize *et al.*, 2003). Überexpression von *amiB*

kann in einem *tatC*-Deletionsstamm den *tat*⁻-Phänotyp (Ketten) revertieren (Ize *et al.*, 2003), obwohl die Amidasen AmiA und AmiC nicht Tat-abhängig transportiert werden können. Werden beide Amidasen nicht mehr effizient in den periplasmatischen Raum transportiert, bleiben die Tochterzellen nach der Zellteilung aneinander haften. Zellen erscheinen in diesem Falle mit dem Lichtmikroskop nicht mehr als Einzelzellen, sondern bilden lange Ketten. Daraus entwickelte sich die Bezeichnung des Ketten-Phänotyps. Vor der Untersuchung der *tatAE*-Deletionsstämme mittels Lichtmikroskop wurde Plasmid-codiertes *tatA* mit und ohne Mutationen durch die Zugabe von 0,1% Rhamnose induziert. Zunächst wurden die Positiv- und die Negativkontrolle analysiert und mit dem *tat*-WT-Stamm MC4100 verglichen. Rekombinant produziertes TatA konnte den *tat*⁻-Phänotyp komplementieren, sodass einzelne Zellen sichtbar waren (Abb. 3.51B, C). Wenn statt des *tatA*-codierten Plasmides der Leervektor verwendet wurde, konnten sich die Zellen nach der Zellteilung nicht voneinander ablösen und bildeten Ketten aus (Abb. 3.51A). Der komplette (AS 2-20, hier nicht gezeigt) bzw. der teilweise (AS 2-6) Austausch des N-Terminus gegen einen 4fach bzw. 1fach STGGG-*linker* führte zum Funktionsverlust des Tat-Systems (Abb. 3.51D). Wie schon für den Transport des Hi-PIPs beobachtet, führte die Verlängerung des unveränderten N-Terminus um nur ein Isoleucin zur Komplementation des Tat-Systems, sodass einzelne Zellen nachgewiesen wurden (Abb. 3.51E).

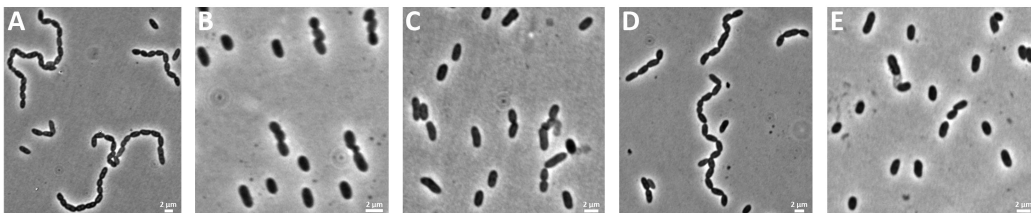


Abbildung 3.51: Überexpression von *tatA(bc-I)-strep* führte zur Komplementation des Tat-Systems im Deletionsstamm JARV16. Lichtmikroskopische Aufnahmen von TatA-Derivaten im Vergleich zum Wildtyp- und Deletionsstamm; In jeder Abbildung ist ein Größenstandard von 2 µm dargestellt.; **A** – JARV16 *tatA/E*-Deletionsstamm, **B** – MC4100 *ara*^R (WT), **C** – JARV16 pBW-*tatA-strep*, **D** – JARV16 pBW-*tatA(bc)-strep* und **E** – JARV16 pBW-*tatA(bc-I)-strep*.

Im Anschluss wurde der Einfluss des Isoleucins auf die Zellteilung untersucht, indem wie schon für die HiPIP-Translokationsanalysen die Position 6 (I6) gegen positive und negative Ladungen ausgetauscht wurde. Veränderungen in der Hydrophobizität dieser Position (I6A, I6F und I6S) hatten keinen Einfluss auf das Tat-System, wohingegen Ladungen jeglicher Art den Transport der Amidasen blockierten und Ketten nachge-

wiesen wurden (Abb. 3.52).

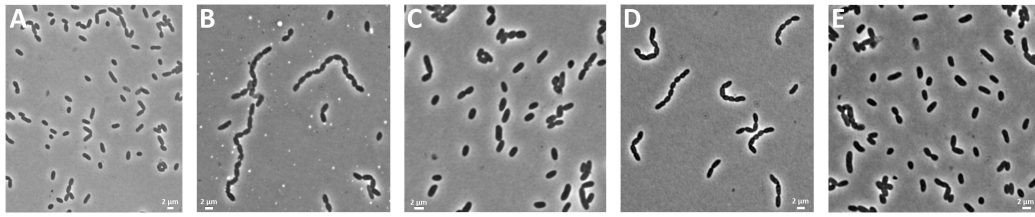
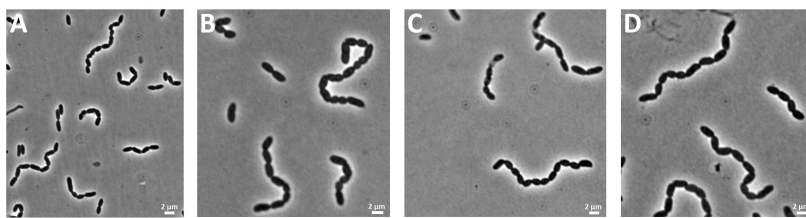


Abbildung 3.52: Ladungen in Position 6 der TMH führen zum Funktionsverlust. Lichtmikroskopische Aufnahmen von TatA-Derivaten; In jeder Abbildung ist ein Größenstandard von $2\ \mu\text{m}$ dargestellt.; **A** – JARV16 pBW-*tatA*(I6A)-*strep*, **B** – JARV16 pBW-*tatA*(I6D)-*strep*, **C** – JARV16 pBW-*tatA*(I6F)-*strep*, **D** – JARV16 pBW-*tatA*(I6K)-*strep* und **E** – JARV16 pBW-*tatA*(I6S)-*strep*.

Wie schon für das Tat-Substrat HiPIP gesehen, konnten mutierte Tat-Systeme im Übergang zur Transmembranhelix den *tat*⁻-Phänotyp nicht komplementieren (Abb. 3.53A-D, E TatA(Q8L)). Es waren nur Ketten sichtbar. Bei dem Austausch eines Tryptophans gegen ein Alanin wurde im Gegensatz zum HiPIP die Effizienz des Tat-Systems für die Amidasen herabgesetzt. Neben Einzelzellen, wurden auch Zweier und kurze Ketten beobachtet (Vergleich Abb. 3.49A und Abb. 3.53E).



E

Derivat	Komplementation des Ketten-Phänotyps
TatA(G3D)	+
TatA(W7A)	(+)
TatA(Q8L)	- (Ketten)
TatA(W7A,Q8L)	- (Ketten)

Abbildung 3.53: Ladungen um den Übergang zur TMH führen zum Funktionsverlust. [**A-D**] Lichtmikroskopische Aufnahmen von TatA-Derivaten und [**E**] Transport der Amidasen in TatA-Mutanten; In jeder Abbildung ist ein Größenstandard von $2\ \mu\text{m}$ dargestellt.; + – Transport der Amidasen in das Periplasma; - – Blockade, Ketten-Phänotyp; (+) – eingeschränkter Transport; **A** – JARV16 pBW-*tatA*(D7D8)-*strep*, **B** – JARV16 pBW-*tatA*(K7K8)-*strep*, **C** – JARV16 pBW-*tatA*(K6K7K8)-*strep*; **D** – JARV16 pBW-*tatA*(K7K8K9)-*strep*; **E** – **TatA(G3D)** – JARV16 pBW-*tatA*(G3D)-*strep*; **TatA(W7A)** – JARV16 pBW-*tatA*(W7A)-*strep*; **TatA(Q8L)** – JARV16 pBW-*tatA*(Q8L)-*strep* und **TatA(W7A,Q8L)** – JARV16 pBW-*tatA*(W7A,Q8L)-*strep*.

3.5.1.3 Funktionalitätsanalysen von TatA-Derivaten mit dem Substrat TorA

Die TMAO-Reduktase wird Tat-abhängig transportiert und befähigt Zellen unter anaeroben Bedingungen TMAO als einzige Energiequelle zu Trimethylamin zu reduzieren. Demzufolge ist ein Wachstum auf TMAO nur möglich, wenn TorA Tat-abhängig transportiert wird (Santini *et al.*, 1998).

Für die Untersuchungen zum Transport der TMAO-Reduktase wurde der *tatAE*-Deletionsstamm (JARV16) genutzt. Die Proteinbiosynthese der TatA-Derivate wurde im M9-Medium durch Glukose reprimiert. Dem TMAO-Medium konnte keine Rhamnose als Induktor zugesetzt werden, weil diese sonst verstoffwechselt würde und nicht zur Induktion des Rhamnose-Promotors gedient hätte. Als Positivkontrolle wurde der Tat-WT-Stamm MC4100 verwendet, der schon nach 24 Stunden ausreichend TorA transportieren konnte (Abb. 3.54 WT), sodass ein Ansteigen der Optischen Dichte (Trübung) messbar war. Die gemessenen OD_{600} korreliert mit der Zellmasse, jedoch nicht mit der Zellzahl. Selbst nach 7 Tagen wurde für die Negativkontrolle kein Wachstum ermittelt (Abb. 3.54 $\Delta tatAE$). Im Vergleich zum Tat-WT-Stamm verzögerte sich das Ansteigen der OD nach rekombinanter Produktion TatAs (Abb. 3.54 TatA). Dies könnte auf das Fehlen der Rhamnose zurückzuführen sein, sodass die Induktion des *tatAs* nur auf das *leakage* des Rhamnose-Promotors zurückzuführen war. Im Gegensatz dazu konnte für alle getesteten TatA-Derivate kein Wachstum auf TMAO-Medium festgestellt werden. Die Wachstumsdaten entsprachen denen der Negativkontrolle und wurden aus diesem Grund nicht dargestellt.

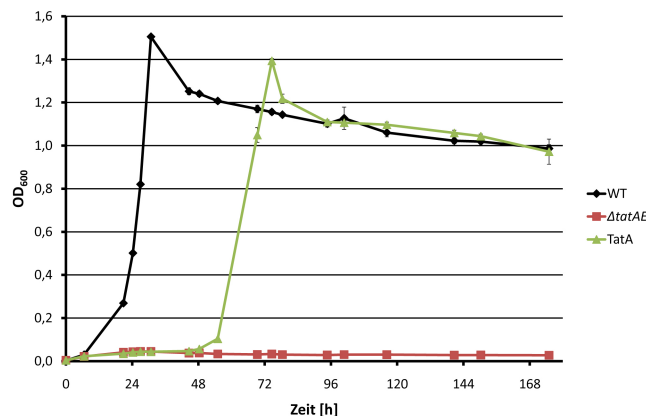


Abbildung 3.54: Rekombinant produziertes TatA befähigt das Tat-System zum TorA-Transport. Es wurde das Zellwachstum in TMAO-Medium mit einer Dreifachbestimmung durchgeführt und die Standardabweichung ist mit Fehlerbalken erfasst. **WT** – MC4100 *ara^R*, **$\Delta tatAE$** – JARV16 pBW22 (Negativkontrolle), **TatA** – JARV16 pBW-*tatA-strep*.

3.5.1.4 Zusammenfassung der Funktionalitätsstudien zu mutierten Tat-Systemen in der Transmembranhelix von TatA

Alle hier gewonnenen Daten zu Mutationen in der Transmembranhelix von TatA sind zusammenfassend dargestellt (Tabelle 19). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl negative als auch positive Ladungen in der Nähe des N-terminalen Beginns der Transmembranhelix die Funktion des Tat-Systems beeinträchtigen. Gleichzeitig haben Austausche (G3D) vor der Position 6 in TatA keinen Einfluss auf das Tat-System, obwohl auch in diesem Beispiel eine negative Ladung eingeführt wurde. Die Länge des Transmembrandurchganges entscheidet darüber, ob TatA in der Membran detektiert wurde und ob das Tat-System funktionell war. Der Austausch der ersten 4 Reste in TatA gegen einen STGG-*linker* hatten keinen Einfluss auf die Effizienz des Tat-Systems. Wurde die Anzahl allerdings auf 5 Reste erhöht, konnten weder HiPIP noch die Amidasen AmiA und AmiC durch das Tat-System in das Periplasma transportiert werden.

Tabelle 19: Zusammenfassung der Funktionsstudien in der Transmembranhelix von TatA

+ – matures Protein im Periplasma; – – Blockade, Akkumulation des *precursor* im Cytoplasma; (+) – eingeschränkter Transport

<i>In-vivo</i> -Translokationsanalyse von			
TatA-Derivat	HiPIP	Amidasen	TorA
bc	-	-	-
bc-I	+	+	-
G3D	+	+	-
I6A	+	+	-
I6D	-	-	-
I6F	+	-	-
I6K	(+)	-	-
I6S	+	+	-

Tabelle 19: Zusammenfassung der Funktionsstudien in der Transmembranhelix von TatA

+ – matures Protein im Periplasma; – – Blockade, Akkumulation des *precursor* im Cytoplasma; (+) – eingeschränkter Transport

<i>In-vivo</i> -Translokationsanalyse von			
TatA-Derivat	HiPIP	Amidasen	TorA
W7A	+	+	-
Q8L	(+)	-	-
W7A,Q8L	-	-	-
D7D8	-	-	-
K7K8	-	-	-
K6K7K8	-	-	-
K7K8K9	-	-	-

3.5.2 Funktionsanalysen von mutierten Tat-Systemen im *hinge* oder in der amphipathischen Helix

Sowohl in TatA als auch in TatB befinden sich hoch-konservierte Aminosäuren, die für die Funktion des Tat-Systems bedeutend sind (Greene *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2006a; Barrett und Robinson, 2005). In *E. coli* ist in TatA ein FG-Motiv konserviert, wobei im TatB das Glycin durch ein Prolin ersetzt wird. In Gram-positiven Bakterien sind beide Motive in einem FGP-Motiv vereint (Barnett *et al.*, 2009). In einer kurzen Übersicht sind die strukturellen Auswirkungen durch AS-Insertionen in der *hinge*-Region und der amphipathischen Helix schematisch dargestellt (Abb. 3.55).

Die Bedeutung der *hinge*-Region für die Funktion des Tat-Systems wurde mit Hilfe von Translokationsstudien ausgewählter Tat-Substrate (HiPIP, CueO bzw. DmsA(ss)-GFP und TorA) untersucht. Sowohl in TatA als auch in TatB wurden mittels *QuikChange*-

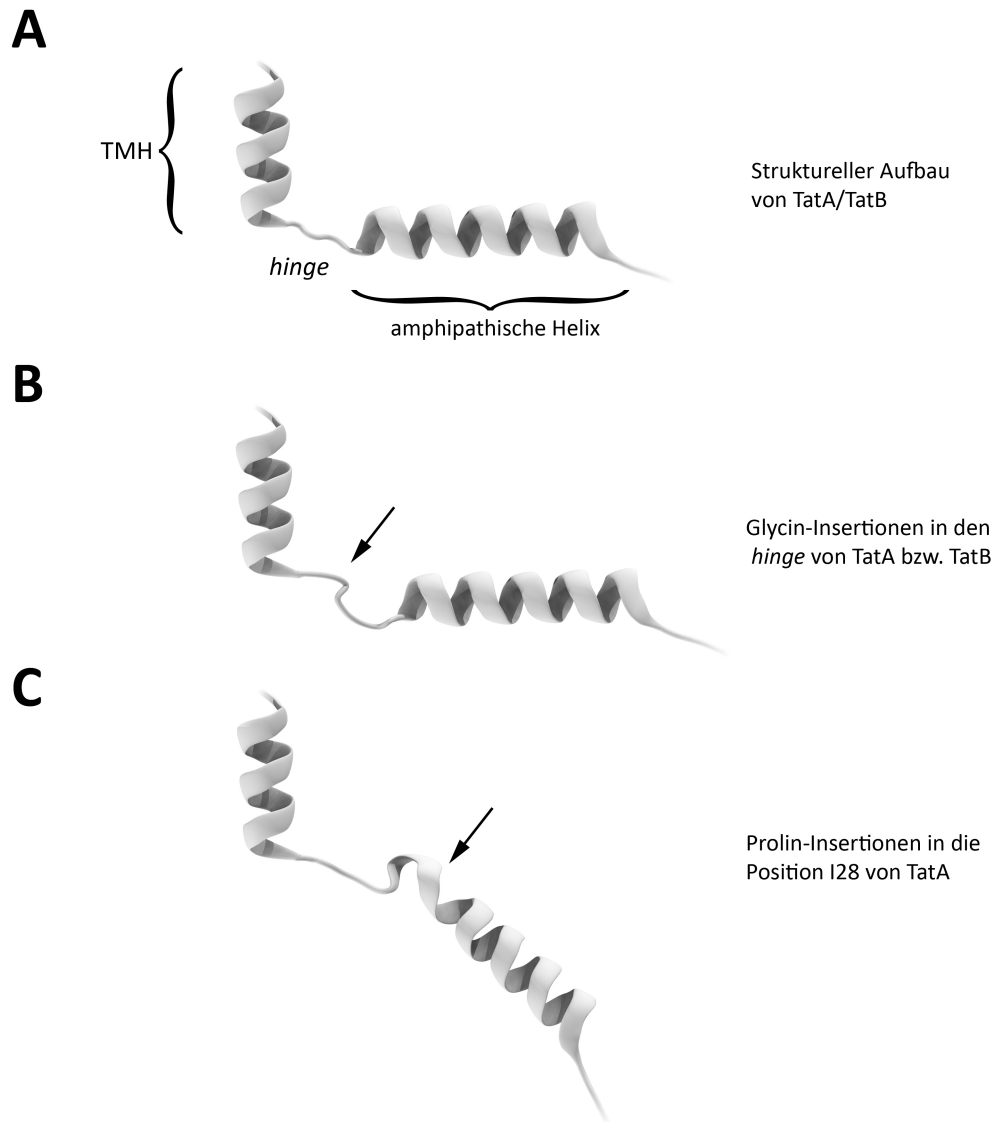


Abbildung 3.55: Schematische Übersicht der strukturellen Auswirkungen von Insertionen in den *hinge* bzw. die amphipathische Helix. **[A]** Die wichtigsten Strukturkomponenten von TatA bzw. TatB sind die Transmembranhelix (TMH), gefolgt von der unstrukturierten *hinge*-Region und in der amphipathischen Helix, **[B]** Insertionen von einem oder bis zu vier Glycinen in den *hinge* erhöhen dessen Flexibilität und **[C]** Prolininsertionen nach der Position 27 in TatA führen zu einem Knick in der Helix.

Mutagenese nach der Position 22 jeweils ein, zwei oder im Falle des TatBs sogar bis zu vier Glycine eingeführt. Durch die Glycin-Insertionen wurde die *hinge*-Region verlängert und eventuell flexibel. Im *tatABCDE*-Deletionsstamm DADE wurde für die konstitutive Expression der *tat*-Gene das Plasmid pABS-*tatABC* gewählt (Berthelmann und Brüser, 2004). Als Negativkontrolle wurde der Leervektor (pABS) und als Positivkontrolle das Plasmid pABS-*tatABC* verwendet.

3.5.2.1 Funktionalitätsanalysen von Tat-Derivaten mit dem Substrat HiPIP

Für die Transportstudien wurde der Vektor pEXH5-*tac* verwendet (Brüser *et al.*, 1998). Ausgehend von einem *tac*-Promotor, der eine Fusion des P_{trp} - und des P_{lac} -Promotors darstellt, wurde das *hip*-Gen konstitutiv exprimiert. Falls das Tat-System funktionell ist, wird HiPIP ins Periplasma transportiert (Abb. 3.56B, linke Fraktionierung). Ohne rekombinante Produktion der Tat-Komponenten konnte HiPIP nicht transportiert werden und akkumulierte im Cytoplasma (Abb. 3.56B, rechte Fraktionierung).

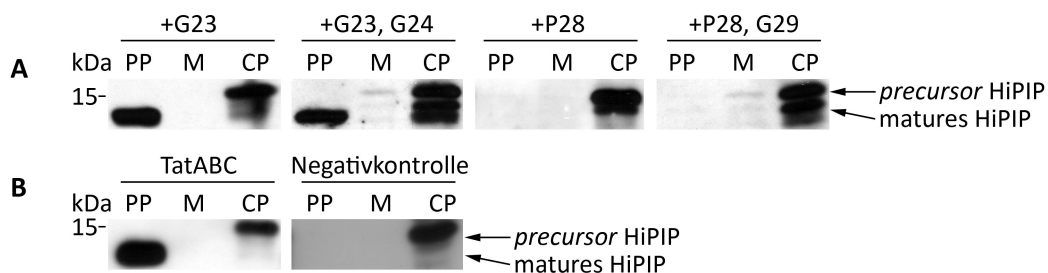


Abbildung 3.56: *In-vivo*-Translokationsanalyse der mutierten Tat-Systeme TatA(+G23), TatA(+G23,24), TatA(+P28) und TatA(+P28,G29) für HiPIP 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; α -HiPIP; Analyse subzellulärer Fraktionen der Stämme [A] **TatA(+G23)** – DADE pABS-*tatA(+G23)BC*; **TatA(+G23,24)** – DADE pABS-*tatA(+G23, 24)BC*; **TatA(+P28)** – DADE pABS-*tatA(+P28)BC*, **TatA(+P28, G29)** – DADE pABS-*tatA(+P28, G29)BC* und [B] **TatA(TatABC)** – DADE pABS-*tatABC* (Positivkontrolle), **Negativkontrolle** – DADE pABS nach Expression von *hip* (pEXH5-*tac*); Periplasma (PP), Membranen (M) und Cytoplasma (CP).

Die Effizienz des Tat-Systems wurde durch die Insertion von einem bzw. zwei Glycinen nach der Position 22 nicht beeinflusst. Matures HiPIP wurde bei ca. 13 kDa im PP bzw. CP und *precursor*-HiPIP wurde nur im CP nachgewiesen (Abb. 3.56A). Auch im Bereich von 15 kDa wurden schwache Banden im Cytoplasma detektiert, was auf einen geringen Abbau des Signalpeptides im Cytoplasma schließen lässt (Abb. 3.56A CP).

Weiterhin wurde Insertionen eines Prolins bzw. eines Prolins und eines Glycins nach Position 27 in TatA untersucht. Insertion eines Glycin an die gleiche Position in TatA

blockierte den Tat-Transport und konnte revertiert werden, indem ein weiteres Glycin eingeführt wurde (Mehner, 2006). Allerdings konnte kein Unterschied zwischen TatA(+P28) und TatA(+P28,G29) festgestellt werden. Beide Proteine konnten das Tat-System nicht komplementieren und HiPIP akkumulierte im Cytoplasma (Abb. 3.56A).

Wie schon für TatA gezeigt wurde, konnten auch Glycininsertionen nach Position 22 in TatB den Phänotyp des *tat*-Deletionsstammes komplementieren (Abb. 3.57). Wurde der *hinge* jedoch auf bis zu vier Glycine verlängert, akkumulierte HiPIP im Cytoplasma (Abb. 3.57).

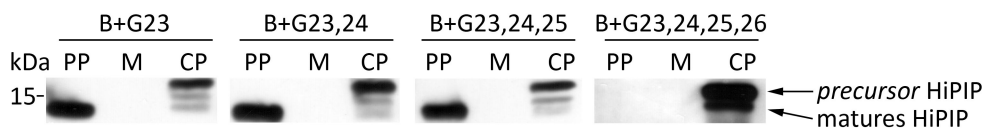


Abbildung 3.57: *In-vivo*-Translokationsanalyse der mutierten Tat-Systeme TatB(+G23), TatB(+G23,24), TatB(+G23,24,25) und TatB(+G23,24,25,26) für HiPIP 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; α -HiPIP; Analyse subzellulärer Fraktionen der Stämme **TatB(+G23)** – DADE pABS-*tatAB*(+G23)*C*; **TatB(+G23,24)** – DADE pABS-*tatAB*(+G23, 24)*C*; **TatB(+G23,24,25)** – DADE pABS-*tatAB*(+G23, 24, 25)*C* und **TatB(+G23,24,25,26)** – DADE pABS-*tatAB*(+G23, 24, 25, 26)*C* nach Expression von *hip* (pEXH5-*tac*); Periplasma (PP), Membranen (M) und Cytoplasma (CP).

3.5.2.2 Funktionalitätsanalysen von Tat-Derivaten mit dem Substrat CueO

Ferner wurden die TatB-Glycin-Insertionen auf die Translokation des Tat-Substrates CueO hin untersucht. CueO, eine periplasmatische *multi-copper oxidase*, ist in *E. coli* für die Kupfer-Homöostase bzw. Kupfertoleranz verantwortlich. Die Oxidase besitzt vier bis fünf Kupferatome pro Molekül (Grass und Rensing, 2001; Roberts *et al.*, 2003). Für den Assay wurde *cueO*, wie schon HiPIP, konstitutiv mit dem Vektor pEX-*cueO*-H6-*tac* exprimiert (Graubner *et al.*, 2007).

Sowohl in der Membranfraktion als auch im Cytoplasma wurde *precursor* CueO bei etwa 58 kDa detektiert (Abb. 3.58 CP, M). Insertionen von bis zu drei Glycinen nach Position 22 in TatB haben keinen Einfluss auf die Effizienz des Tat-Systems. matures CueO konnte im Periplasma detektiert werden, weil die mutierten Tat-Systeme den Phänotyp des *tat*-Deletionsstammes komplementieren konnten. Eine weitere Insertion eines Glycins in TatB führte allerdings zum Verlust des Transportvermögens (Abb. 3.58 TatB(+G23,24,25,26)). Sowohl *precursor* CueO als auch dessen mature Form wurden

im Periplasma detektiert. Inzwischen wurde im Labor gezeigt, dass sich die Fraktio-

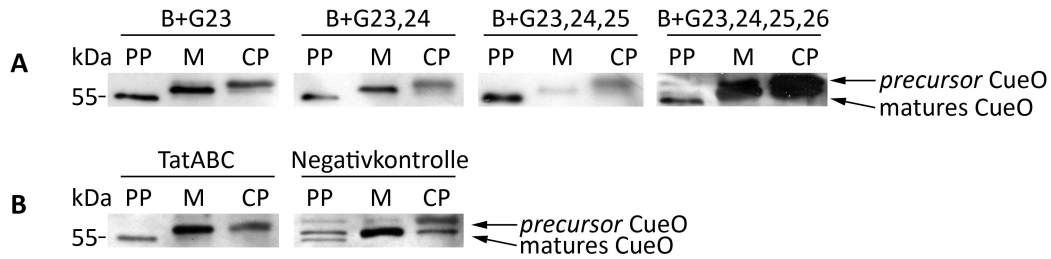


Abbildung 3.58: *In-vivo*-Translokationsanalyse der mutierten Tat-Systeme TatB(+G23), TatB(+G23,24), TatB(+G23,24,25) und TatB(+G23,24,25,26) für CueO 10%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; α -His-tag; Analyse subzellulärer Fraktionen der Stämme [A] **TatB(+G23)** – DADE pABS-*tatAB*(+G23)*C*; **TatB(+G23,24)** – DADE pABS-*tatAB*(+G23, 24)*C*; **TatB(+G23,24,25)** – DADE pABS-*tatAB*(+G23, 24, 25)*C*; **TatB(+G23,24,25,26)** – DADE pABS-*tatAB*(+G23, 24, 25, 26)*C* und [B] **TatABC** – DADE pABS-*tatABC* (Positivkontrolle), **Negativkontrolle** – DADE pABS nach Expression von *cueO* (pEX-*cueO-H6-tac*); Periplasma (PP), Membranen (M) und Cytoplasma (CP).

nierung des Stammes DADE schwieriger gestaltet und zu stärkeren Kontaminationen der Periplasmafraktion mit cytoplasmatischen Komponenten führen kann. Außerdem ist der Arbeitsgruppe bekannt, dass kontaminierender CueO-*precursor* in der Periplasmafraktion von Proteasen angegriffen wird, was die prozessierte Bande in der Periplasmafraktion erklärt (DeLisa *et al.*, 2004).

3.5.2.3 Funktionalitätsanalysen von Tat-Derivaten mit dem Substrat DmsA(ss)-GFP

Zusätzlich zu den *in-vivo*-Translokationsanalysen für das Substrat HiPIP wurden die mutierten TatA-Derivate auch für das Fusionsprotein DmsA(ss)-GFP untersucht. Das Grün-fluoreszierendes Protein (GFP) stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* und kann bei einer Wellenlänge von 395 nm bzw. 475 nm zur Fluoreszenz angeregt werden. GFP gehört nicht zu den natürlichen Tat-Substraten. Durch die Fusion des DmsA-Signalpeptides mit GFP wird dieses allerdings Tat-abhängig transportiert, weil die DMSO-Reduktase (DmsA) zu den Tat-Substraten zählt (Palmer *et al.*, 2005). Für die Translokationsanalyse wurde das Fusionsprotein aus DmsA-Signalpeptid, *Strep*-tag und GFP durch den konstitutiven Vektor pTB-DG codiert (Berthelmann und Brüser, 2004). Statt des pTB-DG-Plasmides wurde in der Negativkontrolle das Plasmid pTB-DG-KK verwendet, in dem das RR-Motiv gegen ein KK-Motiv ausgetauscht ist. Aufgrund dessen wird das Tat-Substrat DmsA(ss)-GFP-KK zwar vom TatBC-Komplex erkannt aber nicht transloziert, sodass der *precursor* im Cytoplasma akkumulierte

und wahrscheinlich durch Proteasen auf mature Größe von ca. 27 kDa abgebaut wurde (Abb. 3.59B, rechte Fraktionierung). Mit Hilfe des Modell-Substrates DmsA(ss)-GFP zeigten bereits Berthelmann *et al.* (2008), dass spezifische Mutationen (D31G, G33S, F39A und F39K) in der amphipathischen Helix von TatA die Effizienz des Tat-Transports herabsetzen.

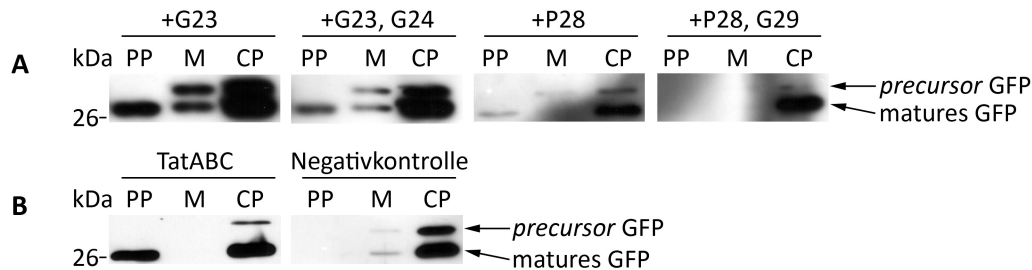


Abbildung 3.59: *In-vivo*-Translokationsanalyse der mutierten Tat-Systeme TatA(+G23), TatA(+G23,24), TatA(+P28) und TatA(+P28,G29) für DmsA(ss)-GFP 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; α -GFP; Analyse subzellulärer Fraktionen der Stämme [A] **TatA(+G23)**– DADE pABS-*tatA*(+G23)BC; **TatA(+G23,24)**– DADE pABS-*tatA*(+G23, 24)BC; **TatA(+P28)**– DADE pABS-*tatA*(+P28)BC, **TatA(+P28, G29)**– DADE pABS-*tatA*(+P28, G29)BC und [B] **TatABC**– DADE pABS-*tatABC* (Positivkontrolle), **Negativkontrolle**– DADE pABS-*tatABC* nach Expression von *dmsA(ss)-gfp* (pTB-DG bzw. pTB-DG-KK für die Negativkontrolle); Periplasma (PP), Membranen (M) und Cytoplasma (CP).

Im Vergleich zur Positivkontrolle wurde matures GFP trotz der Insertion eines oder zweier Glycine nach der Position 22 in die Scharnier-Region von TatA im Periplasma nachgewiesen (Abb. 3.59A, B). Wurde allerdings ein Prolin nach Position 27 in die amphipathische Helix von TatA eingefügt, dann wurde eine herabgesetzte Transporteffizienz detektiert (Abb. 3.59B). Die Verlängerung des Insertionsbereiches um ein Glycin führte zur vollständigen Blockade des Tat-Systems und zur Akkumulation von GFP im Cytoplasma (Abb. 3.59A).

3.5.2.4 Funktionalitätsanalysen von Tat-Derivaten mit dem Substrat TorA

Wie schon zuvor erwähnt wird die TMAO-Reduktase Tat-abhängig nur dann transportiert, wenn der *tat*⁻-Phänotyp durch die mutierten Tat-Systeme komplementiert werden kann. Für die Untersuchungen zum Transport der TMAO-Reduktase wurde der *tatABCDE*-Deletionsstamm (DADE) genutzt. Um die erhaltenen Daten einschätzen zu können, wurde der *tat*-WT-Stamm MC4100 verwendet, der schon nach 24 Stunden TMAO als einzige Energiequelle umsetzen konnte (Abb. 3.60A WT).

Ohne funktionsfähiges Tat-System (Leervektor) wurde kein TorA ins Periplasma transportiert, sodass kein Zellwachstum zu beobachten war (Abb. 3.60A Δ *tatABC*). Nach

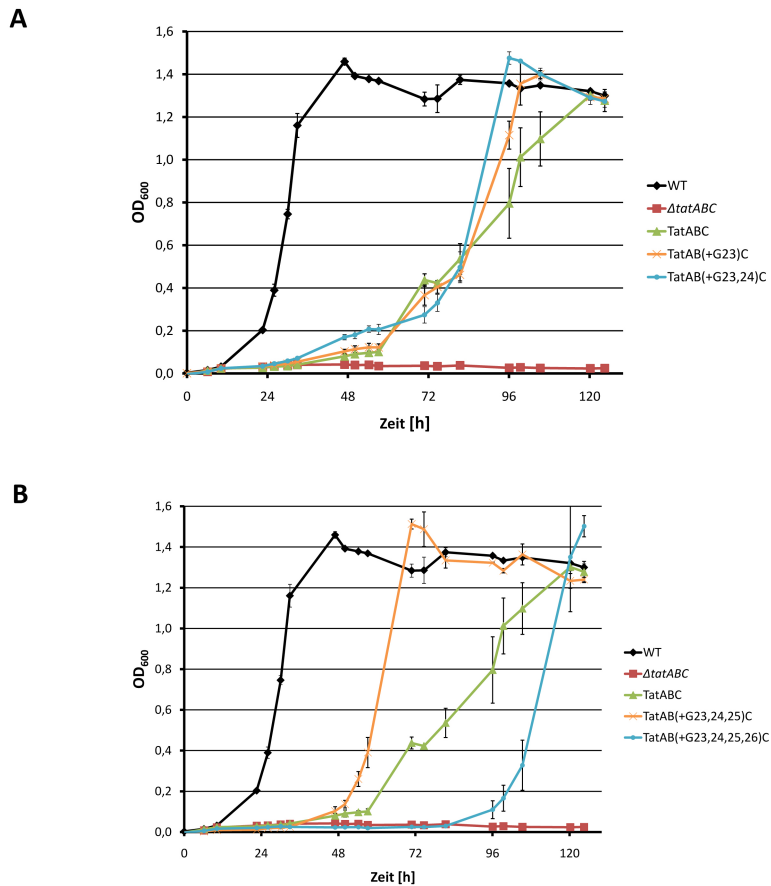


Abbildung 3.60: Glycin-Insertionen in den *hinge* von TatB haben keinen Einfluss auf den TorA-Transport. Es wurde das Zellwachstum in TMAO-Medium mit einer Dreifachbestimmung durchgeführt und die Standardabweichung ist mit Fehlerbalken erfasst. **WT** – MC4100 *ara^R*, **$\Delta tatABC$** – DADE, **TatABC** – DADE pABS-*tatABC*, **[A] TatAB(+G23)C** – DADE pABS-*tatAB(+G23)C*, **TatAB(+G23,G24)C** – DADE pABS-*tatAB(+G23, G24)C*, **[B] TatAB(+G23,24,25)C** – DADE pABS-*tatAB(+G23, G24, G25)C* und **TatAB(+G23,24,25,26)C** – DADE pABS-*tatAB(+G23, G24, G25, G26)C*.

ca. 48 bzw. 72 Stunden konnten auch die mutierten Tat-Systeme mit einem, zwei oder drei Glycin-Insertionen ausreichend TorA transportieren, um TMAO umzusetzen (Abb. 3.60A, B). Lediglich Tat-Systeme mit vier Glycinen in der *hinge*-Region konnten den *tat*⁻-Phänotyp nicht komplementieren (Abb. 3.60A, B). Es ist jedoch zu bemerken, dass die beobachteten OD-Werte der Positivkontrolle (TatABC) stark von dem erwarteten Verhalten abwichen. Üblicherweise sollte der Verlauf des Zellwachstums dem des *tat*-WT-Stammes entsprechen. Dies wurde allerdings nicht festgestellt.

3.5.2.5 Zusammenfassung der Funktionalitätsstudien zu mutierten Tat-Systemen in der *hinge*-Region von TatA und TatB

Es konnte gezeigt werden, dass Verlängerungen der *hinge*-Regionen von TatA und TatB durch Glycin nicht zu einem Funktionsverlust des Tat-Systems führten. Alle untersuchten Substrate unterschiedlicher Größe wurden ungehindert in das Periplasma transportiert (Tabelle 20). Einzig allein Insertionen eines Prolins bzw. eines Prolin-Glycin-Paares nach der Position 27 in der amphipathischen Helix von TatA-Mutanten blockierten den Transport der Tat-Substrate HiPIP und DmsA(ss)-GFP. Beide Proteine akkumulierten im Cytoplasma. Ferner konnte die TatB-Mutante TatB(+G23,24,25,26) mit 4 Glycin-Insertionen den *tat*⁻-Phänotyp nicht komplementieren. Eventuell wurde hier die Höchstgrenze an zulässigen flexiblen Reste erreicht, sodass die postulierte stabilisierende Wirkung einzelner Reste der Transmembranhelix und der amphipathischen Helix unterbrochen wird.

Tabelle 20: Zusammenfassung der Funktionsstudien in der *hinge*-Region von TatA und TatB sowie der amphipathischen Helix von TatA

+ – matures Protein im Periplasma; – – Blockade, Akkumulation des *precursor* im Cytoplasma; (+) – eingeschränkter Transport; **n.b.** – nicht bestimmt

<i>In-vivo</i> -Translokationsanalyse von				
TatA- bzw. TatB-Derivat	HiPIP	DmsA-GFP	CueO	TorA
TatA(+G23)	+	+	n.b.	+

Tabelle 20: Zusammenfassung der Funktionsstudien in der *hinge*-Region von TatA und TatB sowie der amphipathischen Helix von TatA

+ – matures Protein im Periplasma; – – Blockade, Akkumulation des *precursor* im Cytoplasma; (+) – eingeschränkter Transport; **n.b.** – nicht bestimmt

<i>In-vivo</i> -Translokationsanalyse von				
TatA- bzw. TatB-Derivat	HiPIP	DmsA-GFP	CueO	TorA
TatA(+G23,24)	+	+	n.b.	+
TatA(+P28)	-	(+)	n.b.	-
TatA(+P28,G29)	-	-	n.b.	-
TatB(+G23)	+	n.b.	+	(+)
TatB(+G23,24)	+	n.b.	+	(+)
TatB(+G23,24,25)	+	n.b.	+	+
TatB(+G23,24,25,26)	-	n.b.	-	-

4 Diskussion

Obwohl schon seit den 90iger Jahren intensiv am Tat-System geforscht wird, ist bis heute nicht geklärt, wie Tat-Substrate die Cytoplasmamembran durchqueren, ohne den Protonengradienten zu zerstören. Gleichzeitig existieren bislang keine Hinweise darauf, dass neben den Tat-internen Bindungen der einzelnen Komponenten und der Tat-Substrate an den TatBC-Komplex, eventuelle Interaktionen mit anderen Proteinen den Transport unterstützen und so die Membranstabilität aufrecht erhalten wird. Mit Hilfe dieser Dissertation wurden grundlegende Erkenntnisse zur Verbindung des Tat-Systems mit dem Psp-System gewonnen, als auch wichtige Interaktionen der einzelnen Tat-Komponenten gezeigt. Zusätzlich konnte der Einfluss von konservierten Positionen in TatA auf die Funktionalität des Tat-Translokons nachgewiesen werden.

4.1 Veränderungen der *hinge*-Region von TatA und TatB haben keinen entscheidenden Einfluss auf die Funktionalität des Tat-Systems

Die *hinge*-Region scheint im Gegensatz zu den für Interaktionen wichtigen N- und C-terminalen Bereichen der Proteine TatA und TatB von nur geringer Bedeutung für die Proteinfunktionalität zu sein, denn obwohl die *hinge*-Region sowohl in TatA als auch in TatB hoch konserviert ist (Hu *et al.*, 2010; Barnett *et al.*, 2009), führten Verlängerungen in dieser Region nicht zum Verlust der Funktionalität des Tat-Systems (Abb. 20). Dies stimmt insoweit mit Mutationsstudien in den Positionen 20 bis 22 in TatA und TatB überein, als dass auch Einzelaustausche an diesen Positionen keinen Einfluss auf die Funktionalität und die Struktur des Tat-Systems haben (Mehner, 2006; Lee *et al.*, 2006b; Barnett *et al.*, 2009). Es ist wahrscheinlicher, dass die Verlängerung des *hinges* zu einer erhöhten Flexibilität führt, die bis zu einer kritischen Länge toleriert wird und danach zu einer geringeren Effizienz des Tat-Systems führen kann.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, werden Insertionen von bis zu drei Glycinen in TatB und in TatA von bis zu zwei Glycinen toleriert, ohne dass die endgültige Konformation des Gesamtproteins durch die veränderte Struktur des *hinges* beeinträchtigt wird, da Interaktionen mit den anderen Tat-Komponenten immer noch bestehen und die Funktionalität bewahrt wird. Insertionen von bis zu vier Glycinen erhöhen die Fle-

xibilität des *hinges* derart, dass die stabilisierende Wirkung der Reste F14 und L18 in der TMH und P23 und L26 in der amphipathischen Helix (Hu *et al.*, 2010) geschwächt werden würde, sodass die L-förmige TatA-Struktur gestört und die *hinge*-Region nicht richtig geformt werden kann. Es wäre auch denkbar, dass sich der Winkel zwischen TMH und amphipathischer Helix durch die zahlreichen Glycin-Insertionen derart verändert, dass die über den N-Terminus von TatB vermittelte TatB-TatC-Interaktion (Abb. 3.38) im TatBC-Komplex behindert oder geschwächt wird und deshalb das Tat-System blockiert ist.

Die Position 28 innerhalb der amphipathischen Helix von TatA wurde für den potenziellen Ort der Prolin-Insertion ausgesucht, weil die Arbeitsgruppe um Tracy Palmer diese essentielle Position für die Funktionalität des Tat-Systems erwähnte, jedoch keine Daten lieferte (Hicks *et al.*, 2005). Für die Position I28 innerhalb der amphipathischen Helix von TatA werden zwar Insertionen von bis zu zwei Glycinen (Mehner, 2006) toleriert, allerdings nicht die von Prolin (Abb. 20), sodass in letzterem Falle das Tat-System zum Erliegen kommt. Die Glycin-Insertionen und Einzelaustausche (I28A) sprechen jedoch dafür, dass die Position I28 für die Funktionalität des Tat-Systems nicht von besonderer Bedeutung ist (Mehner, 2006). Zusätzlich dazu haben Glycin-Insertionen an der Position 28 auch keinen Einfluss auf die TatA-Komplexe (Mehner, 2006), da der essentielle Rest F39 weit entfernt am C-terminalen Ende der amphipathischen Helix ist und Interaktionen mit der CPM wahrscheinlich nur über F39 und K40 vermittelt werden (Hu *et al.*, 2010; Hou und Brüser, 2011 unveröffentlicht). Die Insertion eines Prolins führt allerdings zu einem „Knick“ von bis zu 30° in der amphipathischen Helix (Richardson und Richardson, 1989), sodass eventuell die Position F39 nicht mehr mit der Membran interagieren kann und dadurch die Blockade des Tat-Systems zu erklären wäre. Prolin fungiert auch als Helixbrecher, da es keine freie Aminogruppe für stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen besitzt und die Größe umliegender Reste einschränkt. Aus diesem Grund könnte auch die Oligomerisierung von TatA gestört werden, da ein „Knick“ in der amphipathischen Helix die vermuteten Interaktionsstellen an den C-Termini von TatA (AS 41-50, Abb. 3.42 TatA(CT)) weiter voneinander entfernt und dadurch den Tat-Transport behindert.

4.2 Interaktionsstudien mit Komponenten des Tat-Systems und PspA

Für das Verständnis des Tat-Systems und des zu Grunde liegenden Mechanismus ist es von großer Bedeutung die Interaktionen der einzelnen Tat-Komponenten und eventueller Interaktionspartner zu untersuchen, da sie Hinweise auf die Organisation der Komponenten sowie auf mögliche funktionelle Einheiten liefern. Im Laufe der Arbeit wurden Interaktionen und teilweise spezifische Interaktionsdomänen der Proteine TatA, TatE, TatB, TatC und PspA charakterisiert. Die einzelnen ermittelten Interaktionen werden im Folgenden diskutiert, eine Übersicht dazu findet sich in Abb. 4.1.

4.2.1 Der C-Terminus von TatA ist für die TatA-Oligomerisierung von Bedeutung

Für den Tat-Mechanismus ist die Oligomerisierung von TatA-Monomere von großer Bedeutung. So konnte in dieser Dissertation mit Hilfe des LexA-basierten 2H-Systems gezeigt werden, dass der C-Terminus von TatA (TatA ohne TMH, *hinge* und amphipathische Helix) zur Oligomerisierung neigt (Abb. 3.42). In Übereinstimmung damit zeigten Dabney-Smith *et al.* (2006) und Dabney-Smith und Cline (2009) mit chemischen Crosslinks, dass der N-Terminus allein nur eine sehr schwache Oligomerisierung des TatAs vermittelt, die erst durch die amphipathische Helix verstärkt wird. Dabei ist zu beachten, dass rekombinant produziertes TatA ohne TMH als lösliches Protein vorliegt (Abb. 3.6 und auch durch Porcelli *et al.*, 2002 beschrieben) und mittels BN-PAGE nur noch als Monomer nachgewiesen werden kann, sodass für eine dauerhaft stabile Interaktion womöglich das vollständige Protein notwendig ist. Der *tat*-defiziente Phänotyp (Blockade des Tat-Systems) beruht auf der subzellulären Lokalisation des C-terminalen TatA-Konstrukts im Cytoplasma.

Mit Hilfe des LexA-basierten 2H-Systems konnte im Zuge dieser Arbeit die Interaktionsstelle der TatA-Monomere auf einen Bereich zwischen den Aminosäuren 41 und 50 begrenzt werden. Dies geschieht aufgrund des interagierenden TatA(CT)-Derivates, das die Reste 41 bis 89 beinhaltet und in Verbindung mit der Tatsache, dass für die Funktionalität des Tat-Systems die AS 1-50 essentiell sind (Lee *et al.*, 2002). In dem Bereich der AS 41-50 identifizierten Warren *et al.* (2009) in Gram-negativen Bakterien drei konservierte saure Reste (D45D46E47). Werden alle drei Reste gegen hydrophobe

AS (QQE>LLM) ausgetauscht, hatte dies Auswirkungen auf die Funktionalität und die Komplex-Assemblierung des Tat-Systems, während Einzelaustausche zu keiner veränderten Translokationseffizienz führen (Warren *et al.*, 2009). Daher wäre es denkbar, dass die TatA-Oligomerisierung über diesen Bereich vermittelt wird, weil die essentiellen Reste für die Tat-Funktionalität noch enthalten sind. Die Selbstinteraktion der TatA-Monomere über den C-Terminus könnte bei der Rekrutierung an den TatBC-Komplex sowohl die Bindung von TatA mit TatB als auch die Bindung von TatA mit TatC begünstigen. Gleichzeitig würden diese Interaktionen der TatA-Monomere eine Interaktion mit PspA nicht sterisch behindern, da gezeigt werden konnte, dass dafür der N-Terminus (AS 1-21) notwendig ist.

4.2.2 Die TatB-Selbstinteraktion und die TatB-TatC-Interaktion werden durch die Transmembranhelix von TatB vermittelt

Das Wissen über Interaktionen der Proteine des TatBC-Komplexes würde einen weiteren Hinweis auf die Struktur des TatBC-Komplexes und daraus resultierend auch auf den Tat-Mechanismus geben. Die durchgeführten Interaktionsstudien zeigten, dass im Unterschied zu TatA für die Interaktion mit TatC-Fusionsproteinen nicht der C-Terminus sondern der N-Terminus von TatB ausreichend ist, unabhängig davon, ob die Adenylatzyklasefragmente an den N- oder den C-Terminus von TatC fusioniert wurden (Abb. 3.38). Dies würde dafür sprechen, dass TatC innerhalb des TatBC-Komplexes eine andere Bindungsstelle an TatB besitzt als TatA. Die beobachteten TatB-TatC-Interaktionen dieser Arbeit stimmen mit den Ergebnissen eines BiFC-Assays überein (Kostecki *et al.*, 2010). Der Interaktionsbereich von TatB mit TatC konnte in dieser Dissertation auf die Transmembranhelix eingeschränkt werden.

Für die TatB-Oligomerisierung ist ein freier N-Terminus von Bedeutung, da keine β -Galaktosidaseaktivität für das TatB(NT)-Fusionsprotein mit dem Volllängen-TatB nachgewiesen werden konnte, sobald der aminoterminal Bereich von TatB durch das T25-Fragment blockiert wurde. Diese Aussage würde die TatB-Interaktion mit TatC im TatBC-Komplex unterstützen, da Bolhuis *et al.* (2001) das Verhältnis von TatB zu TatC im TatBC-Komplex als 1:1 angeben und die Bindung eines TatB-Monomers auch eine Bindung des TatCs induzieren würde.

Da die Transmembranhelix von TatB schon bereits für die Bildung von TatBC-Komplexen verantwortlich zu sein scheint und integraler Bestandteil des Komplexes sein

würde (Tarry *et al.*, 2009; Maldonado *et al.*, 2011a), muss die Bindung TatAs an TatB über den C-Terminus von TatB erfolgen (amphiphische Helix und C-Terminus). Die TatA-TatB-Interaktion scheint von einer vorherigen Membraninsertion beider Proteine abhängig zu sein, da eine Interaktion nur dann gezeigt werden konnte, wenn beide Proteine ihre jeweilige TMH besaßen und membranintegral vorlagen (siehe Abb. A.5 im Anhang). Für die Proteine ohne TMH wurden keine positiven Interaktionsergebnisse erhalten, d.h. dass die Interaktion beider Proteine nur in der Membranumgebung stattfinden kann. Durch diese TatB-TatA-Interaktion könnte sichergestellt werden, dass nur dann das Tat-Substrat durch die TatA-Oligomere der Translokase ins PP transportiert werden, wenn TatA an TatB bzw. TatC im TatBC-Komplex bindet, und dass Interaktionen innerhalb des TatBC-Komplexes durch andere Tat-Komponenten (TatA/TatE) nicht sterisch behindert werden, da sie unterschiedliche Bindungsstellen aufweisen.

4.2.3 Kritische Betrachtung zum Nachweis von Interaktionen von (Membran-) Proteinen mit Hilfe von 2H-Systemen

Interaktionsnachweise zwischen oligomeren Strukturen zweier Systeme wie die PspA-Homodimerbildung und die TatA-Oligomerisierung, sind mit Hilfe von 2H-Systemen schwer handhabbar und hängen stark von der Größe des fusionierten Proteins ab. So konnte in dieser Arbeit für das LexA-basierte 2H-System im Vergleich zum BACTH-System eine deutlich messbare PspA-Homodimerisierung nachgewiesen werden, deren Ausbleiben eventuell im BACTH-System auf die Instabilität der PspA-Fusionsproteine zurückzuführen ist. C-terminale GFP-Fusionen destabilisieren PspA (Osadnik, 2009), sodass es möglich erscheint, dass dies auch auf die T18- bzw. T25-PspA-Fusionen zutreffen könnte. Beide Fusionsdomänen weisen ein Molekulargewicht von 20 bzw. 27 kDa auf (PspA ist 25 kDa schwer), das in etwa dem Molekulargewicht des GFPs entspricht. Da es sich bei PspA vermutlich um ein langes *coiled-coil*-Protein handelt (Osadnik, 2009), könnten aber die Interaktionsdomänen selbst in stabilen Homodimeren so weit auseinander liegen, dass eine Interaktion dieser nicht mehr möglich ist.

Für die Weiterleitung des Stresssignals von der Membran zu PspA sind die Interaktionen der Psp-Komponenten von großer Bedeutung und schon mehrfach beschrieben (Adams *et al.*, 2003; Maxson und Darwin, 2006; Jovanovic *et al.*, 2006, 2009). Es ist jedoch auffällig, dass trotz dieser gezeigten Interaktionen die PspA-PspA-Interaktion bisher kaum eindeutig per 2H-System nachgewiesen werden konnte. Nur die Arbeits-

gruppe um Martin Buck zeigte bisher eine schwache PspA-Interaktion mit Hilfe des BACTH-Systems (Jovanovic *et al.*, 2010). Vom PspA-Homolog LiaH sind bisher in ähnlichen Studien auch noch keine Selbstinteraktionen nachgewiesen worden, obwohl Interaktionen mit anderen Komponenten des LiaRS-Systems möglich waren (Diana Wolf, Vortrag auf der VAAM Karlsruhe).

Ein weiteres Problem bei der Interpretation der erhaltenen Daten des BACTH-Systems stellten die verschiedenen Anzuchtbedingungen dar. Obwohl verschiedene PspA-PspA-Kombinationen zu einer Blaufärbung der Kolonien führten (Abb. 3.35 B) und die Blaufärbung ein erster Hinweis auf eine mögliche Interaktion ist, konnten diese Ergebnisse nicht in Flüssigkulturen reproduziert werden. Beide Anzuchtvarianten unterscheiden sich unter anderem im Sauerstoffgehalt und der Zugänglichkeit der Nährstoffe. Gleichzeitig befinden sich die in Kolonien wachsenden Bakterien in einem Biofilm, in dem sich auch das Genexpressionsmuster im Vergleich zu jenem von Bakterien aus Flüssigkulturen deutlich unterscheidet. Hervorzuheben ist hierbei insbesondere auch die erhöhte *pspA*-Expression in Biofilmen (Beloin *et al.*, 2004). So könnte die erhöhte Aktivität des Psp-Systems einen positiven Einfluss auf die Interaktionskinetik haben. Während des Wachstum auf festen Medien wird das Innere einer Kolonie anoxisch, wodurch eine endogene LacZ-Aktivität im Hintergrund induziert wird und sich die Kolonien mit der Zeit bläulich färben. In Flüssigkultur ist die endogene LacZ-Aktivität gering, sodass in diesem Fall keine oder nur eine geringe β -Galaktosidaseaktivität nachgewiesen werden kann.

Der Nachweis von Interaktionen zwischen Membranproteinen (Tat-Komponenten) mit Hilfe von 2H-Systemen ist ebenfalls schwierig, weil die fusionierten Fragmente häufig lösliche Proteine sind, die eine Membraninsertion eventuell verhindern können. Gleichzeitig können die Fusionsproteine derart sterisch eingeschränkt sein, dass eine stabile Interaktion bzw. möglicherweise stabilisierende Komplexbildung kaum mehr möglich ist. So waren sowohl TatA-, TatE- als auch TatB-Fusionsproteine meistens in ihrer Fähigkeit eingeschränkt den *tat*⁻-Phänotyp zu komplementieren, sobald das T25-Adenylatzyklasefragment bzw. der LexA-Repressor N-terminal fusioniert vorlag. Außerdem kann durch die angewendete IPTG-Induktion nicht ausgeschlossen werden, dass Fusionsproteine vermehrt als *Inclusion bodies* aggregieren und nicht ihrer natürlichen Funktion nachgehen können. Aus diesem Grund ist es wichtig, sowohl N- als auch C-terminale Fusionsmöglichkeiten in den jeweiligen 2H-Systemen zu besitzen, die

möglichst dem WT-Level entsprechen, um Aussagen über die physiologische Bedeutung treffen zu können.

Darüber hinaus ist es unklar ob Fusionen mit Proteinfragmenten wie den N-Termini von TatA bzw. TatB von etwa 2 kDa überhaupt spezifische Interaktionen erlauben oder ob auch unspezifische Wechselwirkung der hydrophoben Bereiche des N-Terminus zu messbaren Aktivitäten führen können. Da allerdings keine Interaktionen zwischen N-terminalen Transmembrandomänen von TatA und TatB beobachtet wurden, scheint eine völlig unspezifische Wechselwirkung von Transmembrandomänen unwahrscheinlich.

Im großen Zusammenhang ist für das Arbeiten mit 2H-Systemen zu beachten, dass das Ausbleiben von Interaktionen (Negativergebnisse) nicht gleichzeitig bedeutet, dass die unfusionierten Proteine *per se* nicht miteinander interagieren würden, sondern eventuell nur, dass sich die gewählte Methode nicht für den Nachweis dieser Interaktion eignet. Positivergebnisse (Interaktionen) sind in dem Sinne als eindeutiger zu bewerten, da falschpositive Interaktionsergebnisse, die durch stabile unspezifische Interaktionen zwischen den beiden fusionierten Proteinen zustande kämen, als unwahrscheinlich anzunehmen sind.

4.2.4 Vergleich der 2H-Ergebnisse mit denen von Maldonado *et al.* (2011b)

Mit dieser Arbeit wurden grundlegende Erkenntnisse über die Interaktionen innerhalb der Tat-Komponenten gewonnen. Um diese gewonnenen Daten in den Kontext des Tat-Systems einordnen zu können, werden diese mit dem einzig bekannten 2H-Artikel über das Tat-System von Maldonado *et al.* (2011b) verglichen und diskutiert (all dies geschieht vor dem Hintergrund der in Abschnitt 4.2.3 beschriebenen Problematik von 2H-Systemen).

Mit Hilfe des LexA-basierten 2H-Systems konnte in dieser Dissertation die Selbstinteraktion von TatA-Oligomeren gezeigt werden, die entweder nur keine TMH oder sowohl keine TMH noch die amphipathische Helix als strukturellen Bereich aufwiesen. Für die gleichen Konstrukte konnte durch Maldonado *et al.* (2011b) im BACTH-System jedoch keine β -Galaktosidaseaktivität nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe um Tracy Palmer (Maldonado) zeigte jedoch mit dem BACTH-System, dass TatA-Derivate ohne Transmembranhelix (AS 22-89) stark miteinander interagieren können. Dies konnte mit den verwendeten TatA-Derivaten (TatA-T22) für das in dieser Doktorarbeit

ebenfalls verwendete BACTH-System nicht reproduziert werden (Abb. A.2 im Anhang durch einen * gekennzeichnet), obwohl dieses TatA-Fusionsprotein wie bei Maldonado *et al.* (2011b) ab AS 22 beginnt. Für die Klonierung des TatA-T22-Derivates verwendeten Maldonado *et al.* (2011b) eine XhoI-Schnittstelle, die in den Ausgangsvektoren des käuflich erworbenen BACTH-Kits nicht enthalten ist und im Kontext des Artikels nicht erläutert wird, woher diese Schnittstelle kommt. Es wird nur erwähnt, dass die XhoI/HindIII verdauten Fragmente mit den entsprechenden Schnittstellen der Vektoren ligiert wurden. Aus diesem Grund konnte nicht eindeutig nachvollzogen werden, ob die erhaltenen Ergebnisse dieser Arbeit auf die verschiedenen Klonierungsstrategien (fehlende XhoI-Schnittstelle) zurückzuführen sind.

Im Gegensatz zu Maldonado *et al.* (2011b) konnte auch für die TatB-Selbstinteraktion ohne TMH wie oben beschrieben keine Interaktion nachgewiesen werden. Die in dieser Dissertation präsentierten Daten sprechen allerdings eher für eine TatB-Selbstinteraktion, die über den TatB-N-Terminus vermittelt wird. Untersuchungen zu den N-Termini von TatA bzw. TatB wurden durch Maldonado *et al.* (2011b) nicht gezeigt, daher kann auf Grundlage der von Maldonado publizierten Daten eine Selbstinteraktion von TatB über den N-Terminus selbst in dem dort verwendeten System nicht ausgeschlossen werden.

Innerhalb dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass für die Interaktion von TatB mit TatC im TatBC-Komplex der TatB-N-Terminus ausreichend ist. Dieses Ergebnis grenzt die Bindungsstelle zwischen beiden Proteinen weiter ein (AS 1-21), da Maldonado *et al.* (2011b) mit Hilfe von Pulldown-Experimenten zeigten, dass die ersten 55 Reste von TatB ausreichend für eine TatB-TatC-Bindung sind.

4.2.5 TatA und TatE interagieren mit PspA

Der erste Hinweis auf ein physiologisches Zusammenspiel zwischen dem Tat- und dem Psp-System wurde durch DeLisa *et al.* (2004) aufgezeigt, die nach Coexpression von *pspA*, *sufI* und *cueO* eine erhöhte Transporteffizienz für die Substrate SufI und CueO beobachten konnten. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass nur bei einer Sättigung der Translokation und der Akkumulation des *precursor* im Cytoplasma PspA verstärkt synthetisiert wurde (DeLisa *et al.*, 2004). Da PspA allerdings unter verschiedensten Bedingungen, insbesondere auch bei Überproduktion rekombinanter Proteine gebildet wird (Poranen *et al.*, 2006; Brissette *et al.*, 1990; Aldor *et al.*, 2005), kann

dieser Effekt auch auf eine interaktionsunabhängige, generelle Stresskompensationsfunktion von PspA zurückgeführt werden.

Die direkte Interaktion von PspA und TatA und damit spezifische Interaktion dieser beiden Systeme wurde erstmals in meiner Diplomarbeit gezeigt (Mehner, 2006) und in dieser Arbeit näher charakterisiert (Abb. 3.1), wobei die Interaktion der beiden Proteine auf der Säulenmatrix hier zum ersten Mal in großem Umfang und ohne weitere Konzentrationsschritte gezeigt werden konnte. Bisher konnte diese nur schwach und nach weiterer Probenkonzentration (Acetonfällung) nachgewiesen werden (Standar, 2004). Gleichzeitig konnte ausgeschlossen werden, dass PspA TatA-unabhängig an die Säulenmatrix binden kann (Abb. 3.2 und Abb. 3.3). Zusätzlich dazu konnte auch zum ersten Mal eine Interaktion von TatE und PspA nachgewiesen werden (Abb. 3.5). Die beobachtete Interaktion ist nicht vollkommen unerwartet, da *tatE* aus einer kryptischen Genduplikation von *tatA* hervorgegangen sein soll, die sich vor allem in einer bis zu 60 %igen Sequenzähnlichkeit auf Proteinebene widerspiegelt, die im besonderen Maße im N-terminalen Bereich und der amphipathischen Helix hervortritt (Abb. 3.4). Beide Proteine sind über die genannten Bereiche mit der Membran assoziiert bzw. in sie integriert und werden nach der Substratbindung an den TatBC-Komplex PMF-abhängig von diesen gebunden (Mori und Cline, 2002; Alami *et al.*, 2003; Dabney-Smith *et al.*, 2006). Infolge dieser Rekrutierung könnte die Membran durch den Tat-Transport von Substraten geschwächt werden. Ein geschwächtes Membranpotential würde allerdings den Transport von weiteren Substraten blockieren (Alder und Theg, 2003), da sich die Tat-Translokase für jeden Transportzyklus neu formieren muss und der PMF-abhängige Schritt wahrscheinlich essentiell ist (Brüser und Sanders, 2003).

Trotz einer TatA-abhängigen lokalen Schwächung der Cytoplasmamembran für den Transport (*membrane weakening*, Brüser und Sanders, 2003) ist es physiologisch sinnvoll anzunehmen, dass durch spezifische Kompensationsmechanismen sichergestellt wird, dass kein unkontrollierter bzw. unnötiger Austausch von Protonen erfolgt und die Zelle eine lebensnotwendige Energiequelle, das Membranpotential, verliert. Diese Rolle könnte vom Psp-System übernommen werden, da PspA an der Aufrechterhaltung der PMF unter Stressbedingungen beteiligt sein soll. Es wird unter verschiedensten Stressbedingungen (Membranschwächung) in der Zelle verstärkt synthetisiert (Kleerebezem *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 2007; Engl *et al.*, 2009). Da das membranassoziiert vorliegende PspA große netzartige Strukturen ausbilden kann (Standar *et al.*, 2008), könnte

die untersuchte TatA-PspA-Interaktion ein Hinweis auf die interaktionsabhängige, lokale Stabilisierung der Membran durch PspA direkt am Tat-Translokon sein. Diese Annahme wird durch die erhaltenen EFTEM-Bilder weiter bestärkt (siehe 4.2.7).

4.2.6 Die TatA-PspA-Interaktion wird durch den N-Terminus von TatA vermittelt.

Durch Studien mit einzelnen TatA-Domänen konnte die Interaktionsdomäne von PspA und TatA eindeutig auf den N-terminalen, hydrophoben Bereich von TatA beschränkt werden. Die hydrophilen Domänen von TatA interagierten hingegen nicht mit PspA (Abb. 3.6). Auch hier wurde durch Kontrollen die eindeutige Abhängigkeit der Elution des PspAs von TatA gezeigt (Abb. 3.8). Ob für die PspA-TatA-Bindung der N-Terminus von TatA frei zugänglich sein muss, konnte nicht ausreichend geklärt werden, da im Falle der N-terminalen Fusion des murenen HiPIPs an TatA dieses Fusionsprotein destabilisiert wurde und die Elution von PspA in der Membranfraktion auch auf abgebautes TatA-strep zurückzuführen sein kann (Abb. 3.9). Durch die Fusion an ein lösliches Protein (matures HiPIP) wurde auch die subzelluläre Lokalisation von TatA in Richtung cytoplasmatisches Protein verschoben, sodass eventuell die Integration in die Membran gestört und deshalb eine erhöhte Proteaseaktivität zu erklären ist.

Aufgrund der durchgeführten Versuche mit veränderten TatA-N-Termini konnte gezeigt werden, dass die PspA-TatA-Interaktion wahrscheinlich auf einer von der regulativen PspA-PspF-Interaktion verschiedenen Art und Weise stattfinden muss. Dieses Erkenntnis ist insofern von Bedeutung, da für den *pspA*-Induktionsmechanismus angenommen wird, dass erst die Verdrängung des Regulatorproteins PspF von PspA durch induzierende Stressproteine (Osadnik, 2009) eine Stressantwort auslöst. TatA- und PspF-Interaktionen mit PspA sollten nach diesem Modell also *in vivo* miteinander konkurrieren.

Es wäre auch denkbar, dass TatA über zusätzliche Bereiche verfügt, die eine Interaktion mit PspA unterstützen bzw. initiieren. Diese Bereiche könnten in der amphipathischen Helix liegen. Mit *in-vivo*-Crosslinks konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass beide Proteine in unmittelbarer Nähe in der Zelle existieren (Abb. 3.45). Hierbei wurde jedoch nur bei Insertion von Crosslinkern in die amphipathische Helix von TatA eine kovalente Bindung zwischen PspA und TatA erreicht. Die geringe Effektivität bzw. das teilweise Ausbleiben von Crosslinks an den Positionen gerade in der TMH könnte dadurch zu er-

klären sein, dass die Wahrscheinlichkeit für kovalente Bindungen der TatA-Monomere untereinander innerhalb der TMH jedoch um einiges höher ist als Bindungen an benachbarte Proteine, da TatA wie bereits erwähnt homo-oligomere Komplexe ausbildet, sodass ein Großteil des aktivierten TatAs mit umgebenden TatA-Monomeren bzw. auch den ubiquitären Membranlipiden und nicht mit anderen Proteinen wie PspA interagiert (Greene *et al.*, 2007). Eventuell wären die Crosslink-Positionen in der amphipathischen Helix von dieser „Absättigung“ weniger betroffen, sodass hier ein größerer Teil der TatA-Proteine mit anderen Proteinen crosslinken könnte. Diese Annahme wird durch Beobachtungen aus dem chloroplastidären System gestützt, in dem eine deutlich höhere Abundanz der Tha4-Tha4-Interaktionen im Verhältnis zu Tha4-Interaktionen mit Hfc106 bzw. cpTatC beobachtet werden konnte (Dabney-Smith *et al.*, 2006; Dabney-Smith und Cline, 2009) und könnte daher erklären, warum von den 13 getesteten Positionen in TatA nur für zwei Positionen Crosslinks mit PspA nachgewiesen werden konnten. Hierbei ist außerdem interessant, dass Crosslinker in einer Region von TatA zu einem Crosslink mit PspA führten, die in den Pulldown-Studien nicht für eine PspA-TatA-Interaktion verantwortlich war. Das dennoch vorhandene Crosslinksignal könnte darin begründet sein, dass für einen Crosslink keine dauerhafte Interaktion, sondern nur eine temporäre räumliche Nähe zwischen zwei Proteinen notwendig ist. So könnte die C-terminale amphipathische Helix von TatA über die *hinge*-Region ausreichend flexibel sein, um bei Interaktionen zwischen dem N-Terminus von TatA mit PspA in räumliche Nähe dieses Proteins oder eines weiteren PspAs in dem größeren PspA-Komplex zu gelangen.

4.2.7 TatA und PspA bilden homo-oligomere Strukturen und cosedimentieren in TatA-PspA-Superkomplexen

Schon recht kurz nach der Entdeckung des Tat-Operons durch Weiner *et al.* (1998) und Sargent *et al.* (1998b) wurde TatA die Rolle der eigentlichen Translokationspore im TatABC-System zugeschrieben. Allerdings wurde TatA nach der Auftrennung im Saccharosegradienten in EM-Aufnahmen nicht wie zunächst durch Sargent *et al.* (2001) und Oates *et al.* (2003) postuliert als ringartige, porenförmige Struktur, sondern als röhrenförmige Komplexe bildend beobachtet. Die erstmalige Beschreibung derartiger Strukturen mit einem Durchmesser von 11,5 nm gelang Berthelmann *et al.* (2008), wobei diese Strukturen auch auf eine cytoplasmatische Akkumulation von TatA infolge

rekombinanter Produktion zurückzuführen sein könnten. Die Annahme, dass TatA-Oligomere ringartige, porenförmige Strukturen ausbilden (Sargent *et al.*, 2001), basiert auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen angereicherter TatAB- bzw. TatABC-Komplexe, sowie auf der Beobachtung 450 kDa schwerer TatA-Komplexe (Porcelli *et al.*, 2002), die vermutlich in der BN-PAGE fragmentieren und als eine Vielzahl von verschieden großen Oligomere aufgetrennt werden (Oates *et al.*, 2005; Richter und Brüser, 2005). Aufgrund dieser Ergebnisse ging man davon aus, dass TatA die Translokationspore bildet, die entsprechend der Größe des zu transportierenden Substrates aus unterschiedlich vielen TatA-Oligomeren aufgebaut ist (Gohlke *et al.*, 2005). Anhand im Zuge dieser Arbeit angefertigter EM-Bilder der TatA-Röhren wird deutlich, dass auch diese Strukturen aus ringförmigen Protomeren aufgebaut sind, da unterschiedlich lange Röhren beobachtet wurden (Abb. 3.17). Berthelmann (2010) zeigte, dass durch die Anwesenheit von TatC rekombinant produzierte TatA-Röhren geordnete Strukturen ausbilden und spekulierte über einen festen Ankerpunkt (TatC), über den die Röhren mit der Membran verbunden sein könnten. Die Anwesenheit von kürzeren TatA-Röhren in dieser Arbeit würde dafür sprechen, dass die Bindung des TatAs mit TatC (seinem Ankerpunkt in der Membran) nur so schwach ist, dass TatA während der Anreicherung oder während der Saccharosegradientenzentrifugation vom TatC dissoziiert. Fraglich ist allerdings, ob vorgeformte TatA-Komplexe existieren oder ob sie dem Substrat entsprechend zunächst aus TatA-Untereinheiten zusammengesetzt werden müssen (Gohlke *et al.*, 2005; Mori und Cline, 2002).

Neben den beschriebenen TatA-Röhren wurden auch kugelige Strukturen mittels Uranylacetat angefärbt. In Arbeiten aus unserem Labor konnte bereits gezeigt werden, dass PspA kugelförmige Komplexe mit einer netzwerkartigen Feinstruktur ausbildet (Standar *et al.*, 2008), die den in dieser Arbeit mit TatA-Röhren coeludierenden und cosedimentierenden Kugelstrukturen sehr ähneln. Aufgrund der Tatsache, dass die PspA-TatA-Coelution in dieser Arbeit eindeutig gezeigt wurde, handelt es sich daher höchstwahrscheinlich um PspA-Komplexe. Zusätzlich zu getrennt liegenden TatA-Röhren und PspA-„Kugeln“ gab es auch Strukturen, die auf eine Verbindung beider Komplexe schließen ließen (Abb. 3.17 durch \rightarrow gekennzeichnet). Verbindungen dieser Art würden für eine Interaktion in größeren „Superkomplexen“ sprechen. Ähnlich geartete Strukturen wurden in EM-Aufnahmen auch für TatA_d und PspA aus *B. subtilis* gezeigt (Westermann *et al.*, 2006), jedoch von der Arbeitsgruppe um Müller wohl

aufgrund fehlender Kenntnis über die TatA-PspA-Interaktion als zwei Ausprägungen (Röhren und Kugel) von TatA-Komplexen identifiziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, Aufbau und Mechanismus des Tat-Systems besser zu verstehen. So konnten in Verbindung von Pulldown-, Crosslink- und 2H-Untersuchungen für alle Tat-Komponenten untereinander und für PspA Interaktionsdomänen identifiziert werden (Übersicht siehe Abb. 4.1), die eine gleichzeitige -und notwendige- Interaktion von Proteinen mit mehreren Interaktionspartnern erlauben, wobei eine sterische Behinderung der verschiedenen Interaktionspartner untereinander möglicherweise verhindert wird.

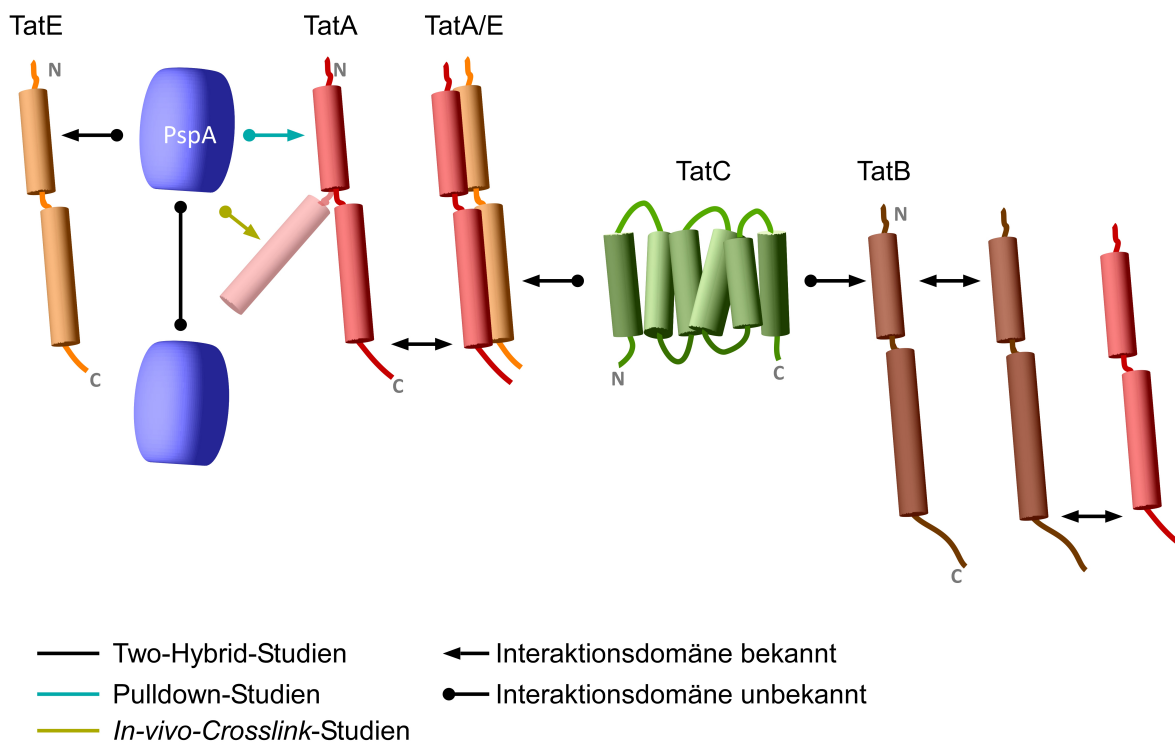


Abbildung 4.1: Schematische Übersicht der bestimmten Interaktionsstellen der einzelnen Tat-Komponenten und TatA/E mit PspA. Für alle Tat-internen Interaktionen mit TatA-Monomeren ist der C-Terminus von Bedeutung, wobei die TatB-Selbstinteraktion und die TatB-Interaktion mit TatC über den N-Terminus vermittelt wird. Da der C-Terminus von TatA/E für die Tat-Interaktionen entscheidend ist, kann der N-Terminus beider Proteine sterisch ungehindert mit PspA interagieren (Pulldown-Studien). Mit Hilfe des *in-vivo*-Crosslinkings konnte PspA an die amphipathische Helix kovalent fixiert werden (pastellrot).

4.3 *pspA* wird TatA-abhängig induziert

Eine Vielzahl von Stressbedingungen vor allem an der Membran bewirken ein Ansteigen der PspA-Konzentration in der Zelle. Für das Membranprotein TatA konnte neben der bereits beschriebenen TatA-PspA-Interaktion auch eine TatA-abhängige *pspA*-Induktion nachgewiesen werden. Fraglich ist hierbei, ob die Induktion von *pspA* indirekt über die Stressantwort oder direkt über die Interaktion mit TatA erfolgt.

4.3.1 *pspA* wird in Abhängigkeit des N-Terminus von TatA induziert

Bei der TatA-abhängigen *pspA*-Induktion (Abb. 3.18) korrelierte, wie schon für das Phagenprotein pIV gesehen, die PspA-Konzentration direkt in Abhängigkeit der rekombinanten Produktion von TatA (Abb. 3.19, Brissette *et al.*, 1990). Laut DeLisa *et al.* (2004) kommt es ebenfalls bei einer Deletion von *tatA* bzw. *tatC* zu einem Anstieg der PspA-Konzentration. Diese Beobachtung konnte für den *tatABCDtatE*-Deletionsstamm DADE bestätigt werden (Abb. 3.21 DADE). Der zu Grunde liegende Mechanismus müsste in diesem Fall von anderen Komponenten als TatA abhängig sein, da dieses durch die Deletion nicht als Induktor zur Verfügung stand. Es könnte auch an dem Eintauchen der Signalpeptide der Tat-Substrate in die Membran begründet liegen (Brüser und Sanders, 2003; Hou *et al.*, 2006), da dieser Schritt Tat-unabhängig erfolgt und eventuell das Membranpotential schwächt, sodass das *psp*-Operon als Stressantwort induziert wird (Osadnik, unveröffentlicht). Fraglich ist allerdings, warum Jones *et al.* (2003) dieses Phänomen nicht beobachten konnten. Der Unterschied könnte im Detail liegen, da (Jones *et al.*, 2003) durch *pspA-lacZ*-Transkriptionsfusionen die Induktion des *pspA*-Gens untersuchten, wohingegen DeLisa *et al.* (2004) die Proteinmenge an PspA verglich. Für die direkt TatA-interaktionsabhängige Induktion von *pspA* könnte die *tatA*-Einzeldelation sprechen, da in diesem Fall im Vergleich zu den restlichen PspA-Proteinmengen in *tat*-Deletionsstämmen weniger PspA nachgewiesen wurde (DeLisa *et al.*, 2004). Die Restinduktion im Vergleich zum WT-Stamm könnte durch TatE erfolgen, da dieses nachgewiesenermaßen wie TatA mit PspA interagiert, im N-terminalen Bereich strukturell sehr ähnlich ist und PspA auch induzieren kann. Ergo existieren in der Zelle Ausweichmechanismen (TatE kann TatA funktionell ersetzen) durch die eine eventuelle Stressantwort eingeleitet werden kann.

Weil TatA und TatE vor allem strukturelle Übereinstimmungen im N-Terminus be-

sitzen und beide PspA induzieren, liegt es nahe, dass die TatA/E-abhängige *pspA*-Induktion vom N-Terminus vermittelt wird. Dies konnte durch verschiedene TatA-Fusionsproteine bestätigt werden, wobei zu beachten ist, dass *pspA* immer nur dann induziert wurde, wenn der N-Terminus von TatA frei zugänglich und nicht durch andere Proteine (z.B. matures HiPIP) blockiert wurde (Abb. 3.21 Vergleich Spuren 9 und 10).

4.3.2 *pspA* wird direkt durch die TatA-PspA-Interaktion induziert

Die *pspA*-Induktion über den N-Terminus muss, wie oben bereits erläutert, nicht zwangsläufig von der Interaktion zwischen TatA und PspA abhängen, sondern könnte auch eine indirekte Folge der Membraninteraktion von TatA sein, da TatA über den N-Terminus membranintegral bzw. membranassoziiert vorliegt, dadurch die Membran schwächt (wie zuvor schon im Abschnitt 4.2.5 eingehender erläutert) und infolgedessen die Psp-Antwort induziert wird. Zur Klärung dieses Sachverhaltes tragen hierzu die erhaltenen Ergebnisse aus den Mutationsstudien mit dem N-Terminus von TatA bei. Für die Funktionalität des Tat-Mechanismus und der daraus abgeleiteten Membraninteraktion von TatA scheinen folgende Merkmale relevant zu sein:

1. Der hydrophobe Bereich der TMH muss für die Membraninsertion ein kritische Länge aufweisen. Wurden die ersten 5 AS von TatA gegen einen STGGG-*linker* ausgetauscht, konnte keine *pspA*-Induktion nachgewiesen werden (Abb. 3.27 Spur 6). Die Verlängerung des hydrophoben Bereiches um nur eine AS (TatA(bc-I)) führte zu einer stärkeren subzellulären Lokalisation des TatA-Derivates und PspAs in den Membranen (Abb. 3.27 Spur 7).

2. Einzelne Ladungen (positiv oder negativ) an der Q8-Position werden toleriert. So konnte gezeigt werden, dass Aminosäureaustausche gegen Aspartat oder Lysin zwar die *pspA*-Induktion beeinflussten, diese aber immer mit einer Verschiebung der subzellulären Lokalisation von TatA einher ging (Abb. 3.26 Spuren 12 und 13). Innerhalb der TatA-Komponenten existiert eine natürlich Varianz an dieser Position, die keinen Einfluss auf die Funktionalität des Tat-Systems und der daraus resultierenden Membraninteraktion von TatA besitzt. So besitzen das TatA-Paralog TatA_d aus *B. subtilis* und das pflanzliche TatA-Homolog Tha4 ein Glutamat und TatE aus *E. coli* weist ein Lysin auf.

3. Negative Ladungen am N-Terminus von TatA stören nicht bei der Funktion und daher wahrscheinlich auch nicht bei einer „spontanen“ Membraninsertion. Aminosäureaustausche der G3-Position gegen ein Aspartat verschoben die subzelluläre Lokalisation des TatAs in Richtung lösliches Protein, was eventuell auf eine geringere Bindungsaffinität der Membraninteraktion von TatA zurückzuführen ist, die aber nicht gleichzeitig bedeutet, dass TatA nur membranassoziiert und nicht mehr integral vorliegt, da dieses TatA-Derivat keinen Einfluss auf die Funktionalität des Tat-Systems hatte. An der gleichen Position ist in TatB natürlicherweise ein Aspartat, das in diesem Fall auch die für die TatBC-Komplex notwendige Insertion in die CPM nicht unterbindet. Durch den gezeigten G3D-Austausch in TatA werden TatB-Suppressormutanten erzeugt, die TatB funktionell ersetzen können (Blaudeck *et al.*, 2005). Dies bedeutet für TatA, dass negative Ladungen zu Beginn der TMH nicht durch Ladungsabstoßung gegenüber den Phospholipiden der CPM die Membraninteraktion verhindern.

4. Für einen postulierten Protonierungsmechanismus oder elektrostatische Wechselwirkungen mit dem TatBC-Komplex ist die Position Q8 in TatA nicht essentiell (Dabney-Smith und Cline, 2009). Interaktionsstudien mit Hilfe des BACTH-Systems unterstützen diese Aussage, da die TMH von TatA nicht für die TatB- bzw. TatC-Interaktion von Bedeutung ist (Abb. 3.39A und Abb. A.5). Dennoch muss die Q8-Position polar sein, weil Aminosäureaustausche gegen die hydrophobe AS Leucin den Tat-Transport blockierten.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass Änderungen in der subzellulären Lokalisation von TatA und daraus resultierende Funktionalitätsdefizite des Tat-Systems keinen Einfluss auf die TatA-abhängige *pspA*-Induktion haben, solange der N-Terminus ausreichend lang ist, und somit eine direkte, interaktionsabhängige Induktion von *pspA* wahrscheinlich erscheint, auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass das eigentliche Interaktionssignal die Schwächung der Membran durch insertiertes TatA darstellt.

4.4 Modell der TatA-abhängigen PspA-Rekrutierung an die Membran

Die erhaltenen Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine TatA-abhängige Rekrutierung PspAs an die Cytoplasmamembran hin (Abb. 4.2). Unter stressfreien Bedingungen wird PspF von seinem negativen Regulator PspA im Cytoplasma gebunden und die PspA-Konzentration ist auch auf einem basalen Niveau. Gleichzeitig kann PspA im CP auch an den N-Terminus von TatA binden, wodurch die TatA-abhängige Coelution von PspA zu erklären ist.

Wird TatA an den TatBC-Komplex rekrutiert, entfernt TatA durch dessen Bindung an PspA PspA aus dem PspA-PspF-Gleichgewicht und dirigiert gebundenes PspA direkt zum TatBC-Komplex. An der Cytoplasmamembran angekommen kann PspA zu einem oligomeren Netzwerk assemblieren, dass durch TatA genau an die Stelle positioniert wurde, an der die Translokation der Tat-Substrate erfolgt und infolgedessen das Membranpotential geschwächt wird.

Diese direkte Lokalisierung ist bei dieser Art von Membranstress von möglicherweise besonderer Bedeutung, da es sich bei der Öffnung einer „Pore“ während des Translokationsprozesses nicht um einen delokalisierten, d.h. über die gesamte Membran gleichverteilten Stressor wie z.B. Ethanol handelt, sondern um ein lokal und temporär eingeschränktes Ereignis. Da für die Funktionalität des Tat-Systems ein stabiles Membranpotential essentiell ist, hätte die Bindung an den N-Terminus von TatA den gewissen Vorteil, dass eine eventuelle Konformationsänderung des TatA-N-Terminus infolge der Membraninteraktion direkt an PspA weitergeleitet werden kann und dies der Impuls für das Ausbilden der netzwerkartigen Strukturen wäre, um das Membranpotential zu stabilisieren.

Freies PspF würde in diesem Modell ohne Bindung von PspA σ^{54} -abhängig die Transkription des *pspABCDE*-Operon induzieren, bis die PspA-Konzentration im CP wieder ausreichend ist (d.h. die TatA-Komplexe mit PspA „abgesättigt“ sind), um die PspF-abhängige PspA-Produktion zu unterbinden.

Auf der Grundlage der Daten dieser Dissertation kann also postuliert werden, dass zusätzlich zu der bereits bekannten PspBC-abhängigen Rekrutierung PspAs an die

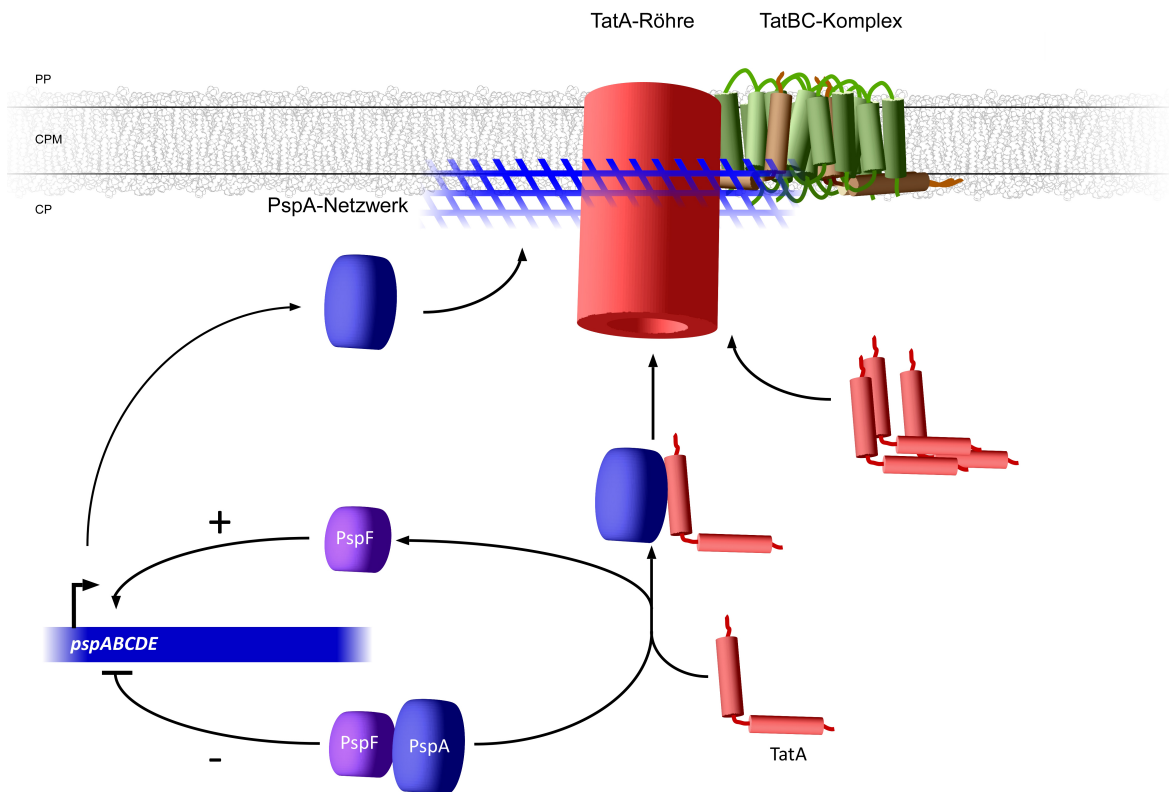


Abbildung 4.2: Schematische Übersicht über die TatA-vermittelte Induktion von *pspA* und dessen Rekrutierung an die Cytoplasmamembran in *E. coli*. Sowohl PspF als auch TatA interagieren im stressfreien Zustand mit PspA. Falls TatA an den TatBC-Komplex in der Membran rekrutiert wird, würde PspA von PspF abgelöst und würde durch seine Bindung an TatA zum TatBC-Komplex dirigiert. PspA bildet eine netzartige Feinstruktur direkt am TatBC-Komplex aus, wodurch es einer möglichen Schwächung des Membranpotentials entgegenwirkt. Freies PspF induziert die Transkription des *psp*-Operons solange bis ausreichend PspA im CP vorliegt, um die PspF-abhängige PspA-Produktion zu unterbinden.

CPM die in dieser Arbeit gezeigte TatA-abhängige PspA-Interaktion und die daraus resultierende *pspA*-Induktion eventuell einen weiteren Regulationsmechanismus der Psp-Stressantwort in *E. coli* darstellt, welcher im Gegensatz zu den bisher bekannten Induktionsbedingungen bereits "präventiv", d.h. vor dem eigentlichen Membranstress wirkt, und nicht erst als Antwort auf eine Schwächung der Membran.

Weitere Arbeiten an diesem Thema könnten daher die Funktionsweise des Psp-Systems und vor allem PspAs und dessen Stabilisierung des Membranpotentials während des Tat-Transportes weiter beleuchten. Die Bestimmung der exakte Bindestelle der PspA-TatA-Interaktion könnte dazu beitragen einen generell gültigen Phänotyp des Psp-Systems zu definieren.

Literatur

- Adams, H. ; Teertstra, W. ; Demmers, J. ; Boesten, R. ; Tommassen, J.: Interactions between phage shock proteins in *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* (2003), Nr. 4, S. 1174–1180
- Adams, H. ; Teertstra, W. ; Koster, M. ; Tommassen, J.: PspE (phage shock protein E) of *Escherichia coli* is a rhodanese. In: *FEBS Lett* (2002), Nr. 1-3, S. 173–176
- Alami, M. ; Lüke, I. ; Deitermann, S. ; Eisner, G. ; Koch, H.-G. ; Brunner, J. ; Müller, M.: Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. In: *Mol Cell* (2003), Nr. 4, S. 937–946
- Alami, M. ; Trescher, D. ; Wu, L.-F. ; Müller, M.: Separate analysis of twin-arginine translocation (Tat)-specific membrane binding and translocation in *Escherichia coli*. In: *J Biol Chem* (2002), Nr. 23, S. 20499–20503
- Alder, N. N. ; Theg, S. M.: Energetics of protein transport across biological membranes. A study of the thylakoid Δ pH-dependent/cpTat pathway. In: *Cell* (2003), Nr. 2, S. 231–242
- Aldor, I. S. ; Krawitz, D. C. ; Forrest, W. ; Chen, C. ; Nishihara, J. C. ; Joly, J. C. ; Champion, K. M.: Proteomic profiling of recombinant *Escherichia coli* in high-cell-density fermentations for improved production of an antibody fragment biopharmaceutical. In: *Appl Environ Microbiol* (2005), Nr. 4, S. 1717–1728
- Aseeva, E. ; Ossenbühl, F. ; Eichacker, L. A. ; Wanner, G. ; Soll, J. ; Vothknecht, U. C.: Complex formation of Vipp1 depends on its α -helical PspA-like domain. In: *J Biol Chem* (2004), Nr. 34, S. 35535–35541
- Baba, T. ; Ara, T. ; Hasegawa, M. ; Takai, Y. ; Okumura, Y. ; Baba, M. ; Datsenko, K. A. ; Tomita, M. ; Wanner, B. L. ; Mori, H.: Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. In: *Mol Syst Biol* (2006), Nr. 8, S. 1–11
- Bachmann, J. ; Bauer, B. ; Zwicker, K. ; Ludwig, B. ; Anderka, O.: The Rieske protein from *Paracoccus denitrificans* is inserted into the cytoplasmic membrane by the twin-arginine translocase. In: *FEBS J* (2006), Nr. 21, S. 4817–4830

- Barnett, J. P. ; Ploeg, R. Van der ; Eijlander, R. T. ; Nenninger, A. ; Mendel, S. ; Rozeboom, R. ; Kuipers, O. P. ; Van Dijl, J. M. ; Robinson, C.: The twin-arginine translocation (Tat) systems from *Bacillus subtilis* display a conserved mode of complex organization and similar substrate recognition requirements. In: *FEBS J* (2009), Nr. 1, S. 232–243
- Barrett, C. M. L. ; Robinson, C.: Evidence for interactions between domains of TatA and TatB from mutagenesis of the TatABC subunits of the twin-arginine translocase. In: *FEBS J* (2005), Nr. 9, S. 2261–2275
- Beck, K. ; Eisner, G. ; Trescher, D. ; Dalbey, R. E. ; Brunner, J. ; Müller, M.: YidC, an assembly site for polytopic *Escherichia coli* membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. In: *EMBO Rep* (2001), Nr. 8, S. 709–714
- Behrendt, J. ; Lindenstrauss, U. ; Brüser, T.: The TatBC complex formation suppresses a modular TatB-multimerization in *Escherichia coli*. In: *FEBS Lett* (2007), Nr. 21, S. 4085–4090
- Behrendt, J. ; Standar, K. ; Lindenstrauss, U. ; Brüser, T.: Topological studies on the twin-arginine translocase component TatC. In: *FEMS Microbiol Lett* (2004), Nr. 2, S. 303–308
- Beloin, C. ; Valle, J. ; Latour-Lambert, P. ; Faure, P. ; Kzreminski, M. ; Balestrino, D. ; Haagensen, J. A. J. ; Molin, S. ; Prensier, G. ; Arbeille, B. ; Ghigo, J.-M.: Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. In: *Mol Microbiol* (2004), Nr. 3, S. 659–674
- Berks, B. C.: A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? In: *Mol Microbiol* (1996), Nr. 3, S. 393–404
- Berks, B. C. ; Palmer, T. ; Sargent, F.: The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology. In: *Adv Microb Physiol* (2003), S. 187–254
- Berks, B. C. ; Palmer, T. ; Sargent, F.: Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. In: *Curr Opin Microbiol* (2005), Nr. 2, S. 174–181
- Berks, B. C. ; Sargent, F. ; Palmer, T.: The Tat protein export pathway. In: *Mol Microbiol* (2000), Nr. 2, S. 260–274

- Bernhardt, T. G. ; De Boer, P. A. J.: The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. In: *Mol Microbiol* (2003), Nr. 5, S. 1171–1182
- Berthelmann, F.: Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung der Komponenten des Tat-Systems in *Escherichia coli*. In: *Dissertation am Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg* (2010),
- Berthelmann, F. ; Brüser, T.: Localization of the Tat translocon components in *Escherichia coli*. In: *FEBS Lett* (2004), Nr. 1-3, S. 82–88
- Berthelmann, F. ; Mehner, D. ; Richter, S. ; Lindenstrauß, U. ; Lünsdorf, H. ; Hause, G. ; Brüser, T.: Recombinant expression of *tatABC* and *tatAC* results in the formation of interacting cytoplasmic TatA tubes in *Escherichia coli*. In: *J Biol Chem* (2008), Nr. 37, S. 25281–25289
- Bidle, K. A. ; Kirkland, P. A. ; Nannen, J. L. ; Maupin-Furlow, J. A.: Proteomic analysis of *Haloferax volcanii* reveals salinity-mediated regulation of the stress response protein PspA. In: *Microbiology* (2008), Nr. Pt 5, S. 1436–1443
- Blaudeck, N. ; Kreutzenbeck, P. ; Müller, M. ; Sprenger, G. A. ; Freudl, R.: Isolation and characterization of bifunctional *Escherichia coli* TatA mutant proteins that allow efficient tat-dependent protein translocation in the absence of TatB. In: *J Biol Chem* (2005), Nr. 5, S. 3426–3432
- Blobel, G. ; Dobberstein, B.: Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. In: *J Cell Biol* (1975), Nr. 3, S. 835–851
- Bogsch, E. ; Brink, S. ; Robinson, C.: 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* (1997), Nr. 13, S. 3851–3859
- Bogsch, E. G. ; Sargent, F. ; Stanley, N. R. ; Berks, B. C. ; Robinson, C. ; Palmer, T.: An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. In: *J Biol Chem* (1998), Nr. 29, S. 18003–18006

- Bolhuis, A. ; Bogsch, E. G. ; Robinson, C.: Subunit interactions in the twin-arginine translocase complex of *Escherichia coli*. In: *FEBS Lett* (2000), Nr. 1, S. 88–92
- Bolhuis, A. ; Mathers, J. E. ; Thomas, J. D. ; Barrett, C. M. ; Robinson, C.: TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. In: *J Biol Chem* (2001), Nr. 23, S. 20213–20219
- Bostina, M. ; Mohsin, B. ; Kühlbrandt, W. ; Collinson, I.: Atomic model of the *E. coli* membrane-bound protein translocation complex SecYEG. In: *J Mol Biol* (2005), Nr. 5, S. 1035–1043
- Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal Biochem* (1976), Nr. 1-2, S. 248–254
- Breukink, E. ; Nouwen, N. ; Van Raalte, A. ; Mizushima, S. ; Tommassen, J. ; De Kruijff, B.: The C terminus of SecA is involved in both lipid binding and SecB binding. In: *J Biol Chem* (1995), Nr. 14, S. 7902–7907
- Breyton, C. ; Haase, W. ; Rapoport, T. A. ; Kühlbrandt, W. ; Collinson, I.: Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. In: *Nature* (2002), Nr. 6898, S. 662–665
- Brissette, J. L. ; Russel, M. ; Weiner, L. ; Model, P.: Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990), Nr. 3, S. 862–866
- Brissette, J. L. ; Weiner, L. ; Ripmaster, T. L. ; Model, P.: Characterization and sequence of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. In: *J Mol Biol* (1991), Nr. 1, S. 35–48
- Brüser, T. ; Deutzmann, R. ; Dahl, C.: Evidence against the double-arginine motif as the only determinant for protein translocation by a novel Sec-independent pathway in *Escherichia coli*. In: *FEMS Microbiol Lett* (1998), Nr. 2, S. 329–336
- Brüser, T. ; Sanders, C.: An alternative model of the twin arginine translocation system. In: *Microbiol Res* (2003), Nr. 1, S. 7–17
- Brüser, T. ; Yano, T. ; Brune, D. C. ; Daldal, F.: Membrane targeting of a folded and cofactor-containing protein. In: *Eur J Biochem* (2003), Nr. 6, S. 1211–1221

- Casadaban, M. J.: Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage λ and Mu. In: *J Mol Biol* (1976), Nr. 3, S. 541–555
- Chan, C. S. ; Haney, E. F. ; Vogel, H. J. ; Turner, R. J.: Towards understanding the Tat translocation mechanism through structural and biophysical studies of the amphipathic region of TatA from *Escherichia coli*. In: *Biochim Biophys Acta* (2011), Nr. 9, S. 2289–2296
- Chan, C. S. ; Zlomislic, M. R. ; Tieleman, D. P. ; Turner, R. J.: The TatA subunit of *Escherichia coli* twin-arginine translocase has an N-in topology. In: *Biochemistry* (2007), Nr. 25, S. 7396–7404
- Chanal, A. ; Santini, C.-L. ; Wu, L.-F.: Potential receptor function of three homologous components, TatA, TatB and TatE, of the twin-arginine signal sequence-dependent metalloenzyme translocation pathway in *Escherichia coli*. In: *Mol Microbiol* (1998), Nr. 3, S. 674–676
- Cherepanov, P. P. ; Wackernagel, W.: Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. In: *Gene* (1995), Nr. 1, S. 9–14
- Chien, C. T. ; Bartel, P. L. ; Sternglanz, R. ; Fields, S.: The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (1991), Nr. 21, S. 9578–9582
- Chin, J. W. ; Schultz, P. G.: *In vivo* photocrosslinking with unnatural amino Acid mutagenesis. In: *Chembiochem* (2002), Nr. 11, S. 1135–1137
- Cline, K. ; Mori, H.: Thylakoid Δ pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. In: *J Cell Biol* (2001), Nr. 4, S. 719–729
- Cristóbal, S. ; De Gier, J. W. ; Nielsen, H. ; Von Heijne, G.: Competition between Sec- and Tat-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. In: *EMBO J* (1999), Nr. 11, S. 2982–2990

- Dabney-Smith, C. ; Cline, K.: Clustering of C-terminal stromal domains of Tha4 homooligomers during translocation by the Tat protein transport system. In: *Mol Biol Cell* (2009), Nr. 7, S. 2060–2069
- Dabney-Smith, C. ; Mori, H. ; Cline, K.: Oligomers of Tha4 organize at the thylakoid Tat translocase during protein transport. In: *J Biol Chem* (2006), Nr. 9, S. 5476–5483
- Dalbey, R. E. ; Chen, M.: Sec-translocase mediated membrane protein biogenesis. In: *Biochim Biophys Acta* (2004), Nr. 1-3, S. 37–53
- Danese, P. N. ; Silhavy, T. J.: Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. In: *Annu Rev Genet* (1998), Nr. 32, S. 59–94
- Darwin, A. J.: The phage shock protein response. In: *Mol Microbiol* (2005), Nr. 3, S. 621–628
- Darwin, A. J. ; Miller, V. L.: The *psp* locus of *Yersinia enterocolitica* is required for virulence and for growth *in vitro* when the Ysc type III secretion system is produced. In: *Mol Microbiol* (2001), Nr. 2, S. 429–444
- Datsenko, K. A. ; Wanner, B. L.: One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000), Nr. 12, S. 6640–6645
- De Gier, J. W. ; Luirink, J.: Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. In: *Mol Microbiol* (2001), Nr. 2, S. 314–322
- De Gier, J. W. ; Valent, Q. A. ; Von Heijne, G. ; Luirink, J.: The *E. coli* SRP: preferences of a targeting factor. In: *FEBS Lett* (1997), Nr. 1, S. 1–4
- De Keersmaecker, S. ; Van Mellaert, S. ; Lammertyn, E. ; Vrancken, K. ; Anné, J. ; Geukens, N.: Functional analysis of TatA and TatB in *Streptomyces lividans*. In: *Biochem Biophys Res Commun* (2005), Nr. 3, S. 973–982
- De Keersmaecker, S. ; Van Mellaert, S. ; Schaerlaekens, K. ; Van Dessel, W. ; Vrancken, K. ; Lammertyn, E. ; Anné, J. ; Geukens, N.: Structural organization of the twin-arginine translocation system in *Streptomyces lividans*. In: *FEBS Lett* (2005), Nr. 3, S. 797–802

- De Leeuw, E. ; Porcelli, I. ; Sargent, F. ; Palmer, T. ; Berks, B. C.: Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway. In: *FEBS Lett* (2001), Nr. 2, S. 143–148
- DeLisa, M. P. ; Lee, P. ; Palmer, T. ; Georgiou, G.: Phage shock protein PspA of *Escherichia coli* relieves saturation of protein export via the Tat pathway. In: *J Bacteriol* (2004), Nr. 2, S. 366–373
- Ding, Z. ; Christie, P. J.: *Agrobacterium tumefaciens* twin-arginine-dependent translocation is important for virulence, flagellation, and chemotaxis but not type IV secretion. In: *J Bacteriol* (2003), Nr. 3, S. 760–771
- Dmitrova, M. ; Younés-Cauet, G. ; Oertel-Buchheit, P. ; Porte, D. ; Schnarr, M. ; Granger-Schnarr, M.: A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. In: *Mol Gen Genet* (1998), Nr. 2, S. 205–212
- Dubini, A. ; Sargent, F.: Assembly of Tat-dependent [NiFe] hydrogenases: identification of precursor-binding accessory proteins. In: *FEBS Lett* (2003), Nr. 1-3, S. 141–146
- Duong, F. ; Wickner, W.: The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. In: *EMBO J* (1997), Nr. 16, S. 4871–4879
- Dworkin, J. ; Jovanovic, G. ; Model, P.: The PspA protein of *Escherichia coli* is a negative regulator of σ^{54} -dependent transcription. In: *J Bacteriol* (2000), Nr. 2, S. 311–319
- Economou, A. ; Wickner, W.: SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. In: *Cell* (1994), Nr. 5, S. 835–843
- Elderkin, S. ; Bordes, P. ; Jones, S. ; Rappas, M. ; Buck, M.: Molecular determinants for PspA-mediated repression of the AAA transcriptional activator PspF. In: *J Bacteriol* (2005), Nr. 9, S. 3238–3248
- Elderkin, S. ; Jones, S. ; Schumacher, J. ; Studholme, D. ; Buck, M.: Mechanism of action of the *Escherichia coli* phage shock protein PspA in repression of the AAA family transcription factor PspF. In: *J Mol Biol* (2002), Nr. 1, S. 23–37

- Engl, C. ; Jovanovic, G. ; Lloyd, L. J. ; Murray, H. ; Spitaler, M. ; Ying, L. ; Errington, J. ; Buck, M.: *In vivo* localizations of membrane stress controllers PspA and PspG in *Escherichia coli*. In: *Mol Microbiol* (2009), Nr. 3, S. 382–396
- Fekkes, P. ; Does, C. Van der ; Driessen, A. J. M.: The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. In: *EMBO J* (1997), Nr. 20, S. 6105–6113
- Fuhrmann, E. ; Bultema, J. B. ; Kahmann, U. ; Rupprecht, E. ; Boekema, E. J. ; Schneider, D.: The vesicle-inducing protein 1 from *Synechocystis sp.* PCC 6803 organizes into diverse higher-ordered ring structures. In: *Mol Biol Cell* (2009), Nr. 21, S. 4620–4628
- Gérard, F. ; Cline, K.: Efficient twin arginine translocation (Tat) pathway transport of a precursor protein covalently anchored to its initial cpTatC binding site. In: *J Biol Chem* (2006), Nr. 10, S. 6130–6135
- Gohlke, U. ; Pullan, L. ; McDevitt, C. A. ; Porcelli, I. ; De Leeuw, E. ; Palmer, T. ; Saibil, H. R. ; Berks, B. C.: The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005), Nr. 30, S. 10482–10486
- Gouffi, K. ; Gérard, F. ; Santini, C.-L. ; Wu, L.-F.: Dual topology of the *Escherichia coli* TatA protein. In: *J Biol Chem* (2004), Nr. 12, S. 11608–11615
- Grass, G. ; Rensing, C.: CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. In: *Biochem Biophys Res Commun* (2001), Nr. 5, S. 902–908
- Graubner, W. ; Schierhorn, A. ; Brüser, T.: DnaK plays a pivotal role in Tat targeting of CueO and functions beside SlyD as a general Tat signal binding chaperone. In: *J Biol Chem* (2007), Nr. 10, S. 7116–7124
- Green, R. C. ; Darwin, A. J.: PspG, a new member of the *Yersinia enterocolitica* phage shock protein regulon. In: *J Bacteriol* (2004), Nr. 15, S. 4910–4920
- Greene, N. P. ; Porcelli, I. ; Buchanan, G. ; Hicks, M. G. ; Schermann, S. M. ; Palmer, T. ; Berks, B. C.: Cysteine scanning mutagenesis and disulfide mapping studies of the TatA component of the bacterial twin arginine translocase. In: *J Biol Chem* (2007), Nr. 33, S. 23937–23945

- Gueguen, E. ; Savitzky, D. C. ; Darwin, A. J.: Analysis of the *Yersinia enterocolitica* PspBC proteins defines functional domains, essential amino acids and new roles within the phage shock protein response. In: *Mol Microbiol* (2009), Nr. 3, S. 619–633
- Guzman, L. M. ; Belin, D. ; Carson, M. J. ; Beckwith, J.: Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. In: *J Bacteriol* (1995), Nr. 14, S. 4121–4130
- Haldimann, A. ; Wanner, B. L.: Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. In: *J Bacteriol* (2001), Nr. 21, S. 6384–6393
- Hankamer, B. D. ; Elderkin, S. L. ; Buck, M. ; Nield, J.: Organization of the AAA(+) adaptor protein PspA is an oligomeric ring. In: *J Biol Chem* (2004), Nr. 10, S. 8862–8866
- Hasan, N. ; Koob, M. ; Szybalski, W.: *Escherichia coli* genome targeting, I. Cre-lox-mediated *in vitro* generation of ori- plasmids and their *in vivo* chromosomal integration and retrieval. In: *Gene* (1994), Nr. 1, S. 51–56
- Hicks, M. G. ; De Leeuw, E. ; Porcelli, I. ; Buchanan, G. ; Berks, B. C. ; Palmer, T.: The *Escherichia coli* twin-arginine translocase: conserved residues of TatA and TatB family components involved in protein transport. In: *FEBS Lett* (2003), Nr. 1-3, S. 61–67
- Hicks, M. G. ; Lee, P. A. ; Georgiou, G. ; Berks, B. C. ; Palmer, T.: Positive selection for loss-of-function *tat* mutations identifies critical residues required for TatA activity. In: *J Bacteriol* (2005), Nr. 8, S. 2920–2925
- Hinsley, A. P. ; Stanley, N. R. ; Palmer, T. ; Berks, B. C.: A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the 'invariant' arginine residues of the consensus targeting motif. In: *FEBS Lett* (2001), Nr. 1, S. 45–49
- Holzapfel, E. ; Eisner, G. ; Alami, M. ; Barrett, C. M . L. ; Buchanan, G. ; Lüke, I. ; Betton, J.-M. ; Robinson, C. ; Palmer, T. ; Moser, M. ; Müller, M.: The entire N-terminal half of TatC is involved in twin-arginine precursor binding. In: *Biochemistry* (2007), Nr. 10, S. 2892–2898

- Hou, B. ; Brüser, T.: The Tat-dependent protein translocation pathway. In: *BioMol Con, in revision* (2011),
- Hou, B. ; Frielingsdorf, S. ; Klösgen, R. B.: Unassisted membrane insertion as the initial step in Δ pH/Tat-dependent protein transport. In: *J Mol Biol* (2006), Nr. 5, S. 957–967
- Hu, Y. ; Zhao, E. ; Li, H. ; Xia, B. ; Jin, C.: Solution NMR structure of the TatA component of the twin-arginine protein transport system from gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. In: *J Am Chem Soc* (2010), Nr. 45, S. 15942–15944
- Hunt, J. F. ; Weinkauff, S. ; Henry, L. ; Fak, J. J. ; McNicholas, P. ; Oliver, D. B. ; Deisenhofer, J.: Nucleotide control of interdomain interactions in the conformational reaction cycle of SecA. In: *Science* (2002), Nr. 5589, S. 2018–2026
- Hutcheon, G. W. ; Bolhuis, A.: The archaeal twin-arginine translocation pathway. In: *Biochem Soc Trans* (2003), Nr. Pt 3, S. 686–689
- Ize, B. ; Stanley, N. R. ; Buchanan, G. ; Palmer, T.: Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity. In: *Mol Microbiol* (2003), Nr. 5, S. 1183–1193
- Jack, R. L. ; Buchanan, G. ; Dubini, A. ; Hatzixanthis, K. ; Palmer, T. ; Sargent, F.: Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins. In: *EMBO J* (2004), Nr. 20, S. 3962–3972
- Jack, R. L. ; Sargent, F. ; Berks, B. C. ; Sawers, G. ; Palmer, T.: Constitutive expression of *Escherichia coli* *tat* genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth. In: *J Bacteriol* (2001), Nr. 5, S. 1801–1804
- Jones, S. E. ; Lloyd, L. J. ; Tan, K. K. ; Buck, M.: Secretion defects that activate the phage shock response of *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* (2003), Nr. 22, S. 6707–6711
- Jongbloed, J. D. ; Martin, U. ; Antelmann, H. ; Hecker, M. ; Tjalsma, H. ; Venema, G. ; Bron, S. ; Van Dijl, J. M. ; Müller, J.: TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway. In: *J Biol Chem* (2000), Nr. 52, S. 41350–41357

- Jovanovic, G. ; Engl, C. ; Buck, M.: Physical, functional and conditional interactions between ArcAB and phage shock proteins upon secretin-induced stress in *Escherichia coli*. In: *Mol Microbiol* (2009), Nr. 1, S. 16–28
- Jovanovic, G. ; Engl, C. ; Mayhew, A. J. ; Burrows, P. C. ; Buck, M.: Properties of the phage shock protein (Psp) regulatory complex that govern signal transduction and induction of the Psp response in *Escherichia coli*. In: *Microbiology* (2010), Nr. Pt 10, S. 2920–2932
- Jovanovic, G. ; Lloyd, L. J. ; Stumpf, M. P. H. ; Mayhew, A. J. ; Buck, M.: Induction and function of the phage shock protein extracytoplasmic stress response in *Escherichia coli*. In: *J Biol Chem* (2006), Nr. 30, S. 21147–21161
- Jovanovic, G. ; Rakonjac, J. ; Model, P.: *In vivo* and *in vitro* activities of the *Escherichia coli* σ^{54} transcription activator, PspF, and its DNA-binding mutant, PspF Δ HTH. In: *J Mol Biol* (1999), Nr. 2, S. 469–483
- Jovanovic, G. ; Weiner, L. ; Model, P.: Identification, nucleotide sequence, and characterization of PspF, the transcriptional activator of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. In: *J Bacteriol* (1996), Nr. 7, S. 1936–1945
- Karimova, G. ; Dautin, N. ; Ladant, D.: Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. In: *J Bacteriol* (2005), Nr. 7, S. 2233–2243
- Karimova, G. ; Ladant, D.: A bacterial two-hybrid system based on a Cyclic AMP signaling cascade. In: *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York* (2005), S. 499–515
- Karimova, G. ; Pidoux, J. ; Ullmann, A. ; Ladant, D.: A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998), Nr. 10, S. 5752–5756
- Karimova, G. ; Ullmann, A. ; Ladant, D.: Protein-protein interaction between *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system. In: *J Mol Microbiol Biotechnol* (2001), Nr. 1, S. 73–82

- Kato, J. ; Nishimura, Y. ; Yamada, M. ; Suzuki, H. ; Hirota, Y.: Gene organization in the region containing a new gene involved in chromosome partition in *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* (1988), Nr. 9, S. 3967–3977
- Kauer, J. C. ; Erickson-Viitanen, S. ; Wolfe, H. R. ; DeGrado, W. F.: p-Benzoyl-L-phenylalanine, a new photoreactive amino acid. Photolabeling of calmodulin with a synthetic calmodulin-binding peptide. In: *J Biol Chem* (1986), Nr. 23, S. 10695–10700
- Kleerebezem, M. ; Crielaard, W. ; Tommassen, J.: Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) of *Escherichia coli* in maintenance of the protonmotive force under stress conditions. In: *EMBO J* (1996), Nr. 1, S. 162–171
- Kleerebezem, M. ; Tommassen, J.: Expression of the *pspA* gene stimulates efficient protein export in *Escherichia coli*. In: *Mol Microbiol* (1993), Nr. 6, S. 947–956
- Kobayashi, H. ; Yamamoto, M. ; Aono, R.: Appearance of a stress-response protein, phage shock protein A, in *Escherichia coli* exposed to hydrophobic organic solvents. In: *Microbiology* (1998), Nr. 2, S. 353–359
- Kobayashi, R. ; Suzuki, T. ; Yoshida, M.: *Escherichia coli* phage shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes. In: *Mol Microbiol* (2007), Nr. 1, S. 100–109
- Kostecki, J. S. ; Li, H. ; Turner, R. J. ; DeLisa, M. P.: Visualizing interactions along the *Escherichia coli* twin-arginine translocation pathway using protein fragment complementation. In: *PLoS One* (2010), Nr. 2, S. e9225
- Kroll, D. ; Meierhoff, K. ; Bechtold, N. ; Kinoshita, M. ; Westphal, S. ; Vothknecht, U. C. ; Soll, J. ; Westhoff, P.: VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001), Nr. 7, S. 4238–4242
- Laan, M. Van der ; Urbanus, M. L. ; Hagen-Jongman, C. M. T. ; Nouwen, N. ; Oudega, B. ; Harms, N. ; Driessen, A. J M. ; Luirink, J.: A conserved function of YidC in the biogenesis of respiratory chain complexes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003), Nr. 10, S. 5801–5806

- Ladant, D. ; Ullmann, A.: *Bordatella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. In: *Trends Microbiol* (1999), Nr. 4, S. 172–176
- Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* (1970), Nr. 5259, S. 680–685
- Landschulz, W. H. ; Johnson, P. F. ; McKnight, S. L.: The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. In: *Science* (1988), Nr. 4860, S. 1759–1764
- Lavander, M. ; Ericsson, S. K. ; Bröms, J. E. ; Forsberg, A.: The twin arginine translocation system is essential for virulence of *Yersinia pseudotuberculosis*. In: *Infect Immun* (2006), Nr. 3, S. 1768–1776
- Lee, H. C. ; Bernstein, H. D.: The targeting pathway of *Escherichia coli* presecretory and integral membrane proteins is specified by the hydrophobicity of the targeting signal. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001), Nr. 6, S. 3471–3476
- Lee, P. A. ; Buchanan, G. ; Stanley, N. R. ; Berks, B. C. ; Palmer, T.: Truncation analysis of TatA and TatB defines the minimal functional units required for protein translocation. In: *J Bacteriol* (2002), Nr. 21, S. 5871–5879
- Lee, P. A. ; Orriss, G. L. ; Buchanan, G. ; Greene, N. P. ; Bond, P. J. ; Punginelli, C. ; Jack, R. L. ; Sansom, M. S. P. ; Berks, B. C. ; Palmer, T.: Cysteine-scanning mutagenesis and disulfide mapping studies of the conserved domain of the twin-arginine translocase TatB component. In: *J Biol Chem* (2006), Nr. 45, S. 34072–34085
- Lee, P. A. ; Tullman-Ercek, D. ; Georgiou, G.: The bacterial twin-arginine translocation pathway. In: *Annu Rev Microbiol* (2006), Nr. 60, S. 373–395
- Li, H. ; Turner, R. J.: *In vivo* associations of *Escherichia coli* NarJ with a peptide of the first 50 residues of nitrate reductase catalytic subunit NarG. In: *Can J Microbiol* (2009), Nr. 2, S. 179–188
- Li, H. ; Yang, F. ; Kang, X. ; Xia, B. ; Jin, C.: Solution structures and backbone dynamics of *Escherichia coli* rhodanese PspE in its sulfur-free and persulfide-intermediate forms: implications for the catalytic mechanism of rhodanese. In: *Biochemistry* (2008), Nr. 15, S. 4377–4385

- Liu, C. ; Willmund, F. ; Golecki, J. R. ; Cacace, S. ; Hess, B. ; Markert, C. ; Schroda, M.: The chloroplast HSP70B-CDJ2-CGE1 chaperones catalyse assembly and disassembly of VIPP1 oligomers in *Chlamydomonas*. In: *Plant J* (2007), Nr. 2, S. 265–277
- Lloyd, L. J. ; Jones, S. E. ; Jovanovic, G. ; Gyaneshwar, P. ; Rolfe, M. D. ; Thompson, A. ; Hinton, J. C. ; Buck, M.: Identification of a new member of the phage shock protein response in *Escherichia coli*, the phage shock protein G (PspG). In: *J Biol Chem* (2004), Nr. 53, S. 55707–55714
- Luirink, J. ; Dobberstein, B.: Mammalian and *Escherichia coli* signal recognition particles. In: *Mol Microbiol* (1994), Nr. 1, S. 9–13
- Maldonado, B. ; Buchanan, G. ; Müller, M. ; Berks, B. C. ; Palmer, T.: Genetic Evidence for a TatC Dimer at the Core of the *Escherichia coli* Twin Arginine (Tat) Protein Translocase. In: *J Mol Microbiol Biotechnol* (2011), Nr. 3, S. 168–175
- Maldonado, B. ; Kneuper, H. ; Buchanan, G. ; Hatzixanthis, K. ; Sargent, F. ; Berks, B. C. ; Palmer, T.: Characterisation of the membrane-extrinsic domain of the TatB component of the twin arginine protein translocase. In: *FEBS Lett* (2011), Nr. 3, S. 478–484
- Mangels, D. ; Mathers, J. ; Bolhuis, A. ; Robinson, C.: The core TatABC complex of the twin-arginine translocase in *Escherichia coli*: TatC drives assembly whereas TatA is essential for stability. In: *J Mol Biol* (2005), Nr. 2, S. 415–423
- Maurer, C. ; Panahandeh, S. ; Jungkamp, A.-C. ; Moser, M. ; Müller, M.: TatB functions as an oligomeric binding site for folded Tat precursor proteins. In: *Mol Biol Cell* (2010), Nr. 23, S. 4151–4161
- Maxson, M. E. ; Darwin, A. J.: PspB and PspC of *Yersinia enterocolitica* are dual function proteins: regulators and effectors of the phage shock protein response. In: *Mol Microbiol* (2006), Nr. 5, S. 1610–1623
- McDevitt, C. A. ; Buchanan, G. ; Sargent, F. ; Palmer, T. ; Berks, B. C.: Subunit composition and *in vivo* substrate-binding characteristics of *Escherichia coli* Tat protein complexes expressed at native levels. In: *FEBS J* (2006), Nr. 24, S. 5656–5668

- McDevitt, C. A. ; Hicks, M. G. ; Palmer, T. ; Berks, B. C.: Characterisation of Tat protein transport complexes carrying inactivating mutations. In: *Biochem Biophys Res Commun* (2005), Nr. 2, S. 693–698
- Mehner, D.: Untersuchungen zu den Komponenten TatA und TatB des Tat-Translokons von *Escherichia coli*. In: *Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg* (2006),
- Miller, J. D. ; Bernstein, H. D. ; Walter, P.: Interaction of *E. coli* Ffh/4.5S ribonucleoprotein and FtsY mimics that of mammalian signal recognition particle and its receptor. In: *Nature* (1994), Nr. 6464, S. 657–659
- Miller, J. H.: A short course in bacterial genetics. In: *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York* (1992),
- Milstein, C. ; Brownlee, G. G. ; Harrison, T. M. ; Mathews, M. B.: A possible precursor of immunoglobulin light chains. In: *Nat New Biol* (1972), Nr. 91, S. 117–120
- Molik, S. ; Karnauchov, I. ; Weidlich, C. ; Herrmann, R. G. ; Klösgen, R. B.: The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b_6f complex in chloroplasts: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? In: *J Biol Chem* (2001), Nr. 46, S. 42761–42766
- Mori, H. ; Cline, K.: Post-translational protein translocation into thylakoids by the Sec and Δ pH-dependent pathways. In: *Biochim Biophys Acta* (2001), Nr. 1-2, S. 80–90
- Mori, H. ; Cline, K.: A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid Δ pH/Tat translocase. In: *J Cell Biol* (2002), Nr. 2, S. 205–210
- Müller, M. ; Klösgen, R. B.: The Tat pathway in bacteria and chloroplasts (review). In: *Mol Membr Biol* (2005), Nr. 1-2, S. 113–121
- Müller, S. D. ; De Angelis, A. A. ; Walther, T. H. ; Grage, S. L. ; Lange, C. ; Opella, S. J. ; Ulrich, A. S.: 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* (2007), Nr. 12, S. 3071–3079

- Natale, P. ; Brüser, T. ; Driessen, A. J. M.: Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—distinct translocases and mechanisms. In: *Biochim Biophys Acta* (2008), Nr. 9, S. 1735–1756
- Nilavongse, A. ; Brondijk, T. H. C. ; Overton, T. W. ; Richardson, D. J. ; Leach, E. R. ; Cole, J. A.: The NapF protein of the *Escherichia coli* periplasmic nitrate reductase system: demonstration of a cytoplasmic location and interaction with the catalytic subunit, NapA. In: *Microbiology* (2006), Nr. Pt 11, S. 3227–3237
- Oates, J. ; Barrett, C. M. L. ; Barnett, J. P. ; Byrne, K. G. ; Bolhuis, A. ; Robinson, C.: 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* (2005), Nr. 1, S. 295–305
- Oates, J. ; Mathers, J. ; Mangels, D. ; Kühlbrandt, W. ; Robinson, C. ; Model, K.: Consensus structural features of purified bacterial TatABC complexes. In: *J Mol Biol* (2003), Nr. 2, S. 277–286
- Ochsner, U. A. ; Snyder, A. ; Vasil, A. I. ; Vasil, M. L.: Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002), Nr. 12, S. 8312–8317
- Oresnik, I. J. ; Ladner, C. L. ; Turner, R. J.: Identification of a twin-arginine leader-binding protein. In: *Mol Microbiol* (2001), Nr. 2, S. 323–331
- Orriss, G. L. ; Tarry, M. J. ; Ize, B. ; Sargent, F. ; Lea, S. M. ; Palmer, T. ; Berks, B. C.: TatBC, TatB, and TatC form structurally autonomous units within the twin arginine protein transport system of *Escherichia coli*. In: *FEBS Lett* (2007), Nr. 21, S. 4091–4097
- Osadnik, H.: Untersuchungen zu Struktur, Funktion und Interaktion des *phage shock protein A* aus *Escherichia coli*. In: *Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg* (2009),
- Palmer, T. ; Sargent, F. ; Berks, B. C.: Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. In: *Trends Microbiol* (2005), Nr. 4, S. 175–180

- Panahandeh, S. ; Müller, M.: Site-specific cross-linking of *in vitro* synthesized *E. coli* preproteins for investigating transmembrane translocation pathways. In: *Methods Mol Biol* (2010), Nr. 619, S. 217–240
- Pérez-Rodríguez, R. ; Fisher, A. C. ; Perlmutter, J. D. ; Hicks, M. G. ; Chanal, A. ; Santini, C.-L. ; Wu, L.-F. ; Palmer, T. ; DeLisa, M. P.: An essential role for the DnaK molecular chaperone in stabilizing over-expressed substrate proteins of the bacterial twin-arginine translocation pathway. In: *J Mol Biol* (2007), Nr. 3, S. 715–730
- Peter, B. J. ; Arsuaga, J. ; Breier, A. M. ; Khodursky, A. B. ; Brown, P. O. ; Cozzarelli, N. R.: Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. In: *Genome Biol* (2004), Nr. 11, S. R87
- Pohlschröder, M. ; Dilks, K. ; Hand, N. J. ; Rose, R. W.: Translocation of proteins across archaeal cytoplasmic membranes. In: *FEMS Microbiol Rev* (2004), Nr. 1, S. 3–24
- Pop, O. I. ; Westermann, M. ; Volkmer-Engert, R. ; Schulz, D. ; Lemke, C. ; Schreiber, S. ; Gerlach, R. ; Wetzker, R. ; Müller, J. P.: Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatA_d indicates protein-mediated targeting of the Tat export in *Bacillus subtilis*. In: *J Biol Chem* (2003), Nr. 40, S. 38428–38436
- Poranen, M. M. ; Ravantti, J. J. ; Grahn, A. M. ; Gupta, R. ; Auvinen, P. ; Bamford, D. H.: Global changes in cellular gene expression during bacteriophage PRD1 infection. In: *J Virol* (2006), Nr. 16, S. 8081–8088
- Porcelli, I. ; De Leeuw, E. ; Wallis, R. ; Laan, E. Van den Brink-Van der ; De Kruijff, B. ; Wallace, B. A. ; Palmer, T. ; Berks, B. C.: Characterization and membrane assembly of the TatA component of the *Escherichia coli* twin-arginine protein transport system. In: *Biochemistry* (2002), Nr. 46, S. 13690–13697
- Porte, D. ; Oertel-Buchheit, P. ; Granger-Schnarr, M. ; Schnarr, M.: Fos leucine zipper variants with increased association capacity. In: *J Biol Chem* (1995), Nr. 39, S. 22721–22730
- Prickril, B. C. ; Czechowski, M. H. ; Przybyła, A. E. ; Peck, H. D. ; LeGall, J.: Putative signal peptide on the small subunit of the periplasmic hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris*. In: *J Bacteriol* (1986), Nr. 2, S. 722–725

- Pugsley, A. P.: The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. In: *Microbiol Rev* (1993), Nr. 1, S. 50–108
- Punginelli, C. ; Maldonado, B. ; Grahl, S. ; Jack, R. ; Alami, M. ; Schröder, J. ; Berks, B. C. ; Palmer, T.: Cysteine scanning mutagenesis and topological mapping of the *Escherichia coli* twin-arginine translocase TatC Component. In: *J Bacteriol* (2007), Nr. 15, S. 5482–5494
- Randall, L. L. ; Topping, T. B. ; Hardy, S. J. ; Pavlov, M. Y. ; Freistroffer, D. V. ; Ehrenberg, M.: Binding of SecB to ribosome-bound polypeptides has the same characteristics as binding to full-length, denatured proteins. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997), Nr. 3, S. 802–807
- Richardson, J. S. ; Richardson, D. C.: 1. Principles and Patterns of Protein Conformation. In: *Plenum Press, New York* (1989), S. 1–95
- Richter, S. ; Brüser, T.: Targeting of unfolded PhoA to the TAT translocon of *Escherichia coli*. In: *J Biol Chem* (2005), Nr. 52, S. 42723–42730
- Roberts, S. A. ; Wildner, G. F. ; Grass, G. ; Weichsel, A. ; Ambrus, A. ; Rensing, C. ; Montfort, W. R.: A labile regulatory copper ion lies near the T1 copper site in the multicopper oxidase CueO. In: *J Biol Chem* (2003), Nr. 34, S. 31958–31963
- Rodrigue, A. ; Chanal, A. ; Beck, K. ; Müller, M. ; Wu, L.-F.: Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. In: *J Biol Chem* (1999), Nr. 19, S. 13223–13228
- Rose, R. W. ; Brüser, T. ; Kissinger, J. C. ; Pohlschröder, M.: Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. In: *Mol Microbiol* (2002), Nr. 4, S. 943–950
- Saier, M. H.: Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. In: *J Membr Biol* (2006), Nr. 2, S. 75–90
- Sambrook, J. ; Fritsch, E. F. ; Maniatis, T.: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989
- Sambrook, J. ; Russell, D. W.: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001

- Sanger, F. ; Nicklen, S. ; Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (1977), Nr. 12, S. 5463–5467
- Santini, C. L. ; Ize, B. ; Chanal, A. ; Müller, M. ; Giordano, G. ; Wu, L.-F.: A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. In: *EMBO J* (1998), Nr. 1, S. 101–112
- Sargent, F. ; Ballantine, S. P. ; Rugman, P. A. ; Palmer, T. ; Boxer, D. H.: Reassignment of the gene encoding the *Escherichia coli* hydrogenase 2 small subunit—identification of a soluble precursor of the small subunit in a *hypB* mutant. In: *Eur J Biochem* (1998), Nr. 3, S. 746–754
- Sargent, F. ; Berks, B. C. ; Palmer, T.: Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins. In: *FEMS Microbiol Lett* (2006), Nr. 2, S. 198–207
- Sargent, F. ; Bogsch, E. G. ; Stanley, N. R. ; Wexler, M. ; Robinson, C. ; Berks, B. C. ; Palmer, T.: Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. In: *EMBO J* (1998), Nr. 13, S. 3640–3650
- Sargent, F. ; Gohlke, U. ; De Leeuw, E. ; Stanley, N. R. ; Palmer, T. ; Saibil, H. R. ; Berks, B. C.: Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure. In: *Eur J Biochem* (2001), Nr. 12, S. 3361–3367
- Sargent, F. ; Stanley, N. R. ; Berks, B. C. ; Palmer, T.: Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. A distinct and pivotal role for the TatB protein. In: *J Biol Chem* (1999), Nr. 51, S. 36073–36082
- Schägger, H. ; Cramer, W. A. ; Von Jagow, G.: Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. In: *Anal Biochem* (1994), Nr. 2, S. 220–230
- Schatz, P. J. ; Beckwith, J.: Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. In: *Annu Rev Genet* (1990), Nr. 24, S. 215–248

- Schiebel, E. ; Driessen, A. J. M. ; Hartl, F. U. ; Wickner, W.: $\Delta\mu_{H^+}$ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. In: *Cell* (1991), Nr. 5, S. 927–939
- Schöttmer, F.: Untersuchung der Interaktion der Tat Komponenten TatA und TatB sowie deren Derivate mithilfe des bakteriellen Two-Hybrid-Systems. In: *Bachelorarbeit am Institut für Mikrobiologie, Leibniz-Universität Hannover* (2011),
- Schreiber, S. ; Stengel, R. ; Westermann, M. ; Volkmer-Engert, R. ; Pop, O. I. ; Müller, J. P.: Affinity of TatC_d for TatA_d elucidates its receptor function in the *Bacillus subtilis* twin arginine translocation (Tat) translocase system. In: *J Biol Chem* (2006), Nr. 29, S. 19977–19984
- Scotti, P. A. ; Valent, Q. A. ; Manting, E. H. ; Urbanus, M. L. ; Driessen, A. J. M. ; Oudega, B. ; Luirink, J.: SecA is not required for signal recognition particle-mediated targeting and initial membrane insertion of a nascent inner membrane protein. In: *J Biol Chem* (1999), Nr. 42, S. 29883–29888
- Settles, A. M. ; Yonetani, A. ; Baron, A. ; Bush, D. R. ; Cline, K. ; Martienssen, R.: Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. In: *Science* (1997), Nr. 5342, S. 1467–1470
- Smith, V. F. ; Schwartz, B. L. ; Randall, L. L. ; Smith, R. D.: Electrospray mass spectrometric investigation of the chaperone SecB. In: *Protein Sci* (1996), Nr. 3, S. 488–494
- Standar, K.: Untersuchungen zur Struktur und Funktion von PspA aus *Escherichia coli*. In: *Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg* (2004),
- Standar, K. ; Mehner, D. ; Osadnik, H. ; Berthelmann, F. ; Hause, G. ; Lünsdorf, H. ; Brüser, T.: PspA can form large scaffolds in *Escherichia coli*. In: *FEBS Lett* (2008), Nr. 25-26, S. 3585–3589
- Sturm, A. ; Schierhorn, A. ; Lindenstrauss, U. ; Lilie, H. ; Brüser, T.: YcdB from *Escherichia coli* reveals a novel class of Tat-dependently translocated hemoproteins. In: *J Biol Chem* (2006), Nr. 20, S. 13972–13978

- Tarry, M. J. ; Schäfer, E. ; Chen, S. ; Buchanan, G. ; Greene, N. P. ; Lea, S. M. ; Palmer, T. ; Saibil, H. R. ; Berks, B. C.: Structural analysis of substrate binding by the TatBC component of the twin-arginine protein transport system. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009), Nr. 32, S. 13284–13289
- Valent, Q. A. ; Kendall, D. A. ; High, S. ; Kusters, R. ; Oudega, B. ; Luirink, J.: Early events in preprotein recognition in *E. coli*: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides. In: *EMBO J* (1995), Nr. 22, S. 5494–5505
- Valent, Q. A. ; Scotti, P. A. ; High, S. ; De Gier, J. W. ; Von Heijne, G. ; Lentzen, G. ; Wintermeyer, W. ; Oudega, B. ; Luirink, J.: The *Escherichia coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon. In: *EMBO J* (1998), Nr. 9, S. 2504–2512
- Van B. V. ; Clemons, W. M. ; Collinson, I. ; Modis, Y. ; Hartmann, E. ; Harrison, S. C. ; Rapoport, T. A.: X-ray structure of a protein-conducting channel. In: *Nature* (2004), Nr. 6969, S. 36–44
- Van Dongen, W. ; Hagen, W. ; Berg, W. Van den ; Veeger, C.: Evidence for an unusual mechanism of membrane translocation of the periplasmic hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough), as derived from expression in *Escherichia coli*. In: *FEMS Microbiol Lett* (1988), Nr. 1, S. 5–9
- Voss, A.: Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the *Strep*-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. In: *Protein Eng* (1997), Nr. 8, S. 975–982
- Voulhoux, R. ; Ball, G. ; Ize, B. ; Vasil, M. L. ; Lazdunski, A. ; Wu, L.-F. ; Filloux, A.: Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. In: *EMBO J* (2001), Nr. 23, S. 6735–6741
- Vrancken, K. ; Van Mellaert, L. ; Anné, J.: Characterization of the *Streptomyces lividans* PspA response. In: *J Bacteriol* (2008), Nr. 10, S. 3475–3481
- Vrontou, E. ; Karamanou, S. ; Baud, C. ; Sianidis, G. ; Economou, A.: Global coordination of protein translocation by the SecA IRA1 switch. In: *J Biol Chem* (2004), Nr. 21, S. 22490–22497

- Walther, T. H. ; Grage, S. L. ; Rot, N. ; Ulrich, A. S.: Membrane alignment of the pore-forming component TatA_d of the twin-arginine translocase from *Bacillus subtilis* resolved by solid-state NMR spectroscopy. In: *J Am Chem Soc* (2010), Nr. 45, S. 15945–15956
- Warren, G. ; Oates, J. ; Robinson, C. ; Dixon, A. M.: Contributions of the transmembrane domain and a key acidic motif to assembly and function of the TatA complex. In: *J Mol Biol* (2009), Nr. 1, S. 122–132
- Weber, A. ; Kögl, S. A. ; Jung, K.: Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* (2006), Nr. 20, S. 7165–7175
- Weiner, J. H. ; Bilous, P. T. ; Shaw, G. M. ; Lubitz, S. P. ; Frost, L. ; Thomas, G. H. ; Cole, J. A. ; Turner, R. J.: A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. In: *Cell* (1998), Nr. 1, S. 93–101
- Weiner, L. ; Model, P.: Role of an *Escherichia coli* stress-response operon in stationary-phase survival. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994), Nr. 6, S. 2191–2195
- Westermann, M. ; Pop, O. I. ; Gerlach, R. ; Appel, T. R. ; Schlörmann, W. ; Schreiber, S. ; Müller, J. P.: The TatA_d component of the *Bacillus subtilis* twin-arginine protein transport system forms homo-multimeric complexes in its cytosolic and membrane embedded localisation. In: *Biochim Biophys Acta* (2006), Nr. 4, S. 443–451
- Westphal, S. ; Heins, L. ; Soll, J. ; Vothknecht, U. C.: *Vipp1* deletion mutant of *Synechocystis*: a connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis? In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001), Nr. 7, S. 4243–4248
- Wexler, M. ; Sargent, F. ; Jack, R. L. ; Stanley, N. R. ; Bogsch, E. G. ; Robinson, C. ; Berks, B. C. ; Palmer, T.: TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export. In: *J Biol Chem* (2000), Nr. 22, S. 16717–16722
- White-Ziegler, C. A. ; Um, S. ; Pérez, N. M. ; Berns, A. L. ; Malhowski, A. J. ; Young, S.: Low temperature (23 degrees C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. In: *Microbiology* (2008), Nr. 1, S. 148–166

- Widdick, D. A. ; Dilks, K. ; Chandra, G. ; Bottrill, A. ; Naldrett, M. ; Pohlschröder, M. ; Palmer, T.: The twin-arginine translocation pathway is a major route of protein export in *Streptomyces coelicolor*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006), Nr. 47, S. 17927–17932
- Wilms, B. ; Hauck, A. ; Reuss, M. ; Syldatk, C. ; Mattes, R. ; Siemann, M. ; Altenbuchner, J.: High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli rha_{BAD}* promoter. In: *Biotechnol Bioeng* (2001), Nr. 2, S. 95–103
- Winkler, J. ; Lünsdorf, H. ; Jockusch, B. M.: The ultrastructure of chicken gizzard vinculin as visualized by high-resolution electron microscopy. In: *J Struct Biol* (1996), Nr. 2, S. 270–277
- Yahr, T. L. ; Wickner, W. T.: Functional reconstitution of bacterial Tat translocation *in vitro*. In: *EMBO J* (2001), Nr. 10, S. 2472–2479
- Yen, M.-R. ; Tseng, Y.-H. ; Nguyen, E. H. ; Wu, L.-F. ; Saier, M. H.: Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. In: *Arch Microbiol* (2002), Nr. 6, S. 441–450
- Young, T. S. ; Ahmad, I. ; Yin, Y. A. ; Schultz, P. G.: An enhanced system for unnatural amino acid mutagenesis in *E. coli*. In: *J Mol Biol* (2010), Nr. 2, S. 361–374
- Zimmermann, R. ; Wickner, W.: Energetics and intermediates of the assembly of Protein OmpA into the outer membrane of *Escherichia coli*. In: *J Biol Chem* (1983), Nr. 6, S. 3920–3925
- Zor, T. ; Selinger, Z.: Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. In: *Anal Biochem* (1996), Nr. 2, S. 302–308

A Anhang

A.1 TatA interagiert auch nach C12E9-Behandlung mit PspA

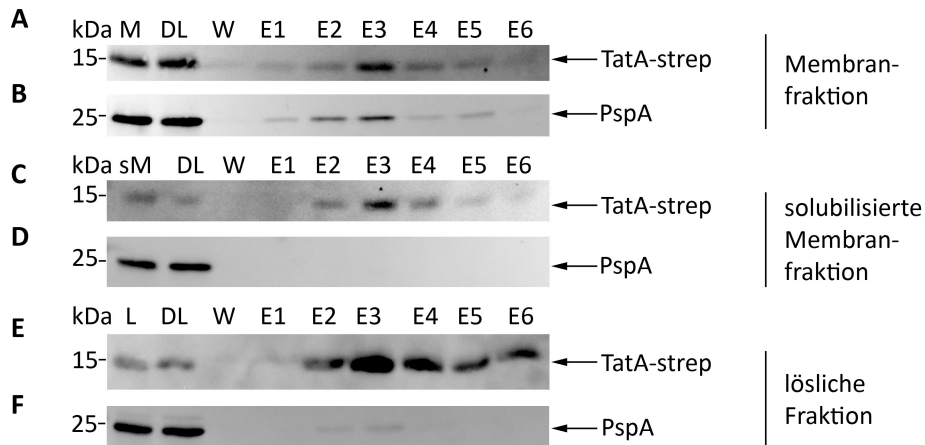


Abbildung A.1: Anreicherung von TatA-strep aus der [A-B] Membranfraktion, [C-D] mit 2% C12E9 solubilisierten Membranfraktion sowie der [E-F] löslichen Fraktion des Stammes JARV16 attB::*tatA-strep* mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. [A, C, E] α -TatA, [B, D, F] depletierter α -PspA; 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; M – Membranfraktion, L – lösliche Fraktion, sM – mit 2% C12E9 solubilisierte Membranfraktion, DL – Durchlauf der Affinitätssäule, W – Letzte Waschfraktion, E1, . . . , E6 – Elutionsfraktionen 1 bis 6.

A.2 Interaktionsassay von TatA mit PspA bzw. TatA-Derivat (TatA-T22) mit sich selbst auf Selektionsmedium

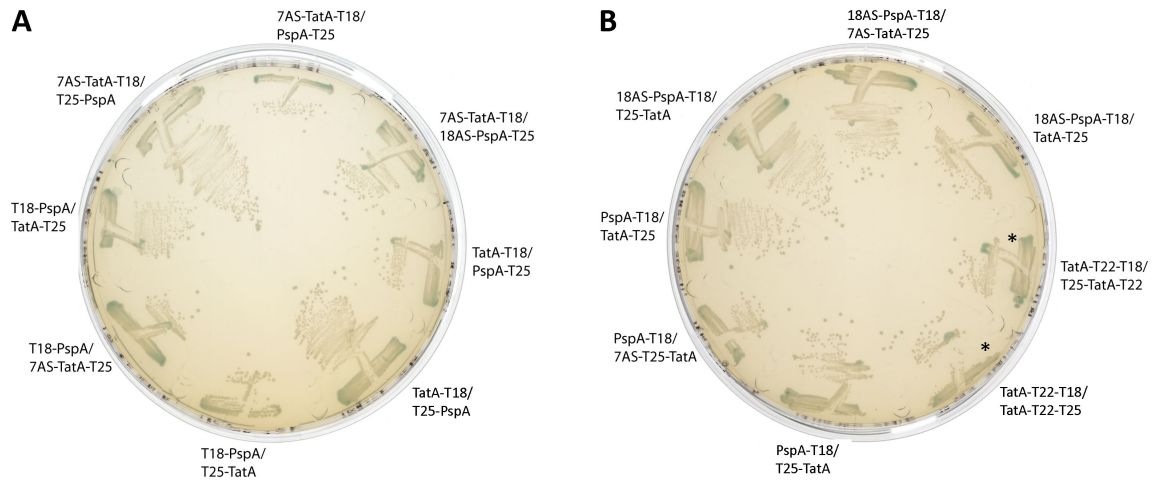


Abbildung A.2: Interaktionsassay der TatA-PspA-Bindung oder TatA-T22-Bindung auf X-Gal/LB-Medium. Wachstum der *E. coli*-Stämme DHM1 mit T18-/ T25-Fusionsproteinen auf LB-Medium mit X-Gal nach Inkubation (2 d) bei 30 °C. **[A]** 7AS-TatA-T18/ T25-PspA – DHM1 pUT18-7AS-*tatA-strep*, pKT25-*pspA-strep*; 7AS-TatA-T18/ PspA-T25 – DHM1 pUT18-7AS-*tatA-strep*, pKNT25-*pspA*-(GGGS)₃; 7AS-TatA-T18/ 18-PspA-T25 – DHM1 pUT18-7AS-*tatA-strep*, pKNT25-18AS-*pspA-strep*; TatA-T18/ PspA-T25 – DHM1 pUT18-*tatA-strep*, pKNT25-18AS-*pspA-strep*; T18-PspA/ TatA-T25 – DHM1 pUT18C-*pspA-strep*, pKNT25-7AS-*tatA-strep*; T18-PspA/ 7AS-TatA-strep – DHM1 pUT18C-*pspA-strep*, pKNT25-7AS-*tatA-strep*; T18-PspA/ T25-PspA – DHM1 pUT18C-*pspA-strep*, pKNT25-*tatA-strep* und **[B]** 18AS-T18-PspA/ TatA-T25 – DHM1 pUT18-18AS-*pspA-strep*, pKNT25-*tatA-strep*; 18AS-T18-PspA/ 7AS-TatA-T25 – DHM1 pUT18-18AS-*pspA-strep*, pKNT25-7AS-*tatA-strep*; 18AS-T18-PspA/ T25-TatA – DHM1 pUT18-18AS-*pspA-strep*, pKNT25-*tatA-strep*; PspA-T18/ TatA-T25 – DHM1 pUT18-*pspA*-(GGGS)₃, pKNT25-7AS-*tatA-strep*; PspA-T18/ T25-TatA – DHM1 pUT18-*pspA*-(GGGS)₃, pKNT25-7AS-*tatA-strep*; TatA-T22-T18/ TatA-T22-T25 – DHM1 pUT18-*tatA-T22-strep*, pKNT25-*tatA-T22-strep* und TatA-T22-T18/ T25-TatA-T22 – DHM1 pUT18-*tatA-T22-strep*, pKNT25-*tatA-T22-strep*.

A.3 Überblick über die Interaktionsassays auf Selektionsmedium

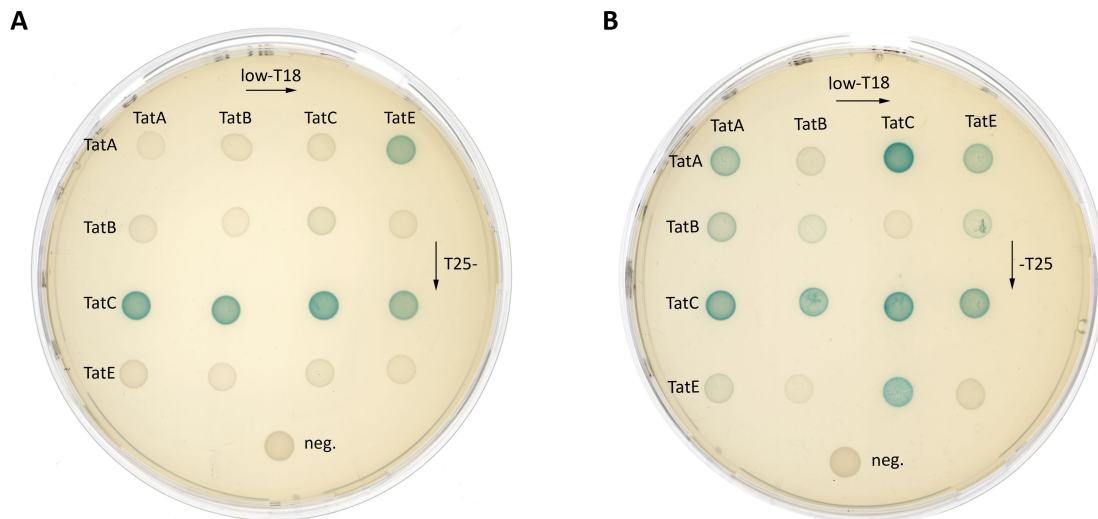


Abbildung A.3: Überblick über den Interaktionsassay auf festem Medium unter Kontrolle des *tat*-Promotors. Es wurden $10\ \mu\text{l}$ gleicher Optischen Dichte der verschiedenen DHM1-Kulturen auf X-Gal/LB-Agar getropft und bis zu zwei Tagen bei $30\ ^\circ\text{C}$ inkubiert. Dabei wurde das T18-Fragment C-terminal fusioniert und die Genexpression stand unter der Kontrolle des *tat*-Promotors. Das T25-Fragment wurde entweder an den **[A]** N-Terminus oder an den **[B]** C-Terminus fusioniert und die Genexpression stand unter Kontrolle des *lac*-Promotors. **neg.** – DHM1 pUT18, pKNT25; **-low-T18** – pUL-*ptat-strep*-T18; **T25-** – pKT25-*strep* und **-T25-** – pKNT25-*strep*.

A.4 Überblick über die Interaktionsassays auf Selektionsmedium 2

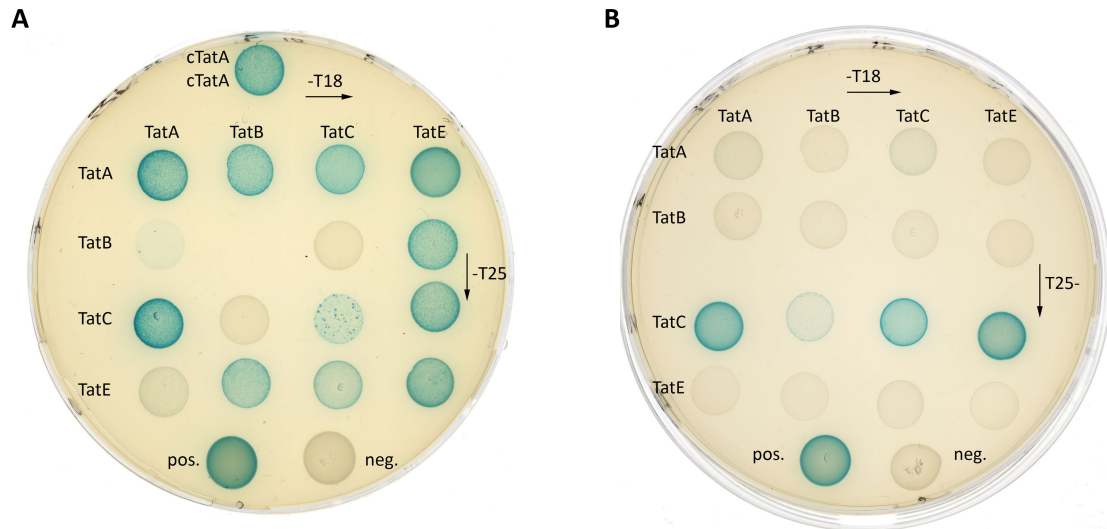


Abbildung A.4: Überblick über den Interaktionsassay auf festem Medium unter Kontrolle des *lac*-Promotors. Es wurden $10\ \mu\text{l}$ gleicher Optischen Dichte der verschiedenen DHM1-Kulturen auf X-Gal/LB-Agar getropft und bis zu zwei Tagen bei $30\ ^\circ\text{C}$ inkubiert. Dabei wurde das T18-Fragment C-terminal fusioniert und die Genexpression stand unter der Kontrolle des *lac*-Promotors. Das T25-Fragment war auf den *mid-copy*-Plasmiden codiert und wurde entweder an den [A] C-Terminus oder an den [B] N-Terminus des Interessenproteins fusioniert. **neg.** – DHM1 pUT18, pKNT25 (Negativkontrolle); **pos.** – DHM1 pUT18C-zip, pKT25-zip (Positivkontrolle); **7AS-TatA/ 7AS-TatA** – DHM1 pUT18-7AS-*tatA-strep*, pKNT25-7AS-*tatA-strep*; **-T18** – pUT18-*strep*; **T25-** – pKT25-*strep* und **-T25** – pKNT25-*strep*.

A.5 Für die Interaktion mit TatA bzw. TatE muss der N-Terminus von TatB frei zugänglich
sein

**A.5 Für die Interaktion mit TatA bzw. TatE muss der N-Terminus
von TatB frei zugänglich sein**

siehe nächste Seite

A.5 Für die Interaktion mit TatA bzw. TatE muss der N-Terminus von TatB frei zugänglich sein

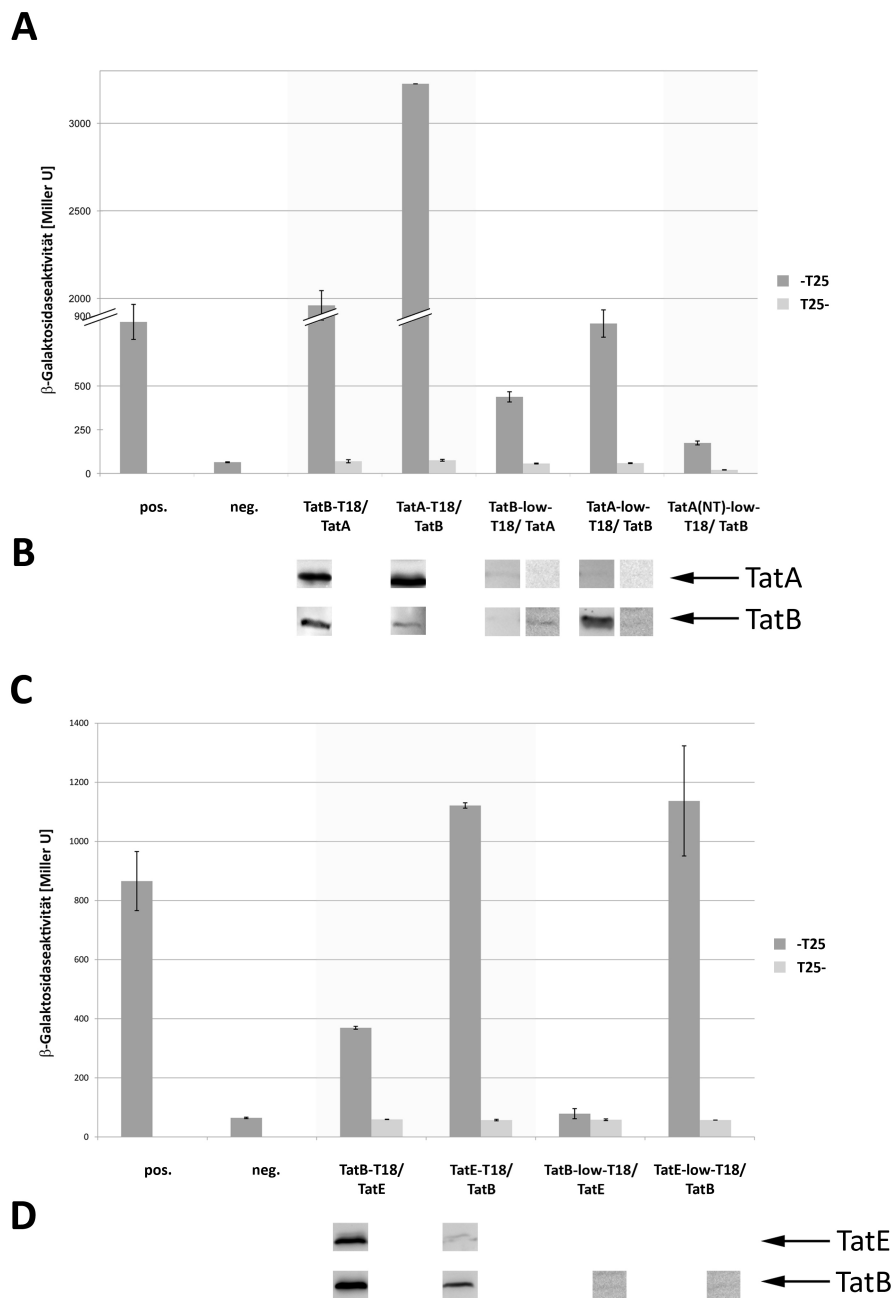


Abbildung A.5: Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität von TatB mit [A] TatA und [C] mit TatE. [A, C] Die β -Galaktosidaseaktivität wurde in Miller-Units im *E. coli*-Stamm DHM1 mit T18-/ T25-Fusionsproteinen bestimmt. Im Säulendiagramm wurden die N-terminal fusionierten T25-Fragmente hellgrau (T25-), die C-terminal fusionierten T25-Fragment dunkelgrau (-T25) dargestellt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung ist mit Fehlerbalken erfasst. [B, D] Nachweis von TatA, TatE und TatB in ganzen Zellen mit α -TatA, α -TatB bzw. *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat mittels 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; **pos.** – DHM1 pUT18C-*zip*, pKT25-*zip*; **neg.** – DHM1 pUT18, pKNT25; **TatB-T18/ TatA** – DHM1 pUT18-*tatB-strep*, pKNT25-*tatA-strep* bzw. pKT25-*tatA-strep*; **TatA-T18/ TatB** – DHM1 pUT18-*tatA-strep*, pKNT25-*tatB-strep* bzw. pKT25-*tatB-strep*; **TatB-low-T18/ TatA** – DHM1 pUL-*ptat-tatB-strep*-T18, pKNT25-*tatA-strep* bzw. pKT25-*tatA-strep*; **TatA-low-T18/ TatB** – DHM1 pUL-*ptat-tatA-strep*-T18, pKNT25-*tatB-strep* bzw. pKT25-*tatB-strep*; **TatA(NT)-low-T18/ TatB** – DHM1 pUL-*ptat-tatA(NT)-strep*-T18, pKNT25-*tatB-strep* bzw. pKT25-*tatB-strep*; **TatB-T18/ TatE** – DHM1 pUT18-*tatB-strep*, pKNT25-*tatE-strep* bzw. pKT25-*tatE-strep*; **TatE-T18/ TatB** – DHM1 pUT18-*tatE-strep*, pKNT25-*tatB-strep* bzw. pKT25-*tatB-strep*; **TatB-low-T18/ TatE** – DHM1 pUL-*ptat-tatB-strep*-T18, pKNT25-*tatE-strep* bzw. pKT25-*tatE-strep* und **TatE-low-T18/ TatB** – DHM1 pUL-*ptat-tatE-strep*-T18, pKNT25-*tatB-strep* bzw. pKT25-*tatB-strep*.

A.6 Affinitätschromatographische Anreicherung von UV-gelcrosslinktem TatA(I28-pBpa)

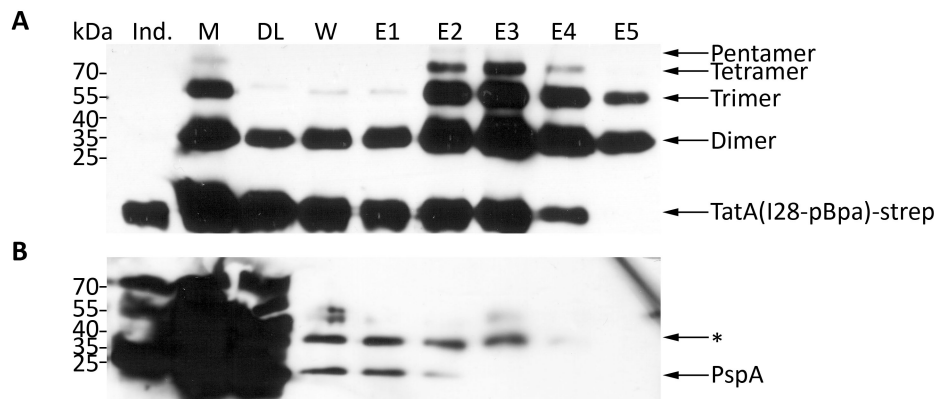


Abbildung A.6: Anreicherung des TatA-Derivates TatA(I28-pBpa) aus 0,5% SDS solubilierten Membranen des Stammes MC4100 pBW-*tatA*(I28-pBpa)-*strep* mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. **[A]** *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat, **[B]** α -PspA; 15%iges SDS-Polyacrylamidgel, Western-Blot, 3 μ l Marker-/10 μ l Probenvolumen; **Ind.** – Probe vor UV-Crosslink, **M** – mit 0,5% SDS solubilierte Membranfraktion, **DL** – Durchlauf der Affinitätssäule, **W** – Letzte Waschfraktion, **E1, . . . , E5** – Elutionsfraktionen 1 bis 5, * – möglicher Crosslink zwischen TatA und PspA.

B Publikationsliste

1. Mehner, D. (2006): Untersuchungen zu den Komponenten TatA und TatB des Tat-Translokons von *Escherichia coli*. In: Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Berthelmann, F.; Mehner, D.; Richter, S.; Lindenstrauss, U.; Lünsdorf, H.; Hause, G. und 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 (23); S. 25281-9
3. Standar, K.; Mehner, D.; Osadnik, H.; Berthelmann, F.; Hause, G.; Lünsdorf, H. und Brüser, T. (2008): PspA can form large scaffolds in *Escherichia coli*. In: *FEBS Lett*, 582 (25-26); S. 3585-9

LEBENS LAUF

Denise Mehner

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Naturwissenschaftliche Fakultät
Institut für Mikrobiologie
Schneiderberg 50
30167 Hannover

Tel.: +49 (0) 511 762 19168
E-Mail: denise.mehner@ifmb.uni-hannover.de

PRAKTIKA UND JOBS

- seit 01.01.2010 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Naturwissenschaftlichen Fakultät - Institut für Mikrobiologie der Leibniz Universität Hannover
- Feb. 2007 – Dez. 2009 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften am Institut für Biologie/Mikrobiologie in der Abteilung Allg. Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit dem Thema: „Tat-abhängiger Transport gefalteter Proteine in Bakterien“
- Jan. - Mär. 2005 Betriebspraktikum in Max-Planck-Institut für Proteinfaltung
- Feb. 2004 Praktikum „Zytologische Nachweismethoden“

STUDIUM

- Diplom Biologie Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
 - Mär. 2006 - Jan. 2007 Diplomarbeit mit dem Thema „Untersuchungen zu den Komponenten TatA und TatB des Tat-Translokons von *Escherichia coli*“
 - Okt. 2001 - Jan. 2006 Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Pflanzenphysiologie, Zellbiochemie, Immunologie

SCHULE

- 1998 - 2000 Absolvierung der Allgemeine Hochschulreife am Johann-Wolfgang-von-Goethe-Gymnasium Chemnitz
- 1992 - 1998 Gottfried-Leibniz-Gymnasium in Chemnitz

AUSLANDSAUFENTHALTE

- Sep. 2000 - Sep. 2001 Au Pair in Chicago, USA
- Jun. 2004 - Aug. 2004 Head Counselor im Farley Outdoor Education Center, Cape Cod, USA