

**Studien zur Assemblierung
der Tat-Translokase
von *Escherichia coli***

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation

von

Hendrik Geise, M. Sc.

2019

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

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Kürşad Turgay

Tag der Promotion: 14.11.2019

ZUSAMMENFASSUNG

Das *twin-arginine-translocation* (Tat)-System transportiert gefaltete Proteine über prokaryotische, plastidäre und einige mitochondriale Membranen. Das Tat-System von *Escherichia coli* besteht aus den Komponenten TatA/E, TatB und TatC. Diese assemblieren im Laufe des Transportes zu Tat-Komplexen mit unterschiedlichen Molekulargewichten, welche mit zu transportierenden Substraten interagieren können. TatB und TatC stellen zentrale Bestandteile aller bisher beobachteten Tat-Komplexe dar. Jedoch ist weder die Rolle von TatA/E bei der Assemblierung von Tat-Komplexen, noch die Stöchiometrie der einzelnen Komponenten innerhalb dieser Komplexe bekannt. Ebenso ist der Mechanismus des Tat-abhängigen Proteintransports ungeklärt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse der Tat-Komponenten und Tat-Substrate auf die bekannten Tat-Komplexe sowie auf einen bisher nicht charakterisierten Tat-Komplex untersucht. Hierfür wurden die assemblierten Tat-Komplexe in An- und Abwesenheit einzelner oder mehrerer Komponenten des Tat-Systems mittels BN-PAGE/Western-Blot analysiert. Für die Untersuchung des Einflusses von Tat-Substraten wurde die Substrataffinität der Tat-Komplexe anhand spezieller Aminosäureaustausche modifiziert. Hierbei zeigte sich, dass die Tat-Komponenten TatA/E, TatB und TatC essenziell für die Assemblierung funktionaler Tat-Komplexe sind. Außerdem handelt es sich bei dem zuvor nicht charakterisierten Tat-Komplex um einen TatABC-Komplex. Dieser liegt, in Anwesenheit von TatA, nicht in Assoziation mit Substraten vor. Die TatA-Abhängigkeit sowie die Dissoziation von assoziierten Substraten weisen darauf hin, dass es sich bei dem Tat-Komplex um ein spätes Intermediat des Tat-Translokons handeln könnte.

Neben der Charakterisierung und Untersuchung von Tat-Komplexen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls Strategien für die Reinigung von Tat-Komplexen etabliert. Hierbei gelang es, die bisher bekannten TatABC-Komplexe anzureichern. Es konnten weiterhin Rückschlüsse auf die Stabilität verschiedener Tat-Komplexe gezogen werden. So zeigte sich, dass stabilisierende Agenzien wie Saccharose für die Anreicherung vom Tat-Komplex 2 benötigt werden, während Tat-Komplex 1 auch ohne den Zusatz von Saccharose angereichert werden konnte.

Schlagwörter: *Escherichia coli*, *Twin-arginine-translocation*, Membranproteinkomplexe

ABSTRACT

The twin-arginine translocation (Tat) system transports folded proteins across membranes of prokaryotes, plant plastids, and some mitochondria. The Tat system of *Escherichia coli* consists of the components TatA/E, TatB and TatC. These components assemble in the course of transport into Tat complexes of different molecular weights, which can interact with substrates. TatB and TatC are central components of all previously described Tat complexes. However, neither the role of TatA/E in assembly of Tat complexes, nor the stoichiometry of the individual components within the complexes is known. Similarly, the mechanism of Tat dependent protein transport is unclear.

In the present work, the effects of the Tat components and Tat substrates on the known Tat complexes and a so far uncharacterized Tat complex were investigated. For this purpose, the assembled Tat complexes were analyzed by BN-PAGE/Western-Blot in the presence and absence of one or more components of the Tat system. To study the influence of Tat substrates, the substrate affinity of the Tat complexes was modified by means of specific amino acid changes. It was shown that the Tat components TatA/E, TatB and TatC are essential for the assembly of functional Tat complexes. In addition, the so far uncharacterized Tat complex is a TatABC complex. In the presence of TatA this complex is not associated with substrates. The TatA dependence as well as the dissociation of associated substrates indicate that the Tat complex may be a late intermediate of the Tat translocon.

In addition to the characterization and investigation of Tat complexes, strategies for the purification of Tat complexes have been established in the present work. These strategies were used to enrich the known TatABC complexes. It was also possible to draw conclusions about the stability of different Tat complexes. Thus, it was shown that stabilizing agents such as sucrose are needed specially for the enrichment of Tat complex 2, while Tat complex 1 could be enriched without the addition of sucrose.

Keywords: *Escherichia coli*, twin-arginine-translocation, membrane protein complexes

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABSTRACT	II
INHALTSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Proteintransportsysteme Gram-negativer Bakterien.....	2
1.2 Proteintransportsysteme der Cytoplasmamembran.....	3
1.2.1 Der Sec-abhängige Proteintransport.....	3
1.2.2 Der Tat-abhängige Proteintransport	6
1.3 Das Tat-System von <i>Escherichia coli</i>	8
1.3.1 Die Tat-Komponenten	8
1.3.2 Die Tat-Substrate	10
1.3.3 Das Tat-Signalpeptid	11
1.4 Die Tat-Translokase.....	12
1.4.1 Interaktionen der Tat-Komponenten.....	12
1.4.2 Tat-Komplexe in <i>Escherichia coli</i>	18
1.4.3 Modelle der Tat-Translokase.....	21
1.4.4 Zelluläre Lokalisation der Tat-Komponenten.....	22
1.5 Mechanismen des Tat-Transportes	23
1.6 Zielsetzung	25
2 MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 Bakterienstämme und Plasmide	26
2.1.1 Bakterienstämme	26
2.1.2 Plasmide.....	26
2.1.3 Oligonukleotide	30

2.2	Molekulargenetische Methoden.....	32
2.2.1	Plasmid-Minipräparation.....	32
2.2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	32
2.2.3	Agarose Gelelektrophorese.....	36
2.2.4	DNA-Restriktion.....	37
2.2.5	Reinigung von DNA-Fragmenten.....	38
2.2.6	Ligation von geschnittenen DNA-Fragmenten.....	38
2.2.7	Herstellung ultrakompetenter Zellen.....	39
2.2.8	Transformation ultrakompetenter Zellen.....	39
2.2.9	<i>Fast-Transformation</i>	40
2.2.10	DNA-Sequenzierung.....	40
2.3	Kultivierungsbedingungen.....	41
2.3.1	Nährmedien und Zusätze.....	41
2.3.2	Anzucht und Zellernte.....	42
2.3.3	<i>In-vivo-cross-linking</i>	43
2.3.4	Stammhaltung.....	44
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	44
2.4.1	Präparation von Membranen.....	44
2.4.2	Solubilisierung von Membranproteinen.....	45
2.4.3	<i>Strep-Tactin</i> [®] -Affinitätschromatographie.....	46
2.4.4	Ni-Chelat-Affinitätschromatographie.....	48
2.4.5	Größenausschlusschromatographie.....	50
2.4.6	BN-PAGE.....	51
2.4.7	SDS-PAGE.....	53
2.4.8	Kolloidale Coomassie-Färbung.....	54
2.4.9	Western-Blot.....	55
2.4.10	Proteindetektion.....	56
2.4.11	<i>Antibody stripping</i> von Western-Blots.....	57
2.5	Funktionalitätstests.....	58
2.5.1	<i>In-vivo</i> -Translokationsanalyse: Subzelluläre Fraktionierung.....	58
2.5.2	SDS-Sensitivitätsmessung.....	59
2.5.3	Bestimmung des Kettenphänotyps.....	60

2.6	Mikroskopische Methoden.....	61
2.6.1	Herstellung von Agar-Slides.....	61
2.6.2	Durchlichtmikroskopie	61
2.7	Geräte und Chemikalien	61
2.7.1	Zentrifugen und Rotoren.....	61
2.7.2	Chemikalien, Enzyme und Wasser.....	62
3	ERGEBNISSE.....	63
3.1	Einflüsse von Tat _{C150Bpa} auf die Tat-Translokase.....	63
3.1.1	<i>In-vivo-cross-linking</i> Studien zu Position 50 von TatC.....	63
3.1.2	Tat _{C150Bpa} beeinflusst nicht die Funktionalität des Tat-Systems	66
3.1.3	Tat _{C150Bpa} stabilisiert Tat-Komplex 3.....	68
3.2	Charakterisierung von Tat-Komplex 3	70
3.2.1	Tat-Komplex 3 wird auch durch Tat _{C150Y} stabilisiert.....	71
3.2.2	Tat-Komplex 3 beinhaltet kein Substrat	73
3.2.3	Tat-Komplex 3 assembliert nur in Gegenwart von TatA	76
3.2.4	In Abwesenheit von TatA stabilisiert Tat _{C150Bpa} Tat-Komplex 2S.....	78
3.2.5	Die Substratbindung beeinflusst die Assemblierung der Tat-Komplexe 2S und 3.....	80
3.3	Stöchiometrie des Tat-Systems.....	82
3.3.1	Alle bekannten Tat-Komplexe können in Abwesenheit von TatA assemblieren.....	83
3.3.2	TatB zeigt biochemische Ähnlichkeiten zu TatA	86
3.3.3	TatA ist für die Funktionalität des Tat-Systems zwingend notwendig.....	88
3.3.4	TatA, TatB und TatC sind für die Assemblierung von Tat-Komplexen essenziell	90
3.3.5	TatA ist Bestandteil der Tat-Komplexe 1, 2, 2S und 3.....	93
3.3.6	TatE kann TatA nicht nur funktionell, sondern auch strukturell ersetzen	96
3.3.7	Die Assemblierung der Tat-Komplexe ist unabhängig vom Membranpotential	98
3.4	Etablierung von Strategien zur Reinigung von Tat-Komplexen.....	99
3.4.1	Affinitätschromatographische Reinigung von TatABC-Komplexen.....	100
3.4.2	Größenausschlusschromatographische Reinigung von TatABC Komplexen	102
3.4.3	Kombination zweier affinitätschromatographischer Reinigungsschritte.....	109
3.4.4	<i>Tags</i> können Tat-Komplexe destabilisieren	114
3.4.5	Tat-Komplexe können durch Saccharose stabilisiert werden.....	116

4	DISKUSSION	121
4.1	Einfluss von TatC ₁₅₀ auf die Stabilität und Funktionalität von Tat-Komplexen.....	121
4.1.1	TatC _{150Bpa} -Dimere belegen eine Dynamik der Tat-Translokase.....	121
4.1.2	TatC _{150Bpa} führt zu einer Stabilisierung der Tat-Translokase	125
4.1.3	Aromaten an Position 50 von TatC beeinflussen Stabilität und Funktionalität.....	127
4.2	Die Tat(A)BC _{150Bpa} -Komplexe.....	130
4.2.1	TatC _{150Bpa} zeigt eine erhöhte Affinität zu TatA und TatB.....	131
4.2.2	TatC _{150Bpa} stabilisiert neben Tat-Komplex 3 den Tat-Komplex 2S.....	133
4.2.3	Die Modifikation der Substratbindung induziert die Bildung von Tat-Komplex 3.....	135
4.3	Die Rolle der Komponenten bei der Assemblierung von Tat-Komplexen.....	138
4.3.1	TatA kann strukturell, jedoch nicht funktionell durch TatB ersetzt werden.....	139
4.3.2	Die Tat-Komplexe 1, 2, 2S und 3 sind TatABC-Komplexe.....	141
4.3.3	Funktionelle Tat-Komplexe assemblieren nur in Anwesenheit von TatA/E, TatB und TatC	144
4.3.4	TatA kann funktionell und strukturell durch TatE ersetzt werden	148
4.4	Anreicherung von Tat-Komplexen	152
4.4.1	Für die Reinigung sind stabilisierende Maßnahmen notwendig.....	153
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	160
	PUBLIKATIONSLISTE.....	179
	LEBENS LAUF	180
	DANKSAGUNG	181

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB	<i>antibody</i>
abs.	absolut
Amp/Amp ^R	Ampicillin/ampicilinresistent
APH	Amphipatische Helix
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ara/Ara ^R	Arabinose/arabinoseresistent
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>absolute units</i>
BAM	<i>β-barrel assembly machinery</i>
BCCP	Biotin-Carboxy-Carrier-Protein
Bis Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BN	<i>Blue-native</i>
b/bp	Base(n)/Basenpaar(e)
Bpa	<i>p</i> -Benzoyl-L-phenylalanin
C	<i>cross-linker</i>
CCCP	Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorophenylhydrazon
Cm/Cm ^R	Chloramphenicol/chloramphenicolresistent
CP	Cytoplasma
Da	Dalton
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DDM	<i>n</i> -Dodecyl-β-D-Maltosid
DL	Durchlauf
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Elutionsfraktion
ECL	<i>enhanced-chemiluminescence</i>

EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EM	Elektronenmikroskop(ie)
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> (und andere)
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GTP	Guanosintriphosphat
H6	Hexahistidin
IM	<i>inner membrane</i> (Cytoplasmamembran)
IMAC	Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie
LB	Luria Bertani (Komplexmedium)
Lol	<i>localization of lipoprotein</i>
M	Membran
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MGD	Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid
MT	Metallothionein
MW	<i>molecular weight</i>
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OM	<i>outer membrane</i>
<i>ori</i>	<i>origin of replication</i>
PAGE	Polyacylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PIPES	Piperazin- <i>N,N'</i> -bis(2-Ethansulfonsäure)
PMF	<i>proton motive force</i>
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PP	Periplasma
psi	<i>pounds per square inch</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBS	ribosomale Bindestelle
RNA	<i>ribonucleic acid</i>

rpm	<i>rounds per minute</i>
RSS	Restriktionsschnittstelle
RT	Raumtemperatur
Sec	<i>general secretion pathway</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
SIMIBI	<i>signal recognition particle, MinD and BioD</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
SOC	<i>super optimal catabolite-repression</i>
SV	Säulenvolumen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tat	<i>twin-arginine translocation</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin</i>
TES	Tris-EDTA-Saccharose
Tet/Tet ^R	Tetracyclin/tetracyclinresistent
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i>
TMAO	Trimethylamin- <i>N</i> -Oxid
Tmd	Trifluoromethyldiazirin
TMH	Transmembranhelix
TSS	<i>transformation and storage solution</i>
ÜS	Überstand
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
W	Waschfraktion
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)

Verwendete Proteine und Proteinkomplexe

AmiA	<i>N</i> -Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase (Tat-Substrat)
AmiC	<i>N</i> -Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase (Tat-Substrat)
ATPase	Adenosintriphosphatase, Hydrolase
BCCP	Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CueO	<i>multi-copper oxidase</i> (Tat-Substrat)
DNAse	Desoxyribonuklease
EfeB/YcdB	DyP-Typ Peroxidase mit Häm-Kofaktor (Tat-Substrat)
FtsY	Membranassoziierter SRP-Rezeptor
GroEL	Chaperon
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HybC	[Ni-Fe]-bindende Untereinheit der Hydrogenase 2
HybO	Untereinheit der Hydrogenase 2 (Tat-Substrat)
IgG	Immunglobulin G
mCherry	Rot fluoreszierendes Protein
SecA	Komponente des Sec-Systems (ATPase)
SecB	Komponente des Sec-Systems (Chaperon)
SecDF-YajC	Mit SecYEG assoziierter Komplex
SecYEG	Komponenten des Sec-Systems (Translokon)
SRP	<i>signal recognition particle</i>
SufI	An der Zellteilung beteiligtes Protein (Tat-Substrat)
TatA (Tha4)	Komponente des Tat-Systems
TatB (Hcf106)	Komponente des Tat-Systems
TatC (cpTatC)	Komponente des Tat-Systems
TatE	Komponente des Tat-Systems
TorA	Trimethylamin- <i>N</i> -Oxid (TMAO)-Reduktase
TorD	Chaperon für die Insertion des TorA MGD Kofaktors
YidC	Membranprotein Insertase
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

Nukleinbasen

A	Adenin	G	Guanin
C	Cytosin	T	Thymin

Aminosäuren

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

1 EINLEITUNG

Alle Lebewesen eint das Bestreben, sich im Laufe der Zeit den äußeren Bedingungen anzupassen. Dies dient kurzfristig dem Fortbestand einzelner Organismen und langfristig dem Fortbestand von Arten. Bei der Anpassung spielen die biologischen und chemischen Bedingungen der Umgebung eine zentrale Rolle. Die Aufnahme und Verstoffwechslung anorganischer und organischer Stoffe unter möglichst geringem Energieaufwand und die effiziente Nutzung der Ressourcen bietet einen evolutionären Vorteil gegenüber konkurrierenden biologischen Systemen. Zu diesem Zweck haben sich im Laufe der Zeit sowohl in eukaryotischen, als auch in prokaryotischen Zellen räumlich voneinander getrennte Reaktionsräume (Kompartimente) entwickelt. Diese Kompartimentierung bietet den Vorteil, dass unterschiedliche Reaktionen unter jeweils optimalen Bedingungen parallel stattfinden können. Die Kompartimente sind meist durch Biomembranen voneinander abgegrenzt. Ein Austausch zwischen den Kompartimenten wird durch die selektive Permeabilität dieser Membranen ermöglicht. Des Weiteren kann über Membranen ein Konzentrationsgradient aufgebaut werden, der als Energiequelle für chemische Reaktionen genutzt werden kann.

Das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* besitzt mit dem Cytoplasma (CP) und dem Periplasma (PP) zwei dieser Kompartimente. Die Cytoplasmamembran (innere Membran, IM) trennt das Cytoplasma vom umgebenden Periplasma. Dieses wird durch die äußere Membran (OM) vom umgebenden (extrazellulären) Raum abgegrenzt. Gram-positive Organismen hingegen besitzen keine äußere Membran und folglich mit dem Cytoplasma nur ein Kompartiment.

Die Proteinbiosynthese findet im Cytoplasma statt. Jedoch haben viele Proteine Gram-negativer Bakterien ihren Funktionsort in der Cytoplasmamembran, dem Periplasma, der äußeren Membran oder gar dem extrazellulären Raum. Um Proteine vom Ort der Proteinbiosynthese zu ihrem Bestimmungsort zu transportieren, hat sich im Laufe der Zeit eine Vielzahl von Proteinsektionssystemen entwickelt.

1.1 Proteintransportsysteme Gram-negativer Bakterien

Die unterschiedlichen Proteintransportsysteme Gram-negativer Bakterien können grundsätzlich anhand des Bestimmungsortes der zu transportierenden Proteine klassifiziert werden.

Integrale Membranproteine der Cytoplasmamembran werden in der Regel mithilfe des SRP-abhängigen Sec-Transports transportiert und durch die Insertase YidC lateral in die Membran entlassen (Xie und Dalbey 2008). Proteine, bei denen nur wenige hydrophile Reste auf die periplasmatische Seite der Cytoplasmamembran transportiert werden müssen, werden Sec-unabhängig von YidC in die Cytoplasmamembran inseriert (Kiefer und Kuhn 2007).

Die Mehrzahl der periplasmatischen Proteine wird im ungefalteten Zustand über das Sec-System transportiert (Driessen und Nouwen 2008). Einige periplasmatische Proteine hingegen können ihre funktionelle Konformation nur im Cytoplasma einnehmen. Diese Proteine falten bereits im Cytoplasma und werden anschließend mithilfe des Tat-Systems über die Cytoplasmamembran transportiert (Hamsanathan und Musser 2018).

Für die Insertion integraler Membranproteine der äußeren Membran sind zwei Transportsysteme bekannt. Nach dem Transport über die Cytoplasmamembran durch das Sec- oder das Tat-System werden Lipoproteine über das Lol-System (Tokuda und Matsuyama 2004) und β -barrel Proteine über das BAM-System in die äußere Membran inseriert (Knowles *et al.* 2009). Auch Proteine, die Oberflächenstrukturen bilden, sind in der äußeren Membran verankert. Die Untereinheiten werden im ungefalteten Zustand mithilfe des Sec-Systems in das Periplasma transportiert und durch Poren, die aus β -barrel- oder Lipoproteinen bestehen, zu den assemblierenden Pili weitergeleitet. Auf diese Weise werden Typ-I-Pili, P-Pili, *curli*-Pili und Typ-IV-Pili gebildet (Kline *et al.* 2010).

Die Sekretion von Proteinen über die äußere Membran kann anhand zweier verschiedener Mechanismen stattfinden. Der Mechanismus der Sekretionssysteme vom Typ I, III, IV und VI beinhaltet keine periplasmatischen Intermediate. Beispielsweise werden Proteine vom Typ-III-Sekretionssystem über das sogenannte Injektosom vom Cytoplasma über die innere- und äußere Membran direkt in das Cytoplasma einer eukaryotischen Wirtszelle transportiert. Sekretionssysteme vom Typ II und V hingegen transportieren periplasmatische Proteine, die zuvor Sec- oder Tat-abhängig transportiert wurden. Oft handelt es sich bei diesen extrazellulären Proteinen um Exotoxine. Diese werden in einem zweiten Schritt mithilfe des Typ-II- oder Typ-V-Sekretionssystems über die äußere Membran transportiert (Dalbey und Kuhn 2012).

1.2 Proteintransportsysteme der Cytoplasmamembran

Mit Ausnahme der Substrate der Sekretionssysteme vom Typ I, III, IV und V und derer, die Sec-unabhängig von YidC in die Cytoplasmamembran inseriert werden, können Proteine der inneren und äußeren Membran sowie periplasmatische und extrazellulär vorliegende Proteine ihren Bestimmungsort nur mithilfe des Sec- oder Tat-Systems erreichen. Damit spielen die Proteintransportsysteme der Cytoplasmamembran eine Schlüsselrolle. Proteine, die mithilfe des Sec- oder Tat-Systems transportiert werden sollen, tragen sich prinzipiell ähnelnde N-terminale Signalpeptide. So zeichnen sich die Signalpeptide durch eine positiv geladene, aminoterminal Region (n-Region), einen hydrophoben Kern (h-Region) und eine hydrophile carboxyterminale Region (c-Region) aus. Letztere enthält eine konservierte Sequenz zur Erkennung und Abspaltung des Signalpeptids durch die Typ I Signalpeptidase. Sec-Signalpeptide werden anhand dieser Eigenschaften erkannt und enthalten keine weiteren konservierten Aminosäuresequenzmotive (Natale *et al.* 2008). Tat-Signalpeptide besitzen zusätzlich das hochkonservierte, namensgebende *twin-arginine* Motiv [S/T]-R-R-X-F-L-K im Übergang zwischen der n- und der h-Region (Berks 1996). Ursprünglich wurde dieses Motiv als *hydrogenase signal peptide consensus box* R-R-X-F-X-K anhand der Signalpeptide von Hydrogenasen identifiziert (Nivière *et al.* 1992).

1.2.1 Der Sec-abhängige Proteintransport

Das Sec-System (*general secretion system*) transportiert den Großteil der periplasmatischen Proteine. Außerdem werden die meisten Lipoproteine und β -barrel-Proteine der äußeren Membran sowie die Untereinheiten, die zur Assemblierung von Pili auf der Zelloberfläche benötigt werden, initial mithilfe des Sec-Systems im ungefalteten Zustand über die Cytoplasmamembran transportiert (Dalbey und Kuhn 2012). In *E. coli* besteht die zur Translokation genutzte Pore aus den Komponenten SecE, SecG und SecY, welche den heterotrimeren, membranintegralen SecYEG Proteinkomplex bilden. Dieser ist peripher mit der ATPase SecA assoziiert und wird für die Translokation großer, hydrophiler Regionen benötigt (Kuhn 1988; Deitermann *et al.* 2005). Hydrophobe Domänen werden hingegen von der Sec-Translokase transportiert und können mit der Hilfe von YidC in die Membran inseriert werden (Houben *et al.* 2004). SecY besteht aus 10 Transmembrandomänen und interagiert mit SecE und SecG um den Translokationskanal zu bilden (Breyton *et al.* 2002). Die Energie für die Membraninsertion von SecA zur Initiation der Translokation liefern die Hydrolyse von ATP und die protonenmotorische Kraft (PMF) (Driessen und Wickner 1991; Nishiyama *et al.* 1999).

Der Transport kann beschleunigt werden, wenn SecA durch einen Komplex aus SecD, SecF und YajC stabilisiert wird (Duong und Wickner 1997). Dieser Komplex ist für die Translokation jedoch nicht essenziell (Pogliano und Beckwith 1994). Berechnungen zeigten, dass ATP-abhängige Konformationsänderungen des SecYEG-Komplexes dazu führen, dass der *precursor* auf der cytoplasmatischen Seite der Translokationspore ungefaltet bleibt, während auf der periplasmatischen Seite die Bildung einer Helix induziert wird. Auf diese Art und Weise können sich *precursor*-Proteine, welche sich in der Translokationspore befinden, nur in eine Richtung bewegen (Corey *et al.* 2019).

Grundsätzlich ist beim Sec-abhängigen Transport zwischen dem kotranslationalen, SRP-abhängigen Transport und dem posttranslationalen, SecB-abhängigen Transport zu unterscheiden (Fekkes und Driessen 1999) (siehe **Abbildung 1**).

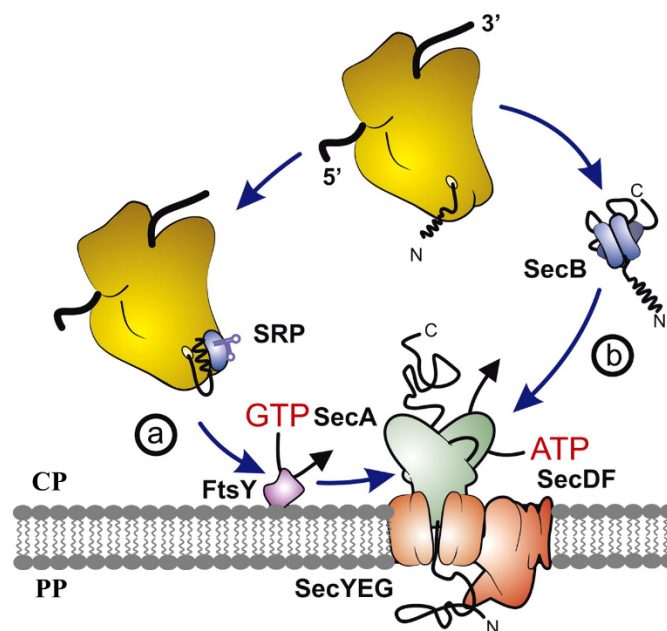


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Sec-abhängigen Proteintransportes basierend auf Nathale *et al.* 2008. (a) Kotranslationaler, SRP-abhängiger Sec-Transport. (b) Posttranslationaler, SecB-abhängiger Sec-Transport.

1.2.1.1 Der kotranslationale, SRP-abhängige Sec-Transport

Beim kotranslationalen, SRP-abhängigen Sec-Transport wird der *signal recognition particle* (SRP) benötigt, um das zu transportierende Substrat an die Cytoplasmamembran zu bringen. Die meisten integralen Proteine der Cytoplasmamembran werden über den SRP-abhängigen Sec-Transport transportiert (Ulbrandt *et al.* 1997; Wickström *et al.* 2011). Der bakterielle SRP besteht aus dem Ffh Polypeptid und der 4.5S RNA und interagiert mit hydrophoben Bereichen des naszierenden Polypeptids eines Membranproteins. Der Komplex aus SRP, dem naszierenden Polypeptid und dem Ribosom wird anschließend zum membranassoziierten SRP-Rezeptor FtsY geleitet (Luirink und Sinning 2004). SRP und FtsY sind SIMIBI-Typ GTPasen, deren Aktivität durch Dimerisierung reguliert wird (Wittinghofer und Vetter 2011). Die aktive Tasche entsteht erst durch die Dimerisierung beider Proteine und bindet zwei Moleküle GTP (Egea *et al.* 2004; Focia *et al.* 2004). Durch die Hydrolyse von GTP entstandenes GDP wird mithilfe eines intrinsischen Nukleotid-Austauschfaktors durch GTP ersetzt (Moser *et al.* 1997). Die Hydrolyse von GTP bedingt die Dissoziation von SRP und FtsY. In der Folge wird das Ribosom mit dem naszierenden Polypeptid an SecY übergeben, woraufhin die Translokation durch SecYEG erfolgt. Transmembrandomänen werden mithilfe von YidC lateral in die Membran entlassen (Beck *et al.* 2001). Befinden sich mehr als 13 Aminosäuren zwischen den Transmembrandomänen, ist außerdem die eine zusätzliche Öffnung des Sec-Translokons durch SecA erforderlich (Deitermann *et al.* 2005).

1.2.1.2 Der posttranslationale, SecB-abhängige Sec-Transport

Beim posttranslationalen, SecB-abhängigen Transport wird das Signalpeptid des naszierenden Polypeptids vom Trigger-Faktor gebunden (Beck *et al.* 2000). Nach der Abspaltung vom Ribosom kann der *precursor* entweder von nicht-membranassoziiertem, cytoplasmatischem SecA (Chun und Randall 1994) oder von SecB über das N-terminale Signalpeptid des zu transportierenden Proteins gebunden werden. SecB fungiert dabei als Chaperon und verhindert die Faltung des *precursors* (Randall und Hardy 2002; Zhou und Xu 2005). Es liegt in tetramerer Form als Dimer von Dimeren vor (Murén *et al.* 1999) und besitzt zwei Kanäle, die zur Bindung des Signalpeptids dienen (Xu *et al.* 2000). Durch die Interaktion eines SecB-Tetramers mit zwei SecA-Protomeren erfolgt die Übergabe des *precursors* an SecA (Zhou und Xu 2003; Suo *et al.* 2011). Unter der Verwendung von ATP als Energiequelle initiiert SecA die Translokation des *precursors* über das SecYEG-Translokon in das Periplasma (Economou und Wickner 1994; Economou *et al.* 1995).

1.2.2 Der Tat-abhängige Proteintransport

Die funktionelle Konformation einiger Proteine ist von einem Kofaktor abhängig (Jack *et al.* 2004) oder kann nur mithilfe cytoplasmatischer Chaperone eingenommen werden (DeLisa *et al.* 2003; Kerner *et al.* 2005; Stolle *et al.* 2016). Der Transport gefalteter Proteine über die Cytoplasmamembran wird mithilfe des Tat-Systems durchgeführt (Berks 1996). Substrate, die Tat-abhängig transportiert werden, weisen das hochkonservierte, namensgebende *twin-arginine* Motiv auf (Natale *et al.* 2008). Das Tat-System pflanzlicher Plastide und Gram-negativer Proteobakterien wie *E. coli* besteht aus den Komponenten TatA (Tha4) (Mori *et al.* 1999; Sargent *et al.* 1998), TatB (Hcf106) (Settles 1997; Sargent *et al.* 1999) und TatC (cpTatC) (Bogsch *et al.* 1997; Mori *et al.* 2001). TatB weist starke Ähnlichkeiten zu TatA auf (Yen *et al.* 2002; Brüser 2007) und ist kein Bestandteil minimaler Tat-Systeme Gram-positiver Bakterien, die nur die Komponenten TatA und TatC benötigen (Pop *et al.* 2002; Jongbloed *et al.* 2004). Einige Gram-negative Bakterien besitzen ein zusätzliches TatA-Paralog, TatE (Sargent *et al.* 1998). Auch mitochondriale Tat-Systeme sind bekannt, die sich aus den gleichen Komponenten in unterschiedlichen Kombinationen (TatAC, TatBC, TatC) zusammensetzen (Yen *et al.* 2002; Petru *et al.* 2018).

Bei TatABC-Systemen besteht die vollständig funktionale Tat-Translokase aus den Komponenten TatA/E, TatB und TatC (Sargent *et al.* 1999). TatB und TatC bilden den TatBC-Komplex, welcher mit dem Signalpeptid von *precursor*-Proteinen interagiert (Alami *et al.* 2003; Gérard und Cline 2006; Maurer *et al.* 2010; Ramasamy *et al.* 2013; Hamsanathan *et al.* 2017). TatA interagiert im Rahmen des Tat-Transportes mit dem TatBC-Komplex. Nicht mit dem TatBC-Komplex assoziiertes TatA bildet Homooligomere verschiedener Größen und kann unabhängig von TatBC mit Tat-Substraten interagieren (Pop *et al.* 2003; Taubert *et al.* 2015).

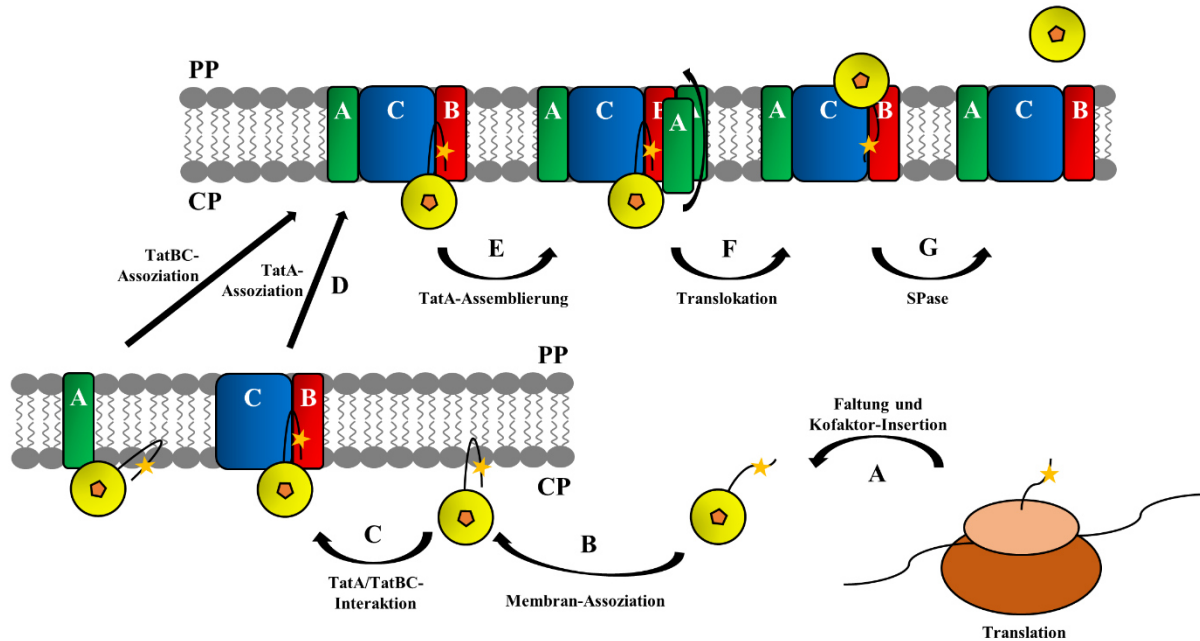


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Mechanismus des Tat-abhängigen Proteintransports. (A) Translatierte *precursor*-Proteine werden zunächst, teilweise mithilfe spezifischer oder genereller Chaperone, gefaltet. Auch die Insertion von Kofaktoren (Pentagon) findet in der Regel bereits im Cytoplasma statt. (B) Bedingt durch die hydrophobe h-Region assoziieren *precursor*-Proteine anhand des Signalpeptids an die Membran. (C) *Precursor*-Proteine interagieren dort sowohl mit TatBC-Komplexen, als auch mit TatA. (D) Anschließend bilden sich Substrat-assoziierte TatABC-Komplexe. (E) Die Substratbindung hat die verstärkte Assoziation von TatA an Tat-Komplexe zur Folge. (F) Das Substrat passiert die Membran auf bisher ungeklärte Weise. (G) Letztlich wird das Signalpeptid mithilfe der Signalpeptidase entfernt.

Im Gegensatz zu anderen Transportsystemen scheinen die Komponenten des Tat-Systems keine stabile, dauerhafte Pore zu bilden, durch die Substrate transportiert werden können. Viel eher scheint das Tat-Translokon bei Bedarf zu assemblieren. Der Mechanismus des Tat-Transports ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt und es existieren unterschiedliche Modelle. Diese reichen von einer symmetrischen Pore als Assemblierung von TatA, TatB und TatC (Aldridge *et al.* 2014; Blümmel *et al.* 2015; Alcock *et al.* 2016) über eine asymmetrische Pore, bei der die symmetrische Pore durch die Assoziation von weiteren TatA-Protomeren erweitert wird, (Alcock *et al.* 2016) bis hin zu einer Schwächung der Membran (*membrane weakening*). Die Theorie der Membranschwächung basiert auf der lateralen Assoziation von TatA-Assemblierungen an TatBC-Komplexe, sodass das zu transportierende Substrat die geschwächte Membran ohne die Bildung einer Pore passieren kann (Brüser und Sanders 2003).

1.3 Das Tat-System von *Escherichia coli*

Für den Import von Proteinen in pflanzliche Thylakoide waren bereits zwei Mechanismen bekannt. Neben einem zum Sec-Transport analogen Mechanismus konnte ein zweiter Mechanismus identifiziert werden, der maßgeblich vom Protonengradienten (ΔpH) abhängig ist (Mould und Robinson 1991; Cline *et al.* 1992). Später konnte das konservierte *twin-arginine* Motiv mit diesem Mechanismus in Verbindung gebracht werden (Chaddock *et al.* 1995). Dieses konservierte Sequenzmotiv wurde zuvor bereits bei Signalpeptiden von Hydrogenasen aus Gram-negativen, Sulfat-reduzierenden Bakterien beobachtet (Nivière *et al.* 1992) und wurde später auch bei Bakterien mit dem Tat-abhängigen Transport in Verbindung gebracht (Berks 1996; Santini *et al.* 1998; Weiner *et al.* 1998).

Escherichia coli ist der bisher am intensivsten untersuchte prokaryotische Organismus und ein Vertreter der *Enterobacteriaceae*. Es handelt sich um ein stäbchenförmiges, Gram-negatives und fakultativ-anaerobes Bakterium. In *E. coli* sind die Gene, die für die Tat-Komponenten TatA, TatB und TatC codieren, im *tatABCD*-Operon organisiert. Das für TatE codierende Gen befindet sich isoliert vom *tatABCD*-Operon an anderer Stelle des Genoms (Sargent *et al.* 1998). TatD ist nicht essenziell für den Tat-abhängigen Transport in *E. coli* (Wexler *et al.* 2000). TatB und TatC sind hingegen zwingend für die Funktionalität des Tat-Systems notwendig (Bogsch *et al.* 1998; Sargent *et al.* 1999). TatE ist ein TatA-Paralog. Die Anwesenheit einer der beiden Komponenten ist Voraussetzung für den Tat-abhängigen Transport (Sargent *et al.* 1998).

1.3.1 Die Tat-Komponenten

Aufbau und Struktur der Tat-Komponenten

Bei TatA, TatB, TatC und TatE handelt es sich um membranintegrale Proteine. TatA, TatB und TatE zeichnen sich durch eine L-förmige Konformation aus. An einen kurzen periplasmatischen N-Terminus schließt sich eine Transmembrandomäne an. Es folgt eine amphipathische Helix, die mit der cytoplasmatischen Seite der Membran interagiert. Die Transmembranhelix (TMH) und die amphipathische Helix (APH) sind durch eine kurze, flexible *hinge*-Region getrennt. Bei TatA und TatE folgt auf die amphipathische Helix ein unstrukturierter C-Terminus (Baglieri *et al.* 2012; Rodriguez *et al.* 2013). TatB besitzt zwei weitere Helices, welche deutlich flexibler sind als die TMH und die APH. Aufgrund der Ladungsverteilung von $\alpha 3$ und $\alpha 4$ wird davon ausgegangen, dass diese sich frei beweglich im Cytoplasma befinden, was eine Interaktion von $\alpha 3$ und $\alpha 4$ mit zu transportierenden Substraten nahelegt (Zhang *et al.* 2014) (siehe **Abbildung 3** und **Abbildung 4**).

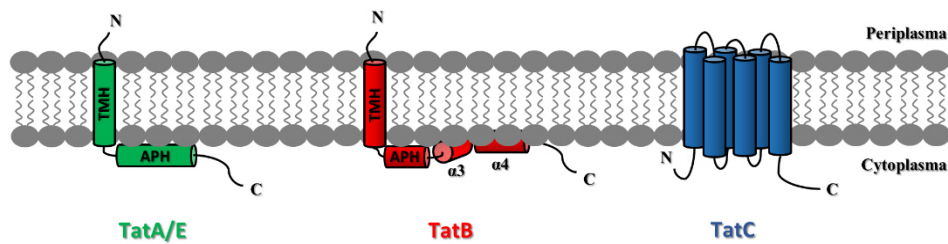


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänen und helikalen Bereiche der Tat-Komponenten TatA/E, TatB und TatC.

Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus von TatC befinden sich in unstrukturierter Konformation im Cytoplasma. TatC besitzt 6 Transmembranhelices (Sargent *et al.* 1998), die durch zwei cytoplasmatische und zwei periplasmatische Regionen getrennt werden (siehe **Abbildung 3**). Die periplasmatischen und cytoplasmatischen Regionen weisen größtenteils keine Sekundärstruktur auf, bestehen aber auch teilweise aus helikalen Elementen. Die erste Helix ragt weit aus der Membran heraus, wodurch die erste periplasmatische Region einen großen helikalen Bereich hat. Aufgrund der kurzen Transmembranhelices 5 und 6 liegt der Bereich zwischen diesen Helices innerhalb der Lipiddoppelschicht und ragt nicht in das Periplasma (Rollauer *et al.* 2012; Ramasamy *et al.* 2013). Bedingt durch die Anordnung der Helices ähnelt die Struktur von TatC einem Handschuh mit einer konkaven und einer konvexen Seite (Ramasamy *et al.* 2013) (siehe **Abbildung 4** und **Abbildung 7**).

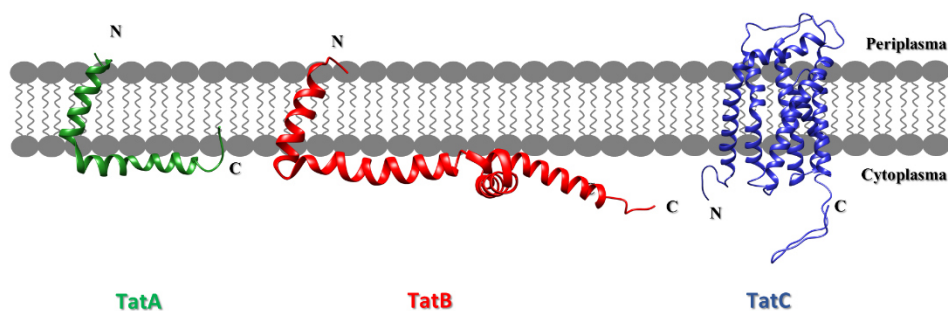


Abbildung 4: NMR-Strukturen von TatA (PDB 2LZR) und TatB (PDB 2MI2) aus *E. coli* (Rodriguez *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2014). Das Modell von TatC aus *E. coli* basiert auf der Kristallstruktur von TatC aus *Aquifex aeolicus* (PDB 4HTS) (Ramasamy *et al.* 2013) und wurde mit RaptorX (Peng und Xu 2011; Källberg *et al.* 2014) modelliert. Die Bildbearbeitung wurde mit UCSF Chimera (Pettersen *et al.* 2004) durchgeführt.

Membraninsertion der Tat-Komponenten

Kleinere Komponenten von Transportsystemen wie SecE und TatA und TatB aus Chloroplasten (cpSecE, Tha4 und Hcf106) integrieren ohne die Hilfe einer Insertase oder eines Transportsystems eigenständig in die Membran (Steiner *et al.* 2002; Fincher *et al.* 2003). Größere Komponenten mit mehreren Transmembrandomänen wie TatC können nicht eigenständig in die Membran insertieren. Weder cpSecY noch Alb3 (SecY und YidC aus Chloroplasten) werden für die Membraninsertion von cpTatC benötigt. Das weist auf die Existenz einer spezialisierten Translokase zur Membranintegration von Transportsystemen in Chloroplasten hin (Martin *et al.* 2009). Die Membraninsertion von TatC in inverse Membranvesikel (INV) von *E. coli* konnte hingegen nur in der Anwesenheit von SecYEG und YidC beobachtet werden. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass SecYEG und YidC für die Membraninsertion von TatC in *E. coli* benötigt werden. Die Anwesenheit von SecYEG und YidC ist jedoch nur für den Transport des ersten und zweiten periplasmatischen Bereichs von TatC zwingend notwendig. Die Transmembranhelices 5 und 6 sind deutlich kürzer als die anderen Transmembranhelices und werden nur durch einen kurzen hydrophoben Bereich voneinander getrennt. Dieser befindet sich innerhalb der Lipiddoppelschicht und wird ohne die Hilfe von SecYEG und YidC transportiert (Welte *et al.* 2012; Zhu *et al.* 2012).

1.3.2 Die Tat-Substrate

Die Faltung außerhalb des Cytoplasmas ist eine Voraussetzung für die Funktionalität von Sec-abhängig transportierten Proteinen. Das Tat-System transportiert Proteine, die ihre funktionelle Konformation nur im Cytoplasma einnehmen können. Die Gründe hierfür sind vielfältig.

Manche Proteine benötigen für die Faltung und Insertion von Kofaktoren spezifische Chaperone. Die Trimethylamin-*N*-Oxid (TMAO)-Reduktase TorA spielt eine wichtige Rolle bei der anaeroben Atmung. Mithilfe eines Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (MGD) Kofaktors reduziert TorA TMAO zu Trimethylamin (Méjean *et al.* 1994). Für die Insertion des MGD Kofaktors wird das spezifische Chaperon TorD benötigt (Pommier *et al.* 1998). TorD interagiert nicht nur mit der murenen Domäne von TorA, sondern auch mit dem TorA-Signalpeptid, wodurch der Transport erst nach der Insertion des Kofaktors stattfinden kann (Jack *et al.* 2004).

Die [Ni-Fe]-Hydrogenase 2 ist ein membranassoziiertes Heterodimer aus HybO und HybC. HybO besitzt ein N-terminales Tat-Signalpeptid. HybC bindet den [NiFe]-Kofaktor, besitzt jedoch kein Signalpeptid (Rodrigue *et al.* 1999). Nach der Integration des Kofaktors wird der C-Terminus von HybC im Cytoplasma durch HybE prozessiert. Das mature HybC bildet gemeinsam mit HybO den HybOC-Komplex, der mithilfe des Tat-Signalpeptids von HybO Tat-abhängig transportiert wird (Dubini und Sargent 2003).

Andere Tat-abhängig transportierte Proteine benötigen zwar keinen Kofaktor, können jedoch nur mit der Hilfe allgemeiner, cytoplasmatischer Chaperone gefaltet werden. So kann die *N*-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase AmiA ihre funktionelle Konformation nur mithilfe des cytoplasmatischen Chaperons GroEL einnehmen (Kerner *et al.* 2005).

1.3.3 Das Tat-Signalpeptid

Tat-Substrate besitzen N-terminale Signalpeptide. Die dreigliedrige Struktur ähnelt der von Sec-Signalpeptiden. Sec-Signalpeptide werden nur anhand dieser Struktur, die sich durch eine positiv geladene, N-terminale n-Region, einen zentralen, hydrophoben Kern (h-Region) und eine polare, C-terminale c-Region auszeichnet, erkannt (Freudl 2018) (siehe **Abbildung 5**). Die Effizienz des Sec-abhängigen Transportes wird maßgeblich durch die Nettoladung der n-Region sowie die Länge und Nettoladung der h-Region beeinflusst (Inouye *et al.* 1982; Chou und Kendall 1990; Goldstein *et al.* 1991). Für die korrekte Abspaltung des Signalpeptides durch die Signal-Peptidase müssen sich an der -3 und -1 Position Aminosäuren mit kleinen unpolaren Seitenketten (A-X-A) befinden (Heijne 1984; Karamyshev *et al.* 1998) (siehe **Abbildung 5**).

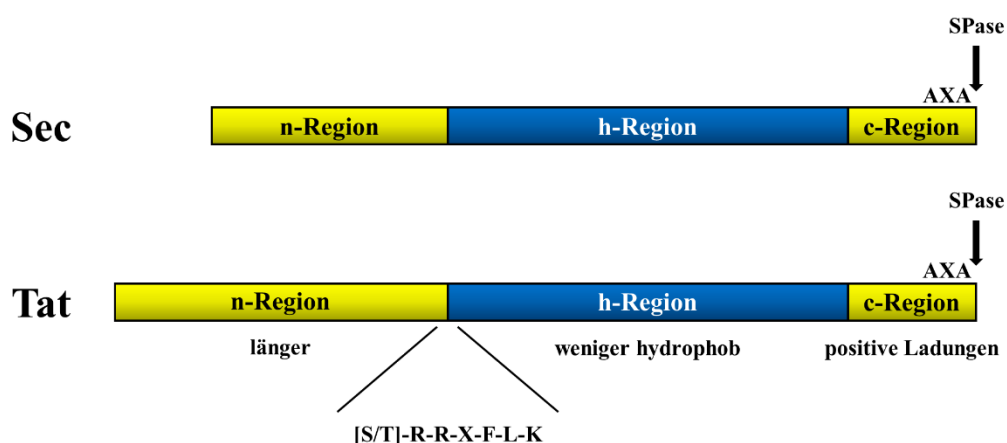


Abbildung 5: Generelle Eigenschaften von Sec- und Tat-Signalpeptiden basierend auf Freudl 2018. Beide besitzen eine dreigliedrige Struktur bestehend aus einer n-, h- und c-Region. Am Ende der c-Region befindet sich eine Erkennungssequenz für die Signalpeptidase (Konsensussequenz A-X-A). Im Unterschied zu Sec-Signalpeptiden besitzen Tat-Signalpeptide neben der hochkonservierten *twin-arginine* Sequenz eine längere n-Region, eine weniger hydrophobe h-Region und positive Ladungen in der c-Region (*sec avoidance*).

Tat-Signalpeptide weisen einige zusätzliche Eigenschaften auf, die sie von Sec-Signalpeptiden unterscheiden. Hierzu zählt unter anderem das hochkonservierte, namensgebende *twin-arginine* Motiv [S/T]-R-R-X-F-L-K, wobei X häufig für eine polare Aminosäure steht. Diese befindet sich im Übergang zwischen der n- und der h-Region (Berks 1996). Im Vergleich mit Sec-Signalpeptiden besitzen Tat-Signalpeptide in der Regel eine längere n-Region und eine weniger hydrophobe h-Region (Berks 1996; Cristóbal *et al.* 1999). Außerdem befinden sich in der c-Region von Tat-Signalpeptiden in einigen Fällen positiv geladene Aminosäuren. Diese sind in der c-Region von Sec-Signalpeptiden nicht zu finden. Gemeinsam mit der geringeren Hydrophobizität der h-Region verhindern die positiven Ladungen der c-Region, dass Tat-Signalpeptide durch Komponenten des Sec-Systems erkannt werden (*sec avoidance*) (Bogsch *et al.* 1997; Cristóbal *et al.* 1999; Blaudeck *et al.* 2003) (siehe **Abbildung 5**).

1.4 Die Tat-Translokase

Für den Tat-abhängigen Transport von gefalteten Proteinen über die Cytoplasmamembran werden die Tat-Komponenten TatA/E, TatB und TatC benötigt. TatB und TatC bilden den TatBC-Komplex (Cline und Mori 2001; Bolhuis *et al.* 2001). Tat-Substrate interagieren nicht nur mit dem TatBC-Komplex (Cline und Mori 2001; Richter und Brüser 2005), sondern auch mit TatA (Fröbel *et al.* 2011; Taubert *et al.* 2015). Dieses liegt sowohl frei in der Membran als auch in Assoziation mit dem TatBC-Komplex vor (Bolhuis *et al.* 2001; Oates *et al.* 2003). Freies, nicht mit dem TatBC-Komplex assoziiertes TatA bildet Homooligomere unterschiedlicher Größen (McDevitt *et al.* 2006; Behrendt *et al.* 2007).

1.4.1 Interaktionen der Tat-Komponenten

Hinweise auf den Mechanismus des Tat-abhängigen Proteintransportes können mithilfe unterschiedlicher Methoden erhalten werden. Eine Möglichkeit die Interaktionen zwischen den Komponenten des Tat-Systems zu untersuchen ist die Quervernetzung (*cross-linking*) der Komponenten. Hierbei werden Modifikationen verwendet, die unter bestimmten Bedingungen zur Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen zwei benachbarten Proteinen führen. So können Homo- oder Heterodimere erhalten werden, die nach SDS-PAGE/Western-Blot mittels spezifischer Antikörper detektiert werden können. Es ist zwischen der monodirektionalen und der bidirektionalen Quervernetzung zu unterscheiden. Bei der monodirektionalen Quervernetzung wird nur bei einem der Interaktionspartner eine Aminosäure durch eine reaktive Aminosäure ausgetauscht. Unter bestimmten Bedingungen reagiert diese beispielsweise mit

Peptidbindungen von benachbarten Proteinen. Der interagierende Bereich des Nachbarproteins lässt sich hierbei mithilfe massenspektrometrischer Analysen identifizieren. Zum Einsatz kommen beispielsweise aromatische Aminosäuren wie Trifluoromethyldiazirin-L-Phenylalanin **1** (Tmd-Phe) oder *p*-Benzoyl-L-Phenylalanin **2** (Bpa) (siehe **Abbildung 6**), die durch die Bestrahlung mit UV-Licht in einer radikalischen Reaktion unspezifisch mit benachbarten Proteinen reagieren (Beck *et al.* 2000; Young *et al.* 2010).

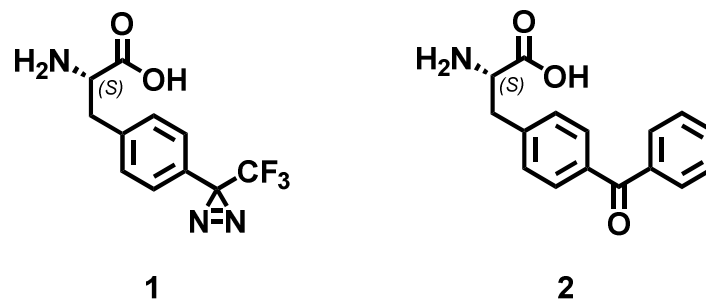


Abbildung 6: Strukturformeln von Trifluoromethyldiazirin-L-Phenylalanin **1** (Tmd-Phe) und *p*-Benzoyl-L-Phenylalanin **2** (Bpa).

Bei der bidirektionalen Quervernetzung wird in beiden interagierenden Proteinen ein Cystein-Austausch vorgenommen. Befinden sich die beiden Cysteine in direkter Nachbarschaft, bildet sich unter oxidativen Bedingungen eine Disulfidbindung, die beide Proteine kovalent miteinander verknüpft (Lee *et al.* 2006; Punginelli *et al.* 2007; Aldridge *et al.* 2014; Habersetzer *et al.* 2017). Auch die chemischen Eigenschaften anderer Aminosäuren können zur Quervernetzung genutzt werden. Beispielsweise können Amidbindungen zwischen Carboxyl- und Aminogruppen mithilfe von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) gebildet werden (Blümmel *et al.* 2017).

1.4.1.1 TatBC-Interaktionen

Sowohl Hcf106 und cpTatC des Tat-Systems von Chloroplasten als auch TatB und TatC des Tat-Systems von *E. coli* interagieren miteinander, um TatBC-Komplexe zu bilden (Cline und Mori 2001; Bolhuis *et al.* 2001). Innerhalb dieser Komplexe liegen TatB und TatC im Verhältnis 1:1 vor (Bolhuis *et al.* 2001). Die Transmembranhelix (TMH) und die amphipathische Helix (APH) von TatB sind von zentraler Bedeutung für die Funktionalität des Tat-Systems (Lee *et al.* 2002). Nach der Quervernetzung von TatB-Protomeren konnten kovalent verknüpfte TatB-Oligomere aus bis zu vier Protomeren erhalten werden. Dies weist auf eine zentrale Lage von vier TatB-Protomeren innerhalb eines tetrameren TatBC-Komplexes hin (Lee *et al.* 2006; Blümmel *et al.* 2015).

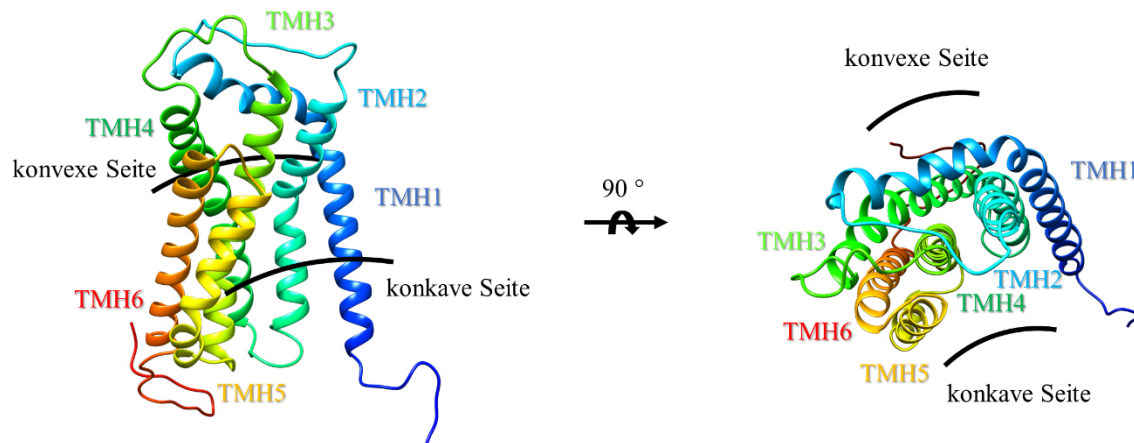


Abbildung 7: Modell von TatC aus *E. coli*. Das Modell basiert auf der Kristallstruktur von TatC aus *Aquifex aeolicus* (PDB 4HTS) (Ramasamy *et al.* 2013) und wurde mit RaptorX (Peng und Xu 2011; Källberg *et al.* 2014) modelliert. Die Bildbearbeitung wurde mit UCSF Chimera (Pettersen *et al.* 2004) durchgeführt. Es zeigt sich eine Struktur mit einer konkaven und einer konvexen Seite (Ramasamy *et al.* 2013).

Es konnten zahlreiche Interaktionen zwischen TatB- und TatC-Protomeren beobachtet werden. Diese deuten darauf hin, dass TatB-Protomere sich in der Regel auf der konkaven Seite von TatC befinden (siehe **Abbildung 7** und **Abbildung 8**). So interagiert TatB mit dem cytoplasmatischen Bereich von TMH1 und TMH3 sowie dem zentralen Bereich von TMH4 (Zoufaly *et al.* 2012; Blümmel *et al.* 2015). Eine Interaktion der Transmembranhelix von TatB mit TMH5 von TatC wurde vorhergesagt (Rollauer *et al.* 2012) und konnte später mithilfe von Quervernetzungen bestätigt werden (Kneuper *et al.* 2012; Alcock *et al.* 2016). Auch substratabhängige Interaktionen der Transmembranhelix von TatB mit TMH6 von TatC konnten beobachtet werden (Habersetzer *et al.* 2017).

Die Oligomerisierung von TatC-Protomeren basiert maßgeblich auf der Interaktion der periplasmatischen Bereiche verschiedener TatC-Protomere (Zoufaly *et al.* 2012; Cléon *et al.* 2015; Blümmel *et al.* 2015). Jedoch hat auch die Anwesenheit von TatB einen entscheidenden Einfluss auf die Quervernetzung von TatC-Protomeren (Blümmel *et al.* 2015). Gemeinsam mit der großen Anzahl an TatB-TatC Interaktionen legt dies nahe, dass ein TatC-Protomer nicht nur mit einem, sondern mit mindestens zwei TatB-Protomeren interagiert. So könnte die Interaktion eines TatB-Protomers mit zwei TatC-Protomeren, die wiederum jeweils mit zwei TatB-Protomeren interagieren, zur Assemblierung von TatBC-Komplexen führen (Blümmel *et al.* 2015; Alcock *et al.* 2016) (siehe **Abbildung 8**).

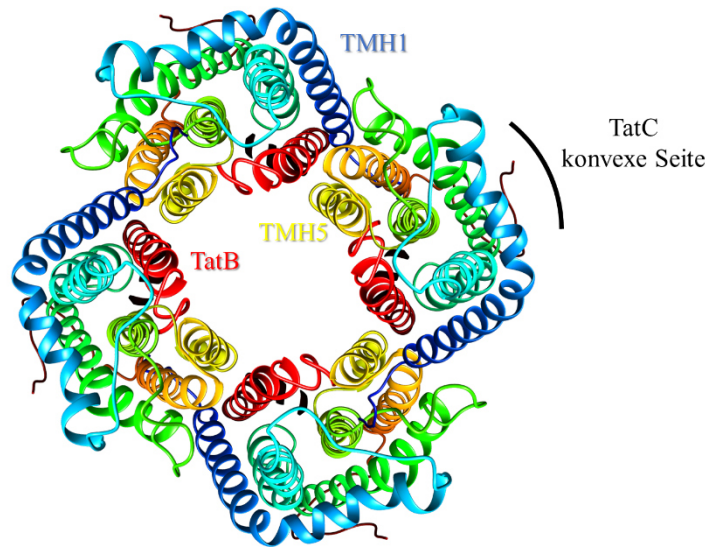


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung eines tetrameren TatBC-Komplexes. Basierend auf Blümmel *et al.* 2015. Sicht auf die Translokase von der periplasmatischen Seite. Die Interaktionen von TatB (rot) sowohl mit TMH1 (dunkelblau), TMH3 und TMH4 (grün) als auch mit TMH5 (gelb) legen die Interaktion eines TatB-Protomers mit zwei verschiedenen TatC-Protomern nahe (Blümmel *et al.* 2015; Alcock *et al.* 2016).

Die Quervernetzung von TatC-Protomern resultierte sowohl in TatC-Dimeren als auch in TatC-Tetra- und Hexameren (Punginelli *et al.* 2007; Zoufaly *et al.* 2012; Blümmel *et al.* 2015). Des Weiteren wurde die Funktionalität des Tat-Systems nicht nennenswert durch die Produktion von TatC-TatC-Fusionsproteinen eingeschränkt, sodass TatC-Dimere die minimale funktionale Einheit zu bilden scheinen (Maldonado *et al.* 2011). Jedoch ist die Orientierung der interagierenden TatC-Protomere schwer zu bestimmen. Neben TatC-Protomern eines TatBC-Komplexes könnten auch TatC-Protomere unterschiedlicher TatBC-Komplexe miteinander interagieren (Punginelli *et al.* 2007). Während hexamere TatC-Oligomere nur in der Abwesenheit von TatB beobachtet werden konnten (Behrendt und Brüser 2014; Blümmel *et al.* 2015), konnten dimere und tetramere TatC-Strukturen auch in Anwesenheit von TatA und TatB erhalten werden (Zoufaly *et al.* 2012; Blümmel *et al.* 2015).

Der TatBC-Komplex interagiert mit Substraten, die Tat-abhängig transportiert werden (Cline und Mori 2001; Richter und Brüser 2005). Neben dem bereits beschriebenen Aufbau des Signalpeptids (siehe Abschnitt 1.3.3) sind hierfür auch die interagierenden Regionen von TatB und TatC von zentraler Bedeutung. Die Interaktion des Signalpeptids mit TatB und TatC ist vom hochkonservierten *twin-arginine* Motiv abhängig (Kreutzenbeck *et al.* 2007; Lausberg *et al.* 2012). Auch weitere Eigenschaften des Signalpeptids beeinflussen die Interaktion mit dem TatBC-Komplex. Die Hydrophobizität der h-Region und die Nettoladung der c-Region üben

entscheidenden Einfluss auf die Transporteffizienz aus. Beispielsweise konnte das Fehlen des *twin-arginine* Motivs durch eine erhöhte Hydrophobizität der h-Region oder eine positivere Nettoladung der c-Region ausgeglichen werden (Ulfig *et al.* 2017; Ulfig und Freudl 2018). Essenziell für die Erkennung des *twin-arginine* Motivs sind vor allem der N-terminale Bereich von TatB sowie der cytoplasmatische Bereich von TatC (Holzapfel *et al.* 2007; Kreutzenbeck *et al.* 2007; Lausberg *et al.* 2012; Zoufaly *et al.* 2012). Bereits einzelne Mutationen in diesem Bereich bewirken, dass Substrate nicht mehr mit TatC interagieren (Holzapfel *et al.* 2007; Behrendt und Brüser 2014). Die cytoplasmatische Domäne von TatB interagiert zusätzlich mit der murenen Domäne von Substraten (Maurer *et al.* 2010). Es gibt Hinweise, dass TatBC-Komplexe mit mehreren Substraten zeitgleich interagieren (Tarry *et al.* 2009; Ma und Cline 2010; Aldridge *et al.* 2014). Die Interaktion von Signalpeptiden mit dem TatBC-Komplex ist nicht von der protonenmotorischen Kraft abhängig (Zoufaly *et al.* 2012). Aufgrund der zwei hydrophilen Regionen des Signalpeptids formt dieses eine Art *Hairpin* (siehe **Abbildung 2**), wodurch die h-Region zwischen zwei TatC-Protomeren eines TatBC-Komplexes in die Membran inseriert (Aldridge *et al.* 2014; Hamsanathan *et al.* 2017). Auch in der Abwesenheit von TatB können Signalpeptide unabhängig von der protonenmotorischen Kraft mit TatC interagieren und in die Membran inseriert werden. Jedoch wird das Signalpeptid in Abwesenheit von TatB transportunabhängig abgespalten, was auf eine regulatorische Funktion von TatB bei der Interaktion von Signalpeptiden und TatBC-Komplexen hindeutet (Fröbel *et al.* 2012).

1.4.1.2 TatA/E-Interaktionen

TatA-Protomere neigen dazu, homooligomere Komplexe unterschiedlicher Größen zu bilden. Diese können mittels BN-PAGE/Western-Blot als eine Art Leiter zwischen 100 und 500 kDa erhalten werden (Oates *et al.* 2005). Die Koelution kleiner Mengen TatA bei der Reinigung von TatBC-Komplexen mittels Größenausschlusschromatographie deutet darauf hin, dass TatA in Assoziation mit dem TatBC-Komplex vorliegt, jedoch nur schwach mit diesem interagiert (Bolhuis *et al.* 2001). In Anwesenheit von Tat-Substraten können größere Mengen TatA erhalten werden, die mit dem TatBC-Komplex interagieren (Mori und Cline 2002). Auch eine Stabilisierung des TatBC-Komplexes durch TatA wurde bereits diskutiert (Mangels *et al.* 2005).

Anhand von Quervernetzungen konnte gezeigt werden, dass die Transmembranhelix von TatA sowohl mit TatB als auch mit TatC interagiert (Fröbel *et al.* 2011). Dabei interagiert TatA mit dem periplasmatischen Bereich von TMH4 und dem Bereich zwischen TMH5 und TMH6 von TatC (Zoufaly *et al.* 2012). Die Interaktionen von TatA mit TMH4 und TMH5 von TatC treten dabei vermehrt in Anwesenheit eines Substrates auf und sind von der protonenmotorischen Kraft abhängig. Das deutet darauf hin, dass TatA-Protomere verstärkt an Substrat-gebundene TatBC-Komplexe assoziieren (Aldridge *et al.* 2014). Außerdem lieferte die Quervernetzung von TatA- und TatC-Protomeren unterschiedliche Addukte, je nachdem, ob die Experimente in An- oder in Abwesenheit von TatB durchgeführt wurden. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass einzelne Bereiche von TatC im Laufe des Transports sowohl mit TatA als auch mit TatB interagieren (Blümmel *et al.* 2015). Das konnte durch bidirektionale Quervernetzungen von TatC- mit TatA- und TatB-Protomeren in Anwesenheit und in Abwesenheit hoher Substrat-Konzentrationen bestätigt werden. So interagiert TatB mit TMH5 von TatC und TatA mit TMH6 von TatC, sofern keines der Tat-Substrate überproduziert wird. Wurde jedoch ein Tat-Substrat in erhöhtem Maße produziert, schienen TatA und TatB die Positionen zu tauschen, sodass TatA-Interaktionen mit TMH5 von TatC und TatB-Interaktionen mit TMH6 von TatC beobachtet werden konnten (Habersetzer *et al.* 2017). Des Weiteren konnten Interaktionen der Transmembranhelix, der amphipathischen Helix und des unstrukturierten C-terminalen Bereiches von TatA mit dem Signalpeptid des Tat-Substrats SufI beobachtet werden. Diese Interaktionen waren stets von der protonenmotorischen Kraft und der Anwesenheit von TatB und TatC abhängig. Interaktionen von TatA mit TatB und TatC konnten jedoch auch in Abwesenheit von Tat-Substraten beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass der TatBC-Komplex immer mit einigen TatA-Protomeren assoziiert ist (Fröbel *et al.* 2011; Blümmel *et al.* 2015). Auch in Abwesenheit von TatB und TatC konnten spezifische Interaktionen von TatA mit Tat-Substraten gezeigt werden. Diese waren nicht vom *twin-arginine* Motiv, sondern von der prinzipiellen Struktur des Signalpeptids und einigen Bereichen der maturen Domäne abhängig (Taubert *et al.* 2015).

Auch für TatE konnten Interaktionen beobachtet werden, die denen von TatA entsprechen. So liegt ein Großteil der TatE-Protomere nicht in Assoziation mit TatBC-Komplexen, sondern in Assoziation mit weiteren TatE- und TatA-Protomeren vor. Es konnten auch Interaktionen von TatE mit TatB und TatC beobachtet werden. Diese waren jedoch in Anwesenheit von TatA deutlich seltener (Eimer *et al.* 2015). Quervernetzungen von TatE mit einem Tat-Substrat zeigten ebenfalls, dass TatE in Anwesenheit von TatB und TatC mit ähnlichen Bereichen des Tat-Signalpeptids interagiert wie TatA (Eimer *et al.* 2018).

1.4.2 Tat-Komplexe in *Escherichia coli*

Hinweise auf den Mechanismus des Tat-abhängigen Proteintransports können auch mithilfe von Analysen der nativen Tat-Komplexe erhalten werden. Um Membranproteine und Membranproteinkomplexe in Lösung zu bringen, werden Detergenzien verwendet. Diese bilden Mizellen, die Membranproteine aus der Membran herauslösen. Proteine, die gemeinsam Proteinkomplexe bilden, interagieren in der Regel anhand von nichtkovalenten, wie ionischen oder hydrophoben, Wechselwirkungen. Ionische Detergenzien können diese Wechselwirkungen unter Umständen stören, sodass Proteinkomplexe disassemblieren. Aus diesem Grund werden für die Solubilisierung von membranintegralen oder membranassoziierten Proteinkomplexen meist nichtionische Detergenzien verwendet, die die Interaktionen zwischen den einzelnen Komponenten eines Proteinkomplexes nicht beeinflussen. Für die Solubilisierung von Tat-Komplexen hat sich das nichtionische Detergens Digitonin **3** etabliert. Es handelt sich dabei um ein Glykosid aus der Gruppe der Saponine, welches aus dem Samen des Fingerhuts (*Digitalis purpurea*) extrahiert wird (siehe **Abbildung 9**).

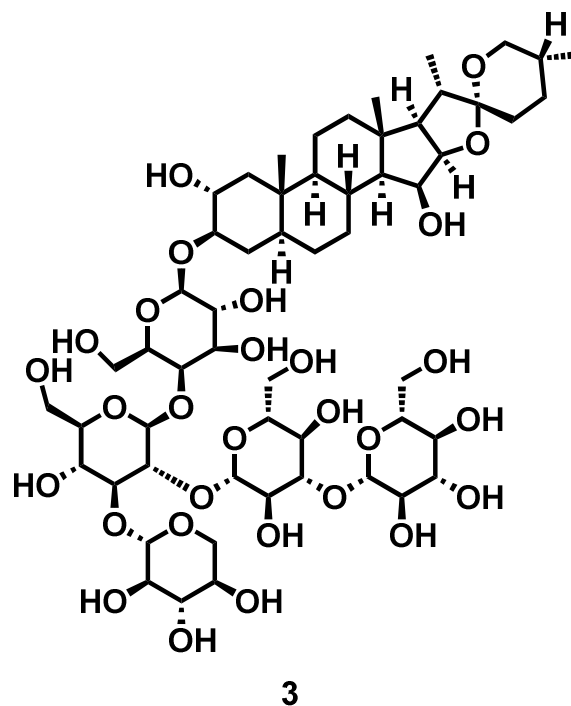


Abbildung 9: Strukturformel von Digitonin **3**.

Für die Analyse von Tat-Komplexen wurden in der Vergangenheit hauptsächlich zwei Methoden verwendet. Bei der *Blue-native*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) werden die solubilisierten Tat-Komplexe mithilfe nicht denaturierender Acrylamidgelelektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt (Schägger und Jagow 1991; Cline und Mori 2001).

Alternativ werden die solubilisierten Tat-Komplexe mittels Größenausschlusschromatographie der Größe nach aufgetrennt. Anschließend werden die Fraktionen in Bezug auf die Einzelkomponenten unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE/Western-Blot untersucht (Bolhuis *et al.* 2001).

Für pflanzliche Tat-Systeme wurde zunächst ein Tat-Komplex aus den Komponenten Hcf106 (TatB) und cpTatC (TatC) mit einem ungefähren Molekulargewicht von 700 kDa beobachtet. Für diesen TatBC-Komplex konnten Interaktionen mit *in vitro* synthetisierten Substraten gezeigt werden (Cline und Mori 2001). Ein ähnlicher Tat-Komplex wurde auch für das Tat-System von *E. coli* erhalten. Jedoch wies dieser ein Molekulargewicht von etwa 600 kDa auf und enthielt neben TatB und TatC auch TatA. TatB und TatC lagen innerhalb dieses Komplexes im Verhältnis 1:1 vor (Bolhuis *et al.* 2001). Auch für diesen Komplex ließ sich später eine Interaktion mit Signalpeptiden nachweisen (Leeuw *et al.* 2002). In Abwesenheit von Tata wurden TatBC-Komplexe mit identischem Molekulargewicht erhalten (McDevitt *et al.* 2005). Tat-Komplexe mit ähnlichem modularem Aufbau wurden auch für die Tat-systeme von *Salmonella typhimurium* und *Agrobacterium tumefaciens* beobachtet (Oates *et al.* 2003).

Aus der Beobachtung von TatA-Homooligomeren unterschiedlicher Größen wurde geschlossen, dass nur ein kleiner Teil der TatA-Protomere in Assoziation mit TatBC-Komplexen vorliegt. TatA-Protomere hingegen, die nicht in Assoziation mit TatBC-Komplexen vorliegen, interagieren mit anderen TatA-Protomeren (Oates *et al.* 2005). In ähnlicher Weise neigt auch TatB dazu Homooligomere verschiedener Größen zu bilden. Dies konnte jedoch nur in Abwesenheit von TatC beobachtet werden, während sich die TatB-Homooligomere in Anwesenheit von TatC zugunsten von zwei TatBC-Komplexen auflösten (Behrendt *et al.* 2007). TatC bildete in Abwesenheit von TatB und TatA einen Komplex mit einem Molekulargewicht von etwa 250 bzw. 230 kDa. Daraus wurde geschlossen, dass dieser TatC-Komplex den Kern des Tat-Komplexes bildet und durch die Interaktion mit TatB-Protomeren TatBC-Komplexe mit Molekulargewichten von 430, 440 bzw. 580 kDa entstehen (Behrendt *et al.* 2007; Orriss *et al.* 2007). Der 580 kDa TatBC-Komplex konnte bei der Verwendung geringerer TatB-Konzentrationen in Abwesenheit von TatA nicht erhalten werden. Das weist darauf hin, dass es sich beim 580 kDa Tat-Komplex um einen TatABC-Komplex handelt (Behrendt und Brüser 2014).

BN-PAGE/Western-Blot-Analysen zeigten, dass die Inaktivierung des Tat-Systems durch Tat_{C_{P48A}} von einer Disassemblierung der Tat-Komplexe herrührt. Untersuchungen weiterer inaktivierender Mutationen wiesen jedoch darauf hin, dass die Inaktivierung des Tat-Systems nicht zwingend durch die Destabilisierung der Tat-Translokase bedingt ist (McDevitt *et al.* 2005; Barrett *et al.* 2005; Behrendt und Brüser 2014). So resultiert Tat_{C_{F94A}} zwar in einer Inaktivierung des Tat-Systems, jedoch nicht in einer Disassemblierung der Tat-Komplexe (Barrett *et al.* 2005; Behrendt und Brüser 2014). Die Disassemblierung von Tat-Komplexen konnte ebenfalls durch harschere Bedingungen bei der Solubilisierung herbeigeführt werden (Gérard und Cline 2007).

Die Interaktion von Tat-Komplexen mit Tat-Substraten scheint von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst zu werden. So ist die Interaktion des Tat-Substrates SufI mit dem Tat-Komplex unabhängig vom *twin-arginine* Motiv (McDevitt *et al.* 2006). Andererseits konnte nur anhand des Tat-Signalpeptids ein substratassoziiertes Tat-Komplex mit dem Sec-Substrat PhoA erhalten werden. Hierfür wurde der mature Bereich mit einem Tat-Signalpeptid inklusive intaktem *twin-arginine* Motiv fusioniert. Aufgrund des ungefalteten muren Bereichs führte dies zu einem stabilen Komplex mit einem Molekulargewicht von etwa 580 kDa. Außerdem wurde ein weiterer Tat-Komplex ohne gebundenes Substrat und einem Molekulargewicht von etwa 440 kDa beobachtet (Richter und Brüser 2005).

Dies deutet darauf hin, dass Tat-Substrate auf unterschiedliche Art und Weise mit der Tat-Translokase interagieren. Auch ist nicht abschließend geklärt, wie viele Substrat-Protomere im Rahmen des Transportes mit einem Tat-Komplex interagieren. Jedoch geht die Assoziation von Substraten in allen bisher untersuchten Fällen mit einer Erhöhung des Molekulargewichts von Tat-Komplexen einher (Tarry *et al.* 2009; Ma und Cline 2010; Behrendt und Brüser 2014). Elektronenmikroskopisch wurden TatBC-Komplexe in Assoziation mit einem oder zwei Protomeren des Tat-Substrates SufI identifiziert (Tarry *et al.* 2009). Auch vier quervernetzte Substrate mit vier Signalpeptiden wurden transportiert (Ma und Cline 2010). Sowohl der Tat-Komplex mit einer Größe von 440 kDa als auch der mit einer Größe von 580 kDa Tat-Komplex können Substrat-assoziiert vorliegen. Dies wurde anhand der Überproduktion des Tat-Substrates EfeB (YcdB) gezeigt. Hierbei konnten zwei EfeB-Tat-Komplexe mit leicht erhöhten Molekulargewichten von 500 und 600 kDa erhalten werden (Behrendt und Brüser 2014).

Die vorliegenden Daten unterstreichen die Dynamik des Tat-abhängigen Proteintransportes, die einige Schwierigkeiten bei der Isolation von Tat-Komplexen verursacht. Neben destabilisierenden Modifikationen konnten jedoch auch stabilisierende Modifizierungen vorgenommen werden. So wurden einzelne Aminosäureaustausche in TatB und TatC durchgeführt, die die Stabilität der Tat-Komplexe erhöhten und die Interaktion mit Signalpeptiden ohne *twi-arginine* Motive erlaubten (Huang *et al.* 2017). Ebenso konnten Tat-Komplexe gereinigt werden, die nach der Reinigung *in vitro* mit Tat-Substraten interagierten (Wojnowska *et al.* 2018).

1.4.3 Modelle der Tat-Translokase

Für die Struktur der Tat-Translokase wurden verschiedenste Modelle vorgeschlagen. Diese basieren zum Beispiel auf quervernetzten Addukten von Tat-Komponenten oder Analysen nativer Tat-Komplexe und deren Disassemblierung unter bestimmten Bedingungen. So wurde unter anderem ein dimeres Modell der Tat-Translokase vorgeschlagen, welches auf der Beobachtung von TatC- und Substratdimeren nach der kovalenten Quervernetzung beruht (Aldridge *et al.* 2014) (siehe **Abbildung 10A**). Die Quervernetzung von TatB und TatC resultierte in einigen Fällen in TatB- und TatC-Addukten aus vier Protomeren, was zur Entwicklung eines tetrameren Modells der Tat-Translokase führte (Blümmel *et al.* 2015) (siehe **Abbildung 10C**). Auch eine trimere Struktur wurde anhand von molekulardynamischen Berechnungen unter Berücksichtigung der bekannten Interaktionen vorgeschlagen (Alcock *et al.* 2016) (siehe **Abbildung 10B**). Hexamere Modelle beruhen auf der Quervernetzung von TatC-Protomeren in Abwesenheit von TatA und TatB. Hierbei wurden TatC-Addukte aus sechs Protomeren erhalten (Blümmel *et al.* 2015). Auch die Solubilisierung von TatC-Komplexen unter harscheren Bedingungen mit dem Detergenz C₁₂E₉ lieferte sechs TatC-Oligomere unterschiedlicher Größe (Behrendt und Brüser 2014). Heptamere Strukturen aus 7 TatC- und 7 TatB-Protomeren, bei denen Substrate lateral an den Translokase-Komplex assoziieren, wurden basierend auf der elektronenmikroskopischen Untersuchung von TatBC-Komplexen vorgeschlagen (Tarry *et al.* 2009). Aus kinetischen Untersuchungen von Tat-Systemen aus pflanzlichen Thylakoiden und Chloroplasten wurde auf eine oktamere Struktur der Tat-Translokase geschlossen (Celedon und Cline 2012).

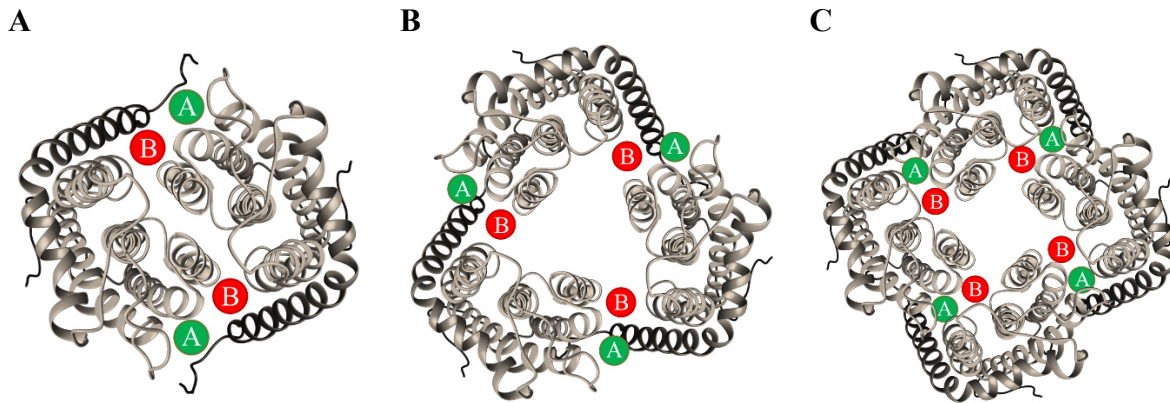


Abbildung 10: Schematische Darstellungen des dimeren, trimeren und tetrameren Modells der Tat-Translokase. Die Perspektive zeigt die Sicht auf die Translokase von der periplasmatischen Seite. **(A)** Dimeres Modell der Tat-Translokase basierend auf Aldridge *et al.* 2014. **(B)** Trimeres Modell der Tat-Translokase basierend auf Alcock *et al.* 2016. **(C)** Tetrameres Modell der Tat-Translokase basierend auf Blümmel *et al.* 2015 und Alcock *et al.* 2016. Bei allen Modellen interagieren die TatC-Protomere (grau) an beiden Seiten der konkaven Struktur mit je einem TatB- (rot) und einem TatA-Protomer (grün). TatA, TatB und TatC liegen im Verhältnis 1:1:1 vor.

Alle genannten Modelle eint die Annahme, dass die Komponenten TatA, TatB und TatC innerhalb des Kern-Komplexes im Verhältnis 1:1:1 vorliegen. Dabei befinden sich TatA und TatB in direkter Nachbarschaft und tragen zur Interaktion zwischen den TatC-Protomeren bei (siehe **Abbildung 10**). Abhängig von der protonenmotorischen Kraft assemblieren im Laufe des Transportes verstärkt TatA-Protomere an den Kern-Komplex, wodurch die Membranpassage von Substraten ermöglicht wird. Jedoch konnte bisher nicht aufgeklärt werden, wie viele Substrate an einen Translokase-Komplex assoziieren und wie der Transport genau stattfindet (Hamsanathan und Musser 2018) (siehe **Abbildung 2**).

1.4.4 Zelluläre Lokalisation der Tat-Komponenten

Zur Bestimmung der zellulären Lokalisation der Tat-Komponenten wurden diese als Fusionsproteine mit fluoreszierenden Proteinen produziert und die Zellen anschließend mikroskopisch mithilfe konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie analysiert. Die Fusion von TatA, TatB und TatC aus *E. coli* an das Grün-fluoreszierende-Protein (GFP) hatte dabei keinen Einfluss auf die Aktivität des Tat-Systems. TatA-GFP war gleichmäßig in der Membran verteilt, lag jedoch in erhöhten Konzentrationen an den Zellpolen vor. TatB-GFP akkumulierte in kleinen Bereichen, die sich an den Zellpolen befanden. TatC-GFP konnte vermehrt an den Zellpolen lokalisiert werden (Berthelmann und Brüser 2004). In einer weiteren Studie konnte anhand der Reinigung von Tat-Komplexen mittels Größenausschlusschromatographie gezeigt werden, dass die Fusion von TatA, TatB und TatC mit YFP-, CFP- und GFP (-XFP) die

Interaktion zwischen den einzelnen Tat-Komponenten nicht beeinflusst. Für TatA- und TatB-XFP konnten ähnliche zelluläre Lokalisationen beobachtet werden. TatC-XFP hingegen lag nicht nur an den Zellpolen, sondern in der ganzen Membran und nur in wenigen Bereichen in erhöhter Konzentration vor (Ray *et al.* 2005).

Im Rahmen weiterer Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass die Bildung von Bereichen mit erhöhten TatA-GFP-Konzentrationen an den Zellpolen strikt von der PMF und der Anwesenheit von TatB und TatC abhängig ist. Die Produktion eines Tat-Substrates führte zur punktuellen Akkumulation von TatA-GFP und TatC-mCherry, während die Akkumulation von TatB-mCherry vor allem von der Anwesenheit von TatA und TatC abhängig war. Außerdem wurde eine Kolo-kalisation der Bereiche mit erhöhten Konzentrationen TatA-GFP und TatB-mCherry beobachtet (Rose *et al.* 2013). Die Akkumulation von TatB-YFP und TatC-YFP fand unabhängig von der protonenmotorischen Kraft oder der Produktion von Tat-Substraten statt (Alcock *et al.* 2013).

1.5 Mechanismen des Tat-Transportes

Auf der Basis der beschriebenen Daten und Modelle wurden verschiedene Mechanismen des Tat-abhängigen Proteintransports vorgeschlagen. TatA spielt in allen vorgeschlagenen Mechanismen eine zentrale Rolle, da TatA-Protomere Substrat- und PMF-abhängig verstärkt an das Tat-Translokon assemblieren und somit die Membranpassage von Substraten ermöglichen (Mori und Cline 2002; Dabney-Smith *et al.* 2006; Dabney-Smith und Cline 2009; Rose *et al.* 2013; Alcock *et al.* 2013; Cline 2015). Für die TatA-abhängige Membranpassage wurden unterschiedliche Mechanismen diskutiert. Vorgeschlagen wurde unter anderem die Bildung einer temporären Pore aus TatA-Protomeren, durch die Substrate transportiert werden. Solche Poren aus TatA-Protomeren wurden jedoch nur in Abwesenheit von TatB und TatC beobachtet (Gohlke *et al.* 2005; White *et al.* 2010; Rodriguez *et al.* 2013). Eine weitere Möglichkeit stellt die Schwächung der Membran durch die auffällig kurze Transmembranhelix von TatA dar. In der Konsequenz könnte die Assemblierung von TatA-Protomeren punktuell zu einer solchen Destabilisierung der Membran führen, dass diese temporär perforiert wird. In der Folge könnten Substrate die Membran passieren können (Brüser und Sanders 2003; Hou *et al.* 2018). Die Tatsache, dass sowohl TatA als auch TatE nur gemeinsam mit TatB und TatC zu funktionellen Tat-Translokasen assemblieren können, lässt darauf schließen, dass es sich um Assemblierungen aller drei Komponenten handelt, bei denen die Anzahl und das Verhältnis von TatA/E-Protomeren variieren kann (Baglieri *et al.* 2012).

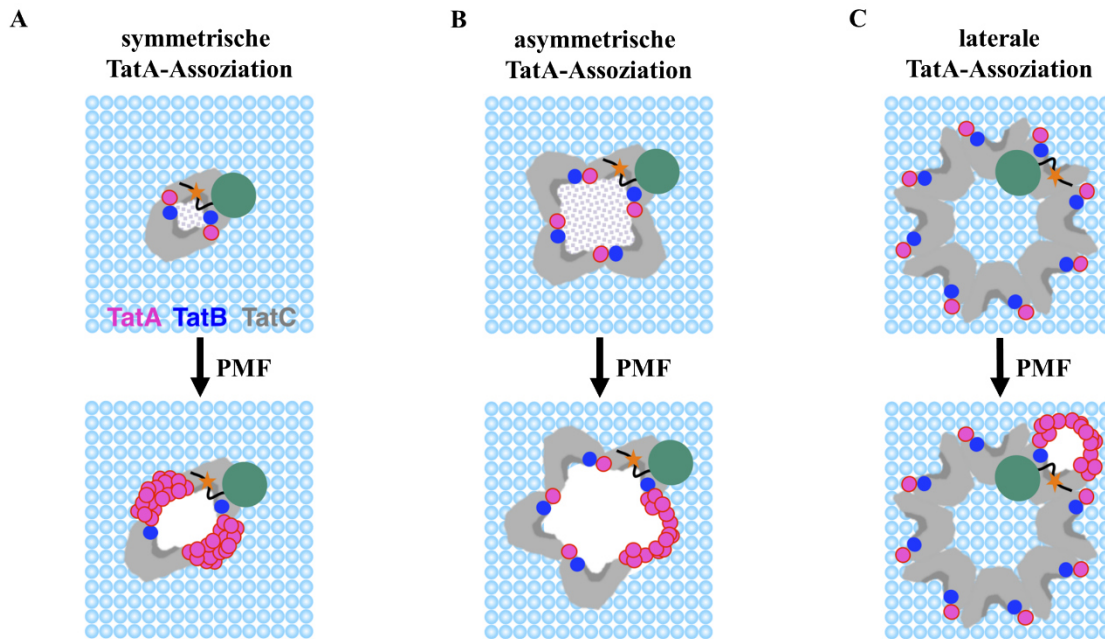


Abbildung 11: Modelle der TatA-Assoziation an den TatABC-Komplex. Basierend auf Hamsanathan und Musser 2018. Die Anzahl und die Anordnung von TatA (magenta), TatB (blau) und TatC (grau) ist unbekannt. Exemplarisch wurde das dimere, tetramere und heptamere Modell verwendet. Das *twin-arginine* Motiv des Signalpeptids (orange) interagiert mit der konkaven Seite von TatC (dunkelgrau). **(A)** Bei der symmetrischen Assoziation von TatA assoziieren TatA-Protomere an zwei Stellen der Translokase. **(B)** Bei der asymmetrischen Assemblierung von TatA assoziieren TatA-Protomere nur an einer Interaktionsstelle. **(C)** Bei der lateralen Assoziation von TatA bleibt der Kern-Komplex intakt. Die Membranpassage wird von lateralen TatA-Assemblierungen TatBC-abhängig (Leake *et al.* 2008) ermöglicht.

Unklar ist, ob TatA lateral an den Tat-Komplex assoziiert, oder ob die Assoziation von TatA zu einer Vergrößerung des Tat-Komplexes führt. Modelle, die von einer lateralen Assoziation von Substraten ausgehen (Tarry *et al.* 2009), legen nahe, dass auch TatA-Protomere lateral an den Translokase-Komplex assoziieren und die konkave Seite von TatC nach außen orientiert ist (siehe **Abbildung 11C**) (Hamsanathan und Musser 2018).

Viele der beobachteten Interaktionen zwischen den einzelnen Tat-Komponenten deuten aber auch darauf hin, dass die konkave Seite von TatC, welche mit dem Signalpeptid von Substraten interagiert, dem Zentrum des Tat-Komplexes zugewandt ist (Punginelli *et al.* 2007; Ma und Cline 2010; Aldridge *et al.* 2014; Blümmel *et al.* 2015). Signalpeptide von Substraten würden dann zentral mit dem Tat-Komplex interagieren. Die verstärkte Assoziation weiterer TatA-Protomere an den Tat-Komplex könnte zu einer Vergrößerung des Translokase-Komplexes führen. Dabei besteht sowohl die Möglichkeit der symmetrischen, als auch der asymmetrischen Assoziation von TatA-Protomeren (siehe **Abbildung 11A** und **B**). Aus wie vielen Protomeren der einzelnen Komponenten der Translokase-Komplex besteht, wird hierbei nicht vom Mechanismus vorgegeben (Hamsanathan und Musser 2018).

1.6 Zielsetzung

Im Rahmen von vorangegangenen Abschlussarbeiten von Dr. Eyleen Sabine Heidrich und Christoph Stefan Nikolin wurde eine Position innerhalb der ersten periplasmatischen Domäne von TatC identifiziert, welche nicht nur eine Rolle bei der Oligomerisierung von TatC-Protomeren spielt, sondern auch zur Stabilisierung eines zuvor nicht charakterisierten Tat-Komplexes führte.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte dieser Tat-Komplex charakterisiert werden. Um die Ursachen für das erhöhte Molekulargewicht des Komplexes aufzuklären, sollten die Einflüsse der einzelnen Komponenten des Tat-Systems auf die Assemblierung dieses Komplexes untersucht werden.

Aufgrund des erhöhten Molekulargewichtes und des Fehlens leichterer Tat-Komplexe oder Disassemblierungsprodukte wurde außerdem davon ausgegangen, dass es sich um einen stabilisierten Tat-Komplex handelte. Dieser sollte für die Entwicklung einer Strategie zur Reinigung von Tat-Komplexen genutzt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

2.1.1 Bakterienstämme

Im Folgenden sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten *E.-coli*-Stämme tabellarisch aufgelistet (siehe **Tabelle 1**).

Tabelle 1: Verwendete *E.-coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp/Charakteristika	Herkunft/Referenz
XL1-Blue MRF ⁺	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^q \Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$	Agilent, Waldbronn
DADE	MC4100 $\Delta tatABC \Delta tatE$	(Wexler <i>et al.</i> 2000)
DADE D6 ara ^R	MC4100 $\Delta tatABC \Delta tatE ara^R$	(Lindenstrauss <i>et al.</i> 2010)

2.1.2 Plasmide

Im Folgenden sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide tabellarisch aufgelistet (siehe **Tabelle 2**).

Tabelle 2: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Charakteristika	Herkunft/Referenz
pEVOL-pBpF-tet	Tet ^R Plasmid zur Produktion der Bpa spezifischen tRNA Synthase (Anticodon: TAG)	(Young <i>et al.</i> 2010)
pBAD-ycdB _{Strep}	Amp ^R pBAD-Derivat zur heterologen Überproduktion von YcdB (EfeB)	(Behrendt und Brüser 2014)
pABS-tatABC _{H6}	Cm ^R pABS- <i>pspC</i> _{H6} -Derivat mit <i>tatABC</i> (NdeI, BamHI)	Dr. Denise Mehner-Breitfeld
pABS-tatABC _{E103A-H6}	Cm ^R pABS- <i>tatABC</i> _{H6} -Derivat, TatC E103A Austausch (<i>QuikChange</i> [®])	Diese Arbeit
pABS-tatAC	Cm ^R pABS- <i>tatABC</i> -Derivat mit mutiertem TatB Startcodon	(Behrendt <i>et al.</i> 2007)
pABS-P _{tat(B)-tatBC_{MT3}}	Cm ^R pABS- <i>tatABC</i> _{H6} -Derivat mit <i>tatBC</i> _{MT3} und <i>tatB</i> -RBS	Dr. Michael Thomas Ringel

Plasmid	Charakteristika	Herkunft/Referenz
pABS-P _{tat(B)} -tatBC _{H6}	Cm ^R pABS-P _{tat(B)} -tatBC _{MT3} -Derivat mit tatB-RBS (EcoRV, PstI)	Diese Arbeit
pABS-tatEBC _{H6}	Cm ^R pABS-tatABC _{H6} -Derivat mit tatE, tatE-RBS und C-terminal verlängertem (3 AS) TatE zur Erhaltung der tatB-RBS	Diese Arbeit
pABS-tatAB _{Strep} C _{H6}	Cm ^R pABS-tatABC _{H6} -Derivat mit N-terminaler Strep-Tag [®] II Sequenz an TatB unter Erhaltung der tatC-RBS	Diese Arbeit
pABS-tatAB _{GS-Strep} C _{H6}	Cm ^R pABS-tatABC _{H6} -Derivat mit N-terminaler GS-Strep-Tag [®] II Sequenz an TatB unter Erhaltung der tatC-RBS	Diese Arbeit
pDE-tatAC _{H6}	Cm ^R pDE-Derivat mit tatAC aus pABS-tatAC (NdeI, BamHI)	Diese Arbeit
pDE-tatABC _{H6}	Cm ^R pABS-tatABC _{H6} -Derivat, ori p15A durch ori Cola aus pCOLAduet1 ausgetauscht (NheI, XbaI)	Dr. Denise Mehner-Breitfeld, Dr. Eyleen Sabine Heidrich
pDE-tatABC _{I50Bpa-H6}	Cm ^R pDE-tatABC _{H6} -Derivat, TatC I50Bpa Austausch (QuikChange [®])	Diese Arbeit
pDE-tatABC _{I50Y-H6}	Cm ^R pDE-tatABC _{H6} -Derivat, TatC I50Y Austausch (QuikChange [®])	Diese Arbeit
pDE-tatABC _{I50W-H6}	Cm ^R pDE-tatABC _{H6} -Derivat, TatC I50W Austausch (QuikChange [®])	Diese Arbeit
pDE-tatABC _{I50F-H6}	Cm ^R pDE-tatABC _{H6} -Derivat, TatC I50F Austausch (QuikChange [®])	Diese Arbeit
pDE-tatABC _{E103A-H6}	Cm ^R pDE-tatABC _{H6} -Derivat, TatC E103A Austausch (QuikChange [®])	Diese Arbeit
pDE-tatABC _{F94Q, E103A-H6}	Cm ^R pDE-tatABC _{E103A-H6} -Derivat, TatC F94Q und E103A Austausch (QuikChange [®])	Diese Arbeit
pDE-tatABC _{I50Bpa, E103A-H6}	Cm ^R pDE-tatABC _{E103A-H6} -Derivat, TatC I50Bpa und E103A Austausch (Fusions-PCR)	Diese Arbeit

Plasmid	Charakteristika	Herkunft/Referenz
pDE- <i>tatABC</i> _{150Bpa,F94Q,E103A-H6}	Cm ^R pDE- <i>tatABC</i> _{150Bpa, E103A-H6} -Derivat, TatC I50Bpa, F94Q und E103A Austausch (<i>QuikChange</i> [®])	Diese Arbeit
pDE- <i>tatABC</i> _{150Y, E103A-H6}	Cm ^R pDE- <i>tatABC</i> _{150Y-H6} -Derivat, TatC und E103A Austausch (<i>QuikChange</i> [®])	Diese Arbeit
pDE- <i>tatABC</i> _{150Y,F94Q,E103A-H6}	Cm ^R pDE- <i>tatABC</i> _{150Y, E103A-H6} -Derivat, TatC F94Q Austausch (<i>QuikChange</i> [®])	Diese Arbeit
pDE-P _{<i>tatB-tatBC</i>_{H6}}	Cm ^R pABS-P _{<i>tatB-tatBC</i>_{H6}} -Derivat, <i>ori</i> p15A durch <i>ori</i> ColA aus pCOLAduet1 ausgetauscht (AvrII, SpeI)	Diese Arbeit
pDE-P _{<i>tatB-tatBC</i>_{150Bpa-H6}}	Cm ^R pDE-P _{<i>tatB-tatBC</i>_{H6}} -Derivat, TatC I50Bpa Austausch (<i>QuikChange</i> [®])	Diese Arbeit
pDE-P _{<i>tatB-tatBC</i>_{150Y-H6}}	Cm ^R pDE-P _{<i>tatB-tatBC</i>_{H6}} -Derivat, TatC I50Y Austausch (<i>QuikChange</i> [®])	Diese Arbeit
pDE- <i>tatC</i> _{H6}	Cm ^R pDE-Derivat mit <i>tatC</i> unter Kontrolle des <i>tatA</i> -Promotors (NdeI, BamHI)	Diese Arbeit
pDE- <i>tatC</i> _{150Bpa-H6}	Cm ^R pDE- <i>tatC</i> _{H6} -Derivat mit I50Bpa Austausch (<i>QuikChange</i> [®])	Diese Arbeit
pZA31- <i>tatBC</i>	Cm ^R pZA31-MCS-Derivat mit <i>tatBC</i> (EcoRI, PstI)	(Behrendt und Brüser 2014)
pZA31- <i>tatBC</i> _{H6}	Cm ^R pZA31- <i>tatBC</i> -Derivat mit <i>tatBC</i> _{H6} (EcoRI, PstI)	Diese Arbeit
pZX31- <i>tatBC</i> _{H6}	Cm ^R pZA31- <i>tatBC</i> _{H6} -Derivat, <i>ori</i> p15A durch <i>ori</i> ColA aus pCOLAduet1 ausgetauscht (AvrII, SpeI)	Diese Arbeit
pZX31- <i>tatBC</i> _{150Bpa-H6}	Cm ^R pZX31- <i>tatBC</i> _{H6} -Derivat mit TatC I50Bpa Austausch (<i>QuikChange</i> [®])	Diese Arbeit
pZX31- <i>tatBC</i> _{150Y-H6}	Cm ^R pZX31- <i>tatBC</i> _{H6} -Derivat mit TatC I50Y Austausch (<i>QuikChange</i> [®])	Diese Arbeit
pZX31- <i>tatBC</i> _{150Bpa,E103A-H6}	Cm ^R pZX31- <i>tatBC</i> _{150Bpa-H6} -Derivat mit TatC E103A Austausch (<i>QuikChange</i> [®])	Diese Arbeit
pZX31- <i>tatBC</i> _{150Bpa,F94Q,E103A-H6}	Cm ^R pZX31- <i>tatBC</i> _{150Bpa,E103A-H6} -Derivat mit TatC F94Q Austausch (<i>QuikChange</i> [®])	Diese Arbeit

Plasmid	Charakteristika	Herkunft/Referenz
pZX31- <i>tatC_{H6}</i>	Cm ^R pZX31- <i>tatBC_{H6}</i> -Derivat mit <i>tatC</i> (EcoRI, PstI)	Diese Arbeit
pZX31- <i>tatC_{150Bpa-H6}</i>	Cm ^R pZX31- <i>tatBC_{H6}</i> -Derivat mit <i>tatC_{150Bpa}</i> (EcoRI, PstI)	Diese Arbeit
pBW- <i>tatA</i>	Amp ^R pBW-Derivat zur heterologen Produktion von TatA	Dr. Denise Mehner-Breitfeld
pBW- <i>tatB</i>	Amp ^R pBW-Derivat zur heterologen Produktion von TatB (<i>P_{rha}</i> , <i>tatB</i> -RBS, EcoRI, PstI)	Diese Arbeit
pBW- <i>tatAB</i>	Amp ^R pBW-Derivat zur heterologen Produktion von TatAB (<i>P_{rha}</i> , <i>tatA</i> -RBS, EcoRI, PstI)	Diese Arbeit
pBW- <i>tatABC_{H6}</i>	Amp ^R pBW-Derivat zur heterologen Produktion von TatABC (<i>P_{rha}</i> , <i>tatA</i> -RBS, EcoRI, PstI)	Diese Arbeit
pBW- <i>tatAB_{GS-StrepCH6}</i>	Amp ^R pBW- <i>tatABC_{H6}</i> -Derivat mit <i>tatAB_{GS-StrepCH6}</i> (<i>P_{rha}</i> , <i>tatA</i> -RBS EcoRI, PstI)	Diese Arbeit
pBW- <i>tatAB_{StrepCH6}</i>	Amp ^R pBW- <i>tatABC_{H6}</i> -Derivat mit <i>tatAB_{StrepCH6}</i> (<i>P_{rha}</i> , <i>tatA</i> -RBS EcoRI, PstI)	Diese Arbeit
pBW- <i>tatBC_{H6}</i>	Amp ^R pBW-Derivat zur heterologen Produktion von TatBC (<i>P_{rha}</i> , <i>tatB</i> -RBS, EcoRI, PstI)	Diese Arbeit
pBW- <i>ycdB_{Strep}</i>	Amp ^R pBW-Derivat zur heterologen Überproduktion von YcdB (EfeB)	(Sturm <i>et al.</i> 2006)

2.1.3 Oligonukleotide

Im Folgenden sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide tabellarisch aufgelistet (siehe **Tabelle 3**).

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
<i>tatA</i> -NdeI-F	TCTTCTCATATGGGTGGTATCAGTATTT GGC	Amplifikation von <i>tatA</i> mit Einführung einer NdeI-RSS zur Insertion in pDE/pABS-Plasmide
$P_{rha(A)}$ - <i>tatA</i> +SD- EcoRI-f	GATCGAATTCAGGCGCTTTTTAGACTG GTCGTAATGAACCACAGAGGAACACAT ATGG	Amplifikation von <i>tatA</i> mit <i>tatA</i> -RBS und einem Teil vom P_{rha} und EcoRI-RSS zur Insertion in pBW Plasmide
<i>tatB</i> -EcoRI-F	GAAGACGCGAATTCCCACGATAAAGA GC	Amplifikation von <i>tatB</i> mit EcoRI-RSS zur Insertion in pZX31-Plasmide
$P_{rha(B)}$ - <i>tatB</i> +SD- EcoRI-f	GATCGAATTCAGGCGCTTTTTAGACTG GTCGTAATGAAAAGAGCAGGTGTAAT CCG	Amplifikation von <i>tatB</i> mit <i>tatB</i> -RBS und einem Teil von P_{rha} und EcoRI-RSS zur Insertion in pBW-Plasmide
<i>tatC</i> -NdeI-f	CCGTACATATGTCTGTAGAAGATACTC AACCGC	Amplifikation von <i>tatC</i> mit NdeI-RSS zur Insertion in pDE/pABS-Plasmide
<i>tatC</i> -EcoRI-f	CCTTCGAATTCGTCGAGTGATAAACCG	Amplifikation von <i>tatC</i> mit EcoRI-RSS zur Insertion in pZX31-Plasmide
<i>tatC</i> -BamHI-R	CAAGCGGATCCTTCTTCAGTTTTTTCGC TTTCTGCTTC	Amplifikation von <i>tatC</i> mit BamHI-RSS ohne Stopcodon zur Insertion in pDE/pABS-Plasmide
<i>tatC_{H6}</i> -PstI-R	TAGCCACTGCAGTTAATGGTGATGGTG ATGGTGTTCTTCAGTTTTTTCGCTTTC	Amplifikation von <i>tatC_{H6}</i> mit Stopcodon und PstI-RSS zur Insertion in pZX31/pBW-Plasmide
<i>tatE</i> +RBS-NdeI-F	GATCCATATGAAGAAGGTATCTATGGG TGAGATTAGTATTACCAAAC	Amplifikation von <i>tatE</i> mit <i>tatE</i> -RBS und NdeI-RSS zur Insertion in pDE/pABS-Plasmide
<i>tatE</i> - <i>tatB</i> -F	GAAAAGCTCTCTCATAAAGAGCAGGTG TAATCCGTGTTTGATATCG	Amplifikation von <i>tatE</i> mit C-terminaler <i>tatA</i> Sequenz (9 bp) zur Erhaltung der <i>tatB</i> -RBS und homologem Bereich zu <i>tatB</i>

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
<i>tatE-tatB</i> -R	CCGATATCAAACACGGATTACACCTG CTCTTTATGAGAGAGCTTTTC	Amplifikation von <i>tatB</i> mit <i>tatB</i> -RBS, C-terminalem Bereich von <i>tatA</i> (9 bp) und homologem Bereich zu <i>tatE</i>
<i>tatC</i> -E103A-F	GTATAAGCATGCGCGTCGCCTGGTG	E103A Austausch in <i>tatC</i>
<i>tatC</i> -E103A-R	CACCAGGCGACGCGCATGCTTATAC	E103A Austausch in <i>tatC</i>
<i>tatC</i> -I50Bpa-F	CACCTGGTATCCGCGCCATTGT <u>AGAA</u> GCAGTTGCCGCAAGGTTTC	I50Bpa Austausch in <i>tatC</i>
<i>tatC</i> -I50Bpa-R	GAACCTTGCGGCAACTGCTTCT <u>ACAA</u> TGGCGCGGATAACCAGGTG	I50Bpa Austausch in <i>tatC</i>
<i>tatC</i> -I50Y-F	GGTATCCGCGCCATTGT <u>IATA</u> AAGCAGT TGCCGCAAG	I50Y Austausch in <i>tatC</i>
<i>tatC</i> -I50Y-R	CTTGCGGCAACTGCTT <u>ATACA</u> ATGGC GCGGATACC	I50Y Austausch in <i>tatC</i>
<i>tatC</i> -I50F-F	GTATCCGCGCCATTGT <u>TCA</u> AAGCAGTT GCCG	I50F Austausch in <i>tatC</i>
<i>tatC</i> -I50F-R	CGGCAACTGCTT <u>GAA</u> CAATGGCGCGG ATAC	I50F Austausch in <i>tatC</i>
<i>tatC</i> -I50W-F	GTATCCGCGCCATTGT <u>TGGA</u> AAGCAGTT GCCGCAAG	I50W Austausch in <i>tatC</i>
<i>tatC</i> -I50W-R	CTTGCGGCAACTGCTT <u>CCACA</u> ATGGC GCGGATAC	I50W Austausch in <i>tatC</i>
<i>tatC</i> -F94Q-F	CTATCAGGTGTGGGCAC <u>AGAT</u> CGCCC CAGCGCTG	F94Q Austausch in <i>tatC</i>
<i>tatC</i> -F94Q-R	CAGCGCTGGGGCGATCTGTGCCCA CCTGATAG	F94Q Austausch in <i>tatC</i>
ColA-AvrII-F	GATCCCTAGGAAACGTCCTAGAAGAT GCCAGGAGGATA	Amplifikation des <i>ori</i> ColA mit AvrII- RSS
ColA-SpeI-R	GATCACTAGTTGGTGTGGGAATCCG TAAAGG	Amplifikation des <i>ori</i> ColA mit SpeI- RSS

Tabelle 4: Zur Sequenzierung verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
pBw-seq-F	CACAATTCAGCAAATTGTGAAC	Für pBW-Konstrukte; bindet in P_{rha}
$P_{LtetO-1}$ -Prom-seq-F	CCCTATCAGTGATAGAGATAC	Für pZ-Derivate, bindet in $P_{LtetO-1}$
<i>tatA</i> -seq-F	GGCCGTGTAACGTATAATC	Für <i>tatA</i> ; bindet in P_{tatA}
<i>tatC</i> -CT-1F	TCAGCCGACCTGAATGGG	Für <i>tatA</i> ; bindet in P_{tatA}
<i>tatB</i> -seq-F	GGATACGAATCAGGAACAGGC	Für <i>tatB</i> ; bindet in <i>tatA</i>
<i>tatC</i> -seq-F	GCGGACGCTGAACCGAAAAC	Für <i>tatC</i> ; bindet in <i>tatB</i>
pABS-seq-R	GTCAGCCCCATACGATATAAG	Für <i>tatC</i> ; bindet hinter <i>tatC</i>

2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.1 Plasmid-Minipräparation

Zur Gewinnung von reiner Plasmid-DNA aus einer 4 ml Übernachtskultur von *E. coli* wurde das *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit 1* (peqlab/VWR, Erlangen) verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl H₂O von der Silicagel-Membran eluiert. Anschließend wurde die Konzentration der Plasmid-DNA mithilfe eines *Nanodrop2000* Spektralphotometers (Thermo Scientific, Dreieich) bestimmt und für weitere molekulargenetische Arbeiten bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Durchführung von Polymerasekettenreaktionen wurde der *FlexCycler²* oder der *T-Personal 48 Thermocycler* (Biometra/Analytik Jena AG, Jena) verwendet.

2.2.2.1 Standard-PCR

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde mithilfe der Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Hierfür wurde eine selbst hergestellte *Pfu*-Polymerase oder die *Phusion[®] High-Fidelity*-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) verwendet. Aus lyophilisierten Oligonukleotiden (Biomers, Ulm) wurden durch die Zugabe des entsprechenden Volumens H₂O Stammlösungen mit einer Konzentration von 100 pmol/µl hergestellt. Für Standard-PCRs wurden hieraus Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 25 pmol/µl erstellt. **Tabelle 5** zeigt ein Pipettierschema und **Tabelle 6** ein Programm für die Standard-

Polymerasekettenreaktion. Die Anlagerung (*Annealing*) der Oligonukleotide wurde bei 55 °C durchgeführt. Bei der Beobachtung unspezifischer Amplifikate wurde die *Annealing*-Temperatur erhöht. Die Elongationszeit wurde in Abhängigkeit von der Syntheseleistung der verwendeten Polymerase und der Länge des erwarteten Fragments gewählt (*Pfu*-Polymerase: 0,5 kb/min; *Phusion*[®]-Polymerase: 2 - 4 kb/min).

Tabelle 5: Pipettierschema für eine Standard-Polymerasekettenreaktion.

Volumen	Komponente
1 µl	Ausgangs-DNA (10 - 100 ng/µl)
1 µl	<i>forward</i> Primer (25 pmol/µl)
1 µl	<i>reverse</i> Primer (25 pmol/µl)
1 µl	dNTPs (10 pmol/µl)
1 µl	Polymerase
5 µl / 10 µl	10 x / 5 x Puffer (<i>Phusion</i> [®] -/ <i>Pfu</i> -Polymerase)
± 2,5 µl	DMSO
ad 50 µl	H ₂ O

Tabelle 6: Programm für eine Standard-Polymerasekettenreaktion.

Schritt	Zeit	Temperatur
1. Initiale Denaturierung	2 min	96 - 98 °C
2. Denaturierung	15 s	96 - 98 °C
3. Primeranlagerung	15 s	55 °C
4. Elongation	1 min/kb (<i>Pfu</i> -Polymerase) 15 - 30 s/kb (<i>Phusion</i> [®] -Polymerase)	68 - 72 °C
5. Finale Elongation	1 min/kb (<i>Pfu</i> -Polymerase) 15 - 30 s/kb (<i>Phusion</i> [®] -Polymerase)	68 - 72 °C
6. Lagerung	∞	8 °C

Vor der finalen Elongation wurden die Schritte 2., 3. und 4. 30-mal wiederholt

2.2.2.2 *QuikChange*[®]-Site-Directed-Mutagenese

Mithilfe der *QuikChange*[®]-Site-Directed-Mutagenese (Agilent, Waldbronn) wurden gezielt ein, zwei oder drei Basen der Plasmid-DNA ausgetauscht. Hierfür wurden zwei komplementäre Oligonukleotid-Primer verwendet, die die gewünschten Basenaustausche beinhalten. Die amplifizierten Plasmide mit den gewünschten Basenaustauschen liegen im Gegensatz zu den Ausgangsplasmiden nicht methyliert vor. Im Anschluss an die PCR wurden die Ausgangsplasmide mit dem Restriktionsenzym DpnI abgebaut, welches nur methylierte DNA schneidet. Hierfür wurde je 50 µl PCR-Ansatz 1 µl DpnI zugegeben und für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 7: Pipettierschema für *QuikChange*[®]-Site-Directed-Mutagenesen.

Volumen	Komponente
1 µl	Ausgangs-DNA (10 - 100 ng/µl)
1 µl	<i>forward</i> Primer (10 pmol/µl)
1 µl	<i>reverse</i> Primer (10 pmol/µl)
1 µl	dNTPs (10 pmol/µl)
1 µl	Polymerase
5 µl / 10 µl	10 x / 5 x Puffer (<i>Phusion</i> [®] -/ <i>Pfu</i> -Polymerase)
± 2,5 µl	DMSO
ad 50 µl	H ₂ O

Tabelle 8: PCR-Programm für *QuikChange*[®]-Site-Directed-Mutagenesen.

Schritt	Zeit	Temperatur
1. Initiale Denaturierung	2 min	96 - 98 °C
2. Denaturierung	30 s	96 - 98 °C
3. Primeranlagerung	30 s	55 °C
4. Elongation	1 min/kb (<i>Pfu</i> -Polymerase) 15 - 30 s/kb (<i>Phusion</i> [®] -Polymerase)	68 - 72 °C
5. Finale Elongation	1 min/kb (<i>Pfu</i> -Polymerase) 15 - 30 s/kb (<i>Phusion</i> [®] -Polymerase)	68 - 72 °C
6. Lagerung	∞	8 °C

Vor der finalen Elongation wurden die Schritte 2., 3. und 4. 20-mal wiederholt

2.2.2.3 Fusions-PCR

Die Fusion zweier PCR-Produkte wurde mittels Fusions-PCR durchgeführt. Als Ausgangs-DNA wurden PCR-Produkte verwendet, die mithilfe einer Standard-PCR (siehe Abschnitt 2.2.2.1) erstellt wurden. Die 5'-Überhänge zweier Oligonukleotid-Primer wurden hierbei so gewählt, dass die resultierenden Amplifikate homologe Bereiche von mindestens 17 bp besitzen. Von beiden Amplifikaten wurden je 10 fmol als Ausgangs-DNA für eine Polymerasekettenreaktion unter Standardbedingungen (siehe **Tabelle 5** und **Tabelle 6**) verwendet. Anschließend wurden 10 Zyklen ohne die Zugabe von Oligonukleotid-Primern durchgeführt, sodass nach der Anlagerung der homologen Bereiche ein Produkt aus den fusionierten Amplifikaten entstand. Nach 10 Zyklen wurde je 1 µl des *forward*- und des *reverse* Primers (25 pmol/µl) zugegeben und für weitere 25 Zyklen eine PCR unter Standardbedingungen (siehe Abschnitt 2.2.2.1) durchgeführt.

2.2.2.4 Kolonie-PCR/Kontroll-PCR

Ligationen von DNA-Fragmenten und geschnittener Plasmid-DNA sowie *QuikChange*[®]-Mutagenesen wurden mittels Kolonie- oder Kontroll-PCR überprüft. Hierfür wurde pro Kolonie oder Plasmid eine PCR in einem Volumen von 25 µl durchgeführt. Als DNA-Polymerase wurde die *OneTaq*[®] *Quick-Load*[®] DNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) verwendet. Außerdem wurde 5 x *OneTaq*[®] *Quick-Load*[®] Puffer (New England Biolabs, Frankfurt am Main) verwendet, sodass die PCR-Ansätze ohne die Zugabe von Probenpuffer direkt für die Agarose-Gelelektrophorese verwendet werden konnten. **Tabelle 9** zeigt ein Pipettierschema und **Tabelle 10** ein PCR-Programm für eine Kontroll- oder Kolonie-PCR. Bei der Kolonie-PCR wurde eine Kolonie mithilfe einer Pipettenspitze aufgenommen. Anschließend wurde diese Pipettenspitze für das Einbringen von Zellmaterial in den PCR-Ansatz verwendet und in LB-Medium mit entsprechenden Zusätzen abgeworfen, sodass die verwendeten Kolonien weiterverwendet werden konnten. Bei der Kontroll-PCR wurde 1 µl isolierter Plasmid-DNA als Ausgangs-DNA verwendet.

Tabelle 9: Pipettierschema für eine Kolonie-/Kontroll-PCR.

Volumen	Komponente
1 µl oder 1 Kolonie	Plasmid-DNA (10 - 100 ng/µl) oder 1 Kolonie
0,5 µl	<i>forward</i> Primer (25 pmol/µl)
0,5 µl	<i>reverse</i> Primer (25 pmol/µl)
0,5 µl	dNTPs (10 pmol/µl)
0,125 µl	<i>OneTaq</i> [®] <i>Quick-Load</i> [®] DNA-Polymerase
5 µl	5 x <i>OneTaq</i> [®] <i>Quick-Load</i> [®] Puffer
ad 25 µl	H ₂ O

Tabelle 10: PCR-Programm für eine Kolonie-/Kontroll-PCR.

Schritt	Zeit	Temperatur
1. Initiale Denaturierung	2 min	94 °C
2. Denaturierung	30 s	94 °C
3. Primeranlagerung	30 s	55 °C
4. Elongation	1 min/kb	68 °C
5. Finale Elongation	1 min/kb	68 °C
6. Lagerung	∞	8 °C

Vor der finalen Elongation wurden die Schritte 2., 3. und 4. 30-mal wiederholt

2.2.3 Agarose Gelelektrophorese

Für die Separation von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden horizontale Flachbettapparaturen (*Perfect Blue*[™] *Gelsystem Mini S*, *Mini M* und *Mini L*, peqlab/VWR, Erlangen) verwendet. Kleinere DNA-Fragmente (< 500 bp) wurden in einem 2 %igen (w/v) und größere DNA-Fragmente sowie Plasmide in einem 1,5 %igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Zur Detektion der DNA-Fragmente wurden der aufgekochten Agaroselösung vor der Polymerisation 5 µl *HD-Green+ DNA Stain* (Intas, Göttingen) zugegeben. Das Probenvolumen für analytische Gele betrug 25 µl und für präparative Gele 50 µl. Vor dem Beladen der Gele

wurden die Proben mit $\frac{1}{6}$ des Probenvolumens an 6 x Probenpuffer [50 % (w/v) Glycerin, 200 mM EDTA, 0,2 % (w/v) Xylencyanol oder Bromphenolblau] vermischt. Die Gelelektrophorese erfolgte für 30 - 45 min in TAE-Puffer [40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA] bei einer Spannung von 100 - 130 V. Als Größenstandard wurden 5 μ l der *SERVA FastLoad 100 bp DNA-Leiter* oder der *SERVA FastLoad 1 kb DNA-Leiter* (SERVA, Heidelberg) verwendet. Die Detektion erfolgte anschließend unter UV-Licht mithilfe des *Intas-UV-System Gel Stick* (Intas, Göttingen).

2.2.4 DNA-Restriktion

Sofern Ligationen von DNA-Fragmenten und *QuikChange*[®]-Mutagenesen nicht mittels Kontroll- oder Kolonie-PCR überprüft wurden, fand eine Kontrolle anhand einer Testrestriktion statt. Testrestriktionen von Plasmid-DNA wurden in einem Volumen von 20 μ l und präparative Restriktionen von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA in einem Volumen von 50 μ l durchgeführt. DNA-Restriktionen wurden für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Bei Verwendung der Restriktionsendonuklease NdeI wurde die Inkubationszeit auf drei Stunden verlängert. Sofern diese verfügbar waren, wurden *High-Fidelity* (HF[®]) Restriktionsendonukleasen verwendet. Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen stammten von dem Unternehmen New England Biolabs (Frankfurt am Main). Sollten PCR-Amplifikate geschnitten werden, wurden die verwendeten Oligonukleotid-Primer so erstellt, dass diese einen 5'-Überhang tragen, der die Schnittstelle der entsprechenden Restriktionsendonuklease und mindestens vier weitere Nukleotide enthält. **Tabelle 11** zeigt ein Pipettierschema für eine Testrestriktion und **Tabelle 12** ein Pipettierschema für eine präparative Restriktion von DNA-Fragmenten bzw. Plasmid-DNA.

Tabelle 11: Pipettierschema für eine Testrestriktion von Plasmid-DNA.

Volumen	Komponente
10 μ l	Plasmid-DNA (100 - 300 ng/ μ l)
je 1 μ l	je Restriktionsendonuklease
2 μ l	10 x <i>CutSmart</i> [®] Puffer
ad 20 μ l	H ₂ O

Tabelle 12: Pipettierschema für die präparative Restriktion von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten.

Volumen	Komponente
40 µl	Plasmid-DNA oder DNA-Fragment (100 - 300 ng/µl)
je 2,5 µl	je Restriktionsendonuklease
5 µl	10 x <i>CutSmart</i> [®] Puffer
ad 50 µl	H ₂ O

2.2.5 Reinigung von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte und geschnittene Plasmid-DNA wurden zunächst elektrophoretisch von unerwünschten Nebenprodukten getrennt. Die erhaltenen Fragmente wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und Fragmente der gewünschten Größe mithilfe eines Skalpellens ausgeschnitten. Zur Reinigung von PCR-Produkten, bei denen weniger als 50 bp durch Restriktionsendonukleasen entfernt wurden, wurde keine vorherige Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die DNA-Fragmente wurden mit dem *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* (Macherey-Nagel, Düren) gereinigt. Die Elution von der Silica-Gel Membran erfolgte in zwei Schritten mit je 15 µl H₂O. Sollte eine höhere Konzentration der DNA-Fragmente erhalten werden, wurde das Volumen für die Elution entsprechend verringert. Anschließend wurde die Konzentration der DNA-Fragmente mithilfe des *Nanodrop2000* Spektralphotometers (Thermo Scientific, Dreieich) bestimmt und für weitere molekulargenetische Arbeiten bei -20 °C gelagert.

2.2.6 Ligation von geschnittenen DNA-Fragmenten

Nach der Reinigung wurden geschnittene PCR-Produkte (*Insert*) und Plasmid-DNA mithilfe der *T4 DNA Ligase* (New England Biolabs, Frankfurt am Main) über Nacht bei 16 °C ligiert. Die Ligation wurde in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Es wurden je 0,02 pmol der geschnittenen Plasmid-DNA verwendet. Jede Ligation wurde in zwei unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt, bei denen das *Insert* und die geschnittene Plasmid-DNA einmal im Verhältnis 3:1 (0,06 pmol *Insert*) und einmal im Verhältnis 5:1 (0,1 pmol *Insert*) eingesetzt wurden. Zusätzlich wurde immer eine Kontroll-Ligation ohne *Insert* mitgeführt. **Tabelle 13** zeigt ein Pipettierschema für die Ligation von geschnittenem PCR-Produkt (*Insert*) und geschnittener Plasmid-DNA.

Tabelle 13: Pipettierschema für eine Ligation von geschnittenem PCR-Produkt (*Insert*) und geschnittener Plasmid-DNA.

Volumen / Stoffmenge	Komponente
0,02 pmol	geschnittene Plasmid-DNA
0,06 bzw. 0,1 pmol	geschnittenes PCR-Produkt (<i>Insert</i>)
2 µl	10 x <i>T4 DNA Ligase</i> Puffer
1 µl	<i>T4 DNA Ligase</i>
ad 20 µl	H ₂ O

2.2.7 Herstellung ultrakompetenter Zellen

Für die Herstellung ultrakompetenter Zellen wurde zunächst aus einer Glycerinkultur eine 5 ml Übernachtskultur aus LB-Medium und den entsprechenden Zusätzen inokuliert und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde eine 25 ml Hauptkultur aus LB-Medium und den entsprechenden Antibiotika mit 500 µl dieser Übernachtskultur angeimpft. Diese wurde bei 37 °C solange schüttelnd inkubiert, bis eine optische Dichte (bei 600 nm) von 0,6 erreicht war und dann für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen für 10 Minuten bei 4 °C und 6.800 xg sedimentiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 7,5 ml Transformationspuffer [10 mM PIPES (pH 6,7), 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl] resuspendiert, für 45 Minuten auf Eis inkubiert und erneut für 10 Minuten bei 6.800 xg und 4 °C sedimentiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes und dem Resuspendieren der Zellen in 2,5 ml Transformationspuffer wurden diese für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden langsam 160 µl DMSO zugegeben und vermischt. Nach einer erneuten Inkubation für 10 min auf Eis wurde die Suspension ultrakompetenter Zellen aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.8 Transformation ultrakompetenter Zellen

Für die Transformation ultrakompetenter *E. coli* Zellen wurden je 90 - 100 µl ultrakompetente Zellen (siehe Abschnitt 2.2.7) langsam auf Eis aufgetaut, mit 10 µl eines Ligationsansatzes bzw. Plasmid-DNA vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein einminütiger Hitzeschock bei 42 °C, gefolgt von einer zweiminütigen Inkubation auf Eis durchgeführt. Nach der Zugabe von 1 ml SOC-Medium [2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose]

wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Nachfolgend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 6.800 xg (kleine Tischzentrifuge) sedimentiert, im Rückstand resuspendiert, auf LB-Agar mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.9 *Fast-Transformation*

Für die schnelle Transformation (*Fast-Transformation*) einzelner *E.-coli*-Stämme wurde zunächst aus einer Glycerinkultur eine 5 ml Übernachtskultur aus LB-Medium und den entsprechenden Antibiotika inokuliert und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde eine 5 ml Hauptkultur aus LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika mit 100 µl dieser Übernachtskultur angeimpft. Diese wurde bei 37 °C solange schüttelnd inkubiert, bis eine optische Dichte (bei 600 nm) von 0,3 - 0,4 erreicht war und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden je Transformationsansatz die Zellen aus 1 ml für 5 Minuten bei 6.800 xg sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 µl TSS-Puffer [LB-Medium (pH 6,5), 10 % (w/v) PEG 6000, 5 % (v/v) DMSO, 33 mM MgSO₄] resuspendiert. Nach der Zugabe von 2 - 4 µl Plasmid-DNA wurde der Transformationsansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert, 1 ml SOC-Medium hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 5 Minuten bei 6.800 xg sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen im Rücklauf resuspendiert, auf LB-Agar mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.10 DNA-Sequenzierung

Zur Kontrolle von Basenaustauschen durch *QuikChange*[®]-Mutagenesen und der korrekten Ligation von geschnittenen PCR-Produkten und geschnittener Plasmid-DNA wurden die DNA-Sequenzen überprüft. Die Sequenzierung wurde mittels Sanger-Sequenzierung vom Unternehmen SeqLab/Microsynth (Göttingen) durchgeführt. Hierfür wurden je 9 µl gereinigter Plasmid-DNA mit je 1 µl des entsprechenden Oligonukleotid-Primers (25 pmol/µl) vermischt. Die Oligonukleotid-Primer wurden hierbei so gewählt, dass diese mindestens 50 bp vor dem zu sequenzierenden Bereich binden. Bei der Insertion langer DNA-Fragmente mit geschnittener Plasmid-DNA wurden mehrere Sequenzierungen mit unterschiedlichen Oligonukleotid-Primern durchgeführt, sodass die gesamte Sequenz des insertierten DNA-Fragmentes sowie die korrekte Ligation überprüft werden konnte.

2.3 Kultivierungsbedingungen

2.3.1 Nährmedien und Zusätze

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Nährmedien wurden für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert (*Systec VX-150* und *Systec DE-23*, Systec, Linden). Nicht hitzebeständige Substanzen wie Antibiotika, Zucker, Aminosäuren und weitere Zusätze wurden mithilfe eines Spritzenfilters (0,2 µm Porendurchmesser) sterilfiltriert und erst nach dem Abkühlen der Medien hinzugefügt.

Die Kultivierung von *E.-coli*-Stämmen erfolgte in Luria-Bertani-(LB)-Medium (Miller) (siehe **Tabelle 14**). Sollte die Kultivierung auf festem Nährmedium durchgeführt werden, wurde diesem zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Nach der Transformation von Zellen wurde SOC-Medium zur Kultivierung verwendet (siehe **Tabelle 15**).

Tabelle 14: Zusammensetzung von Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) (Miller).

Konzentration	Substanz
1 % (w/v)	Trypton
1 % (w/v)	NaCl
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt

Tabelle 15: Zusammensetzung von SOC-Medium.

Konzentration	Substanz
2 % (w/v)	Trypton
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄
20 mM	Glucose

Je nach Stamm bzw. der codierten Antibiotikaresistenz der enthaltenen Plasmid-DNA wurden den Medien Antibiotika zugegeben (siehe **Tabelle 16**). Die Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert. In H₂O gelöste Antibiotika wurden hierbei in Aliquots von 1 ml und in Ethanol gelöste Antibiotika in 50 ml Reaktionsgefäßen aufbewahrt.

Tabelle 16: Auflistung der verwendeten Antibiotika.

Antibiotikum	Resistenz	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	Amp ^R	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Chloramphenicol	Cm ^R	25 mg/ml in Ethanol (abs.)	25 µg/ml
Tetracyclin	Tet ^R	12,5 mg/ml in 70 % (v/v) Ethanol	12,5 µg/ml

2.3.2 Anzucht und Zellernte

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten *E.-coli*-Stämme wurden in flüssigem oder auf festem LB-Medium mit den entsprechenden Zusätzen bei 37 °C unter oxidischen Bedingungen kultiviert. Für Übernachtskulturen wurde Zellmaterial aus einer Glycerinkultur oder eine einzelne Kolonie von einer Agarplatte entnommen, um 5, 25 oder 50 ml LB-Medium mit den entsprechenden Zusätzen zu beimpfen. Für Übernachtskulturen mit einem Volumen von 5 ml wurden sterile Reagenzgläser mit Metalldeckeln verwendet und bei seitlichem Schütteln inkubiert. Für Übernachtskulturen mit Volumina von 25 ml oder 50 ml wurden Erlenmeyerkolben mit einer Schikane verwendet und schüttelnd bei 180 rpm inkubiert. Hauptkulturen mit den entsprechenden Zusätzen wurden mit 2 - 4 % (v/v) der Übernachtskultur inokuliert. Es wurden Hauptkulturen mit Volumina zwischen 5 ml (Bestimmung der SDS-Sensitivität, in Reagenzgläsern) und 1 l (Reinigung von Tat-Komplexen) kultiviert. Ab einem Volumen von 25 ml wurden die Kultivierungen in Erlenmeyerkolben mit Schikanen durchgeführt, die schüttelnd bei 180 rpm inkubiert wurden.

Das Wachstum der Kulturen wurde photometrisch anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) verfolgt. Die Messung erfolgte anhand einer homogen durchmischten Probe mit einem Volumen von 1 ml und einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm in dem Spektralphotometer *Libra S11* (Biochrom, Cambridge). Für die Messung der optischen Dichte bei 600 nm im linearen Bereich zwischen 0 und 0,3 wurde die Probe ggf. verdünnt. Die optische Dichte bei 600 nm von Hauptkulturen mit einem Volumen von 5 ml wurde direkt in den Kultivierungsgefäßen mithilfe eines *Genesys 20 Spektrophotometers*

(Thermo Scientific, Dreieich) bestimmt. Das unbeimpfte Medium wurde jeweils als Leerwert verwendet.

Die Induktion der Expression von Genen, die unter der Kontrolle des Rhamnose-Promotors standen (pBW-Derivate) erfolgte durch die Zugabe von 0,01 - 0,1 % (w/v) Rhamnose bei einer optischen Dichte (OD_{600}) zwischen 0,5 und 0,8. Einzig bei der Bestimmung der SDS-Sensitivität wurde den Hauptkulturen unmittelbar nach dem Animpfen 0,05 % (w/v) Rhamnose zugegeben. Sofern Rhamnose zugegeben wurde, erfolgte die Kultivierung für 3 Stunden nach der Induktion. Alle weiteren Hauptkulturen wurden für 5 Stunden kultiviert.

Für die Zellernte wurden die Zellen mittels Zentrifugation für 10 Minuten bei 6.800 xg vom Medium getrennt. Das Zellpellet wurde einmal in PBS-Puffer resuspendiert, die Zellen erneut für 10 Minuten bei 6.800 xg sedimentiert und der Überstand verworfen. Hierfür wurde die Tischzentrifuge *PerfectSpin 24 Plus* (bis 2 ml, peqlab/VWR, Erlangen) oder eine der Kühlzentrifugen *5804R* (bis 50 ml, Eppendorf, Hamburg), *Z326K* (bis 50 ml, Hermle, Wehingen) oder *Sorvall Lynx 4000* (bis 1 l, Thermo Scientific, Dreieich) verwendet. Zellpellets wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C für maximal zwei Wochen gelagert.

2.3.3 *In-vivo-cross-linking*

Für die Quervernetzung von TatC-Protomeren wurden *E.-coli*-Stämme verwendet, die das pEVOL-pBpF-Plasmid (Young *et al.* 2010) enthielten. Auf diesem ist eine tRNA-Synthase codiert, sodass Bpa mithilfe einer spezifischen tRNA (Anticodon TAG, Amber-Stopcodon) in die Peptidsequenz integriert werden kann. Für die Expression des für die tRNA-Synthase codierenden Gens und die Integration von Bpa in die Peptidsequenz wurden den entsprechenden Hauptkulturen direkt beim Beimpfen 100 µM Arabinose und 100 µM Bpa zugegeben.

Für die Quervernetzung von TatC-Protomeren wurden die Kulturen der entsprechenden Stämme vor der Zellernte für 30 Minuten mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm bestrahlt (+UV). Den Hauptkulturen der entsprechenden Negativkontrollen (-UV) wurde ebenfalls final 100 µM Arabinose und 100 µM Bpa zugegeben, jedoch erfolgte keine Bestrahlung mit UV-Licht. Der Eintrag von Tageslicht führte nicht zu einer Quervernetzung von TatC-Protomeren, weshalb auf einen Ausschluss von Tageslicht verzichtet wurde. Im Anschluss an die UV-Bestrahlung wurden die Zellen wie beschrieben geerntet (siehe Abschnitt 2.3.2).

2.3.4 Stammhaltung

Für die Stammhaltung wurden Glycerinkulturen angelegt. Von neu erstellten Stämmen wurde hierfür zunächst eine Übernachtskultur mit einem Volumen von 5 ml und den entsprechenden Zusätzen mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte beimpft. Von übernommenen Stämmen wurde eine Übernachtskultur mit den entsprechenden Zusätzen mit Zellmaterial aus einer Glycerinkultur beimpft. Nach der Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden 600 µl der Übernachtskultur mit 600 µl LB-Medium mit 30 % (v/v) Glycerin vermischt (Endkonzentration 15 % (v/v)) und bei -80 °C gelagert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Präparation von Membranen

Vor der Analyse von Tat-Komplexen mittels BN-PAGE/Western-Blot und der Reinigung von Tat-Komplexen wurden zunächst die Membranen der entsprechenden Stämme präpariert und die Membranproteine mithilfe des Detergens Digitonin solubilisiert.

Für die Analyse von Tat-Komplexen mittels BN-PAGE/Western-Blot wurden Hauptkulturen mit einem Volumen von 100 ml und den entsprechenden Zusätzen mit 4 ml einer Übernachtskultur beimpft und wie beschrieben kultiviert (siehe Abschnitt 2.3.2). Nach der Kultivierung wurden Stämme, die pABS- oder pDE-Derivate enthielten, bei der Zellernte auf eine optische Dichte (600 nm) von 1,0 normiert. Stämme, die pZX31-Derivate enthielten, wurden aufgrund der schwachen Genexpression auf eine optische Dichte (600 nm) von 2,0 normiert. Die Zellpellets wurden mit PBS-Puffer gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Zellpellets wurden in 4 ml eiskaltem BN-Aufschlusspuffer [50 mM Bis-Tris HCl (pH 7,0), 20 % (w/v) Saccharose, 10 mM MgCl₂] auf Eis resuspendiert. Vor dem Zellaufschluss wurden 25 µl DNaseI (10 mg/ml) und 2 mM PMSF zugegeben. Der Zellaufschluss wurde in 2 - 3 Passagen mithilfe der *French Pressure Cell Press Model FA-078* (SLM Aminco, Urbana, USA) bei einem Druck von 18.000 psi durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zelltrümmer für 20 min bei 4 °C und 20.000 xg (Kühlzentrifuge *5804R*, Eppendorf, Hamburg oder *Z326K*, Hermle, Wehingen) sedimentiert. 3 ml des Überstandes wurden in Ultrazentrifugationsgefäße überführt, die Membranen für 30 Minuten bei 4 °C und 130.000 xg mittels Ultrazentrifugation (*Sorvall Discovery MI20SE*, Thermo Scientific, Dreieich) sedimentiert und der Überstand verworfen.

Die Reinigung von Tat-Komplexen sollte ausreichende Mengen für strukturbiochemische Analysen liefern. Aus diesem Grund wurde mehr Ausgangsmaterial benötigt und es wurden Zellpellets aus Hauptkulturen mit einem Volumen von 1 l verwendet. Das oben beschriebene Protokoll und die entsprechenden Volumina wurden daher an die Menge des Ausgangsmaterials angepasst (siehe Abschnitt 3.4).

Für die Reinigung von Tat-Komplexen wurden Membranen aus größeren Zellpellets präpariert (1 l, $OD_{600} = 1.0$). Diese wurden wie oben beschrieben prozessiert. Jedoch wurden die Zellen in 30 ml eiskaltem BN-Aufschlusspuffer auf Eis resuspendiert. Die Zelltrümmer wurden für 30 Minuten bei 4 °C und 6.800 xg entfernt (Kühlzentrifuge *Sorvall Lynx 4000*, Thermo Scientific, Dreieich). Für die Sedimentation der Membranen (30 Minuten bei 130.000 xg und 4 °C) wurde im Anschluss die Ultrazentrifuge *Optima L-100XP* (Beckman Coulter, Krefeld) verwendet.

2.4.2 Solubilisierung von Membranproteinen

Membranpellets, die aus Zellpellets einer 100 ml-Hauptkultur präpariert wurden, wurden anschließend auf Eis in 160 µl eiskaltem BN-Aufschlusspuffer resuspendiert. Der Suspension wurden 40 µl 5 % (w/v) Digitonin (Endkonzentration 1 % (w/v) Digitonin) zugegeben. Anschließend wurde die Suspension für 30 Minuten rührend auf Eis inkubiert, um die Membranproteine in Lösung zu bringen. Nicht solubilisierbare Bestandteile der Membran wurden anschließend mittels Ultrazentrifugation für 30 Minuten bei 4 °C und 130.000 xg sedimentiert (*Sorvall Discovery MI20SE*, Thermo Scientific, Dreieich). Der Überstand wurde anschließend für BN-PAGE/Western-Blot-Analysen (siehe Abschnitte 2.4.6 und 2.4.8) verwendet.

Für die Solubilisierung von Membranproteinen aus größeren Membranpellets (präpariert aus 1 l Kulturvolumen, $OD_{600} = 1,0$) wurden die Membranen in 1,6 ml eiskaltem BN-Aufschlusspuffer auf Eis resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend à 160 µl aliquotiert. Nach der Zugabe von je 40 µl 5 % (w/v) Digitonin (Endkonzentration 1 % (w/v) Digitonin) wurden die Ansätze 30 Minuten oder über Nacht schüttelnd bei 4 °C inkubiert (*Revolver Rotator D-6050*, neoLab, Heidelberg). Nach der Inkubation wurden die Ansätze vereinigt und nicht solubilisierbare Membranbestandteile mittels Ultrazentrifugation für 30 Minuten bei 4 °C und 130.000 xg (*Optima L-100XP*, Beckman Coulter, Krefeld) sedimentiert. Der Überstand wurde anschließend für Affinitäts- und Größenausschlusschromatographische Reinigungen (siehe Abschnitte 2.4.3, 2.4.4 und 2.4.5) verwendet.

Herstellung von Digitonin-Lösungen

Für die Herstellung von 5 %igen (w/v) Digitonin-Lösungen wurde die entsprechende Menge Digitonin in H₂O suspendiert. Das schwerlösliche Digitonin wurde durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C in Lösung gebracht und anschließend auf Eis abgekühlt. Nicht gelöste Bestandteile wurden im Anschluss durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 12.000 xg sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zu einer Woche bei -20 °C gelagert. Direkt vor der Verwendung wurden unlösliche Bestandteile erneut durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 12.000 xg sedimentiert und der Überstand verwendet.

2.4.3 *Strep-Tactin*[®]-Affinitätschromatographie

Für die Reinigung von Tat-Komplexen und Substrat-assoziierten Tat-Komplexen wurden einige Proteine als Strep-Tag[®] II-Fusionsproteine produziert (Strep-Tag[®] II-Peptidsequenz: WSHPQFEK). Hierbei wurden sowohl Gravitationssäulen mit *Strep-Tactin*[®] *Superflow*[®] Säulenmaterial, als auch *MagStrep* „type 3“ *XT beads* (IBA, Göttingen) verwendet.

Das Säulenmaterial wurde so gewählt, dass die gewünschten Proteine spezifisch mit diesem interagieren. Bei Gravitationssäulen passieren der Puffer und nicht bindende Bestandteile aufgrund der Schwerkraft das Säulenmaterial. Bei der Verwendung magnetischer Partikel hingegen bilden diese die stationäre Phase, die spezifisch mit den gewünschten Proteinen interagiert. Mithilfe eines Magneten können die Partikel an der Gefäßwand immobilisiert werden. So kann die mobile Phase mit unerwünschten Bestandteilen mit einer Mikropipette entfernt werden. Die Volumina der stationären Phasen und der verwendeten Puffer wurden den Volumina der Proben angepasst. Im Folgenden soll die Reinigung von solubilisierten Fusionsproteinen aus einem Kulturvolumen von 100 ml beschrieben werden. Aus Lösungen mit solubilisierten Membranproteinen wurde vor der Reinigung eine Probe entnommen. Alternativ wurde eine zweite, identische Solubilisierung durchgeführt (ÜS), sodass die gereinigten Fraktionen mit nicht gereinigten Fraktionen verglichen werden konnten. **Tabelle 17** zeigt die Zusammensetzung der für die Reinigung verwendeten Puffer.

Tabelle 17: Verwendete Puffer für die *Strep-Tactin*[®]-Affinitätschromatographie.

Äquilibrierungs-/Waschpuffer	Elutionspuffer
50 mM Bis-Tris HCl (pH 7,0)	50 mM Bis-Tris HCl (pH 7,0)
20 % (w/v) Saccharose	20 % (w/v) Saccharose
10 mM MgCl ₂	10 mM MgCl ₂
50 mM Imidazol	50 mM Imidazol
0,1 % (w/v) Digitonin	0,1 % (w/v) Digitonin
	50 mM D-Desthiobiotin / D-Biotin

Reinigung mittels Gravitationssäulen

Zunächst wurden *Poly-Prep*[®] Chromatographiesäulen (Bio-Rad, München) mit 100 µl *Strep-Tactin*[®] *Superflow*[®] Säulenmaterial (IBA, Göttingen) beladen. Die Lagerungslösung wurde entfernt und das Säulenmaterial mit 1 ml (10 SV) des Äquilibrierungspuffers äquilibriert. Anschließend wurden 200 µl solubilisierter Membranproteine (siehe Abschnitt 2.4.2) aufgetragen. Zur besseren Bindung der *Strep-Tag*[®] II-Fusionsproteine wurden die Probe und das äquilibrierte Säulenmaterial ggf. für 30 Minuten bei 4 °C gerührt. Anschließend wurde die Probe entfernt (Durchlauf, DL). Zur Entfernung unspezifisch gebundener Bestandteile wurden zweimal je 1 ml (10 SV) Waschpuffer aufgetragen und nach Passage der stationären Phase separat gesammelt (Waschfraktionen 1 und 2, W1 und W2). Die Elution der gebundenen Fusionsproteine wurde in mehreren Schritten à 100 µl (1 SV) durchgeführt. Hierfür wurden je 100 µl Elutionspuffer (mit D-Desthiobiotin) aufgetragen und nach Passage der stationären Phase separat gesammelt (Elutionsfraktionen, E). Die Elutionsfraktionen wurden sowohl für analytische Zwecke (BN-PAGE/Western-Blot, SDS-PAGE/Western-Blot) als auch für weitere Reinigungsschritte verwendet. Für weitere Reinigungsschritte wurden die Elutionfraktionen E2 und E3 vereinigt.

Reinigung mittels magnetischer Partikel

Zunächst wurden 40 µl *MagStrep „type 3“ XT beads* (IBA, Göttingen) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Lagerungslösung mithilfe eines Magneten entfernt. Für die Äquilibration der Partikel wurden zweimal 200 µl Äquilibrationpuffer zugegeben, der Puffer und die Partikel vermischt, magnetisch separiert und der Puffer entfernt. Anschließend wurden 200 µl solubilisierter Membranproteine (siehe Abschnitt 2.4.2) mit den äquilibrierten Partikeln für 30 Minuten bei 4 °C schüttelnd inkubiert (*Revolver Rotator D-6050*, neoLab, Heidelberg). Nach der Separation wurde die Probe entfernt und gesammelt (Durchlauf, DL). Für die Entfernung unspezifisch gebundener Bestandteile wurden die Partikel zweimal je mit 400 µl Waschpuffer vermischt, separiert, der Puffer entfernt und gesammelt (Waschfraktionen 1 und 2, W1 und W2). Die Elution der gebundenen Fusionsproteine wurde in mehreren Schritten à 25 µl durchgeführt. Hierfür wurden die Partikel mit je 25 µl Elutionspuffer (mit D-Biotin) vermischt, separiert, der Elutionspuffer entfernt und gesammelt (Elutionsfraktionen, E). Für die erste Elutionsfraktion (E1) wurden die Partikel mit dem Elutionspuffer für 30 Minuten bei 4 °C schüttelnd inkubiert (*Revolver Rotator D-6050*, neoLab, Heidelberg). Die Elutionsfraktionen wurden sowohl für analytische Zwecke (BN-PAGE/Western-Blot, SDS-PAGE/Western-Blot) als auch für weitere Reinigungsschritte verwendet. Für weitere Reinigungsschritte wurden die Elutionsfraktionen E1 und E2 vereinigt.

2.4.4 Ni-Chelat-Affinitätschromatographie

Als weitere Methode zur Reinigung von Tat-Komplexen und Substrat-assoziierten Tat-Komplexen wurden einige Proteine als Fusionsproteine mit einem Hexahistidin-*Tag* produziert. Für die Ni-Chelat-Affinitätschromatographie (Ni-IMAC) wurden sowohl Gravitationsssäulen mit *Protino[®] Ni-NTA Agarose* (Macherey-Nagel, Düren) als auch *HisPur[™] Ni-NTA Magnetic Beads* (Thermo Scientific, Dreieich) verwendet.

Die Volumina der stationären Phasen und der verwendeten Puffer wurden den Volumina der Proben angepasst. Im Folgenden soll exemplarisch die Reinigung von Hexahistidin-Fusionsproteinen aus einem Kulturvolumen von 100 ml beschrieben werden. Aus Lösungen mit solubilisierten Membranproteinen wurde vor der Reinigung eine Probe entnommen. Alternativ wurde eine zweite, identische Solubilisierung durchgeführt (ÜS), sodass die gereinigten Fraktionen mit nicht gereinigten Fraktionen verglichen werden konnten. **Tabelle 18** zeigt die Zusammensetzung der für die Ni-Chelat-Affinitätschromatographie verwendeten Puffer.

Tabelle 18: Verwendete Puffer für die Ni-Chelat-Affinitätschromatographie.

Äquilibriumspuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
50 mM Bis-Tris HCl pH 7,0	50 mM Bis-Tris HCl pH 7,0	50 mM Bis-Tris HCl pH 7,0
20 % (w/v) Saccharose	20 % (w/v) Saccharose	20 % (w/v) Saccharose
10 mM MgCl ₂	10 mM MgCl ₂	10 mM MgCl ₂
0,1 % (w/v) Digitonin	0,1 % (w/v) Digitonin	0,1 % (w/v) Digitonin
	50 mM Imidazol	250 mM Imidazol

Reinigung mittels Gravitationssäulen

Zunächst wurden *Poly-Prep*[®] Chromatographiesäulen (Bio-Rad, München) mit 100 µl *Protino*[®] Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel, Düren) beladen und die Lagerungslösung entfernt. Das Säulenmaterial wurde im Anschluss mit 1 ml (10 SV) des Äquilibriumspuffers äquilibriert. Nach der Passage des Äquilibriumspuffers wurden 200 µl einer Lösung mit solubilisierten Membranproteinen (siehe Abschnitt 2.4.2) aufgetragen. Bei Bedarf wurde die Probe mit dem äquilibrierten Säulenmaterial für 30 Minuten bei 4 °C zur besseren Bindung der Hexahistidin-Fusionsproteine gerührt. Die Probe wurde nach der Passage der stationären Phase gesammelt (Durchlauf, DL). Unspezifisch gebundene Bestandteile wurden durch zweimalige Passage von je 1 ml (10 SV) Waschpuffer entfernt und gesammelt (Waschfraktionen 1 und 2, W1 und W2). Die gewünschten Fusionsproteine wurden in mehreren Schritten mit je 100 µl (1 SV) vom Säulenmaterial eluiert. Hierfür wurden je 100 µl des Elutionspuffers aufgetragen und nach Passage der stationären Phase separat gesammelt (Elutionsfraktionen, E). Die Elutionsfraktionen wurden sowohl für analytische Zwecke (BN-PAGE/Western-Blot, SDS-PAGE/Western-Blot) als auch für weitere Reinigungsschritte verwendet. Für weitere Reinigungsschritte wurden die Elutionsfraktionen E2 und E3 vereinigt.

Reinigung mittels magnetischer Partikel

Zunächst wurden 40 µl *HisPur*[™] Ni-NTA Magnetic Beads (Thermo Scientific, Dreieich) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 160 µl Äquilibriumspuffer vermischt. Die Partikel wurden magnetisch immobilisiert und der Puffer entfernt. Für die Äquilibriumspufferung der Partikel wurden diese erneut zweimal mit 200 µl Äquilibriumspuffer vermischt, magnetisch immobilisiert und der Puffer entfernt. Anschließend wurden 200 µl einer Lösung solubilisierter

Membranproteine (siehe Abschnitt 2.4.2) mit den äquilibrierten Partikeln für 30 Minuten bei 4 °C schüttelnd inkubiert (*Revolver Rotator D-6050*, neoLab, Heidelberg). Die Probe wurde entfernt und gesammelt (Durchlauf, DL). Unspezifisch gebundene Bestandteile wurden durch die zweimalige Vermischung mit je 400 µl Waschpuffer und anschließender Entfernung des Puffers gesammelt (Waschfraktionen 1 und 2, W1 und W2). Die Elution der gebundenen Fusionsproteine erfolgte in mehreren Schritten à 25 µl. Hierfür wurden die Partikel mit je 25 µl Elutionspuffer vermischt, die Partikel magnetisch immobilisiert, der Elutionspuffer entfernt und in einzelnen Fraktionen gesammelt (Elutionsfraktionen, E). Für die erste Elutionsfraktion (E1) wurden die Partikel mit 25 µl Elutionspuffer für 30 Minuten bei 4 °C schüttelnd inkubiert (*Revolver Rotator D-6050*, neoLab, Heidelberg). Die Elutionsfraktionen wurden sowohl für analytische Zwecke (BN-PAGE/Western-Blot, SDS-PAGE/Western-Blot) als auch für weitere Reinigungsschritte verwendet. Für weitere Reinigungsschritte wurden die Elutionsfraktionen E1 und E2 vereinigt.

2.4.5 Größenausschlusschromatographie

Nach der affinitätschromatographischen Reinigung von Tat-Komplexen wurden diese bei Bedarf in einem weiteren Schritt größenausschlusschromatographisch mithilfe eines FLPC-Systems gereinigt. Hierfür wurde ein *ÄKTApurifier* FPLC-System mit einem *UV-900* UV-Detektor, einem *pH/C-900* pH- und Leitfähigkeitssensor, einem *P-900* Pumpensystem, einem *Frac-950* Fraktionensammler und einer *Superose 6 10/300 GL* Gelfiltrationssäule mit einem ungefähren Volumen von 24 ml (GE Healthcare, Freiburg) verwendet.

Injiziert wurden immer Elutionsfraktionen einer Ni-Chelat-Affinitätschromatographie mittels *Protino*[®] *Ni-NTA Agarose* (Macherey-Nagel, Düren). Hierfür wurden die Elutionsfraktionen E2, E3 und E4 vereinigt, wodurch sich ein Injektionsvolumen von 600 µl unter Verwendung einer 1 ml Injektionsschleife ergab. Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden filtriert, um Schwebstoffe zu entfernen und in einem Ultraschallbad bei vermindertem Druck entgast. Die gesamte Reinigung wurde bei 4 °C mit vorgekühlten Puffern und Lösungen durchgeführt. Zur Lagerung wurde das FPLC-System und die Gelfiltrationssäule mit 20 % (v/v) Ethanol und 0,002 % (w/v) NaN₃ gespült. Vor dem Gebrauch wurde das ganze System zunächst mit H₂O gespült und anschließend mit dem für die Reinigung verwendeten Puffer [50 mM Bis-Tris HCl (pH 7,0), 20 % (w/v) Saccharose, 10 mM MgCl₂, 0,1 % (w/v) Digitonin] äquilibriert. Digitonin wurde dem Puffer erst kurz vor Gebrauch zugegeben. Die Äquilibrierung der *Superose 6 10/300 GL* Gelfiltrationssäule wurde mithilfe des UV-Detektors bei Wellenlängen von 254 nm und

280 nm und des pH- und Leitfähigkeitssensors verfolgt. Für das verwendete Puffersystem und die verwendete Gelfiltrationssäule wurde außerdem eine Kalibration mit Proteinen durchgeführt, deren Molekulargewicht bekannt war. Hierfür wurden Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa) und Conalbumin (75 kDa) verwendet (siehe **Abbildung 38**). Die Äquilibration wurde direkt vor dem Gebrauch durchgeführt, sodass die vereinigten Elutionsfraktionen direkt injiziert werden konnten. Die Reinigung erfolgte bei Flussraten zwischen 0,15 und 0,20 ml/min, einem maximalen Druck von 1,5 mPa und wurde mithilfe des UV-Detektors bei 254 nm und 280 nm verfolgt. Die Elutionsfraktionen wurden separat in Volumina von je 0,5 ml gesammelt. Bei der Passage von etwa einem Säulenvolumen (ca. 24 ml) wurde die Reinigung sowie die Fraktionierung beendet. Für weitere Arbeiten wurden die zu den Signalen des entsprechenden Molekulargewichts gehörigen Elutionsfraktionen vereinigt. Aus den vereinigten Elutionsfraktionen wurde eine Probe für analytische Zwecke (BN-PAGE/Western-Blot, SDS-PAGE/Western-Blot) entnommen. Das restliche Volumen wurde für die weitere Reinigung bzw. Konzentration der Tat-Komplexe mittels Ni-Chelat-Affinitätschromatographie verwendet (siehe Abschnitt 2.4.4).

2.4.6 BN-PAGE

Für den Nachweis von Proteinkomplexen wurden diese mittels BN-PAGE (*Blue-native* Polyacrylamidgelelektrophorese) elektrophoretisch voneinander getrennt. Dabei erfolgten alle Arbeitsschritte bei 4 °C oder auf Eis. Die Proben aus solubilisierten Membranproteinen (ohne Reinigung) oder gereinigten Tat-Komplexen wurden jeweils mit $\frac{1}{10}$ des Gesamtvolumens an 10 x BN-Probenpuffer [100 mM Bis-Tris HCl (pH 7,0), 500 mM ϵ -Aminocaprinsäure, 30 % (w/v) Saccharose, 5 % (w/v) Coomassie G250] vermischt. Als Markerproteine wurden 1 mg Thyroglobulin (669 kDa, Merck KGaA, Darmstadt), 1 mg Ferritin (440 kDa, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 5 mg Katalase (230 kDa, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) oder Aldolase (158 kDa, GE Healthcare, Freiburg) in 180 μ l BN-Aufschlusspuffer gelöst und mit 20 μ l 10 x BN-Probenpuffer vermischt. Sowohl von den Proben als auch von den gelösten Markerproteinen wurden jeweils 10 μ l aufgetragen. Es wurden 5 - 13,5 %ige BN-Acrylamidgele mit 4 %igen Sammelgelen (siehe **Tabelle 19**) oder 4 - 12 %ige BN-Acrylamidgele mit 3,5 %igen Sammelgelen (siehe **Tabelle 20**) verwendet.

Tabelle 19: Pipettierschema für ein 5 - 13,5 %iges Trenngel und ein 4 %iges Sammelgel.

Substanz	4 % Sammelgel	5 % Trenngel	13,5 % Trenngel
Acrylamid/Bisacrylamid 49,5 % (w/v), 1,5 % C	121 µl	212 µl	573 µl
3 x Gelpuffer	500 µl	700 µl	700 µl
75 % (v/v) Glycerin	-	140 µl	560 µl
H ₂ O	860 µl	1028 µl	247 µl
TEMED	3 µl	2 µl	2 µl
5 % (w/v) APS	16 µl	11 µl	11 µl

Tabelle 20: Pipettierschema für ein 4 -12 %iges Trenngel und ein 3,5 %iges Sammelgel.

Substanz	3,5 % Sammelgel	4 % Trenngel	12 % Trenngel
Acrylamid/Bisacrylamid 49,5 % (w/v), 1,5 % C	106 µl	170 µl	510 µl
3 x Gelpuffer	500 µl	700 µl	700 µl
75 % (v/v) Glycerin	-	140 µl	560 µl
H ₂ O	875 µl	1070 µl	310 µl
TEMED	3 µl	2 µl	2 µl
5 % (w/v) APS	16 µl	11 µl	11 µl

Der 3 x konzentrierte Gelpuffer setzte sich hierbei aus 150 mM Bis-Tris HCl (pH 7,0) und 1,5 M ϵ -Aminocapronsäure zusammen und wurde bei 4 °C gelagert. Es wurden 0,75 mm dicke Gradientengele mithilfe einer Gradientenmischkammer und einem *SE245 Dual Gel Caster* (Hofer, Holliston, USA) gegossen. Für einen gleichmäßigen Gradienten wurden die Gele zur Polymerisation bei 4 °C gelagert. Die Gele konnten mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden.

Die elektrophoretische Trennung erfolgte zunächst bei 100 V mithilfe von vertikalen *SE250 Mighty Small II Mini* Protein-Elektrophoreseeinheiten (Hofer, Holliston, USA). Hierbei wurde Kathodenpuffer [0,5 M Tricin, 150 mM Bis-Tris HCl (pH 7,0)] verwendet, dem 0,01 % (w/v) Coomassie G250 zugesetzt wurde. Dieses interagiert aufgrund hydrophober Wechselwirkungen

mit den Proteinen und dient als Ladungsträger für die elektrophoretische Trennung von Membranproteinen mit geringer Eigenladung. Nach etwa 2 Stunden und halbem Lauf wurde der Kathodenpuffer durch Kathodenpuffer ohne Coomassie G250 ausgetauscht, die Spannung auf 40 V reduziert und die Elektrophorese über Nacht fortgesetzt. Als Anodenpuffer wurde 50 mM Bis-Tris HCl (pH 7,0) verwendet.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder mittels kolloidaler Coomassie-Färbung gefärbt (siehe Abschnitt 2.4.8) oder es wurde ein Western-Blot (siehe Abschnitt 2.4.9) durchgeführt. Vor dem Western-Blot wurden die BN-Acrylamidgele für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 50 ml Towbin-Puffer [25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol] mit 0,5 ml 10 % (w/v) SDS geschwenkt. Nach der Platzierung eines Gels auf der Membran wurden außerdem die Markerproteine mit einem Kugelschreiber nachgezeichnet.

2.4.7 SDS-PAGE

Für einen quantitativen Vergleich wurden alle Proben, die mittels BN-PAGE/Western-Blot analysiert wurden, auch mittels SDS-PAGE/Western-Blot analysiert. Die denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach einer Methode von Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt. Die Proben wurden zuvor im Verhältnis 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer [100 mM Tris HCl (pH 6,8), 20 % (v/v) Glycerin, 4 % (w/v) SDS, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 200 mM DTT] vermischt. Der SDS-Probenpuffer wurde ohne DTT gelagert. Erst kurz vor dem Gebrauch wurde die entsprechende Menge einer 2 M DTT Lösung zugegeben. Vor der Elektrophorese wurden die Proben für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt. Für die Analyse der Tat-Komponenten TatA, TatB und TatC wurden die Proben vor der Elektrophorese nicht erhitzt, sondern direkt verwendet. Es wurden 1 mm dicke 4,5 %ige Sammelgele und 10, 12,5 und 15 %ige Trenngele (siehe **Tabelle 21**) verwendet. Diese konnten für mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden.

Tabelle 21: Pipettierschema für ein denaturierendes, 4,5 %iges Sammel- und ein 10, 12,5 oder 15 %iges Trenngel.

Substanz	1 Sammelgel		1 Trenngel	
	4,5 %	10 %	12,5 %	15 %
Acrylamid/Bisacrylamid 30 % (w/v), 2,6 % C	630 µl	2,5 ml	3,3 ml	3,75 ml
0,5 M Tris HCl (pH 6,8)	950 µl	-	-	-
1,5 M Tris HCl (pH 8,8)	-	1,88 ml	1,88 ml	1,88 ml
H ₂ O	2,13 ml	3 ml	2,35 ml	1,72 ml
10 % (w/v) SDS	37,5 µl	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	37,5 µl	75 µl	75 µl	75 µl
10 % (w/v) APS	5 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Als Größenstandard wurden 3 µl des *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific, Dreieich) aufgetragen. Das Volumen der aufgetragenen Proben betrug je 10 µl. Die Elektrophorese wurde in vertikalen *Minigel-Twin* Elektrophoresesystemen (Biometra/Analytik Jena, Jena) bei 100 V durchgeführt. Der SDS-Laufpuffer setzte sich aus 200 mM Glycin, 20 mM Tris und 1 % (w/v) SDS zusammen. Nachdem die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 120 - 130 V erhöht und die Elektrophorese fortgesetzt.

2.4.8 Kolloidale Coomassie-Färbung

Um quantitative Aussagen über die gereinigten Proteinmengen treffen zu können, wurden die BN-Acrylamidgele von Reinigungsprofilen nach der BN-PAGE mittels kolloidaler Coomassie-Färbung gefärbt. Hierfür wurden die Gele direkt nach der Elektrophorese zunächst für eine Stunde in je 25 ml Fixierlösung [40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure] geschwenkt. Pro Gel wurden 25 ml Färbelösung verwendet. Hierfür wurden die Lösungen A und B (siehe **Tabelle 22**) im Verhältnis 98:2 vermischt, 20 % (v/v) Methanol zugegeben und für einige Stunden vor dem Gebrauch gerührt oder geschwenkt. Nach dem Fixieren wurde das Gel über Nacht in der Färbelösung geschwenkt. Die Färbelösung wurde anschließend entfernt und das Gel durch mehrfaches Waschen mit Wasser entfärbt. Die Dokumentation erfolgte mithilfe eines *Perfection V850 Pro* Scanners (Epson, Meerbusch).

Tabelle 22: Lösungen für die kolloidale Coomassie-Färbung.

Lösung A		Lösung B	
2 % (w/v) <i>ortho</i> -Phosphorsäure 85 %		5 % (w/v) Coomassie G250	
10 % (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄			
Färbelösung (für ein Gel)			
19,6 ml	Lösung A		
0,4 ml	Lösung B		
5 ml	Methanol		

2.4.9 Western-Blot

Nach der nativen oder denaturierenden Gelelektrophorese wurden die Proteine bzw. Proteinkomplexe mittels Western-Blot auf Nitrocellulose oder PVDF-Membranen übertragen, um einen Nachweis einzelner Proteine mithilfe spezifischer Antikörper zu ermöglichen. Western-Blots wurden im *semi-dry* Verfahren mithilfe von *Fastblot B44* Blotkammern (Biometra/Analytik Jena, Jena) durchgeführt. Es wurden *Roti*[®]-PVDF Membranen (Carl Roth, Karlsruhe) mit einer Porengröße von 0,45 µm oder *Amersham*[™] *Protran 0.2 µm NC* Nitrocellulose Membranen (GE Healthcare, Freiburg) sowie 0,34 mm dickes *Whatman*[™] Chromatographie-Papier (GE Healthcare, Freiburg) verwendet.

Native BN-Acrylamidgele wurden nach der Elektrophorese für 10 Minuten in 50 ml Towbin-Puffer [25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol] mit 0,5 ml 10 % (w/v) SDS geschwenkt und anschließend mit Towbin-Puffer ohne SDS gewaschen. PVDF-Membranen wurden vor dem Gebrauch durch 5-minütiges Schwenken in Methanol aktiviert. Nitrocellulose und PVDF-Membranen wurden direkt vor dem Western-Blot mit Towbin-Puffer äquilibriert.

Drei Filterpapiere wurden in Towbin-Puffer getränkt, überschüssige Flüssigkeit entfernt, Luft einschüsse durch leichten Druck entfernt und auf der Anodenplatte platziert. Darauf wurde die Membran, gefolgt vom Acrylamidgel und drei weiteren Filterpapieren, platziert. Vor dem Auflegen der Anodenplatte wurden Luft einschüsse durch leichten Druck entfernt. Das Blotting erfolgte bei 0,7 mA/cm² für 60 - 90 Minuten.

2.4.10 Proteindetektion

Für die Detektion einzelner Proteine mithilfe spezifischer Antikörper wurden die Membranen nach dem Western-Blot geblockt. Hierfür wurden Membranen von denaturierenden Gelen für eine Stunde und Membranen von nativen Gelen für zwei Stunden in PBS-Puffer [4 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 13,7 mM NaCl, 3 mM KCl] mit 5 % (w/v) Magermilchpulver geschwenkt. Alternativ erfolgte das Blocken über Nacht bei 4 °C.

Nach dem Blocken wurden die Membranen drei Mal für je 5 Minuten durch leichtes Schwenken in PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit einem spezifischen, primären Antikörper schwenkend inkubiert. Für die Detektion von denaturierten Proteinen (nach SDS-PAGE) wurde diese Inkubation für eine Stunde und für die Detektion von Proteinkomplexen (nach BN-PAGE) für zwei Stunden durchgeführt. Gereinigte Antikörper gegen TatA, TatB, TatC, EfeB und β -Lactamase wurden 1:2000 - 1:5000 in PBS-Puffer mit 0,5 % (w/v) BSA und 0,02 % (w/v) NaN₃ verdünnt. Für die Detektion des Biotin-Carboxy-Carrier-Proteins (BCCP) wurde ein *Strep-Tactin*[®]-HRP-Konjugat (IBA, Göttingen) verwendet. Dieses wurde 1:4000 in PBS-Puffer mit 0,5 % (w/v) BSA verdünnt.

Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran dreimal für je 5 Minuten unter leichtem Schwenken mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranen für eine Stunde mit einem sekundären Antikörper schwenkend inkubiert. Für die Detektion von TatA, TatB, TatC und EfeB wurde *goat-anti-rabbit*- und für die Detektion von β -Lactamase *mouse-anti-rabbit*-HRP-Konjugat verwendet. Diese wurden vor der Verwendung 1:3000 in PBS-Puffer mit 0,5 % (w/v) BSA verdünnt. Für die Detektion von BCCP wurde kein sekundärer Antikörper benötigt.

Tabelle 23: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Typ	Antigen	Verdünnung	Quelle
α -EfeB/ α -YcdB	Kaninchen-IgG (Serum)	<i>precursor</i> EfeB/YcdB	1:2000	(Behrendt und Brüser 2014)
α -TatA	Kaninchen-IgG (Serum)	TatA	1:5000	(Mehner <i>et al.</i> 2012)
α -TatB	Kaninchen-IgG (Serum)	TatB	1:5000	(Behrendt und Brüser 2014)

Antikörper	Typ	Antigen	Verdünnung	Quelle
α -TatC	Kaninchen-IgG (Serum)	TatC	1:5000	(Behrendt und Brüser 2014)
α - β -Lactamase	Maus-IgG	β -Lactamase	1:5000	Acris, Herford
<i>goat-anti-rabbit</i> - HRP-Konjugat	Ziegen-IgG (Serum)	Kaninchen- IgG	1:3000	Carl Roth, Karlsruhe
<i>mouse-anti-rabbit</i> - HRP-Konjugat	Maus-IgG (Serum)	Maus-IgG	1:3000	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Strep-Tactin</i> [®] - HRP-Konjugat	rekombinant	Strep-Tag [®] II	1:4000	IBA, Göttingen

Im Anschluss an die Antikörper-Inkubation wurden die Membranen dreimal für 5 Minuten schwenkend in PBS-Puffer gewaschen. Der PBS-Puffer wurde entfernt und je 10 ml der ECL-Entwicklungslösung [100 mM Tris HCl (pH 8,0), 1,25 mM Luminol, 0,225 mM *p*-Coumarinsäure] auf die Membranen gegeben. Stammlösungen von Luminol und *p*-Coumarinsäure wurden bei -20 °C gelagert (250 mM Luminol in DMSO und 90 mM *p*-Coumarinsäure in DMSO). Direkt vor der Entwicklung wurden 6 μ l 30 % (v/v) H₂O₂ zugegeben und die Signale mithilfe eines *MF-ChemiBIS* (DNR, Neve Yamin, Israel) oder eines *ChemoStar 6.0 ECL* (Intas, Göttingen) Fluoreszenz- und Chemilumineszenz-Systems detektiert und aufgenommen. Die Bildverarbeitung wurde mit *ImageJ* (Schneider *et al.* 2012) durchgeführt.

2.4.11 *Antibody stripping* von Western-Blots

Um eine Komigration mehrerer Proteine innerhalb eines Proteinkomplexes nachzuweisen, wurden die gebundenen Antikörper nach der Detektion eines Proteins chemisch entfernt (*Antibody stripping*). Hierfür wurden die Membranen nach der Detektion eines Proteins (siehe Abschnitt 2.4.10) für 20 - 30 Minuten in *AB stripping*-Puffer [100 mM Glycin (pH 2,8), 1 % (w/v) SDS, 0,2 % (v/v) Tween 20] schwenkend inkubiert. Nach mehrfachem Waschen der Membran mit Wasser wurden die Membranen erneut für zwei Stunden in PBS-Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver geblockt. Es folgten drei fünfminütige Waschschrte mit PBS-Puffer. Um sicherzustellen, dass alle primären Antikörper vollständig entfernt wurden, wurde eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper durchgeführt, die Membranen

dreimal für 5 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen und mit einer Belichtungszeit von mindestens 15 Minuten entwickelt (siehe Abschnitt 2.4.10). Sofern keine Signale mehr detektiert werden konnten, wurde die Membran nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten in PBS-Puffer für die Detektion eines weiteren Proteins verwendet. Hierfür wurde erneut eine zweistündige Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper und eine einstündige Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper inklusive der jeweiligen Waschschriffe durchgeführt. (siehe Abschnitt 2.4.10). Für die Illustration der Koloaliation wurden die aufgenommenen Bilder mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms *ImageJ* (Schneider *et al.* 2012) unterschiedlich gefärbt, anhand der Größenstandards und der Abmessungen der Membran kongruent ausgerichtet und die Ebenen multipliziert.

2.5 Funktionalitätstests

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Methoden verwendet, um die untersuchten Tat-Systeme hinsichtlich ihrer Aktivität zu analysieren. Hierbei wurden entweder Phänotypen untersucht, die von transportierten Tat-Substraten vermittelt werden oder die Lokalisation von Tat-Substraten direkt mittels subzellulärer Fraktionierung bestimmt.

2.5.1 *In-vivo*-Translokationsanalyse: Subzelluläre Fraktionierung

Um die Lokalisation von einzelnen Tat-Substraten zu bestimmen, wurde eine *in-vivo*-Translokationsanalyse durchgeführt. Hierfür wurden Periplasma, Membran und Cytoplasma der Zellen einer Kultur voneinander separiert und mittels SDS-PAGE/Western-Blot analysiert.

Für eine Übernackkultur wurden 5 ml LB-Medium, welches die entsprechenden Antibiotika enthielt, mit Zellmaterial aus einer Glycerinkultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Eine Hauptkultur mit einem Volumen von 50 ml und den entsprechenden Zusätzen wurde mit 2 ml der Übernackkultur beimpft und schüttelnd bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 1,5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation für 10 Minuten bei 6.800 xg und 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Für den osmotischen Schock wurde das Zellpellet zunächst in 20 ml TES-Puffer [10 mM Tris HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA, 20 % (w/v) Saccharose] resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut für 10 Minuten bei 6.800 xg und 4 °C sedimentiert, das Pellet in 1 ml 5 mM MgSO₄ resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für 10 Minuten bei 20.000 xg

und 4 °C pelletiert. Aus dem Überstand wurden 100 µl Probe (Periplasma) entnommen und mit 100 µl 2 x SDS-Probenpuffer versetzt. Das Zellpellet wurde erneut in 1 ml 5 mM MgSO₄ resuspendiert und mittels Ultraschall auf Eis aufgeschlossen (3 Minuten, 30 Sekunden Intervalle, *Duty Cycle* 60 %, Intensität 2). Nach dem Zellaufschluss wurden die Zelltrümmer für 10 Minuten bei 20.000 xg und 4 °C sedimentiert. 900 µl des Überstandes wurden in Ultrazentrifugationsgefäße überführt und die Membranen für 30 Minuten bei 130.000 xg und 4 °C pelletiert (*Sorvall Discovery MI20SE*, Thermo Scientific, Dreieich). Aus dem Überstand wurden 100 µl Probe (Cytoplasma) entnommen und mit 100 µl 2 x SDS-Probenpuffer versetzt. Der restliche Überstand wurde verworfen und das Membranpellet in 900 µl 5 mM MgSO₄ resuspendiert. Hiervon wurden 100 µl Probe (Membran) entnommen und mit 100 µl 2 x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben (Periplasma, Cytoplasma, Membran) wurden für SDS-PAGE/Western-Blot-Analysen verwendet. Es wurde ein spezifischer Antikörper gegen das Tat-Substrat EfeB (YcdB) für die Detektion verwendet (siehe **Tabelle 23**). Für die Kontrolle der Fraktionierung wurde außerdem das cytoplasmatische BCCP anhand eines *Strep-Tactin*[®]-HRP-Konjugats und die periplasmatische β-Lactamase mithilfe eines α-β-Lactamase (Maus) Antikörpers und eines *goat-anti-mouse*-HRP-Konjugats detektiert und deren korrekte Lokalisation überprüft. Bei korrekter Lokalisation dieser beiden Proteine konnte die Kontamination des Periplasmas durch cytoplasmatische Proteine aufgrund von Zelllyse ausgeschlossen werden.

2.5.2 SDS-Sensitivitätsmessung

Die SDS-Sensitivitätsmessung beruht auf der Tatsache, dass sich bei *E.-coli*-Stämmen ohne funktionelles Tat-System ein langsames Wachstum in Gegenwart von SDS beobachten lässt. Hierbei spielt die periplasmatische Lokalisierung der Amidasen AmiA und AmiC eine Rolle (Ize *et al.* 2003). Der genaue Zusammenhang zwischen AmiA/AmiC und der SDS-Sensitivität ist jedoch noch nicht bekannt.

Die Bestimmung der SDS-Sensitivität wurde nach einer Methode von Ize *et al.* durchgeführt (Ize *et al.* 2003). Hierfür wurde das Wachstum der zu untersuchenden Stämme in LB-Medium mit sechs unterschiedlichen SDS-Konzentrationen (0; 0,25; 0,5; 1; 2 und 4 % (w/v) SDS) in Triplikaten bestimmt. Es wurde je eine 5 ml Übernachtskultur, welche die entsprechenden Antibiotika enthielt, mit Zellmaterial einer Glycerinkultur beimpft und über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Pro Konzentration und Stamm wurden drei 5 ml Hauptkulturen, die entsprechende Zusätze enthielten, mit 100 µl der Übernachtskultur inokuliert und für drei Stunden schüttelnd bei 37 °C kultiviert. Nach drei Stunden wurde die optische Dichte bei

600 nm bestimmt (*Genesys 20 Spektrophotometer*, Thermo Scientific, Dreieich) und der Mittelwert berechnet. Anschließend wurde das Verhältnis zwischen den erhaltenen Mittelwerten und dem Mittelwert des jeweiligen Stammes bei 0 % (w/v) SDS (=1) bestimmt. Diese normalisierte OD₆₀₀ wurde graphisch gegen die prozentuale SDS-Konzentration aufgetragen. Neben den benötigten Antibiotika wurden auch weitere Zusätze wie Bpa, Arabinose oder Rhamnose direkt beim Beimpfen zugegeben. Teilweise wurden abweichende SDS-Konzentrationen (0; 0,1; 0,5; 1; 2,5 und 4 % (w/v) SDS) verwendet.

2.5.3 Bestimmung des Kettenphänotyps

Der Kettenphänotyp beruht auf der Tatsache, dass sich bei *E.-coli*-Stämmen ohne funktionelles Tat-System Zellketten mikroskopisch beobachten lassen (Stanley *et al.* 2001; Thomas *et al.* 2001). Im Rahmen der Zellteilung spielen die Amidasen AmiA und AmiC bei der Spaltung des Murein-Septums eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund führt das Fehlen von AmiA und AmiC ebenfalls zur Bildung von Zellketten (Heidrich *et al.* 2001). Beide Amidasen werden Tat-abhängig in das Periplasma transportiert, sodass anhand der Zellketten auf die Funktionalität des Tat-Systems geschlossen werden kann (Ize *et al.* 2003; Bernhardt und Boer 2003). Jedoch kann sowohl AmiA als auch AmiC Sec-abhängig transportiert werden (Ize *et al.* 2003; Tullman-Ercek *et al.* 2007). Dies verdeutlicht, dass die Ursachen für die Bildung von Zellketten nicht vollständig geklärt sind.

Die Bestimmung des Kettenphänotyps wurde direkt im Anschluss an die Bestimmung der SDS-Sensitivität (siehe Abschnitt 2.5.2) durchgeführt. Hierfür wurde 1 µl der Kulturen, die in LB-Medium mit 0 % (w/v) SDS gewachsen waren nach dreistündigem Wachstum entnommen, auf Agar-Slides (siehe Abschnitt 2.6.1) getropft und mittels Durchlichtmikroskopie (siehe Abschnitt 2.6.2) untersucht.

2.6 Mikroskopische Methoden

2.6.1 Herstellung von Agar-Slides

Zur Vermeidung von Bewegungsunschärfe bei mikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellen mithilfe einer Agaroseschicht fixiert. Hierfür wurde eine 1 %ige (w/v) Agarose-Lösung erstellt. Durch das Aufkochen der Lösung wurde die Agarose vollständig gelöst und 0,9 ml auf einem Objektträger platziert. Eine glatte und gleichmäßige Oberfläche wurde durch das Auflegen eines weiteren Objektträgers erreicht. Nach der Polymerisation wurde ein Objektträger entfernt und es wurde 1 µl einer Bakteriensuspension (bis zu 10 Proben pro Objektträger) auf der Oberfläche des Agars platziert. Nachdem die Proben eingezogen waren, wurde ein Deckglas darüber platziert und eine mikroskopische Untersuchung durchgeführt.

2.6.2 Durchlichtmikroskopie

Für durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Agar-Slides wurde ein *Axio Imager.M2* Mikroskop mit einer *AxioCam MRm* und einem *EC Plan-Neoluar 100x/1,30* Ölimmersionsobjektiv (Carl Zeiss, Jena) verwendet. Eine Kontrastverstärkung wurde mittels Phasenkontrast (Ringblende Ph3) erreicht. Die Aufnahme erfolgte mit der Software *AxioRel 4.8.2* und die Bildbearbeitung mit der Software *Zen 2.3 (blue edition)* (Carl Zeiss, Jena).

2.7 Geräte und Chemikalien

2.7.1 Zentrifugen und Rotoren

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Zentrifugen mit den entsprechenden Rotoren sind in **Tabelle 24** aufgeführt. Außerdem wurde die Tischzentrifuge *PerfectSpin 24 Plus* (Peqlab/VWR, Erlangen) verwendet.

Tabelle 24: Verwendete Zentrifugen und Rotoren.

Zentrifuge	Rotor	Maximales Volumen
Eppendorf	F-45-30-11	30 x 1,5 bzw. 2 ml
<i>Centrifuge 5804R</i>	A-4-44	4 x 50 ml bzw. 16 x 15 ml
Hermle	220.87	24 x 1,5 bzw. 2 ml
<i>Z326K</i>	220.72	8 x 50 ml bzw. 12 x 15 ml

Zentrifuge	Rotor	Maximales Volumen
Thermo Scientific	A37-8x50	8 x 50 ml
<i>Sorvall Lynx 4000</i>	F10-4x1000	4 x 1000 ml
Thermo Scientific	S100-AT4	6 x 3 ml
<i>Sorvall Discovery M120SE</i>	S55-A2	12 x 1,5 ml
Beckman Coulter	Ti 70.1	12 x 10,4 ml
<i>Optima L-100XP</i>	Ti 70	8 x 26,3 ml

2.7.2 Chemikalien, Enzyme und Wasser

Sofern nicht gesondert aufgeführt wurden Chemikalien der Unternehmen Alfa Aesar (Kandel), AppliChem (Darmstadt), Becton Dickinson GmbH (Heidelberg), Carl Roth (Karlsruhe), IBA (Göttingen), Merck KGaA (Darmstadt), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Oxoid Limited (Basingstoke), SERVA (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und VWR (Erlangen) verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Enzyme wurden vom Unternehmen New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen. Antikörperkonjugate wurden von den Unternehmen Carl Roth (Karlsruhe) und IBA (Göttingen) bezogen.

Für die Herstellung aller Medien wurde vollentsalztes Wasser verwendet. Das Wasser für alle weiteren Puffer und Lösungen wurde aus einer Typ I Wasseraufbereitungsanlage *PURELAB flex* mit einem *LC197* Biofilter (Elga LabWater/Veolia Water Technologies, Celle) entnommen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Einflüsse von TatC_{I50Bpa} auf die Tat-Translokase

Der erste periplasmatische Loop und ein Teil der ersten Transmembranhelix (TMH) bilden die erste periplasmatische Domäne von TatC (siehe **Abbildung 12**). Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass dieser Bereich großen Einfluss auf die Funktionalität und die Stabilität der Tat-Translokase hat (Allen *et al.* 2002; Barrett *et al.* 2005; Kneuper *et al.* 2012). Einige Mutationen in diesem Bereich führen dazu, dass kein Transport von Substraten stattfinden kann. So führt beispielsweise der Austausch von Prolin an Position 48 von TatC durch Alanin bedingt durch die Disassemblierung des Translokons zur Inaktivierung des Tat Systems. (Allen *et al.* 2002; Behrendt und Brüser 2014)

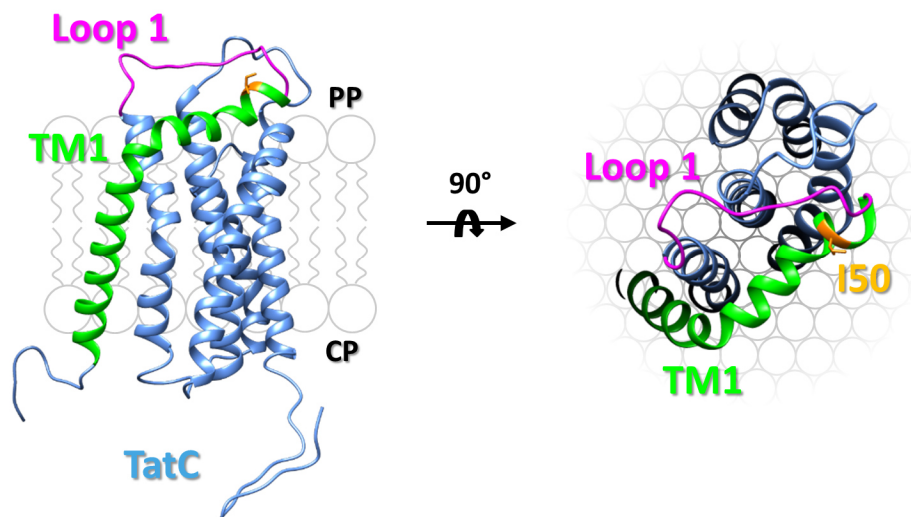


Abbildung 12: Model von TatC aus *E. coli*. Position I50 (orange) befindet sich im Periplasma (PP) am Ende der ersten Transmembranhelix im Übergang zur ersten Schleife (Loop 1). Zusammen bilden diese Bereiche die erste periplasmatische Domäne von TatC. Das Model wurde mit RaptorX (Peng und Xu 2011; Källberg *et al.* 2014) basierend auf der Kristallstruktur von TatC aus *Aquifex aeolicus* (Ramasamy *et al.* 2013) modelliert. Die Bildbearbeitung wurde mit UCSF Chimera (Pettersen *et al.* 2004) durchgeführt. TM: Transmembranhelix, PP: Periplasma, CP: Cytoplasma.

3.1.1 *In-vivo-cross-linking* Studien zu Position 50 von TatC

3.1.1.1 TatC_{I50Bpa} führt zur Bildung von UV-abhängigen TatC-Dimeren

Aufgrund des bekannten Einflusses der ersten periplasmatischen Domäne hat Dr. Eyleen Sabine Heidrich im Rahmen ihrer Masterarbeit (2013), dessen Ziel die Identifizierung von Interaktionsstellen von TatC mit anderen Komponenten des Tat-Translokons war, unter anderem Position 50 von TatC untersucht. Präziser wurden einige Aminosäuren von TatC durch

die unnatürliche Aminosäure *para*-Benzoyl-L-Phenylalanin **2** (Bpa) ausgetauscht (Heidrich 2013). Bpa besitzt eine Benzophenon-Seitenkette (siehe **Abbildung 6**). Durch die Bestrahlung mit UV-Licht bilden sich Radikale, die unspezifisch mit beispielsweise Amidbindungen in unmittelbarer Umgebung reagieren. Befindet sich diese Benzophenon-Seitenkette an einer Position oder in der Nähe einer Position, die in die Interaktion mit einem anderen Protein involviert ist, so lassen sich spezifische Addukte (Homo- oder Heterooligomere) mittels SDS-PAGE und Western-Blot beobachten.

In ihrer Masterarbeit (2013) konnte Dr. Eyleen Sabine Heidrich zeigen, dass der Austausch von Isoleucin durch Bpa an der Position 50 von TatC zur Bildung von TatC-Dimeren führt, welche nur nach der Bestrahlung mit UV-Licht erhalten werden können. Dies legt nahe, dass sich ein Isoleucin 50 eines TatC-Protomers in direkter Nachbarschaft eines weiteren TatC-Protomers befindet. Außerdem zeigt dies, dass ein Isoleucin 50 bei der Dimerisierung von TatC-Protomeren, beispielsweise bei der Assemblierung der Tat Translokase, involviert ist.

Die von Dr. Eyleen Sabine Heidrich durchgeführten Versuche dienten als Ausgangspunkt dieser Arbeit. Um die Ausbeute des kovalent verbundenen TatC-TatC-Dimers zu erhöhen, wurde in dieser Arbeit ein anderes Expressionssystem verwendet. Dabei wurde *tatABC_{H6}* unter der Kontrolle des *tatA*-Promotors exprimiert und auf einem pDE-Derivat codiert. Für die Produktion von TatABC wurde der Tat-defiziente *E.-coli*-Stamm DADE D6 *ara^R* verwendet. Dessen Genom fehlen die Gene *tatA*, *tatB*, *tatC*, *tatD* und *tatE*, sodass die Eigenschaften der Plasmid-codierten Gene der Tat-Komponenten ohne einen Hintergrund aus Wildtyp-Tat-Komponenten untersucht werden konnten. Sollte Bpa in die Peptidsequenz integriert werden, wurden Stämme (*E. coli* DADE D6 *ara^R*) verwendet, die das Plasmid pEVOL-tet besaßen (Young *et al.* 2010). Auf diesem Plasmid ist eine Bpa-spezifische tRNA-Synthase codiert. Diese bewirkt, dass Bpa mithilfe eines Amber-Stopcodon (TAG) in die translatierte Peptidsequenz eingebaut wird. Die Membranen wurden aus 100 ml Kulturvolumen ($OD_{600} = 1.0$) präpariert und mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Eine Reinigung wurde nicht durchgeführt. Die solubilisierten Membranfraktionen wurden nach SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mithilfe von spezifischen Antikörpern gegen TatC und TatB hinsichtlich UV-abhängig gebildeter TatC-Dimere oder kovalent verknüpfter TatB-TatC-Addukte untersucht.

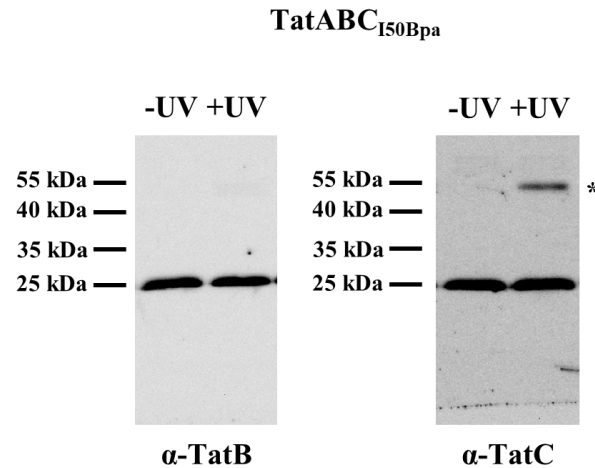


Abbildung 13: TatC_{150Bpa} bildet UV-abhängig Dimere (*). Vergleich der solubilisierten Membranfraktionen aus Kulturen, die vor der Zellernte mit UV-Licht bestrahlt wurden (+UV) mit Kulturen, die nicht bestrahlt wurden (-UV). Die Membranen wurden aus *E. coli* DADE D6 ara^R pEVOL-tet pDE-*tatABC*_{150Bpa-H6} präpariert. SDS-PAGE/Western-Blot-Analyse, 15 %ige SDS-Polyacrylamid Gele, 3 µl Marker- und 10 µl Probenvolumen. Die verwendeten Antikörper sind unter- und die verwendeten Protein-Größenstandards links neben den Blots indiziert. Die Detektion erfolgte mittels einer ECL-Reaktion.

Es ließ sich beobachten, dass die Expression von *tatABC*_{150Bpa} UV-abhängig zur Bildung von TatC-Dimeren führte (siehe **Abbildung 13**, *). Somit konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse von Dr. Eyleen Sabine Heidrich mit dem hier gewählten Expressionssystem reproduziert werden konnten und auf eine Anreicherung von TatC verzichtet werden kann.

3.1.1.2 TatA ist für die Bildung des TatC_{150Bpa}-cross-links nicht notwendig

Des Weiteren wurde der Einfluss von TatA auf die beobachtete Dimerisierung untersucht. Unter natürlichen Bedingungen sind *tatA*, *tatB* und *tatC* im *tatABCD*-Operon organisiert und stehen unter der Kontrolle des *tatA*-Promotors. Bei der Transkription entsteht eine monocistronische mRNA und die Genprodukte TatA, TatB und TatC liegen im Verhältnis 25:1:0,5 vor (Sargent *et al.* 2001). Für die Produktion von TatB und TatC in Anwesenheit von Tata wurde ein Expressionssystem verwendet, bei dem *tatABC* unter der Kontrolle des *tatA*-Promotors exprimiert wird und auf einem pDE- bzw. pABS-Plasmid codiert ist. Für die Produktion von TatB und TatC in Abwesenheit von TatA wurde *tatA* deletiert. Die Expression von *tatBC* unter der Kontrolle des *tatA*-Promotors hat jedoch zur Folge, dass TatB analog zum TatA-Überschuss unter natürlichen Umständen im Überschuss vorliegt.

Aus diesem Grund wurde für die Produktion von TatB und TatC in Abwesenheit von TatA ein Expressionssystem verwendet, bei dem *tatBC_{H6}* unter der Kontrolle des *tet*-Promotors steht und auf einem pZX31-Plasmid kodiert ist.

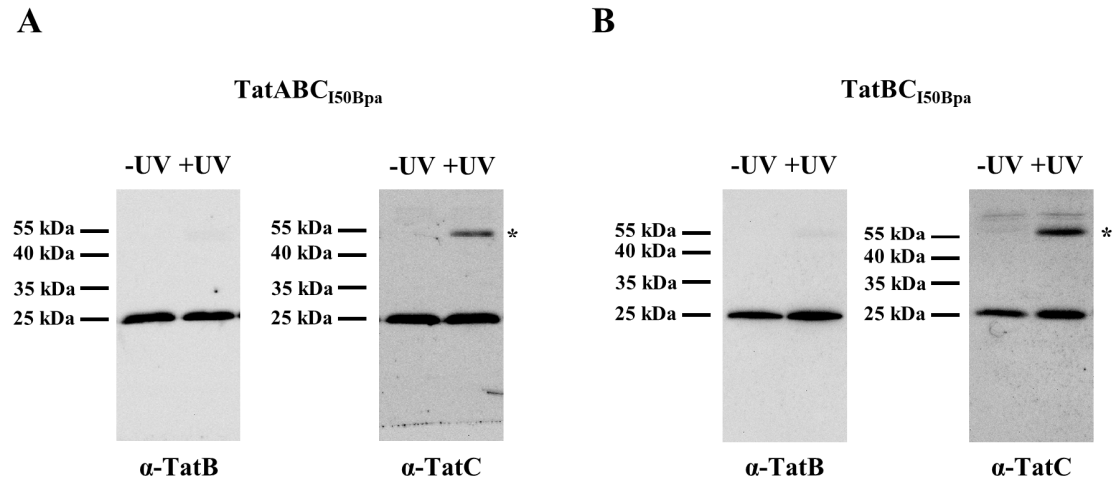


Abbildung 14: TatC_{150Bpa} bildet UV-abhängig Dimere (*). Vergleich der solubilisierten Membranfraktionen aus Kulturen, die vor der Zellernte mit UV-Licht bestrahlt wurden (+UV) mit Kulturen, die nicht bestrahlt wurden (-UV). Die Membranen wurden aus *E. coli* DADE D6 ara^R pEVOL-tet pDE-*tatABC*_{150Bpa-H6} (A) bzw. aus *E. coli* DADE D6 ara^R pEVOL-tet pZX31-*tatBC*_{150Bpa-H6} (B) präpariert. SDS-PAGE/Western-Blot-Analyse, 15 %ige SDS-Polyacrylamid Gele, 3 µl Marker- und 10 µl Probenvolumen. Die verwendeten Antikörper sind unter- und die verwendeten Protein-Größenstandards links neben den Blots indiziert. Die Detektion erfolgte mittels einer ECL-Reaktion.

Analog zu den in Abschnitt 3.1.1.1 durchgeführten Experimenten wurden auch in Abwesenheit von TatA durch den Austausch von Isoleucin an der Position 50 von TatC durch Bpa UV-abhängige TatC-Dimere erhalten (siehe **Abbildung 14B**, *). Die Bildung von UV-abhängigen TatC-Dimeren ist somit unabhängig von TatA.

3.1.2 TatC_{150Bpa} beeinflusst nicht die Funktionalität des Tat-Systems

Einige Mutationen im Bereich der ersten periplasmatischen Domäne von TatC gehen mit einer Inaktivierung des Tat-Translokons einher. Aus diesem Grund wurden die Tat-Systeme, die die TatC_{150Bpa}-Variante beinhalten auf ihre Funktionalität hin überprüft. Hierbei können verschiedene Eigenschaften des Tat-Systems bzw. seiner Substrate genutzt werden, um die Funktionalität der Tat-Translokase zu analysieren. So kann ein inaktives Tat-System dazu führen, dass Substrate nicht mehr über die Cytoplasmamembran transportiert werden können. Periplasma, Membran und Cytoplasma können mittels subzellulärer Fraktionierung voneinander getrennt

(fraktioniert) und mittels SDS-PAGE/Western-Blot hinsichtlich der Anwesenheit bestimmter Tat-Substrate analysiert werden. Der Einfluss des Austausches von TatC Isoleucin 50 durch Bpa auf die Funktionalität der Tat-Translokase wurde mithilfe dieser Methode analysiert und die Translokation des Tat-Substrates EfeB (Sturm *et al.* 2006) untersucht. Hierfür wurde ein Stamm (*E. coli* DADE D6 ara^R) verwendet, der neben einem pDE-Derivat zur Produktion der Tat-Komponenten und dem pEVOL-Plasmid auch ein pBW-Derivat (pBW-*efeB*_{Strep}) enthält, welches zur Produktion von EfeB dient.

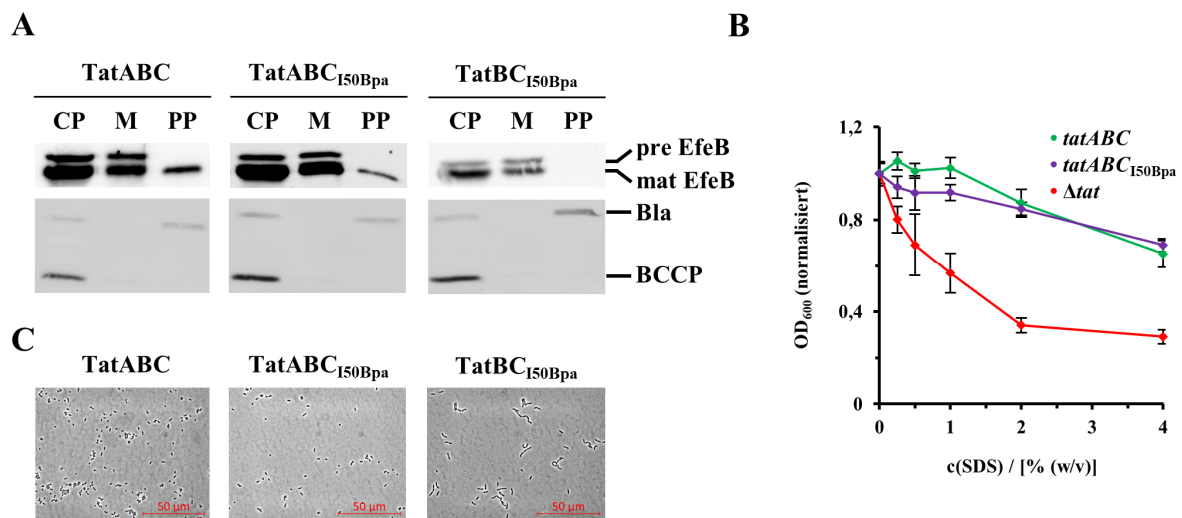


Abbildung 15: TatC_{150Bpa} führt nicht zu einer Inaktivierung des Tat-Systems. Funktionsanalysen von TatABC_{150Bpa}- und TatBC_{150Bpa}-Systemen. **(A)** SDS-PAGE/Western-Blot-Analyse der *in-vivo*-Translokationsanalyse des Tat-Substrates EfeB unter Verwendung eines Antikörpers gegen EfeB (A, oben, 10 %ige SDS-Gele). Verwendet wurden Stämme (*E. coli* DADE D6 ara^R), die die Plasmide pEVOL-tet und pBW-*efeB*_{Strep} sowie pDE- bzw. pZX31-Derivate für die Produktion der Tat-Komponenten (pDE-*tatABC*_{H6}, pDE-*tatABC*_{150Bpa-H6} bzw. pZX31-*tatBC*_{H6}) besitzen. Als Fraktionierungskontrolle dienten β -Lactamase (Bla, α -Bla, periplasmatisch) und das Biotin Carboxyl Carrier Protein (BCCP, α -Strep, cytoplasmatisch) (A, unten, 15 %ige SDS-Gele). **(B)** SDS-Sensitivitätsmessung des TatABC-Systems mit TatC_{150Bpa} im Vergleich zum Wildtyp-TatABC-System und dem Tat defizienten *E. coli* Stamm DADE D6 ara^R. Aufgetragen ist die normalisierte optische Dichte bei 600 nm gegen die prozentuale SDS-Konzentration des verwendeten LB-Mediums. **(C)** Phasenkontrastmikroskopie der verwendeten Stämme.

Im Gegensatz zu anderen inaktivierenden Aminosäuresubstitutionen innerhalb der ersten periplasmatischen Domäne konnte für TatABC_{150Bpa}-Systeme der Transport des Tat-Substrates EfeB mittels subzellulärer Fraktionierung nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 15**).

Manche Tat-Substrate sind außerdem an Prozessen beteiligt, die sich mikroskopisch oder photometrisch analysieren lassen. Beispielsweise werden Amidasen, die eine wichtige Rolle während der Zellteilung spielen, durch das Tat-System transportiert. So wird vermutet, dass das Vorliegen der Tat-abhängig transportierten Amidasen AmiA und AmiC im Periplasma essenziell für eine effiziente Trennung der Zellen nach der Zellteilung ist. Liegen AmiA und AmiC nicht im Periplasma vor können mittels Phasenkontrastmikroskopie Zellketten beobachtet werden. Für TatABC_{I50Bpa}-Systeme konnten jedoch keine Zellketten beobachtet werden. Das deutet darauf hin, dass ein aktives Tat-System vorliegt (siehe **Abbildung 15C**). Außerdem wird vermutet, dass der Export von AmiA und AmiC ebenfalls eine Resistenz gegen SDS vermittelt, sodass Zellen von *E. coli* unverändert in LB-Medium wachsen können, das SDS enthält. Liegt ein inaktives Tat-System vor, ist das Wachstum deutlich verlangsamt, wenn dem Medium SDS zugegeben wird (Ize *et al.* 2003). **Abbildung 15B** verdeutlicht, dass durch TatC_{I50Bpa} keine SDS-Sensitivität vermittelt wurde und bestätigt somit die Beobachtungen der anderen Funktionalitätsanalysen. Als Negativkontrolle wurden TatBC_{I50Bpa}-Systeme verwendet, da die Anwesenheit von TatA essenziell für Funktionalität des Tat-Systems ist.

3.1.3 TatC_{I50Bpa} stabilisiert Tat-Komplex 3

Vorherige Untersuchungen von Punktmutationen innerhalb der ersten periplasmatischen Domäne von TatC wiesen nicht nur darauf hin, dass dieser Bereich einen bedeutenden Einfluss auf die Aktivität des Tat-Systems hat (Allen *et al.* 2002; Kneuper *et al.* 2012). Untersuchungen der Tat-Komplexe mittels BN-PAGE/Western-Blot ergaben außerdem, dass die Inaktivierung des Tat-Systems in einigen Fällen, wie bspw. TatC_{P48A}, auf einer Destabilisierung der Tat-Komplexe beruht. So konnte zum Beispiel für TatC_{P48A} eine Disassemblierung der Tat-Komplexe beobachtet werden (Barrett *et al.* 2005; Behrendt und Brüser 2014). Ist die Stabilität der Tat-Komplexe verringert, sind diese nach Solubilisierung nicht mehr detektierbar. Im Falle von TatC_{P48A} führt die Destabilisierung dazu, dass statt der literaturbekannten 440 kDa und 580 kDa Komplexe nur kleinere Assemblierungen stabil genug sind, um nach Solubilisierung, BN-PAGE und Western-Blotting detektiert werden zu können (Barrett *et al.* 2005; Behrendt und Brüser 2014). Da es sich bei den literaturbekannten Tat-Komplexen um verschiedene Assemblierungsstadien handelt, deren Molekulargewicht maßgeblich von der Menge an TatA, die am Komplex gebunden ist, abhängt, sollen die Komplexe im Folgenden nach ihrem TatA-Assemblierungsstadium benannt werden. Komplexe, die auch TatA-unabhängig gebildet werden und ein Molekulargewicht von ca. 440 kDa aufweisen (Behrendt und Brüser 2014),

sollen im Folgenden als Tat-Komplex 1 bezeichnet werden. Komplexe, die nur in Anwesenheit von TatA oder bei Überproduktion von TatB gebildet werden und eine Molekulargewicht von ca. 580 kDa aufweisen (Behrendt *et al.* 2007; Behrendt und Brüser 2014) werden folgend als Tat-Komplex 2 bezeichnet.

Aufgrund der Destabilisierung der Tat-Komplexe durch Mutationen innerhalb der ersten periplasmatischen Domäne von TatC und der UV-abhängigen Dimerisierung (siehe Abschnitt 3.1.1) wurde der Einfluss auf die Tat-Komplexe von TatC_{150Bpa} bereits im Rahmen der Masterarbeit von Christoph Stefan Nikolin (2016) untersucht. Die Untersuchung der Tat-Komplexe mittels BN-PAGE/Western-Blot zeigte, dass TatC_{150Bpa} nicht zur Disassemblierung, sondern zu einer Stabilisierung von Tat-Komplexen mit signifikant höherem Molekulargewicht führt. Im Rahmen der Masterarbeit von Christoph Stefan Nikolin konnte auch gezeigt werden, dass die Stabilisierung dieser Komplexe, im Gegensatz zur Dimerisierung von TatC_{150Bpa}, nicht von der Bestrahlung mit UV-Licht bzw. der Bildung von kovalent verknüpften TatC-Protomeren abhängig ist und auch UV-unabhängig zu beobachten war (Nikolin 2016).

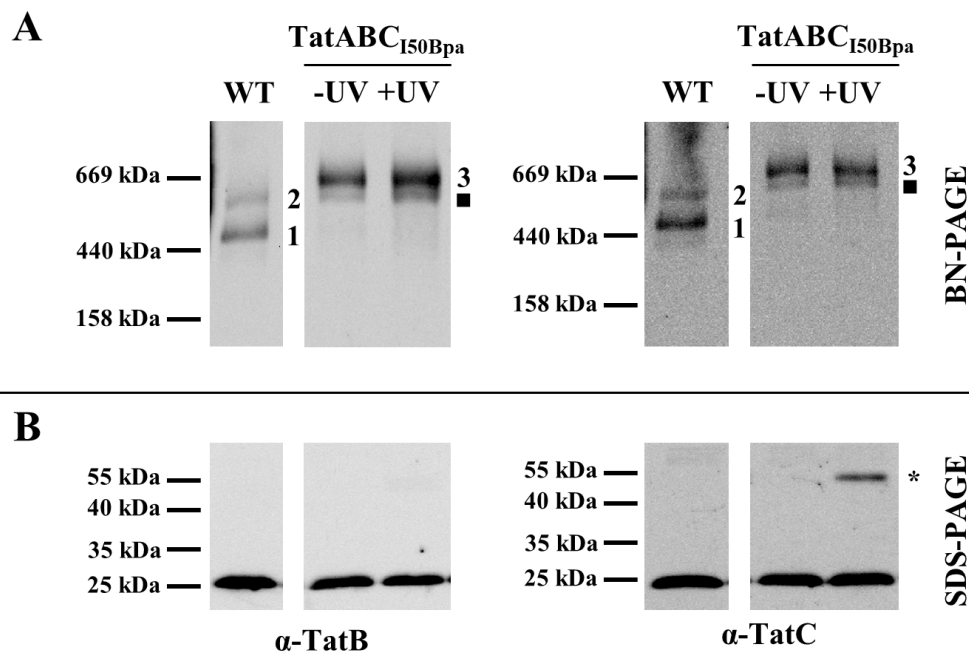


Abbildung 16: TatC_{150Bpa} führt zur Stabilisierung eines neuen Tat-Komplexes (3) mit signifikant erhöhtem Molekulargewicht. **(A)** BN-PAGE/Western-Blot-Analyse der Membranfraktion, präpariert aus TatABC_{150Bpa} produzierenden Stämmen (*E. coli* DADE D6 ara^R pDE-*tatABC*_{150Bpa}) im Vergleich mit dem Wildtyp-Tat-System. 5 - 13.5 %ige BN-Acrylamidgele, 10 µl Marker- und Probenvolumen. **(B)** Dazugehörige SDS-PAGE/Western-Blot-Analyse. 15 %ige Acrylamidgele, 3 µl Marker- und 10 µl Probenvolumen. Die verwendeten Größenstandards sind links neben- und die verwendeten Antikörper unterhalb den Blots indiziert. Ein (■) markiert einen leichteren Tat-Komplex, der nicht genau zugeordnet werden kann.

Im Rahmen dieser Dissertation konnten die von Christoph Stefan Nikolin beschriebenen Ergebnisse reproduziert werden (siehe **Abbildung 16A**, 3). Weitergehend konnte beobachtet werden, dass nicht nur eine Spezies von Tat-Komplexen durch TatC_{150Bpa} stabilisiert wurde. Neben Komplexen mit erhöhtem Molekulargewicht (siehe **Abbildung 16A**, 3) wurden auch leichtere Komplexe (siehe **Abbildung 16A**, ■) detektiert, die in ihrem Gewicht etwa dem von Komplex 2 (siehe **Abbildung 16A**, 2) oder Komplex 2S (siehe **Abbildung 17**, 2S) des Wildtyp-Tat-Systems entsprechen. Tat-Komplex 2S entspricht einem Substrat-assoziierten Tat-Komplex 2 (Behrendt und Brüser 2014), auf den später noch genauer eingegangen werden soll. Eine Differenzierung zwischen Komplex 2 und Komplex 2S kann jedoch nicht allein anhand der Größe durchgeführt werden und wurde im Rahmen späterer Experimente durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.4). Da der beobachtete Tat-Komplex sich bezüglich seines Migrationsverhaltens deutlich von den Komplexen 1 und 2 unterscheidet, soll dieser im Folgenden als Komplex 3 bezeichnet. Nachfolgend sollte dieser Komplex charakterisiert werden.

3.2 Charakterisierung von Tat-Komplex 3

Tat-Komplex 3 wurde im Rahmen der Masterarbeit von Christoph Stefan Nikolin das erste Mal beobachtet und unterschied sich bezüglich des Migrationsverhaltens deutlich von den zuvor charakterisierten Tat-Komplexen (siehe **Abbildung 17**). **Abbildung 17** zeigt einen Vergleich des Migrationsverhaltens der zuvor charakterisierten Tat-Komplexe 1 und 2 und der Substrat-assoziierten Tat-Komplexe 1S und 2S des Wildtyp-Tat-Systems mit Tat-Komplex 3 und einem leichteren Komplex des TatABC_{150Bpa}-Systems. Die Substrat-assoziierten Tat-Komplexe 1S und 2S können beobachtet werden, wenn das Tat-Substrat EfeB überproduziert wird (Behrendt und Brüser 2014). Die Ursachen, aus denen TatC_{150Bpa} zur Detektion eines unbekanntes Komplexes führte, wurden nicht genauer untersucht. Um die Ursachen zu klären, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Charakterisierung von Tat-Komplex 3 durchgeführt werden.

Da Proteinkomplexe bei der BN-PAGE in ihrer nativen Form voneinander separiert werden, findet die Auftrennung streng genommen nicht anhand ihres Molekulargewichtes, sondern anhand ihrer Oberfläche statt. Dabei interagiert der verwendete Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G250 mit den hydrophoben Bereichen der Proteinkomplexe und ersetzt so nach und nach das nicht-ionische Detergens Digitonin, das zur Solubilisierung verwendet wurde. Coomassie-Brilliantblau dient dabei als Ladungsträger.

Abbildung 17 zeigt den Vergleich der TatABC_{150Bpa}-Komplexe mit den bisher bekannten Tat-Komplexen. Es wird deutlich, dass Tat-Komplex 3 ein signifikant differierendes Migrationsverhalten in der BN-PAGE zeigt. Aufgrund der Methodik lässt sich das Molekulargewicht nur ungenau bestimmen. Das Migrationsverhalten weist jedoch darauf hin, dass die Tat-Komplexe sich durch unterschiedlich große Oberflächen auszeichnen. Dies könnte bedeuten, dass Tat-Komplex 3 ein Assemblierungsstadium darstellt, in dem eine oder mehrere Komponenten des Tat-System in verstärktem Maße mit dem Translokon interagieren, sodass sich dessen Oberfläche verändert.

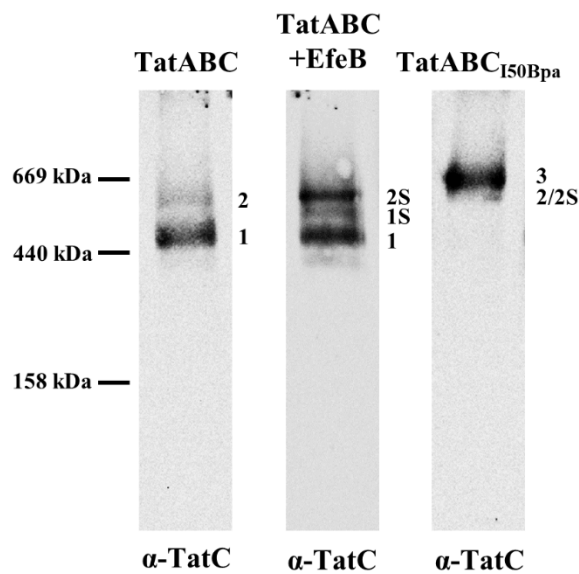


Abbildung 17: Der durch TatC_{150Bpa} stabilisierte Tat-Komplex entspricht keinem der bisher charakterisierten Tat-Komplexe. BN-PAGE/Western-Blot-Analyse von TatABC_{150Bpa}-Komplexen im Vergleich mit Wildtyp-Tat-Komplexen. Wird *tatABC* auf einem Plasmid mit mittlerer Kopienzahl (pDE) codiert, sind die Tat-Komplexe 1 und 2 detektierbar (links). Wird zusätzlich das Tat-Substrat EfeB überproduziert (pBW), sind die Substrat-assoziierten Tat-Komplexe 1S und 2S detektierbar (Mitte). Der neue TatABC_{150Bpa}-Komplex 3 entspricht keinem der zuvor charakterisierten Tat-Komplexe. Der leichtere TatABC_{150Bpa}-Komplex (2/2S) ist nicht nur anhand seines Migrationsverhaltens einzuordnen (rechts).

3.2.1 Tat-Komplex 3 wird auch durch TatC_{150Y} stabilisiert

Die zuvor durchgeführten BN-PAGE/Western-Blot-Analysen gemeinsam mit den SDS-PAGE/Western-Blot-Analysen lassen darauf schließen, dass die Stabilisierung von Tat-Komplex 3 unabhängig von der UV-induzierten kovalenten Dimerisierung von TatC_{150Bpa}-Protomeren ist. So konnte auch ohne die Bestrahlung mit UV-Licht Tat-Komplex 3 erhalten werden, obwohl hierbei keine kovalente Verknüpfung von TatC_{150Bpa}-Protomeren beobachtet wurde (siehe **Abbildung 16**).

Aus diesem Grund wurde folgend untersucht, ob Komplex 3 nur durch den Austausch der Isopropyl-Seitenkette des Isoleucins durch eine aromatische Seitenkette, die bei Bpa vorhanden ist, stabilisiert wird. Um diese Fragestellung genauer zu untersuchen, wurde Isoleucin 50 von TatC durch die natürlichen aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (F), Tyrosin (Y) und Tryptophan (W) ausgetauscht. Anhand des SDS- und des Kettenphänotyps wurden die Tat-Systeme zunächst hinsichtlich ihrer Funktionalität untersucht (siehe **Abbildung 18A** und **B**).

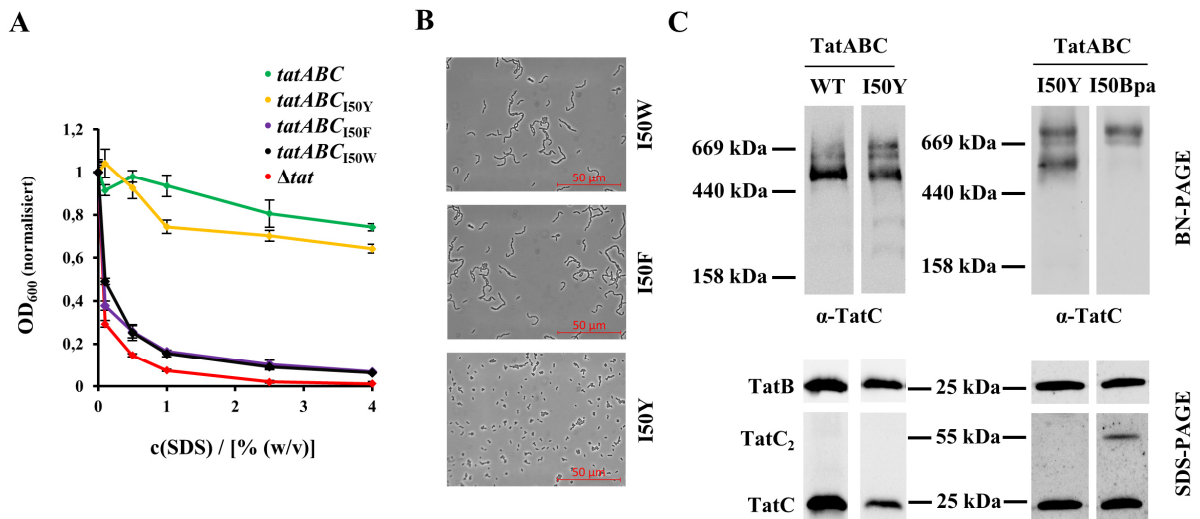


Abbildung 18: TatC_{150Y} führt ebenfalls zur Stabilisierung des neuen Tat-Komplexes mit signifikant erhöhtem Molekulargewicht. Funktionalitätsanalysen von TatC_{150F}, TatC_{150Y} und TatC_{150W} sowie vergleichende BN-PAGE/Western-Blot-Analysen von TatC_{150Y}. **(A)** SDS-Sensitivitätsmessung von Stämmen (*E. coli* DADE D6 ara^R), die TatABC_{150F}, TatABC_{150Y} und TatABC_{150W} produzieren (pABS). Aufgetragen ist die normalisierte optische Dichte bei 600 nm gegen die prozentuale SDS-Konzentration des verwendeten LB-Mediums. **(B)** Mikroskopische Bestimmung des Kettenphänotyps der entsprechenden Stämme. **(C)** BN-PAGE/Western-Blot-Analysen zum Vergleich von TatABC_{150Y} mit Wildtyp-TatABC und TatABC_{150Bpa} sowie die dazugehörigen SDS-PAGE/Western-Blot-Analysen.

Die Analysen der SDS-Sensitivität und des Kettenphänotyps zeigten, dass der Austausch von Isoleucin 50 in TatC gegen Phenylalanin (TatC_{150F}) und Tryptophan (TatC_{150W}) zu einer Inaktivierung des Tat-Systems führte. Bei einem Austausch gegen Tyrosin (TatC_{150Y}) hingegen ließ sich keine Inaktivierung beobachten (siehe **Abbildung 18A** und **B**). Aus diesem Grund wurde der Austausch von TatC₁₅₀ durch Tyrosin genauer untersucht. Vergleichende BN-PAGE/Western-Blot-Analysen von $tatABC_{150Y}$ exprimierenden Stämmen zeigten, dass dieser Austausch ebenfalls zur Detektion zweier Tat-Komplexe mit einem im Vergleich zu den Tat-Komplexen 1 und 2 des Wildtyp-Tat-Systems erhöhten Molekulargewicht führte (siehe **Abbildung 18C**, links). Weitere Analysen, in denen TatABC_{150Y} direkt mit TatABC_{150Bpa}

verglichen wurde, verdeutlichen weiter, dass beide Modifikationen zur Detektion der identischen Tat-Komplexe führen (siehe **Abbildung 18C**, rechts).

Der Austausch von TatC Isoleucin 50 durch Tyrosin bestätigt, dass die Stabilisierung des Tat-Komplexes 3 nicht durch die Bildung kovalent verknüpfter TatC-Protomere ausgelöst wird, sondern dass die Stabilisierung des Tat-Komplexes 3 nur durch den Austausch von Isoleucin 50 durch eine aromatische Aminosäure bedingt ist.

Aus diesem Grund wurde in den folgenden Experimenten, sofern es um die Charakterisierung des Tat-Komplexes 3 ging, auf das UV-abhängige *cross-linking* von TatC-Protomeren verzichtet.

3.2.2 Tat-Komplex 3 beinhaltet kein Substrat

Bereits aus vorherigen Studien ist bekannt, dass unterschiedliche Molekulargewichte der Tat-Komplexe durch eine veränderte Stöchiometrie zwischen den einzelnen Komponenten des Tat-Systems hervorgerufen werden können. So kann beispielsweise die Überproduktion des Tat-Substrates EfeB (früher YcdB) das Gleichgewicht zwischen den Tat-Komplexen insofern beeinflussen, dass vermehrt Tat-Komplexe vorliegen, die mit EfeB assoziiert sind (Behrendt und Brüser 2014). Wie bereits beschrieben wird durch das veränderte Assemblierungsstadium auch das Migrationsverhalten in nativen Gelen verändert, sodass diese Komplexe in der Regel bei einem höheren Molekulargewicht migrieren. Des Weiteren sind Varianten von TatC (TatC_{Y154A}, TatC_{P172A}) bekannt, die eine Substratassoziation stabilisieren. In diesen Fällen können bereits ohne die Überproduktion von Tat-Substraten Tat-Komplexe detektiert werden, die in ihrem Molekulargewicht dem von Substrat-assoziierten Tat-Komplexen entsprechen. Da jedoch in der Regel nicht nur die Assoziation eines bestimmten Substrates stabilisiert wird, ist meist kein einzelnes Substrat in so hohem Grade assoziiert, dass eines der Substrate mittels BN-PAGE/Western-Blot detektiert werden kann (siehe **Abbildung 17**, Mitte) (Behrendt und Brüser 2014). Dieses Problem kann beispielsweise durch die Überproduktion von EfeB gelöst werden. Die hohe Konzentration bewirkt, dass das Gleichgewicht in Richtung der Komplexe beeinflusst wird, die mit EfeB assoziiert sind. In der Folge kann die Kolo-kalisation von EfeB mit den Tat-Komponenten TatB und TatC detektiert werden (Behrendt und Brüser 2014).

Eine weitere Möglichkeit zu untersuchen, ob ein Komplex Substrat-assoziiert ist, ist die Veränderung der Substrataffinität von Tat-Komplexen. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass bestimmte Aminosäuren von TatC essenziell für die Interaktion des Tat-Translokons mit Substraten sind (Zoufaly *et al.* 2012). Dabei zeigte sich, dass vor allem die Glutaminsäure an Position 103 und das Phenylalanin an Position 94 von TatC eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit Signalpeptiden von Substraten spielen. Werden diese Aminosäuren ausgetauscht, nimmt die Substratbindung je nach Substrat signifikant ab. Dabei hat sich die Substitution von Glutaminsäure 103 gegen Alanin ($TatC_{E103A}$) und von Phenylalanin 94 gegen Glutamin ($TatC_{F94Q}$) als besonders effektiv erwiesen. Durch die Kombination beider Substitutionen kann die Bindung von Substraten noch stärker eingeschränkt werden (Huang *et al.* 2017).

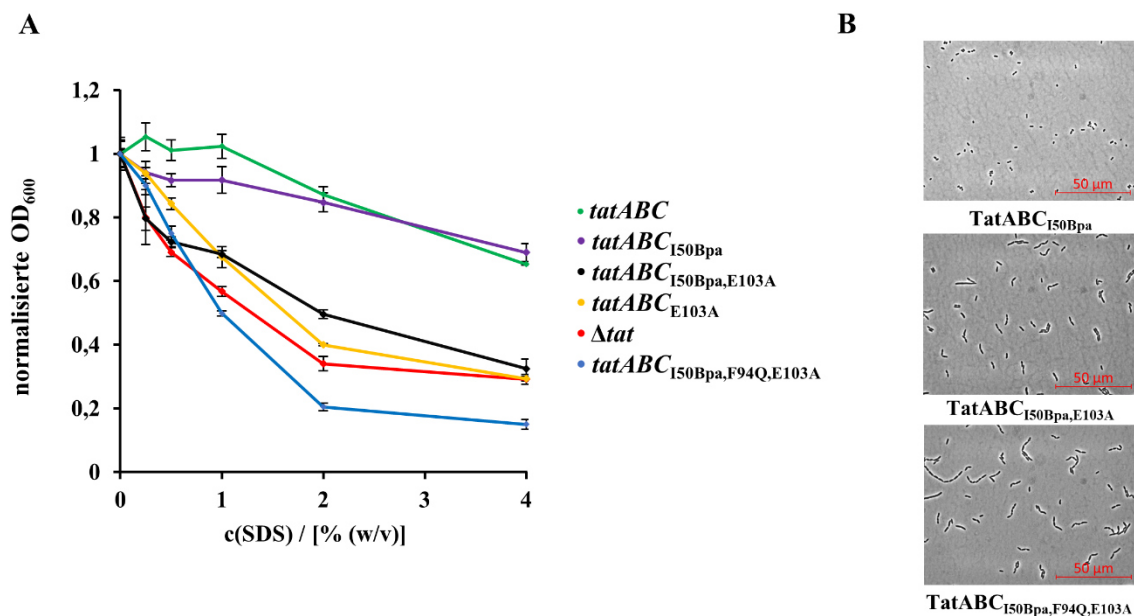


Abbildung 19: Die Veränderung der Substrataffinität führt zur Inaktivierung des $TatABC_{150Bpa}$ -Systems. Funktionalitätsanalyse von Tat-Systemen mit veränderter Substrataffinität. Hierfür wurden Stämme (*E. coli* DADE D6 *ara*^R verwendet, die $TatABC$ -Systeme mit unterschiedlichen TatC-Varianten produzieren (pDE). **(A)** SDS-Sensitivitätsmessung. Aufgetragen ist die normalisierte optische Dichte bei 600 nm gegen die prozentuale SDS-Konzentration des verwendeten LB-Mediums. **(B)** Phasenkontrastmikroskopie der verwendeten Stämme.

Diese Aminosäuresubstitutionen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf genetischer Ebene in die verwendeten Konstrukte (pDE und pZX31) mittels *QuikChange*[®]-Mutagenese oder Fusions-PCR eingebracht. **Abbildung 19** zeigt, dass auch für das hier verwendete Expressionssystem eine Inaktivierung des Tat-Systems beobachtet werden konnte, wenn die TatC-Varianten $TatC_{E103A}$ und $TatC_{F94Q}$, sowohl einzeln als auch in Kombination eingeführt

wurden. Zudem konnte ein deutlich stärkerer Effekt beobachtet werden, wenn diese Mutationen kombiniert wurden (siehe **Abbildung 19A**, vergleiche *tatABC*_{150Bpa,E103A} (schwarz) und *tatABC*_{150Bpa,F94Q,E103A} (blau)). Diese Veränderungen der Substrataffinität führen dazu, dass mittels BN-PAGE/Western-Blot keine Substrat-assoziierten Tat-Komplexe mehr detektiert werden können (Behrendt und Brüser 2014).

Eine plausible Möglichkeit für das erhöhte Molekulargewicht von Tat-Komplex 3 stellt daher eine stabilisierte Assoziation von Substraten und Tat-Komplexen dar. Basierend auf den oben genannten Möglichkeiten sollte diese Fragestellung im Folgenden bearbeitet werden. Hierfür wurde das Tat-Substrat EfeB mithilfe eines induzierbaren Expressionssystems produziert. Außerdem wurde die Substrataffinität mit den oben genannten TatC-Varianten modifiziert. Anschließend wurden die Tat-Komplexe mittels BN-PAGE und Western-Blot analysiert (siehe **Abbildung 20**).

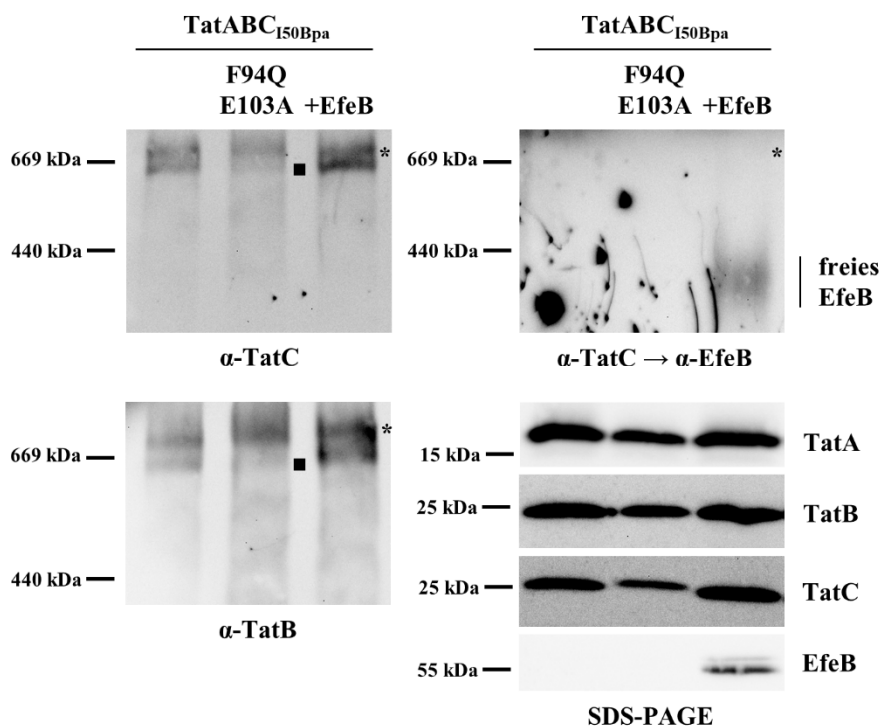


Abbildung 20: Tat-Komplex 3 (*) ist nicht mit Substraten assoziiert. Der leichtere Tat-Komplex (■) scheint jedoch mit der Bindung von Substraten im Zusammenhang zu stehen. Analyse der Kolo-kalisation von EfeB und den Tat-Komponenten mittels BN-PAGE/Western-Blot (*E. coli* DADE D6 ara^R, pDE, 10 µl Marker- und Probenvolumen, 4 - 12 %ige BN-Acrylamidgele) und *AB stripping* sowie die dazugehörigen SDS-PAGE/Western-Blot-Analysen (3 µl Marker- und 10 µl Probenvolumen, 15 %ige Acrylamidgele). EfeB kann auch nach der Überproduktion (pBW) nicht in Tat-Komplex 3 (*) detektiert werden. Die Veränderung der Substrataffinität durch *TatC*_{F94Q,E103A} beeinflusst die Bildung von Komplex 3 nicht, jedoch die des leichteren Komplexes (■).

Um die Assoziation von EfeB mit dem Tat-Komplex 3 zu untersuchen, wurde der TatC-spezifische Antikörper nach der Entwicklung der Membran entfernt (*AB stripping*) und die Membran anschließend mit EfeB-spezifischen Antikörpern entwickelt. Auf diese Weise können zwei Proteine auf einer Membran nachgewiesen werden, sodass eine Aussage über die Kolo-kalisation getroffen werden kann. Eine Kolo-kalisation von EfeB und Tat-Komplex 3 konnte dabei nicht beobachtet werden (siehe **Abbildung 20**, *). Auch die Modifizierung der Substratbindung durch TatC_{F94Q,E103A} ließ auf keinen Effekt der Substratbindung auf die Assemblierung von Tat-Komplex 3 schließen. Auffällig war jedoch, dass die Modifikation der Substrataffinität dazu führte, dass der leichtere Tat-Komplex (2 oder 2S) in deutlich verringertem Maße detektiert wurde (siehe **Abbildung 20**, ■). Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei dem leichteren Tat-Komplex möglicherweise um den Substrat-assoziierten Tat-Komplex 2S handelt. Diese Hypothese soll in Abschnitt 3.2.5 genauer untersucht werden.

3.2.3 Tat-Komplex 3 assembliert nur in Gegenwart von Tata

Neben der Überproduktion von einzelnen Komponenten des Tat-Systems kann das Gleichgewicht auch durch das Fehlen einzelner Komponenten beeinflusst werden. Fehlen Interaktionspartner, die für das nächste Assemblierungsstadium notwendig sind, akkumulieren die Proteinkomplexe, die sich aus den verfügbaren Komponenten zusammensetzen (Behrendt und Brüser 2014). Auf diese Weise werden Proteinkomplexe detektierbar, die in Anwesenheit aller Komponenten aufgrund ihrer Kurzlebigkeit nicht detektierbar sind. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Stöchiometrie zwischen den Tat-Komponenten. Aufgrund der strukturellen und biochemischen Ähnlichkeit zwischen Tata und TatB können TatB-Protomere mit der Tata-Bindestelle von TatC interagieren. Jedoch ist die Affinität von TatB zu dieser Bindestelle deutlich niedriger als die von Tata (Habersetzer *et al.* 2017). Wird *tatBC* unter der Kontrolle des *tatA*-Promotors exprimiert, liegt TatB im Überschuss vor, sodass TatB wahrscheinlich mit Tata-Bindestellen von TatC interagiert. Dies würde erklären, warum Tat-Komplex 2 in Abwesenheit von Tata erhalten werden konnte, wenn TatB überproduziert wurde (Behrendt *et al.* 2007). Aus diesem Grund wurde für Experimente, die der Analyse des Tat-Systems in Abwesenheit von Tata dienen, *tatBC* unter der Kontrolle des *tet*-Promotors exprimiert. Hierbei ist die Effizienz der Transkription aufgrund des Promotors deutlich geringer, wodurch letztlich weniger Protein produziert wird (siehe **Abbildung 21**, SDS-PAGE, vergleiche ABC (P_{tatA}) und BC ($P_{LtetO-1}$)). Die geringere TatB-Konzentration hat wahrscheinlich zur Folge, dass keine Tata-Bindestellen durch TatB besetzt werden können. Dies würde das Fehlen von Tat-

Komplex 2 nach der Expression von *tatBC* unter der Kontrolle des *tet*-Promotors erklären (Behrendt und Brüser 2014). Auf den Einfluss der Stöchiometrie der Tat-Komponenten und den Einfluss der TatB-Konzentration auf die Tat-Komplexe soll im späteren Verlauf dieser Arbeit noch detaillierter eingegangen werden (siehe Abschnitt 3.3.4). Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Analyse von TatBC-Komplexen Stämme (*E. coli* DADE D6 ara^R) verwendet, die *tatBC* unter der Kontrolle des *tet*-Promotors exprimieren und mit den entsprechenden Stämmen verglichen, die *tatABC* unter der Kontrolle des *tatA*-Promotors exprimieren (siehe **Abbildung 21**).

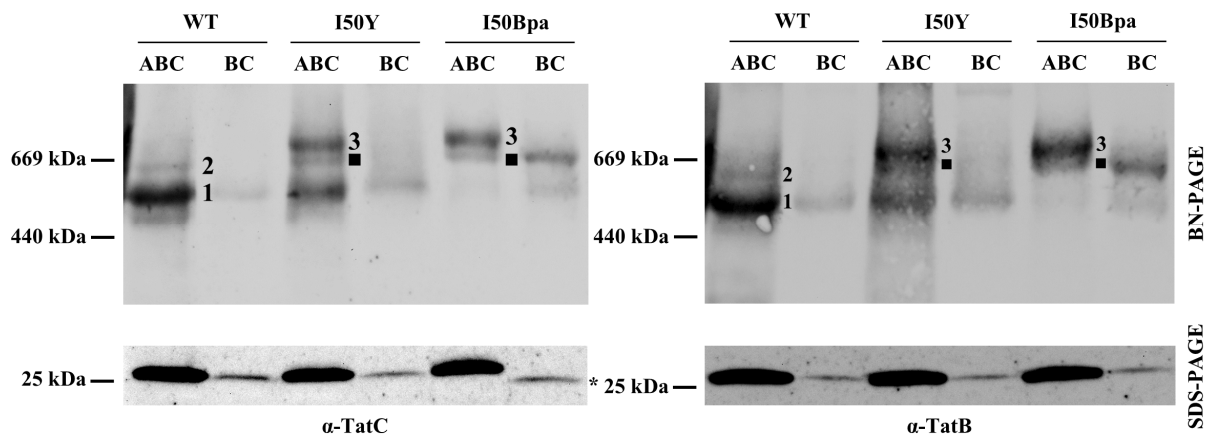


Abbildung 21: Tat-Komplex 3 ist nur in Anwesenheit von TatA detektierbar. In Abwesenheit von TatA wird durch TatC_{I50Bpa} ein leichterer Komplex (■) stabilisiert, der Tat-Komplex 2 oder 2S entspricht. BN-PAGE/Western-Blot-Analyse der solubilisierten Membranfraktionen aus Stämmen (*E. coli* DADE D6 ara^R), die TatBC (pZX31) und TatABC (pDE) ohne Aminosäuresubstitution (WT) und mit TatC_{I50Bpa}- oder TatC_{I50Y}-Variante produzieren. *TatC_{I50Y} trägt keinen C-terminalen Hexahistidin-Tag, weshalb das Migrationsverhalten in der SDS-PAGE leicht abweicht.

Für das Wildtyp-Tat-System konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass Tat-Komplex 2 bei niedrigen TatB-Konzentrationen nur in Anwesenheit von TatA detektiert werden kann (Behrendt *et al.* 2007; Behrendt und Brüser 2014). Die BN-PAGE/Western-Blot-Analyse des Tat-Systems, bei dem TatC_{I50} durch Tyrosin ausgetauscht wurde, zeigte, dass auch hier die Tat-Komplexe 2 und 3 nicht in Abwesenheit von TatA detektiert werden können. Stattdessen konnte nur Tat-Komplex 1 beobachtet werden (siehe **Abbildung 21**, Bahnen 3 und 4). Durch den Austausch von TatC_{I50} gegen Bpa war jedoch Tat-Komplex 1 schon in Anwesenheit von TatA nicht detektierbar (siehe **Abbildung 21**, Bahn 5). Stattdessen konnten zwei schwerere Komplexe detektiert werden. Die Abwesenheit von TatA führte des Weiteren dazu, dass Tat-Komplex 3 nicht mehr gebildet werden konnte. In diesem Fall stellt der leichtere

Tat-Komplex (2 oder 2S) die stabilste Assemblierung dar (siehe **Abbildung 21**, Bahn 6). Außerdem konnten Spuren von Tat-Komplex 1 detektiert werden. Dies weist darauf hin, dass der Tat-Komplex 3 einen TatABC-Komplex darstellt. Die Komplexe 2 oder 2S sind in Tat-Systemen ohne Mutation nur in Anwesenheit von TatA detektierbar (siehe **Abbildung 21**, Bahnen 1 und 2). TatC_{150Bpa} führt jedoch dazu, dass dieser Komplex auch in der Abwesenheit von TatA stabil ist (siehe **Abbildung 21**, Bahn 6). Ein möglicher Grund hierfür kann eine erhöhte Affinität von TatC_{150Bpa} zu TatB sein, sodass TatB in höherem Maße mit Tata Bindestellen interagiert.

3.2.4 In Abwesenheit von TatA stabilisiert TatC_{150Bpa} Tat-Komplex 2S

In der Folge sollte die beobachtete TatA-Abhängigkeit von Tat-Komplex 3 verifiziert werden, um auszuschließen, dass das erhöhte Molekulargewicht von Tat-Komplex 3 neben der Anwesenheit von TatA auch von anderen Faktoren abhängig ist. Es sollte ausgeschlossen werden, dass die Assoziation von Tat-Substraten an die Tat-Translokase einen Anteil an der Bildung des schwereren Tat-Komplexes 3 hat. Hierfür wurden Stämme (*E. coli* DADE D6 ara^R) verwendet, die das Tat-Substrat EfeB überproduzieren. Durch die Assoziation von Tat-Substraten an den TatBC-Komplex sollte dann ein erhöhtes Molekulargewicht und das damit einhergehende veränderte Migrationsverhalten in der BN-PAGE beobachtet werden.

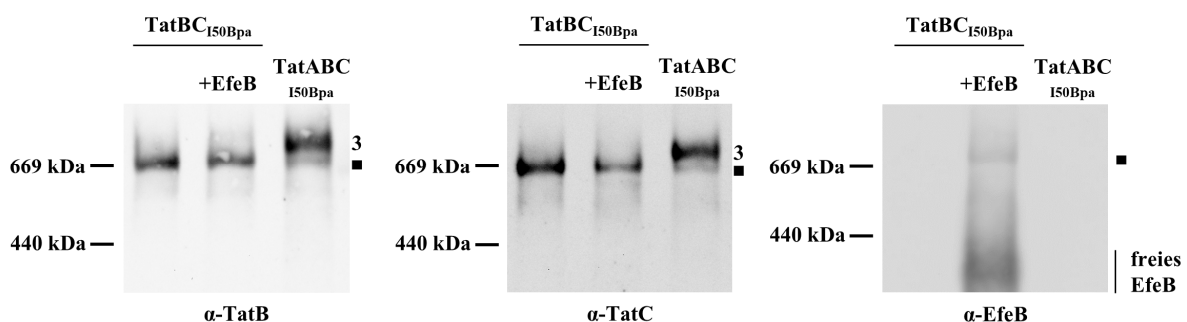


Abbildung 22: In Abwesenheit von TatA stabilisiert TatC_{150Bpa} einen leichteren Komplex (■), der das Tat-Substrat EfeB binden kann. BN-PAGE/Western-Blot-Analyse von Stämmen (*E. coli* DADE D6 ara^R), die zusätzlich zu TatBC_{150Bpa} (pZX31) auch das Tat-Substrat EfeB (pBW) produzieren (Bahn 2). Als direkter Vergleich wurden Stämme (*E. coli* DADE D6 ara^R) verwendet, die TatBC_{150Bpa} (Bahn 1, pZX31) und TatABC_{150Bpa} (Bahn 3, pDE) produzieren, jedoch kein zusätzliches EfeB. (■) markiert den leichteren Tat-Komplex (2/2S).

Die Überproduktion von EfeB in Stämmen, die TatBC_{150Bpa} produzierten, führte nicht zur Bildung- oder Stabilisierung von Substrat-assoziierten Tat-Komplexen mit erhöhtem Molekulargewicht (siehe **Abbildung 22**, Bahn 2). Die Detektion von TatB und TatC zeigte, dass sich das Molekulargewicht der detektierbaren Tat-Komplexe nicht veränderte, wenn zusätzlich das Tat-Substrat EfeB produziert wurde. In beiden Fällen konnte ein Tat-Komplex detektiert werden, der etwas leichter war als Komplex 3 (siehe **Abbildung 22**, Bahnen 1 und 2, ■). Dies unterstützt die vorher beobachtete Stabilisierung von Tat-Komplex 3, die in Anwesenheit von TatA stattfindet (vergleiche **Abbildung 21**). Des Weiteren kann damit ausgeschlossen werden, dass die Assoziation von Tat-Substraten einen Anteil an der Erhöhung des Molekulargewichts hat und unterstreicht die Aussage, dass Tat-Komplex 3 nicht mit Tat-Substraten assoziiert ist.

Auffällig ist jedoch, dass mithilfe eines Antikörpers gegen EfeB neben freiem EfeB auch ein spezifisches Signal detektiert werden konnte, dass in etwa dem Molekulargewicht der Tat-Komplexe entsprach. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die Antikörper nach der Detektion von TatB entfernt (*AB stripping*) und die Membran anschließend für die Detektion von EfeB verwendet.

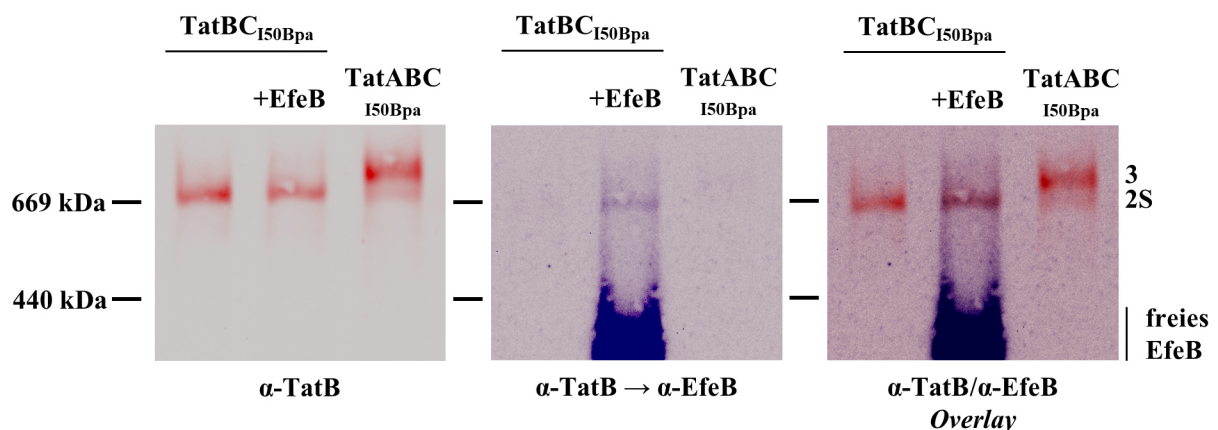


Abbildung 23: In Abwesenheit von TatA stabilisiert TatC_{150Bpa} Tat-Komplex 2S. Kolo-kalisation von EfeB und TatB. BN-PAGE/Western-Blot-Analyse der solubilisierten Membranfraktionen aus Stämmen (*E. coli* DADE D6 ara^R), die zusätzlich zu TatBC_{150Bpa} (pZX31) auch das Tat-Substrat EfeB (pBW) produzieren (Bahn 2). Als direkter Vergleich wurden Stämme (*E. coli* DADE D6 ara^R) verwendet, die TatBC_{150Bpa} (Bahn 1, pZX31) und TatABC_{150Bpa} (Bahn 3, pDE) produzieren, jedoch kein zusätzliches EfeB. Nach BN-PAGE/Western-Blot und TatB-Detektion (links) wurde die Membran für *AB stripping* verwendet und EfeB detektiert (Mitte). Die Bilder wurden eingefärbt (TatB rot, EfeB blau), anhand des Größenstandards ausgerichtet und multipliziert (rechts).

EfeB wurde genau dort mithilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert, wo auch TatB detektiert werden konnte. Dies spricht für eine Kolokalisation von EfeB und TatB. Dass jedoch keine Veränderung des Molekulargewichtes beobachtet wurde, ist ein Hinweis darauf, dass der Tat-Komplex auch ohne die Überproduktion von EfeB bereits bei niedrigen Konzentrationen der Tat-Substrate mit diesen interagiert. Die niedrige Konzentration bedingt jedoch, dass keine ausreichende Konzentration für die Detektion mit einem spezifischen Antikörper vorliegt. Der durch die Überproduktion von EfeB bedingte EfeB-Überschuss in der Zelle führt dazu, dass vermehrt Tat-Komplexe gebildet werden, die mit EfeB interagieren. In der Folge konnte EfeB in Kolokalisation mit TatB detektiert werden (siehe **Abbildung 23**, Bahn 2).

Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass es sich bei dem leichteren Tat-Komplex, der durch den Austausch von TatC Isoleucin 50 durch Bpa stabilisiert wird, um einen Substrat-assoziierten Komplex handelt. Dieser ist bereits bei niedrigen Substrat-Konzentrationen mit Substrat assoziiert, weshalb er nachfolgend als Tat-Komplex 2S bezeichnet werden soll.

3.2.5 Die Substratbindung beeinflusst die Assemblierung der Tat-Komplexe 2S und 3

Nachfolgend sollte der Einfluss der Substratbindung auf die Tat-Komplexe detaillierter analysiert werden. Aus der Tatsache, dass TatC_{I50Bpa} nicht nur zur Stabilisierung von Tat-Komplex 3, sondern auch von Tat-Komplex 2S führt, ergab sich die Frage, ob die Substratbindung eine Grundvoraussetzung für die Stabilisierung dieser Tat-Komplexe ist. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Verhinderung der Substratbindung dazu führt, dass Tat-Komplex 3 nicht mehr assembliert werden kann. Dies würde darauf hinweisen, dass Tat-Komplex 3 durch die Interaktion von Tat-Komplex 2S mit TatA entsteht.

Um den Einfluss der Substratbindung auf die Komplexbildung zu untersuchen, wurden die oben beschriebenen TatC-Varianten TatC_{F94Q} und TatC_{E103A} mit TatC_{I50Bpa} kombiniert und mittels BN-PAGE/Western-Blot analysiert. Diese Austausche wurden nicht nur im TatABC-System vorgenommen, um den Einfluss der Substratbindung auf Tat-Komplex 3 zu untersuchen, sondern auch im TatBC-System. So sollten genauere Aussagen über den Einfluss der Substratbindung auf den Tat-Komplex 2S gemacht werden.

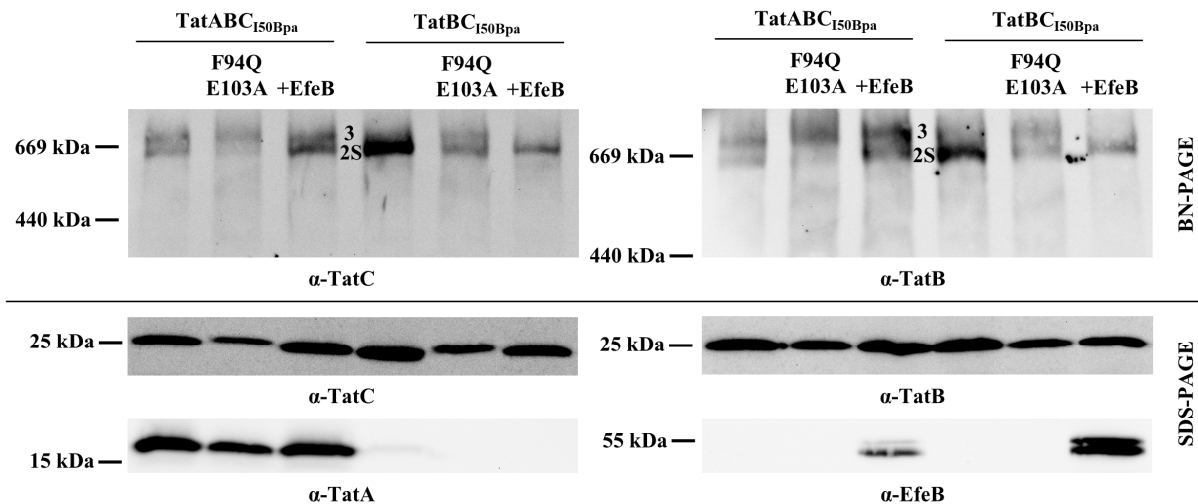


Abbildung 24: Tat-Komplex 3 kann auch in Abwesenheit von TatA stabilisiert werden. Einfluss der Substratbindung auf die Tat-Komplexe 2S und 3. BN-PAGE/Western-Blot- und SDS-PAGE/Western-Blot-Analyse der solubilisierten Membranfraktionen aus Stämmen (*E. coli* DADE D6 ara^R), die TatABC_{150Bpa},F94Q,E103A (pDE) und TatBC_{150Bpa},F94Q,E103A (pZX31) produzieren (Bahnen 2 und 5). Zum internen Vergleich wurden TatABC_{150Bpa} (pDE) und TatBC_{150Bpa} (pZX31) ohne veränderte Substratbindestelle ohne (Bahnen 1 und 4) und mit (Bahnen 3 und 6) EfeB-Überproduktion (pBW) verwendet.

Die Modifikation der Substratbindung durch das Einbringen der Austausch TatC_{F94Q} und TatC_{E103A} in Kombination mit TatC_{150Bpa} zeigte deutlich, dass die Substratbindung in Anwesenheit von TatA keine Grundvoraussetzung für die Assemblierung von Tat-Komplex 3 ist, da dieser auch ohne Substratbindung detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu fiel jedoch auf, dass die Modifikation der Substratbindung dazu führte, dass deutlich weniger Komplex 2S detektiert werden konnte. Entgegen der Erwartungen hatte die modifizierte Substratbindestelle in Anwesenheit von TatA jedoch nicht wie erwartet zur Folge, dass noch leichtere Tat-Komplexe detektiert wurden, sondern im Gegenteil dazu schien das Gleichgewicht sogar eher in Richtung von Tat-Komplex 3 verschoben zu sein (siehe **Abbildung 24**, Bahn 2).

In Abwesenheit von TatA konnte Ähnliches beobachtet werden. In Abwesenheit von TatA resultierte TatC_{150Bpa} ausschließlich in der Stabilisierung von Tat-Komplex 2S. Tat-Komplex 3 konnte bis dahin nur in Anwesenheit von TatA detektiert werden (vergleiche **Abbildung 21**). Die Modifikation der Substratbindung resultierte jedoch entgegen der Erwartungen nicht in der Detektion von leichteren Tat-Komplexen, sondern in der Detektion von Tat-Komplex 3 - trotz der Abwesenheit von TatA. Tat-Komplex 2S konnte trotz TatC_{F94Q} und TatC_{E103A} weiterhin detektiert werden (siehe **Abbildung 24**, Bahn 5). Dies kann eventuell dadurch erklärt werden,

dass Aminosäureaustausche, nicht die Bindung aller Substrate auf die gleiche Weise beeinflussen. So wurden bereits unterschiedliche TatC-Varianten im Hinblick auf ihren Einfluss auf die Interaktion mit Tat-Substraten untersucht mit dem Ergebnis, dass die für die Interaktion essentiellen Positionen je nach Substrat variieren (Holzapfel *et al.* 2007).

Deutlich wird jedoch, dass TatC_{150Bpa} zu einer starken Stabilisierung von Tat-Komplex 3 führt. So ist nicht nur die Affinität von TatC_{150Bpa} zu TatB deutlich erhöht, was sich darin äußert, dass - auch in Abwesenheit von TatA - nur Tat-Komplexe mit höherem (2S und 3) und nicht mit geringerem Molekulargewicht (1) isoliert und detektiert werden können. Zusätzlich ist auch die Affinität des Translokase-Komplexes zu TatA deutlich erhöht, da TatA unabhängig von der Substratbindung mit dem TatBC-Komplex interagiert. Dies führt zur Assemblierung von Tat-Komplex 3.

3.3 Stöchiometrie des Tat-Systems

Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, spielt das Verhältnis zwischen den einzelnen Tat-Komponenten eine entscheidende Rolle bei der Assemblierung der verschiedenen Tat-Komplexe. Bereits vorherige Studien zeigten, dass auch in Abwesenheit von TatA Tat-Komplexe detektiert werden können, die nur aus TatB- und TatC-Protomeren bestehen. Es wurde beobachtet, dass erhöhte Konzentrationen von TatB dazu führen, dass mittels BN-PAGE/Western-Blot-Analyse kein Größenunterschied zwischen TatBC-Komplexen, die in Anwesenheit von TatA assemblieren und solchen, die in Abwesenheit von TatA assemblieren, besteht (Behrendt *et al.* 2007). Im Rahmen neuerer Studien konnte weitergehend gezeigt werden, dass sowohl TatA als auch TatB mit den Transmembranhelices 5 und 6 von TatC interagieren (Habersetzer *et al.* 2017). Dabei konnte beobachtet werden, dass TatA mit der TMH6 und TatB mit der TMH5 von TatC interagiert, sofern keine Überproduktion des Tat-Substrates CueO stattfindet. Die Überproduktion von CueO führte zu einer Interaktion von TatA mit TMH5 und TatB mit TMH6 von TatC. Basierend auf diesen ähnlichen Bindungseigenschaften von TatA und TatB wurde ein Positionswechsel von TatA und TatB im Laufe des Tat-abhängigen Transportes postuliert (Habersetzer *et al.* 2017).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass TatC_{150Bpa} sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von TatA Tat-Komplexe stabilisiert, die höchstwahrscheinlich ein höheres Assemblierungsstadium der Tat-Translokase repräsentieren (siehe Abschnitt 3.2.3, **Abbildung 21**). Um ein besseres Verständnis über den Einfluss der Stöchiometrie zwischen den TatA, TatB und TatC zu erlangen, sollte die Stöchiometrie im Rahmen der vorliegenden

Arbeit anhand des Wildtyp-Tat-Systems untersucht werden. Des Weiteren sollten diese Erkenntnisse auf den zuvor charakterisierten Tat-Komplex 3 und auf die vierte Tat-Komponente TatE, die eine sehr hohe Ähnlichkeit zu TatA aufweist, übertragen werden. Eine funktionelle Komplementation des Fehlens von TatA durch TatE konnte bereits gezeigt werden (Sargent *et al.* 1999). Eine strukturelle Analyse der Komplementation im Hinblick auf die Tat-Komplexe hat jedoch nicht stattgefunden und sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden.

3.3.1 Alle bekannten Tat-Komplexe können in Abwesenheit von TatA assemblieren

Wie bereits in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, sind für die Untersuchung von TatBC-Komplexen in Abwesenheit von TatA gewisse Modifikationen auf genetischer Ebene nötig, um eine Okkupation von TatA-Bindestellen der TatC-Protomere durch TatB zu verhindern bzw. so weit wie möglich einzuschränken. Die Gene *tatA*, *tatB* und *tatC* sind in einem Operon organisiert und stehen unter der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors. Die Genexpression wird dabei so reguliert, dass TatA, TatB und TatC unter natürlichen Bedingungen im Verhältnis 25:1:0,5 vorliegen (Sargent *et al.* 2001). Wird *tatA* deletiert, liegt ein starker TatB-Überschuss vor. Bereits in vorherigen Studien, in denen TatC in geringen Mengen und TatB mithilfe eines Arabinose-induzierbaren Expressionssystems (pBAD) in hohen Mengen produziert wurde, konnte beobachtet werden, dass sich alle bis dahin bekannten Tat-Komplexe bei hohen Konzentrationen von TatB auch in Abwesenheit von TatA detektieren lassen (Behrendt *et al.* 2007). Um dieses Problem zu umgehen, werden *tatB* und *tatC* in den hier durchgeführten Analysen unter der Kontrolle des *tet*-Promotors exprimiert (Behrendt und Brüser 2014).

Neben den bereits untersuchten Expressionssystemen, bei denen *tatBC* unter der Kontrolle der P_{rhaB} - oder $P_{LtetO-1}$ -Promotoren exprimiert wurden (Behrendt *et al.* 2007; Behrendt und Brüser 2014), wurde im Rahmen verschiedener Studien zur Lokalisation der Tat-Komponenten mittels MT3-Tags von Dr. Michael Thomas Ringel ein weiteres Expressionssystem etabliert. Dabei wurde *tatA* aus dem Operon entfernt und die ribosomale Bindestelle (5'-AGAGGA-3'), die sich zwischen *tatA*-Promotor und dem *tatA*-Startcodon befindet, gegen die ribosomale Bindestelle von *tatB* (5'-AGCAGG-3') ausgetauscht. Da sowohl die Sequenz, als auch die Entfernung der ribosomalen Bindestelle zum Startcodon einen Einfluss auf die Translationseffizienz und damit auf die Konzentration der Proteinprodukte haben (Ma *et al.* 2002), sollte anhand dieser Modifikation eine TatB-Konzentration erreicht werden, die eher den natürlichen Umständen entspricht. Dieser modifizierte *tatA*-Promotor soll fortan als *tat(B)*-Promotor ($P_{tat(B)}$) bezeichnet

werden. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde *tatBC_{MT3}* aus dem Plasmid pABS-*P_{tatB}-tatBC_{MT3}* durch *tatBC_{H6}* ausgetauscht. Anschließend wurden Membranen von den entsprechenden Stämmen (*E. coli* DADE D6 *ara^R*) präpariert, die Membranproteine solubilisiert und anschließend mittels BN-PAGE/Western-Blot analysiert (siehe **Abbildung 25**).

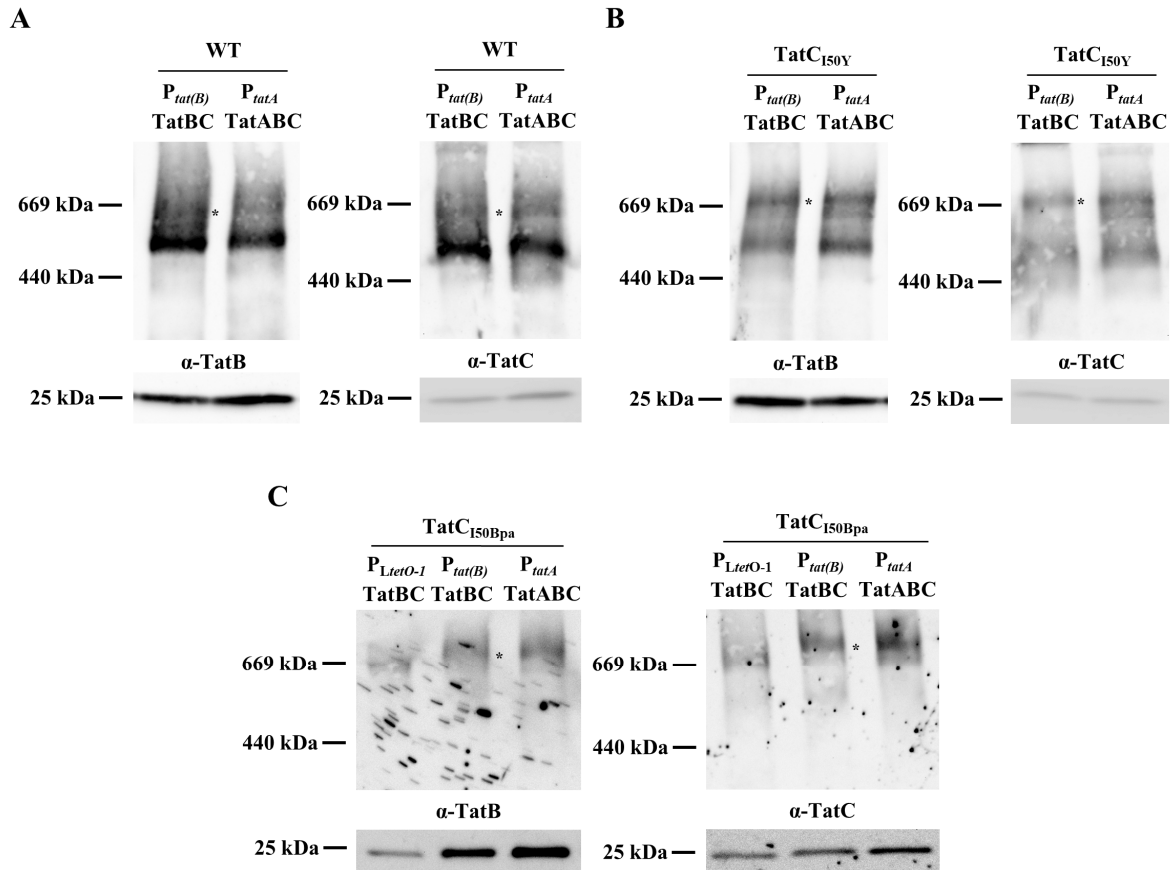


Abbildung 25: Mithilfe eines TatB-Überschusses können auch in Abwesenheit von TatA TatBC-Komplexe gebildet werden, deren Molekulargewicht dem von TatABC-Komplexen entspricht (*). **(A)** Tat_{WT}, **(B)** Tat_{C150Y} und **(C)** Tat_{C150Bpa} verhalten sich in dieser Hinsicht gleich. BN-PAGE/Western-Blot- sowie SDS-PAGE-Western-Blot-Analysen von solubilisierten Membranfraktionen aus Stämmen (*E. coli* DADE D6 *ara^R*), die *tatBC* unter der Kontrolle des modifizierten *tatA*-Promotors exprimieren (pDE-*P_{tat(B)}*) im Vergleich mit den entsprechenden TatABC-Systemen (pDE-*P_{tat(A)}*). 4 - 12 %ige BN-Acrylamidgele (10 µl Marker- und Probenvolumen), 15 %ige Acrylamidgele (3 µl Marker- und 10 µl Probenvolumen).

Obwohl die ribosomale Bindestelle von *tatA* durch die von *tatB* ersetzt wurde, zeigte die Entfernung von *tatA* aus dem Operon den bereits in vorherigen Studien beobachteten Effekt auf die Assemblierung der TatBC-Komplexe. Unter den vorliegenden Bedingungen konnten auch in der Abwesenheit von TatA die Tat-Komplexe mit höherem Molekulargewicht detektiert werden. So konnte beim Wildtyp-Tat-System Tat-Komplex 2 detektiert werden (siehe **Abbildung 25A**). Für TatBC_{150Y} (siehe **Abbildung 25B**) und für TatBC_{150Bpa} (siehe **Abbildung 25C**) konnten die Tat-Komplexe 2S und 3 beobachtet werden. Die BN-PAGE/Western-Blot-Analyse von TatBC_{150Bpa} wurde von Max Hinrich Werner im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt. Als interner Vergleich wurden jeweils die entsprechenden TatABC-Systeme aufgetragen. Die entsprechenden Gene wurden unter der Kontrolle des natürlichen *tatA*-Promotors exprimiert.

Des Weiteren wurden Tat-Komplexe im Rahmen der vorliegenden Arbeit in großen Mengen mit dem Ziel der Reinigung und anschließender strukturebiologischer Studien der Tat-Komplexe produziert. Hierfür wurde ein Expressionssystem genutzt, welches mittels der Zugabe von Rhamnose induziert werden kann (pBW). Die ursprüngliche ribosomale Bindestelle wurde aus dem Rhamnose-Promotor (*P_{rha}*) entfernt. Anschließend wurden *tatABC* bzw. *tatBC* inklusive der entsprechenden ribosomalen Bindestellen von *tatA* (für *tatABC*, *P_{rha(A)}*) und *tatB* (für *tatBC*, *P_{rha(B)}*) eingebracht. Mit diesen Konstrukten wurde der *E. coli* Stamm DADE D6 ara^R transformiert. Die solubilisierten Tat-Komplexe wurden mittels BN-PAGE/Western-Blot analysiert (siehe **Abbildung 26**).

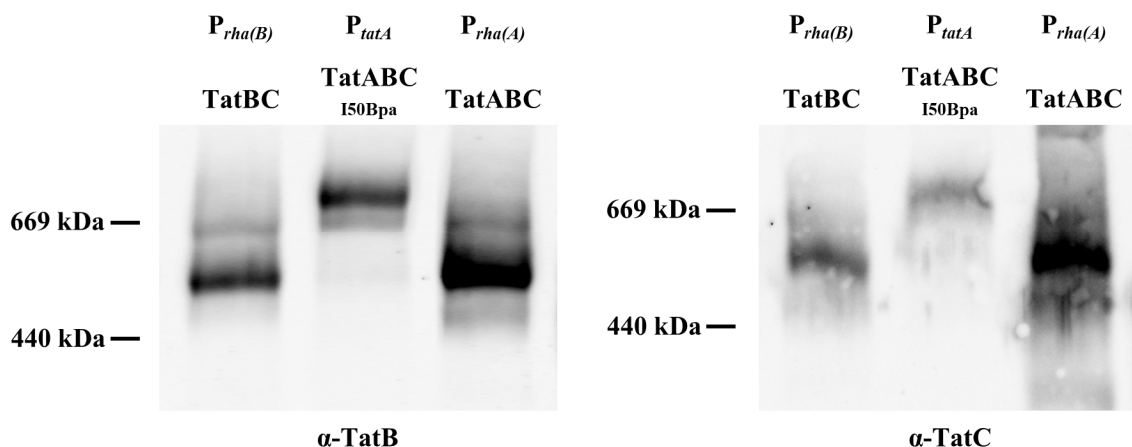


Abbildung 26: Die Überproduktion von TatB und TatC führt zur Bildung von Tat-Komplex 2 in Abwesenheit von TatA. Produktion von Tat-Komplexen mithilfe eines Rhamnose-induzierbaren Expressionssystems. BN-PAGE/Western-Blot-Analyse von Stämmen, die *tatBC* und *tatABC* unter der Kontrolle des modifizierten Rhamnose-Promotors exprimieren (pBW-*P_{rha(B)}*) und pBW-*P_{rha(A)}*). 4 - 12 %ige BN-Acrylamidgele, 10 µl Marker- und Probenvolumen. Die Induktion fand bei OD₆₀₀ = 0,6 durch die Zugabe von 0.1 % Rhamnose statt. Zum Vergleich wurde ein Stamm verwendet, der *tatABC*_{150Bpa} unter der Kontrolle des *tatA*-Promotors exprimiert (pDE).

Auch bei der Produktion von Tat-Komplexen in großen Mengen zeigte sich, dass die Konzentration von TatB entscheidend dafür ist, welche Tat-Komplexe assemblieren können. Die Expression von *tatBC* unter der Kontrolle des modifizierten *tatA*-Promotors ($P_{tat(B)}$) führte ebenfalls dazu, dass Tat-Komplex 2 in Abwesenheit von TatA detektiert werden konnte (siehe **Abbildung 26**, Bahn 1).

3.3.2 TatB zeigt biochemische Ähnlichkeiten zu TatA

In vorausgegangenen Studien von Jana Behrendt konnte bereits gezeigt werden, dass TatB in Abwesenheit von TatC zur Bildung von Homooligomeren neigt (Behrendt *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu bildet TatA unabhängig von anderen Tat-Komponenten stabile oligomere Strukturen aus. Während die verschiedenen TatA-Homooligomere mittels BN-PAGE/Western-Blot nur eine geringe Massendifferenz aufweisen und daher kaum zu differenzieren sind, ist die Differenz zwischen den TatB-Oligomeren nach Solubilisierung mit Digitonin deutlich größer, was eine Differenzierung der verschiedenen Oligomere erlaubt.

Neben der Frage, welchen Einfluss TatA und TatB auf die Assemblierung der Tat-Komplexe ausüben, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss der anderen Tat-Komponenten untersucht werden. Unter Verwendung eines anderen Expressionssystems (pBW) konnten die Ergebnisse von Jana Behrendt reproduziert werden. Hierfür wurden sowohl die Gene einzelner Tat-Komponenten als auch Kombinationen von Genen verschiedener Tat-Komponenten unter der Kontrolle des induzierbaren Rhamnose-Promotors von Zellen des Stammes *E. coli* DADE D6 *ara*^R exprimiert. Nach der Präparation der Membranen und Solubilisierung der Membranproteine mit Digitonin wurden die Tat-Komplexe mittels BN-PAGE/Western-Blot analysiert.

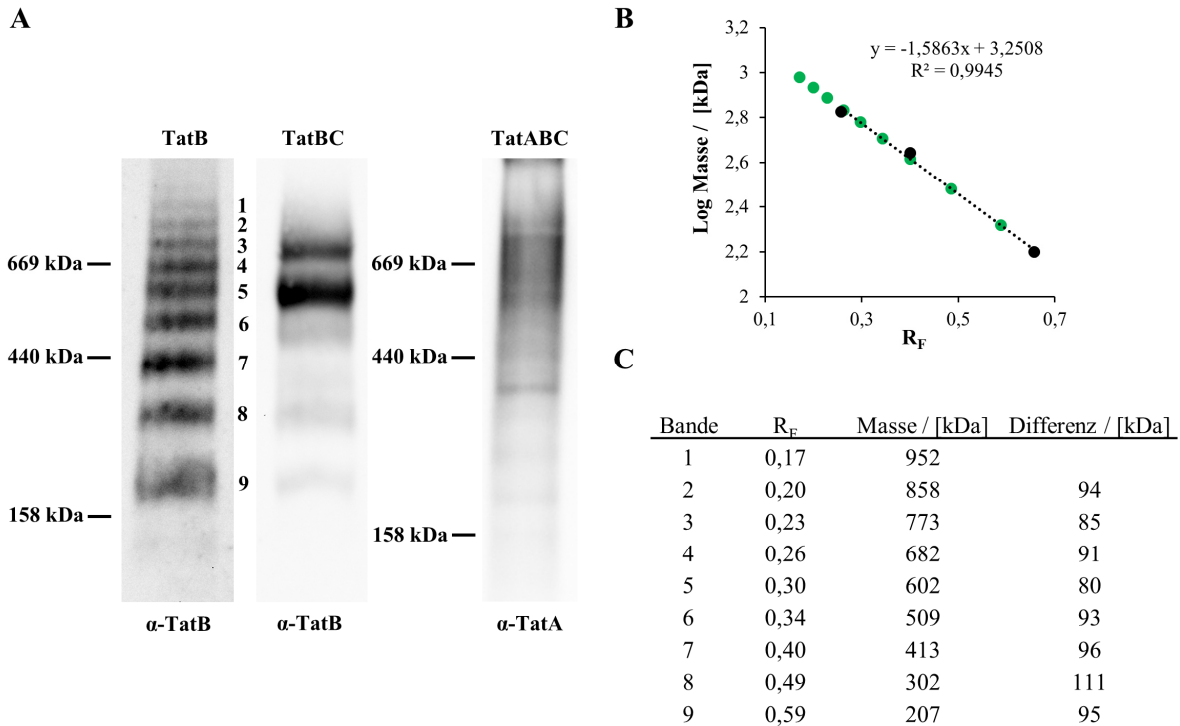


Abbildung 27: In Abwesenheit von TatC neigen TatB-Protomere dazu, miteinander zu interagieren und bilden Homooligomere verschiedener Größen. **(A)** Mittels BN-PAGE/Western-Blot-Analyse kann eine Art TatB-Leiter beobachtet werden, die in Anwesenheit von TatC zugunsten der Tat-Komplexe 1 und 2 schwächer wird. Im Vergleich dazu sind TatA-Oligomere kaum differenzierbar. **(B)** Der dekadische Logarithmus des Molekulargewichts der Markerproteine wurde gegen die R_F-Werte aufgetragen (•). Diese Punkte wurden für eine lineare Regression verwendet, mit der anschließend die Massen der TatB-Oligomere (•) berechnet wurden. **(C)** Die R_F-Werte, Massen sowie die Massendifferenz zum nächstgrößeren TatB-Oligomer wurden tabellarisch zusammengefasst.

Neben den strukturellen Ähnlichkeiten zwischen TatA und TatB konnten auch deutliche biochemische Gemeinsamkeiten der beiden Tat-Komponenten beobachtet werden. Bei hohen Konzentrationen kann TatB TatA bei der Assemblierung der Tat-Komplexe 2 und 3 ersetzen (siehe Abschnitt 3.3.1). TatB neigt außerdem - genau wie TatA dazu, Homooligomere verschiedener Größen zu bilden. Es unterscheiden sich jedoch die Bedingungen, unter denen die Homooligomerisation von TatA und TatB beobachtet werden kann. Während TatA-Protomere unter allen (bisher untersuchten) Bedingungen Homooligomere bilden, zeigt TatB diese Eigenschaft nur in Abwesenheit von TatC. Ein weiterer Unterschied konnte in Bezug auf die Masse der verschiedenen Oligomere beobachtet werden. Aufgrund der geringen Massendifferenz zwischen den verschiedenen TatA-Oligomeren können diese nicht klar voneinander differenziert werden. Die Massendifferenz zwischen den TatB-Oligomeren hingegen ist deutlich größer, sodass die verschiedenen Oligomere voneinander differenziert und deren Größe approximiert werden kann (siehe **Abbildung 27A**).

Anhand der R_F -Werte und der Molekulargewichte der Markerproteine wurde eine lineare Regression durchgeführt, die zur Berechnung der Massen der verschiedenen TatB-Oligomere verwendet wurde (siehe **Abbildung 27B**). Die Differenz zwischen den Massen weist darauf hin, dass die bessere Differenzierbarkeit möglicherweise durch die Stöchiometrie der Oligomere bedingt ist. So liegen zwischen den TatB-Oligomeren Massendifferenzen zwischen 80 und 111 kDa vor. Dies entspricht deutlich mehr als einem TatB-Monomer mit einer Masse von ca. 17 kDa (siehe **Abbildung 27C**). Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass Proteine mittels BN-PAGE in ihrer nativen Form separiert werden, wodurch die Oberfläche einen bedeutenden Einfluss auf das Migrationsverhalten hat. Aus diesem Grund soll an dieser Stelle lediglich auf die biochemischen Ähnlichkeiten von TatB und TatA hingewiesen und auf eine quantitative Aussage verzichtet werden.

3.3.3 TatA ist für die Funktionalität des Tat-Systems zwingend notwendig

Wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, wird durch den Austausch von TatC_{150Bpa} ein Tat-Komplex mit höherem Molekulargewicht stabilisiert. Im Gegensatz zu allen vorherigen Studien kann sogar bei niedrigen Konzentrationen von TatB (*tatBC* unter der Kontrolle des *tet*-Promotors) Tat-Komplex 2S detektiert werden. In vorherigen Studien, wie auch in dieser Arbeit, konnten alle Tat-Komplexe mit einem höheren Molekulargewicht als Komplex 1 oder 1S nur dann beobachtet werden, wenn TatB in hohen Konzentrationen vorlag. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob die Assemblierung von Tat-Komplex 2S hinreichend für die Funktionalität des Tat-Systems ist oder ob die Anwesenheit von TatA zwingend notwendig ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Funktionalitätsanalysen von TatBC_{150Bpa}- und TatBC_{150Y}-Systemen in Abwesenheit von TatA durchgeführt. Als Referenz wurden diese Funktionalitätsanalysen auch in Anwesenheit von TatA und mit TatABC- und TatBC Systemen ohne Mutation durchgeführt (siehe **Abbildung 28**). Verwendet wurden Stämme (*E. coli* DADE D6 ara^R), die *tatABC*, *tatABC*_{150Bpa}, *tatABC*_{150Y} unter der Kontrolle des *tatA*-Promotors (pDE-Derivate) und Stämme (*E. coli* DADE D6 ara^R), die *tatBC*, *tatBC*_{150Bpa}, *tatBC*_{150Y} unter der Kontrolle des *tet*-Promotors (pZX31-Derivate) exprimieren.

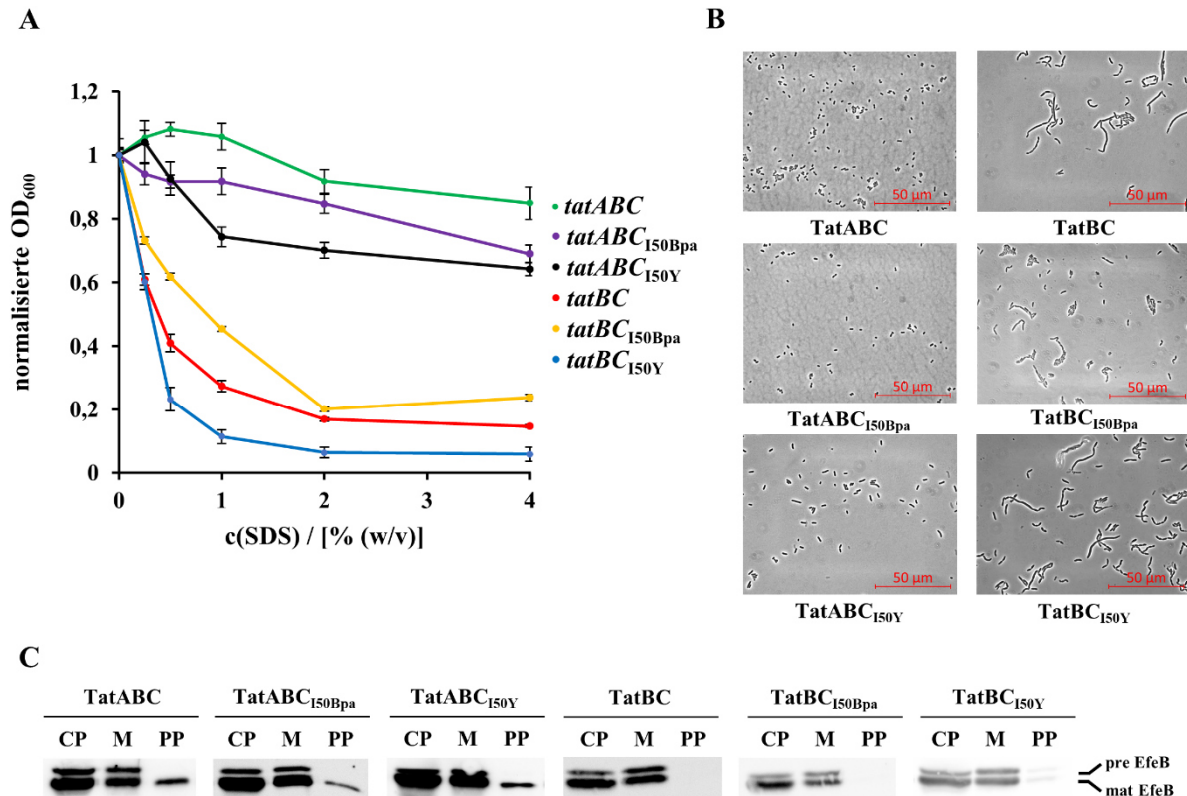


Abbildung 28: Die Aktivität von Tat-Systemen ist von Tata abhängig. Aktivitätsanalysen von TatBC-, TatBC_{150Bpa}- und TatBC_{150Y}-Systemen in Anwesenheit (pDE) und in Abwesenheit (pZX31) von Tata. **(A)** SDS-Sensitivitätsbestimmung, aufgetragen ist die normalisierte optische Dichte bei 600 nm gegen die prozentuale (w/v) SDS-Konzentration (in LB-Medium). Normalisiert wurde jeweils auf die optische Dichte bei 0 % (w/v) SDS. **(B)** Phasenkontrastmikroskopie der verwendeten Stämme. **(C)** Translokationsanalyse von EfeB mittels Periplasmafraktionierung und SDS-PAGE/Western-Blot-Analyse der verwendeten Stämme. 10 %ige Acrylamidgele, 3 µl Marker- und 10 µl Probenvolumen. CP: Cytoplasma, M: Membran, PP: Periplasma.

Die durchgeführten Funktionalitätsanalysen zeigten, dass die Abwesenheit von Tata in jedem Fall zur Inaktivierung des Tat-Systems führte. So ließ sich bei allen Stämmen (*E. coli* DADE D6 ara^R), die TatBC, TatBC_{150Bpa} oder TatBC_{150Y} in Abwesenheit von TataA produzierten, ein deutlich eingeschränktes Wachstum in SDS-haltigem LB-Medium beobachten (siehe **Abbildung 28A**). Mittels Phasenkontrastmikroskopie konnte zudem eine Kettenbildung beobachtet werden. Eine Separation der Zellen zeigte sich ausschließlich in der Anwesenheit von TataA (siehe **Abbildung 28B**). Des Weiteren wurden subzelluläre Fraktionierungen mit allen Stämmen durchgeführt. Der Transport des Tat-Substrates EfeB konnte nur nachgewiesen werden, wenn TataA zusätzlich zu TatBC produziert wurde (siehe **Abbildung 28C**).

Aus den beschriebenen Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass die Assemblierung von Tat-Komplex 2S nicht gleichbedeutend mit einer Funktionalität des Tat-Systems ist.

3.3.4 TatA, TatB und TatC sind für die Assemblierung von Tat-Komplexen essenziell

Im vorherigen Abschnitt konnte im Einklang mit der Literatur gezeigt werden, dass TatA in Abwesenheit von TatE essenziell für den Tat-Transport ist (Sargent *et al.* 1998). Aufgrund der strukturellen und biochemischen Ähnlichkeiten von TatA und TatB sowie der Neigung von TatA Homooligomere zu bilden, ist der Einfluss von TatA auf die Assemblierung der Tat-Komplexe jedoch deutlich schwerer zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde im Folgenden der Einfluss von TatA, TatB und TatC auf die Assemblierung von Tat-Komplexen basierend auf Stämmen (*E. coli* DADE D6 *ara*^R) untersucht, die nur eine oder zwei Tat-Komponenten produzieren. Zusätzlich wurden induzierbare Expressionssysteme (pBW, *P_{rha(A)}* und *P_{rha(B)}*) verwendet, um die konstitutive Produktion (pZX31, *P_{LtetO-1}*) von einer Tat-Komponente zu komplettieren. Dies sollte Rückschlüsse auf den Einfluss einzelner Tat-Komponenten erlauben. Anschließend wurden die Membranen präpariert, die Membranproteine mit Digitonin solubilisiert und mittels BN-PAGE/Western-Blot analysiert.

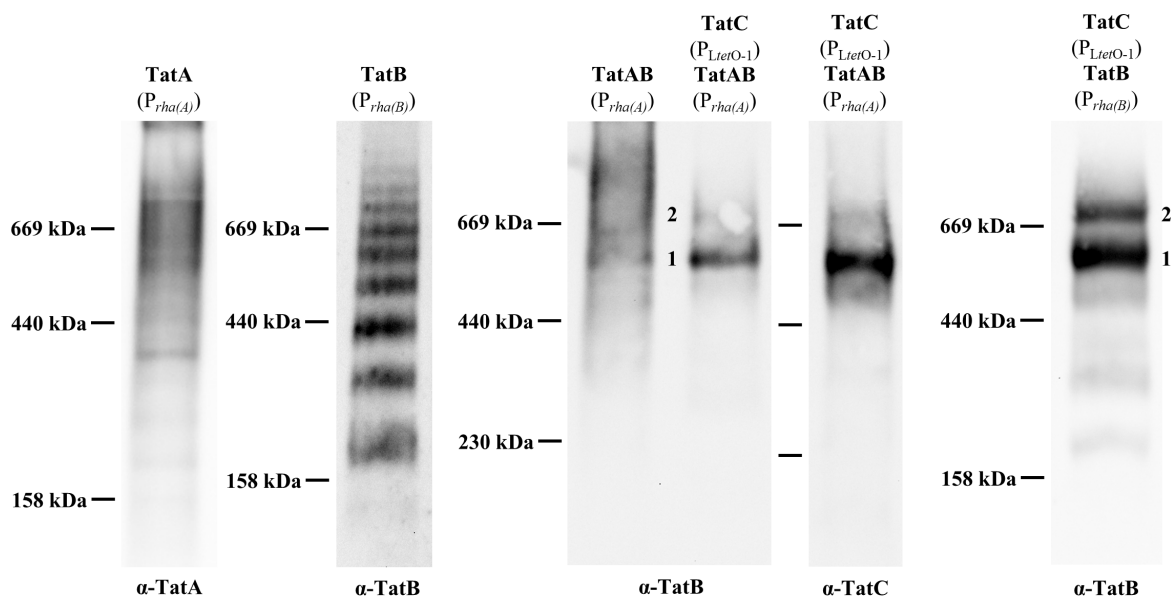


Abbildung 29: Die Homooligomerisation von TatB wird von TatA und TatC beeinflusst. Vergleichende BN-PAGE/Western-Blot-Analyse solubilisierter Membranfraktionen aus Stämmen (*E. coli* DADE D6 *ara*^R), die nur TatA oder TatB produzieren (pBW, *P_{rha(A)}* oder *P_{rha(B)}*) mit einem Stamm, der sowohl TatA als auch TatB produziert (pBW, *P_{rha(A)}*) sowie Stämmen, die zusätzlich *tatC* konstitutiv (pZX31, *P_{LtetO-1}*) - in An- und Abwesenheit von TatA - exprimieren. 4 - 12 %ige BN-Polyacrylamidgele, 10 µl Marker- und Probenvolumen. Die verwendeten Proteingrößenstandards sind neben- und die verwendeten Antikörper unter den jeweiligen Blots indiziert.

Die Untersuchung des Assemblierungsverhaltens einzelner sowie die Kombination verschiedener Tat-Komponenten ergab, dass bei der Produktion von TatA dieses zur Bildung von Homooligomeren neigt. Diese TatA-Homooligomere können mittels BN-PAGE/Western-Blot als eine Art Leiter detektiert werden (siehe **Abbildung 29**, TatA). TatB neigte, wie bereits zuvor beschrieben, nur in der Abwesenheit von TatC zur Bildung von Homooligomeren, die ähnlich wie TatA-Homooligomere als eine Art Leiter detektiert werden konnten (siehe **Abbildung 29**, TatB). Im Gegensatz zu TatA unterschieden sich die einzelnen TatB Homooligomere jedoch deutlicher in ihrer Masse, sodass nach Solubilisierung mit Digitonin weniger unterschiedliche Homooligomere detektiert werden konnten (siehe **Abbildung 29**, TatB). Wurde TatB in Anwesenheit von TatA produziert, konnten nur TatB-Assemblierungen mit höherem Molekulargewicht detektiert werden. Diese ließen sich, ähnlich wie TatA-Oligomere, nicht voneinander differenzieren (siehe **Abbildung 29**, TatAB). Wurde zusätzlich TatC in niedrigen Konzentrationen produziert (pZX31-*tatC_{H6}*), konnten die Tat-Komplexe 1 und 2 detektiert, jedoch keine TatB-Oligomere mehr beobachtet werden (siehe **Abbildung 29**, TatC + TatAB). Ähnliches konnte auch in Abwesenheit von TatA beobachtet werden: Die Produktion von TatB in hohen Konzentrationen (pBW-*tatB*) in Gegenwart von niedrigen TatC-Konzentrationen (pZX31-*tatC_{H6}*) führte nicht nur dazu, dass Tat-Komplex 1 detektiert werden konnte, sondern ebenfalls Tat-Komplex 2. Diese Beobachtung stimmt mit den in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Beobachtungen überein (siehe **Abbildung 29**, TatC + TatB).

Anschließend sollte untersucht werden, ob die Assemblierung der Tat-Komplexe 1 und 2 durch die Produktion von TatB bzw. TatAB in Gegenwart von geringen Konzentrationen an TatC auch mit einer Funktionalität des Tat-Systems einhergeht. Hierfür wurden SDS-Sensitivitätsmessungen durchgeführt sowie der Kettenphänotyp bestimmt.

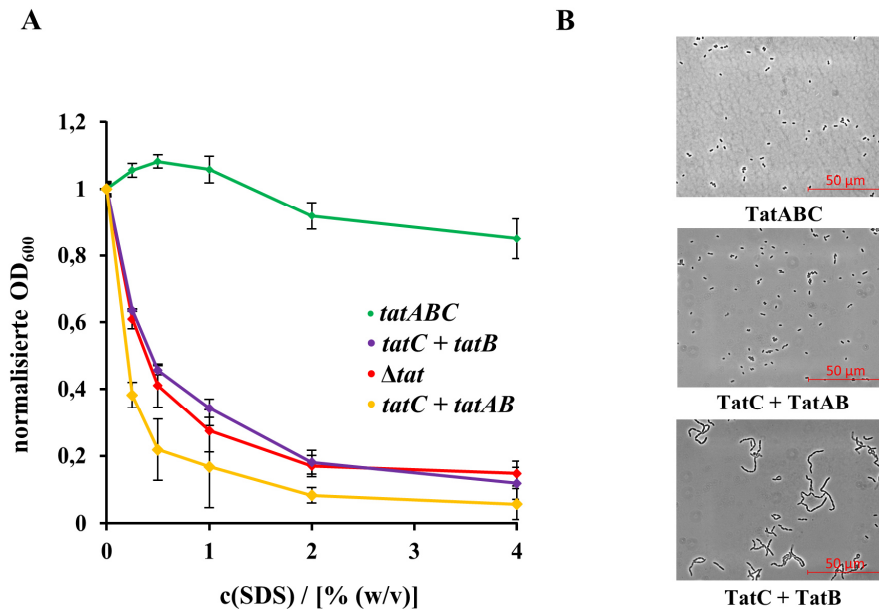


Abbildung 30: Die Überproduktion von TatA und TatB in Anwesenheit von TatC führt nicht zur Assemblierung aktiver Tat-Komplexe. **(A)** Bestimmung der SDS-Sensitivität von Stämmen (*E. coli* DADE D6 ara^R), die TatC in niedrigen- (pDE-*tatC_{H6}*) und TatB bzw. TatAB in hohen Konzentrationen (pBW-*tatB* bzw. pBW-*tatAB*) produzieren. **(B)** Phasenkontrastmikroskopie der verwendeten Stämme.

Die Bestimmung der SDS-Sensitivität sowie des Kettenphänotyps ergaben widersprüchliche Ergebnisse. So konnte, wie erwartet, durch die Produktion von TatB in Anwesenheit von TatC keine verringerte SDS-Sensitivität oder eine Auflösung von Zellketten beobachtet werden (siehe **Abbildung 30**). Die Produktion von TatA und TatB in Anwesenheit von TatC führte jedoch zu einer Auflösung von Zellketten, was auf das Vorliegen eines funktionellen Tat-Systems hindeutet, obwohl der gleiche Stamm keine SDS-Resistenz zeigte (siehe **Abbildung 30**, TatC + TatAB). Möglicherweise kann diese Diskrepanz auf die unterschiedlichen Sensitivitäten der Aktivitätsmessungen zurückgeführt werden und eine Funktionalität des Tat-Systems kann anhand des Kettenphänotyps schneller beobachtet werden als anhand der SDS-Sensitivität. Es kann jedoch auch sein, dass die zugegebene Rhamnose zur Induktion der Expression von *tatA* und *tatB* nicht homogen von allen Zellen aufgenommen wurde, sodass nur in einem Teil der Zellen ein funktionelles Tat-System vorlag. Das würde erklären, warum diese mikroskopisch zwar zu beobachten waren, aber aufgrund des geringen Anteils keine verringerte SDS-Resistenz der gesamten Kultur beobachtet werden konnte. Die Bestimmung der SDS-Sensitivität lässt aus methodischen Gründen eher eine Aussage über die Aktivität des Tat-Systems zu, da hierbei die Zellen einer ganzen Kultur zum Phänotyp beitragen. Da keine SDS-Resistenz zu beobachten war, wird in diesem Fall von einem inaktiven Tat-System ausgegangen.

3.3.5 TatA ist Bestandteil der Tat-Komplexe 1, 2, 2S und 3

Wie bereits erwähnt, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum Zweck von strukturellen Untersuchungen der Tat-Komplexe eine Reinigungsstrategie entwickelt werden. Auf diese Reinigungsstrategie soll im Abschnitt 3.4 detailliert eingegangen werden. Da im Verlauf der Entwicklung dieser Reinigungsstrategie klar wurde, dass mit steigender Anzahl an Reinigungsschritten mittels BN-PAGE/Western-Blot definierte Signale für Tat-Komplexe mit einem TatA-spezifischen Antikörper erhalten werden konnten, wurde diese Reinigungsstrategie auch verwendet, um Aussagen über die Lokalisation von TatA in den Tat-Komplexen zu treffen. Da *tatA* das erste Gen des *tatABC*-Operons ist, liegt TatA in deutlich höherer Konzentration in der Zelle vor als TatB und TatC. TatA neigt dazu, wie zuvor beschrieben, Homooligomere verschiedener Größen zu bilden und kann daher mittels BN-PAGE/Western-Blot nur als eine Art Leiter detektiert werden. Dies macht die Zuordnung von TatA zu den für TatB und TatC detektierbaren Tat-Komplexen unmöglich. Im Rahmen der Entwicklung der Reinigungsstrategie zeigte sich, dass diese TatA-Homooligomere mithilfe der verwendeten Reinigungsstrategie entfernt werden konnten, sodass für TatA ein definiertes Signal detektiert werden konnte, welches sich in etwa auf gleicher Höhe mit den Tat-Komplexen befand, die für TatB und TatC detektiert werden können. Hierfür wurde eine Reinigungsstrategie aus drei aufeinanderfolgenden Reinigungen durchgeführt. Zunächst wurden die Membranen wie beschrieben präpariert und Tat_{H6} anhand einer Ni-IMAC gereinigt. Mit dem Eluat wurde anschließend eine Größenausschlusschromatographie (Superose 6 10/300 GL, GE Healthcare, Freiburg) mittels FPLC durchgeführt. Nachfolgend wurde Tat_{H6} mittels Ni-NTA-*magnetic beads* aus den Fraktionen mit den Proteinkomplexen des gewünschten Größenbereichs gereinigt. Durch das geringere Volumen der Elutionsfraktionen wurde außerdem eine Konzentration der Proben erreicht. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend auf ein BN-Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Western-Blot/Immunodetektion analysiert.

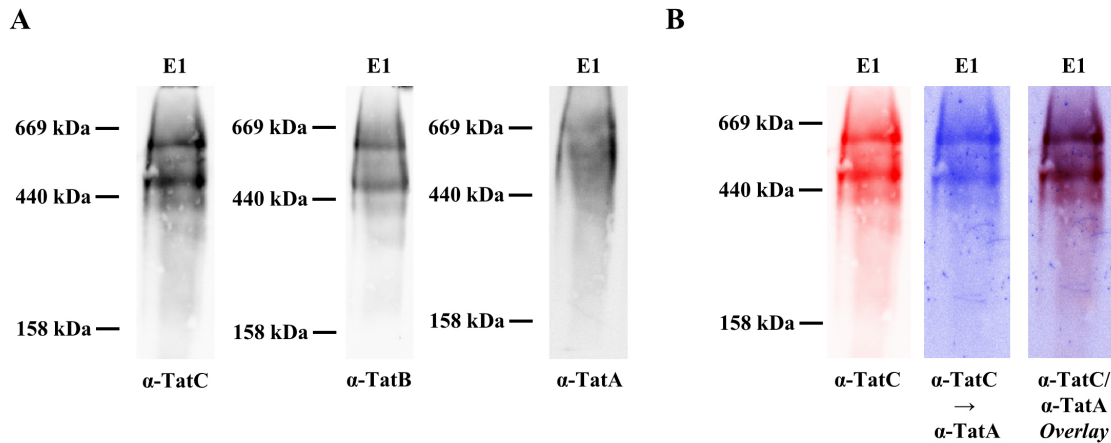


Abbildung 31: Nachweis von TatA innerhalb der Tat-Komplexe 1 und 2. BN-PAGE/Western-Blot-Analyse, 5 - 13,5 %ige BN-Acrylamidgele, 10 μ l Marker- und Probenvolumen. **(A)** Aufgetragen wurde jeweils die erste Elutionsfraktion nach der dritten Reinigung mittels Ni-NTA-magnetic beads. Dieser dritte Schritt schloss sich an eine Ni-IMAC und eine Größenausschlusschromatographie an. Verwendet wurde ein Stamm (*E. coli* DADE D6 ara^R), der TatABC_{H6} (pABS) produziert. **(B)** Zum Nachweis von TatA wurde der Antikörper nach der Detektion von TatC entfernt (*AB stripping*) und die Membran für den Nachweis von TatA verwendet. Die Einzelbilder wurden eingefärbt (TatC rot, TatA blau), anhand des Größenstandards ausgerichtet und multipliziert.

Obwohl zur affinitätschromatographischen Anreicherung nur der Hexahistidin-Tag von TatC_{H6} verwendet wurde, konnten sowohl TatB als auch TatA in den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 31A**). Des Weiteren konnte deutlich beobachtet werden, dass - im Vergleich zu nicht angereicherten Proben - signifikant weniger TatA-Homooligomere detektiert werden konnten (siehe **Abbildung 31A**, TatA). Dies ließ darauf schließen, dass TatA-Homooligomere durch die Anreicherung von TatC entfernt wurden, wodurch ein stärker definiertes Signal mit einem TatA-spezifischen Antikörper erhalten werden konnte. Aus diesem Grund wurde der Antikörper nach der Detektion von TatC und TatB von den Membranen entfernt und diese anschließend für die Detektion von TatA verwendet (*AB stripping*). Um die Kolokalisation der erhaltenen Signale zu untersuchen, wurden die von einer Membran erhaltenen Signale für TatC/TatB und TatA unterschiedlich gefärbt, anhand der Größenstandards übereinandergelegt und die Ebenen multipliziert. **Abbildung 31B** zeigt exemplarisch das *Overlay* für die erhaltenen Signale von TatC und TatA. Anhand der erhaltenen Daten kann eindeutig erkannt werden, dass es sich bei den detektierten Signalen um Proteinkomplexe identischer Größe handelt. Dies bedeutet, dass sowohl Tat-Komplex 1, als auch Tat-Komplex 2 nicht nur aus TatB- und TatC-Protomeren bestehen, sondern auch TatA-Protomere Bestandteile dieser Tat-Komplexe sind.

Um diese Aussage auf die Tat-Komplexe 2S und 3 zu erweitern, wurde die verwendete Reinigungsstrategie ebenfalls für Membranen verwendet, die aus einem Stamm (*E. coli* DADE D6 ara^R) präpariert wurden, der TatABC_{150Bpa-H6} produzierte (siehe **Abbildung 32**).

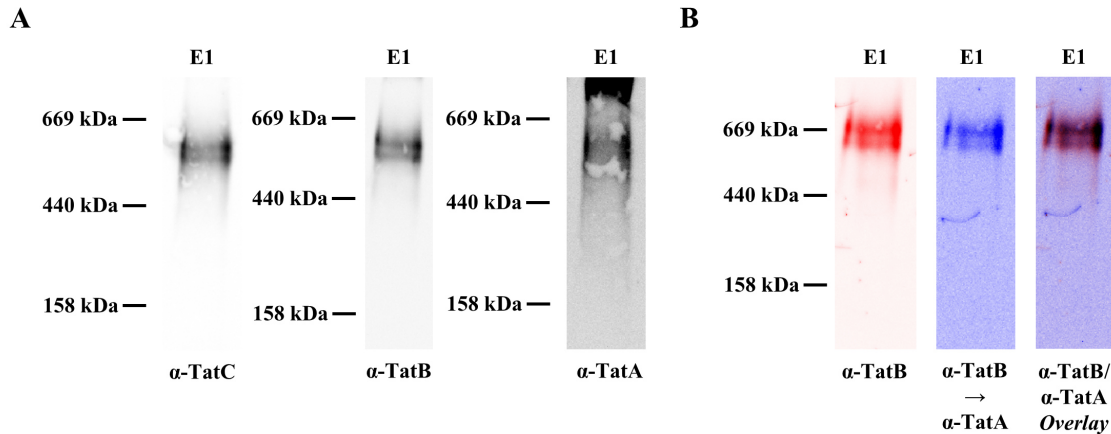


Abbildung 32: Nachweis von TatA innerhalb der Tat-Komplexe 2S und 3. BN-PAGE/Western-Blot-Analyse, 5 - 13,5 %ige BN-Acrylamidgele, 10 μ l Marker- und Probenvolumen. **(A)** Aufgetragen wurde jeweils die erste Elutionsfraktion nach der dritten Reinigung mittels Ni-NTA-magnetic beads. Dieser dritte Schritt schloss sich an eine Ni-IMAC und eine Größenausschlusschromatographie an. Verwendet wurde ein Stamm (*E. coli* DADE D6 ara^R), der TatABC_{150Bpa-H6} (pDE) produziert. **(B)** Zum Nachweis von TatA wurde der Antikörper nach der Detektion von TatB entfernt (*AB stripping*) und die Membran für den Nachweis von TatA verwendet. Die Einzelbilder wurden eingefärbt (TatB rot, TatA blau), anhand des Größenstandards ausgerichtet und multipliziert.

Die Reinigung von TatC_{150Bpa-H6} ergab, dass auch hier ein definiertes Signal mithilfe eines TatA-spezifischen Antikörpers erhalten werden konnte (siehe **Abbildung 32A**). Auch hier wurden die Antikörper nach der Detektion von TatC und TatB von der Membran entfernt und die Membranen für die Detektion von TatA verwendet. **Abbildung 32B** zeigt exemplarisch das *Overlay* der Signale, die für TatC und TatA von der gleichen Membran erhalten wurden.

Auch hier konnte beobachtet werden, dass die erhaltenen Signale von Tat-Komplexen identischer Größe stammen. Diese Beobachtung bestätigt damit die zuvor getroffenen Aussagen, dass es sich bei den Tat-Komplexen 2S und 3 um TatABC-Komplexe handelt. Diese assemblieren in ihrer funktionellen Form nicht nur ausschließlich in der Anwesenheit von TatA. Vielmehr sind TatA-Protomere ebenfalls essenzielle Bestandteile dieser Tat-Komplexe.

3.3.6 TatE kann TatA nicht nur funktionell, sondern auch strukturell ersetzen

Wie in Abschnitt 3.3.5 beschrieben konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass TatA-Protomere Bestandteile der Tat-Komplexe 1, 2, 2S und 3 sind. Diese können aufgrund der Neigung Homooligomere zu bilden jedoch erst nach mehreren Reinigungsschritten in Kolokalisation mit den Tat-Komplexen nachgewiesen werden. Bereits aus vorherigen Studien ist bekannt, dass TatE in *E. coli* ein funktionelles Paralog von TatA ist (Sargent *et al.* 1998; Sargent *et al.* 1999). *Cross-linking* Studien zeigten außerdem, dass TatE auf ähnliche Weise mit den anderen Komponenten des Tat-Systems interagiert wie TatA (Eimer *et al.* 2015; Eimer *et al.* 2018). Jedoch wurde der Einfluss von TatE auf die Assemblierung von Tat-Komplexen bisher nur mikroskopisch untersucht (Baglieri *et al.* 2012). Dabei kann der Nachweis von funktionellen Tat-Komplexen in TatEBC-Systemen hilfreiche Hinweise auf den Einfluss der detektierbaren Tat-Komplexe auf die Funktionalität des Tat-Systems liefern. Bisher konnte eine Funktionalität des Tat-Systems nur in Anwesenheit von TatA beobachtet werden. Funktionale Tat-Systeme in Abwesenheit von TatA konnten nur beobachtet werden, wenn TatA durch TatE ersetzt wurde. Sollten in diesem Fall die gleichen Tat-Komplexe detektiert werden, würde dies einen Hinweis darauf liefern, dass die Assemblierung dieser Tat-Komplexe tatsächlich essenziell für die Funktionalität des Tat Systems ist.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit *tatA* inklusive der zugehörigen ribosomalen Bindestelle aus dem *tatABC*-Operon entfernt und durch und *tatE* inklusive der dazugehörigen ribosomalen Bindestelle (5'-AGAAGG-3') ersetzt. Zur Erhaltung der ribosomalen Bindestelle von *tatB*, die sich am 5'-Ende von *tatA* befindet, wurde *tatE* um die letzten 6 Nukleotide von *tatA* verlängert, gefolgt von einem Stop-Codon. Anschließend wurden Zellen des Stamms *E. coli* DADE 6 ara^R mit dem pABS-*tatEBC_{H6}* Konstrukt transformiert. Diese wurden für die Durchführung von SDS-Sensitivitätsmessungen (siehe **Abbildung 33A**) und die Präparation von solubilisierten Membranen und BN-PAGE/Western-Blot-Analysen verwendet (siehe **Abbildung 33B**).

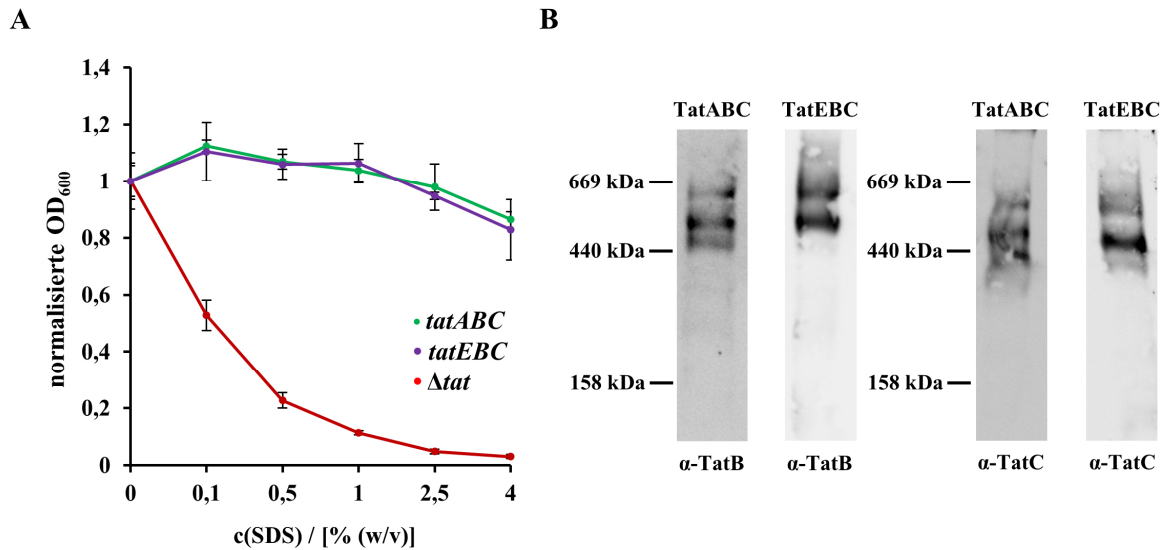


Abbildung 33: TatE kann sowohl funktionell, als auch strukturell das Fehlen von TatA komplementieren. Funktionalitätsanalyse und Analyse der Assemblierung von TatBC-Komplexen beim TatEBC-System. **(A)** SDS-Sensitivitätsmessung vom TatEBC-System im Vergleich zum Wildtyp-Tat-System. Aufgetragen wurde die normalisierte optische Dichte bei 600 nm gegen die prozentuale SDS-Konzentration des LB-Mediums. **(B)** BN-PAGE/Western-Blot-Analyse des TatEBC-Systems im Vergleich zum Wildtyp-TatABC-System. 4 - 12 %ige BN-Acrylamidgele, 10 μ l Marker- und Probenvolumen. Die verwendeten Größenstandards sind links neben- und die verwendeten Antikörper unter den Blots indiziert.

Anhand der SDS-Sensitivitätsmessungen konnten die Ergebnisse voriger Studien, in denen eine funktionelle Komplementation des Fehlens von *tatA* durch *tatE* beobachtet werden konnte, bestätigt werden. So konnte bei der Verwendung von TatEBC-Systemen keine SDS-Sensitivität beobachtet werden (siehe **Abbildung 33A**). Des Weiteren konnten mittels der BN-PAGE/Western-Blot-Analysen von Membranen, die mit Digitonin solubilisiert wurden, TatBC-Komplexe von identischem Molekulargewicht im Vergleich zum Wildtyp-TatABC-System detektiert werden. Präziser konnten hierbei die Tat-Komplexe 1 und 2 unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen TatB und TatC detektiert werden (siehe **Abbildung 33B**). Ein spezifischer Antikörper gegen TatE stand zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung. Dies lässt darauf schließen, dass TatE TatA nicht nur funktionell, sondern auch strukturell vollständig ersetzen kann. Die Tatsache, dass für TatB und TatC die identischen Tat-Komplexe wie im Wildtyp-TatABC-System detektiert werden konnten, könnte darauf hinweisen, dass die Assemblierung dieser Komplexe tatsächlich eine Notwendigkeit für die Funktionalität des Tat-Systems darstellt.

3.3.7 Die Assemblierung der Tat-Komplexe ist unabhängig vom Membranpotential

Neben der Anwesenheit der einzelnen Tat-Komponenten ist die Funktionalität des Tat-Systems auch vom Membranpotential abhängig. So kann der Tat-abhängige Transport sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nur über energetisierte Membranen stattfinden (Cline 2015). Durch die Zugabe des Entkopplers Carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazon (CCCP) können Membranen permeabilisiert werden. Diese Permeabilität führt dazu, dass Protonen die Membran passieren können. In der Folge kommt das Membranpotential zum Erliegen, die Membran kann nicht mehr energetisiert werden und es kann kein Tat-abhängiger Transport von Substraten stattfinden (Cline 2015). Unklar ist bisher jedoch, welchen Einfluss das Membranpotential auf die Interaktion zwischen den einzelnen Tat-Komponenten während des Transports hat.

Um den Einfluss des Membranpotentials auf die Assemblierung von Tat-Komplexen zu untersuchen, wurde den Kulturen eine Stunde vor der Zellernte 100 μ M CCCP zugegeben. Zum Vergleich wurde eine zweite Kultur verwendet, die identisch behandelt wurde. Jedoch wurde auf die Zugabe von CCCP verzichtet. Anschließend wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen, die Membranen präpariert und die solubilisierten Membranproteine mittels BN-PAGE/Western-Blot analysiert (siehe **Abbildung 34**).

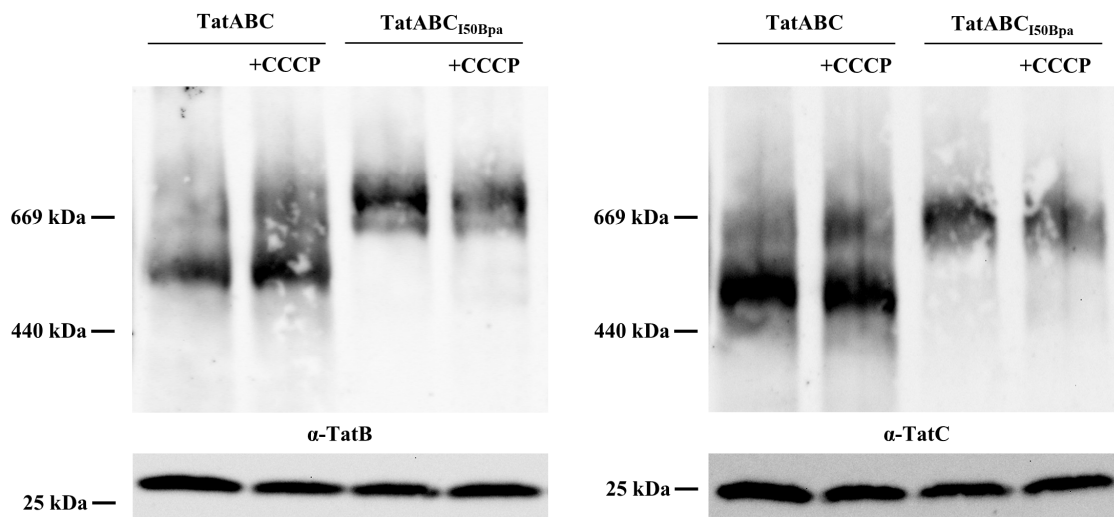


Abbildung 34: Die Assemblierung von Tat-Komplexen ist nicht von der protonenmotorischen Kraft abhängig. BN-PAGE/Western-Blot-Analyse (4 - 12 %ige BN-Acrylamidgele, 10 μ l Marker- und Probenvolumen) sowie die dazugehörigen SDS-PAGE/Western-Blot-Analysen (15 %ige Acrylamidgele, 3 μ l Marker- und 10 μ l Probenvolumen) der solubilisierten Membranfraktionen aus Stämmen (*E. coli* DADE D6 *ara*^R), die TatABC bzw. TatABC_{150Bpa} produzierten (pDE). Je eine Kultur wurde mit 100 μ M CCCP behandelt und mit der solubilisierten Membranfraktion der entsprechenden Kultur verglichen, die nicht mit CCCP behandelt wurde.

Der Vergleich von Tat-Komplexen, die aus mit CCCP behandelten Kulturen stammen, mit Tat-Komplexen aus solchen Kulturen, die nicht mit CCCP behandelt wurden, zeigte, dass die Zugabe von CCCP keinen Einfluss auf die detektierbaren Tat-Komplexe hatte. So konnten auch nach der Zugabe von CCCP die Tat-Komplexe 1 und 2 für Wildtyp-TatABC-Systeme (siehe **Abbildung 34**, Bahnen 1 und 2) und die Tat-Komplex 2S und 3 für TatABC_{150Bpa}-Systeme detektiert werden (siehe **Abbildung 34**, Bahnen 3 und 4). Dies spricht dafür, dass die Assemblierung von Tat-Komplexen, im Gegensatz zum Tat-abhängigen Transport von Substraten, nicht durch das Membranpotential beeinflusst wird. Wäre der Schritt, der den Tat-abhängigen Transport vom Membranpotential abhängig macht, die Assemblierung der Tat-Komplexe, hätte sich ein eindeutiger Unterschied zwischen solubilisierten Membranen aus Kulturen, die mit CCCP behandelt wurden und solchen, die nicht mit CCCP behandelt wurden, ergeben müssen. In diesem Fall hätte erwartet werden können, dass CCCP die Interaktion zwischen den Tat-Komponenten unterbindet und keine Tat-Komplexe mittels BN-PAGE/Western-Blot detektiert werden können. Da dies jedoch nicht der Fall war, kann davon ausgegangen werden, dass die Assemblierung von Tat-Komplexen nicht von einem intakten Membranpotential abhängig ist.

3.4 Etablierung von Strategien zur Reinigung von Tat-Komplexen

Wie bereits in Abschnitt 3.3.5 erwähnt wurde, sollten Strategien zur Reinigung von Tat-Komplexen etabliert werden. Diese Strategien sollten vor allem für strukturelle Studien verwendet werden. Jedoch ergaben sich aus der Analyse gereinigter Tat-Komplexe auch einige Hinweise bezüglich ihrer Zusammensetzung (siehe Abschnitt 3.3.5). Aus vorherigen Studien war bekannt, dass Tat-Komplexe gereinigt werden können. Allerdings gelang es dabei nur, Tat-Komplex 1 zu reinigen. Für die Reinigung wurden TatABC-, TatBC- und TatC-Systeme verwendet. Die stabilsten Tat-Komplexe konnten mittels BN-PAGE/Western-Blot-Analyse nach der Reinigung von TatBC-Systemen beobachtet werden. Jedoch zeigte sich auch immer eine deutliche Disassemblierung von Tat-Komplexen durch die Detektion von kleineren Proteinkomplexen (Orriss *et al.* 2007). Aus diesem Grund sollten Strategien zur Reinigung von TatABC-Komplexen etabliert werden, bei der Tat-Komplexe in stabiler Form erhalten werden können. Des Weiteren sollte ein Auftreten von Disassemblierungsprodukten so weit wie möglich vermieden werden. Mit der Reinigungsstrategie sollte eine möglichst hohe Reinheit bei ausreichender Ausbeute erreicht werden, um so viel Material für strukturelle Untersuchungen wie möglich zu generieren.

Die Reinigung der Tat-Komplexe sollte unter Zuhilfenahme affinitätschromatographischer Methoden durchgeführt werden, wobei auf Hexahistidin-*Tags* und Strep-*Tags*[®] II zurückgegriffen wurde. Als Matrices wurden Agarose und *magnetic beads* eingesetzt. Während bei der Verwendung von funktionalisierter Agarose das Volumen einer Elutionsfraktion in der Regel dem Volumen des Säulenmaterials entsprechen muss, weisen *magnetic beads* den Vorteil auf, dass die stationäre Phase nicht nur mit der Probe, sondern auch mit dem Elutionspuffer inkubiert werden kann. Dies ermöglicht die Elution von allen gebundenen Proteinen in sehr kleinem Volumen, wodurch eine höhere Konzentration des Zielproteins in der Elutionsfraktion im Vergleich zu Durchflussverfahren erreicht werden kann. Für die Etablierung einer Reinigungsstrategie wurden einzelne Anreicherungsschritte durchgeführt. Mittels BN-PAGE/Western-Blot wurde anschließend die Stabilität bzw. das Auftreten von Disassemblierungsprodukten überprüft. Anhand von BN-PAGE in Verbindung mit einer Silber- oder kolloidalen Coomassie-Färbung konnte des Weiteren der Grad der Reinheit bzw. das Auftreten von ungewünschten Koeluenten abgeschätzt werden. Diese sollten durch die Kombination verschiedener Reinigungstechniken möglichst komplett entfernt werden.

3.4.1 Affinitätschromatographische Reinigung von TatABC-Komplexen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass TatC-Protomere, die als Fusionsprotein mit einem *Tag* produziert werden, die Assemblierung der Tat-Komplexe nur geringfügig bis gar nicht beeinflussen. Im Rahmen vorheriger Experimente konnten für das verwendete TatC_{H6}-Fusionsprotein nur selten Disassemblierungsprodukte detektiert werden. Aus diesem Grund sollte der Hexahistidin-*Tag* des TatC_{H6}-Fusionsproteins zur affinitätschromatographischen Reinigung mittels Ni-IMAC oder Ni-NTA-*magnetic beads* verwendet werden.

Zu diesem Zweck wurden zunächst Membranen aus 100 ml Kulturen von *E. coli* DADE D6 ara^R pABS-*tatABC*_{H6} (OD₆₀₀ = 1,0) präpariert und die Membranproteine durch die Zugabe von 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Nach der Entfernung von nicht solubilierten Membranbestandteilen mittels Ultrazentrifugation wurde TatC_{H6} unter Verwendung des BN-Aufschlusspuffers [50 mM Bis-Tris HCl (pH 7,0), 20 % (w/v) Saccharose, 10 mM MgCl₂, 1 % (w/v) Digitonin] und Ni-NTA Agarose angereichert. Zur Elution des gebundenen TatC_{H6} wurde der identische Puffer mit 250 mM Imidazol verwendet. Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen inklusive einer nicht angereicherten Probe (ÜS) mittels BN-PAGE/Western-Blot analysiert (siehe **Abbildung 35**).

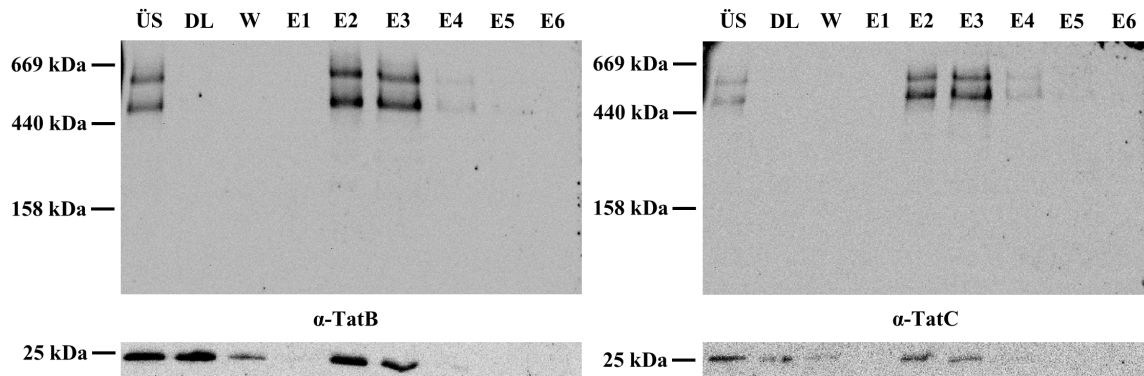


Abbildung 35: Die Tat-Komplexe 1 und 2 können mittels Ni-NTA-Agarose gereinigt werden. BN-PAGE/Western-Blot- (5 - 13 %ige BN-Acrylamidgele, 10 µl Marker- und Probenvolumen) sowie SDS-PAGE/Western-Blot-Analyse (15 %ige Acrylamidgele, 3 µl Marker- und 10 µl Probenvolumen) des Elutionsprofils der affinitätschromatographischen Reinigung von Wildtyp-TatABC-Komplexen. Aufgetragen wurden die solubilisierten Membranen vor der Reinigung (ÜS), der Durchlauf (DL), die Waschfraktion (W) sowie die 6 Elutionsfraktionen (E1 - E6).

Das Elutionsprofil der affinitätschromatographischen Reinigung mittels Ni-NTA-Agarose zeigte, dass nicht nur Tat_{C_{H6}} gereinigt werden konnte. Unter den gewählten Bedingungen wurde die Interaktion zwischen TatB und Tat_{C_{H6}} nicht nennenswert gestört, sodass die Tat-Komplexe 1 und 2 in den Elutionsfraktionen 2 und 3 (E2 und E3) mittels BN-PAGE/Western-Blot detektiert werden konnten. Lediglich eine geringe Menge TatB konnte mittels SDS-PAGE/Western-Blot im Durchlauf detektiert werden (DL) (siehe **Abbildung 35**). Da aufgrund der Organisation des *tatABC*-Operons jedoch höhere Mengen von TatB als von TatC vorliegen, kann es sich dabei auch um überschüssiges TatB handeln, welches keine TatC-Protomere als Interaktionspartner hat.

Außerdem sollte die Reinigung von Tat-Komplexen mittels Ni-NTA-*magnetic beads* durchgeführt werden. Auch für die Reinigung mittels Ni-NTA-*magnetic beads* wurden zunächst testweise Reinigungen mit Membranen durchgeführt, die aus 100 ml Kulturvolumen (OD₆₀₀ = 1,0) nach dem oben beschriebenen Protokoll präpariert wurden. Anschließend wurde die erste Elutionsfraktion (E1) jeweils im Vergleich zu einer nicht gereinigten Probe (ÜS) mittels BN-PAGE/Western-Blot analysiert (siehe **Abbildung 36**).

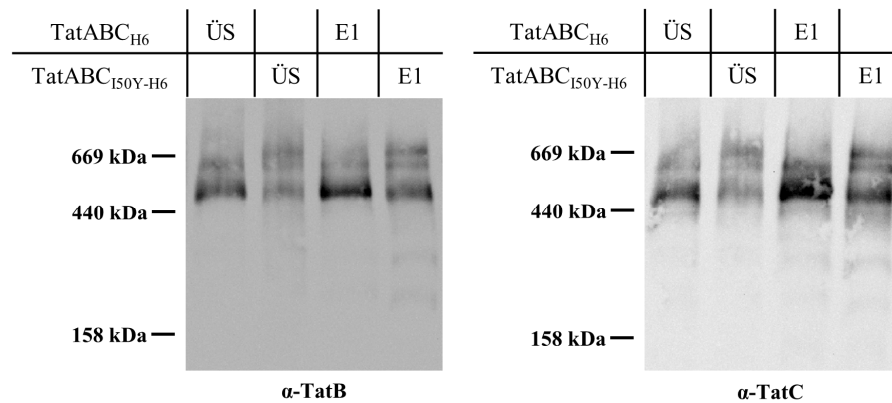


Abbildung 36: Reinigung von Tat-Komplexen mittels Ni-NTA-*magnetic beads*. BN-PAGE/Western-Blot-Analyse (5 - 13,5 %ige BN-Acrylamidgele, 10 µl Marker- und Probenvolumen) der ersten Elutionsfraktion der affinitätschromatographischen Anreicherung von TatABC- und TatABC_{150Y}-Komplexen (pABS). Aufgetragen wurden die solubilisierten Membranen vor der Anreicherung (ÜS) sowie die erste Elutionsfraktion (E1).

Bei der Reinigung von TatC_{H6} mithilfe von Ni-NTA-*magnetic beads* zeigte sich, dass auch hier unter den gewählten Bedingungen keine Disassemblierung der Tat-Komplexe zu beobachten war. So konnten die Tat-Komplexe 1 und 2 in der ersten Elutionsfraktion detektiert werden (siehe **Abbildung 36**, Bahn 3). Des Weiteren konnten die Tat-Komplexe 1, 2S und 3 nach der Reinigung von TatC_{150Y-H6} in der ersten Elutionsfraktion detektiert werden (siehe **Abbildung 36**, Bahn 4). Auffällig war hierbei, dass die Reinigung von TatC_{150Y-H6} dazu führte, dass in einem geringen Maß Disassemblierungsprodukte in der ersten Elutionsfraktion detektiert wurden. Dies bestätigte vorherige Beobachtungen, wonach Tat-Komplexe, bei denen TatC Isoleucin 50 durch Tyrosin ausgetauscht wurde, eine deutlich geringere Stabilität aufweisen. Es konnten jedoch anhand der Reinigungen von TatC_{H6} sowohl unter Zuhilfenahme von Ni-NTA-Agarose als auch von Ni-NTA-*magnetic beads* die Tat-Komplexe 1, 2, 2S und 3 erfolgreich gereinigt werden.

3.4.2 Größenausschlusschromatographische Reinigung von TatABC Komplexen

Nach der erfolgreichen Reinigung von Tat-Komplexen mittels Ni-IMAC wurden Membranen aus mehr als 100 ml Kulturvolumen präpariert. Zunächst wurde hierfür 1 l Kulturvolumen verwendet und das oben beschriebene Protokoll dementsprechend angepasst. Die Membranproteine wurden solubilisiert und TatC_{H6} mittels Ni-IMAC gereinigt. Um die Reinheit zu überprüfen und den Anteil unerwünschter Koeluenten abzuschätzen, wurden die BN-Acrylamidgele mithilfe einer kolloidalen Coomassie-Färbung gefärbt (siehe **Abbildung 37**).

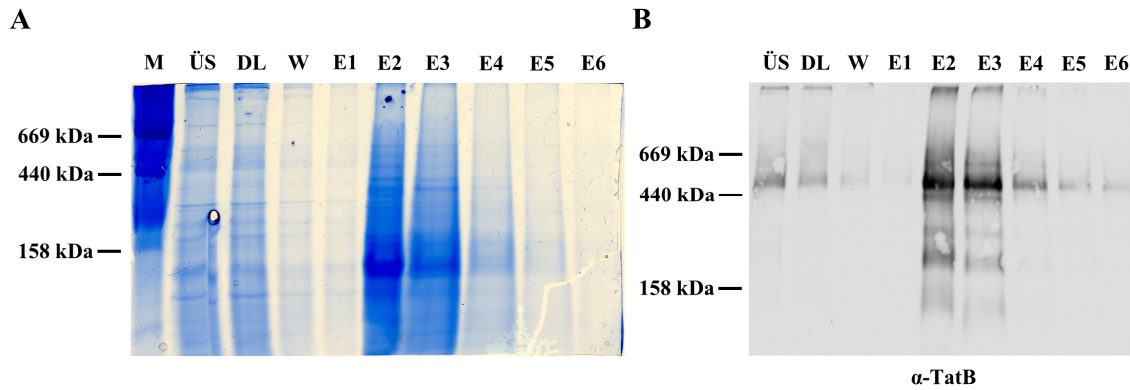


Abbildung 37: Reinigung von Tat_{CH6} (pABS) aus 1 l Kulturvolumen mittels Ni-NTA-Agarose. **(A)** Kolloidale Coomassie-Färbung des Acrylamidgels. **(B)** BN-PAGE/Western-Blot-Analyse (5 - 13,5 %iges BN-Acrylamidgel, 10 µl Marker- und Probenvolumen) des Elutionsprofils. Für die Reinigung wurden die Membranen aus 1 l Kulturvolumen verwendet. Aufgetragen wurden Proben vor der Reinigung (ÜS), aus dem Durchlauf (DL), der Waschfraktion (W) sowie den Elutionsfraktionen (E1 - E6). Die verwendeten Größenstandards sind links neben- und die verwendeten Antikörper unter den Blots indiziert.

Die BN-PAGE/Western-Blot-Analyse zeigte zwar, dass die Reinigung von Tat-Komplexen aus 1 l Kulturvolumen erfolgreich war (siehe **Abbildung 37B**), jedoch deutete das (Kolloidal-Coomassie)-gefärbte BN-Acrylamidgel darauf hin, dass die gereinigten Tat-Komplexe nur einen vergleichsweise geringen Anteil der Protein-Konzentration der Elutionsfraktionen ausmachten (siehe **Abbildung 37A**). Daraus ließ sich schließen, dass die Reinheit nicht ausreichend für strukturelle Untersuchungen war. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass das *Upscaling* dazu führte, dass deutlich mehr Disassemblierungsprodukte der Tat-Komplexe detektiert werden konnten (siehe **Abbildung 37B**). Dies könnte zum Beispiel an der Konzentration der Tat-Komponenten während der Bindung an das Säulenmaterial liegen. Möglich wären jedoch auch Verdünnungseffekte bei der Solubilisierung der Membranproteine. Aus diesem Grund wurde der Ansatz fortan nach der Präparation der Membranen in 200 µl Ansätze geteilt, sodass jeder Solubilisierungsansatz einem Membranpellet aus 100 ml Kulturvolumen ($OD_{600} = 1,0$) entsprach.

Um die Tat-Komplexe weiter anzureichern und eine höhere Reinheit in den Elutionsfraktionen zu erreichen, sollte der Anreicherung mittels Ni-IMAC ein weiterer Anreicherungsschritt folgen. Anhand einer bekannten Prozedur (Orriss *et al.* 2007) sollte die Reinigung der Tat-Komplexe mithilfe einer Größenausschlusschromatographie (Superose 6 10/300 GL, GE Healthcare, Freiburg) durchgeführt werden. Hierfür sollte aus technischen Gründen die Digitonin-Konzentration im Laufe der Reinigung auf 0,1 % (w/v) reduziert werden, sodass die

Reinigung mittels FPLC und Größenausschlusschromatographie mit einem modifizieren Puffersystem [50 mM Bis-Tris HCl (pH 7,0), 20 % (w/v) Saccharose, 10 mM MgCl₂, 0,1 % (w/v) Digitonin] durchgeführt wurde. Mit diesem Puffersystem und dem zu verwendenden Säulenmaterial wurde zunächst eine Kalibration mit bekannten Proteinen durchgeführt, die daraufhin als Größenstandard dienen sollten (siehe **Abbildung 38**).

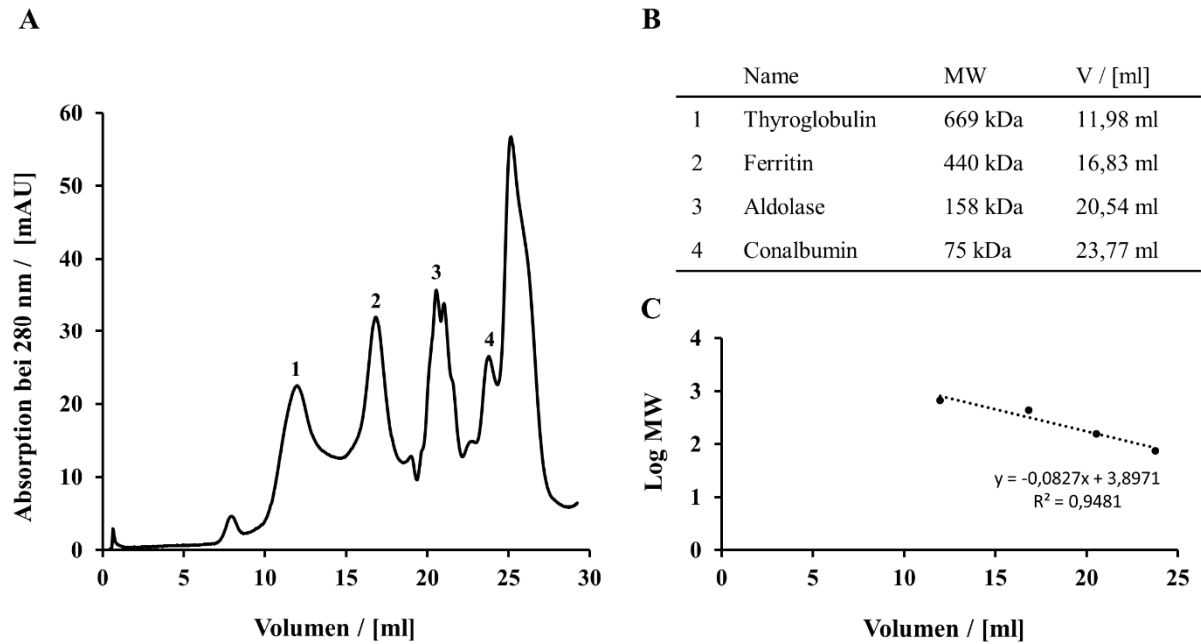


Abbildung 38: Kalibration der Superose 6 10/300 GL Säule für die Größenausschlusschromatographie. **(A)** Elutionsprofil der Größenstandards Thyroglobulin (669 kDa, **1**), Ferritin (440 kDa, **2**), Aldolase (158 kDa, **3**) und Conalbumin (75 kDa, **4**). Aufgetragen wurde die Absorption bei 280 nm in mAU gegen das Puffervolumen nach der Probeninjektion. **(B)** Auflistung der verwendeten Größenstandards sowie deren Molekulargewicht und das Elutionsvolumen für die verwendete Superose 6 Säule. **(C)** Anhand der verwendeten Größenstandards wurde der Logarithmus des Molekulargewichts gegen das Elutionsvolumen aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt.

Anhand des Molekulargewichts der verwendeten Größenstandards Thyroglobulin, Ferritin, Aldolase und Conalbumin und den entsprechenden Elutionsvolumina wurde eine lineare Regression durchgeführt (siehe **Abbildung 38C**). Diese sollte in den folgenden Experimenten als Größenstandard dienen.

3.4.2.1 Größenausschlusschromatographische Reinigung von TatABC_{I50Bpa}-Komplexen

Um die Reinheit zu erhöhen, sollten im Folgenden die in den Elutionsfraktionen der Ni-IMAC enthaltenen Proteine mittels Größenausschlusschromatographie voneinander separiert werden. Auf diesem Wege sollten die Tat-Komplexe mit höherem Molekulargewicht erhalten - und die unerwünschten Koeluenten der ersten Reinigung sowie Disassemblierungsprodukte der Tat-Komplexe entfernt werden. Hierfür wurden die Elutionsfraktionen 2 und 3 der Ni-Affinitätschromatographie (siehe **Abbildung 37**) zusammengeführt und für die Größenausschlusschromatographie (ÄKTA purifier, Superose 6 10/300 GL, GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Mithilfe eines UV-Detektors wurde die Absorption des Eluats in mAU bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgezeichnet. Das Elutionsprofil wurde erhalten indem die Absorption gegen das Elutionsvolumen aufgetragen wurde (siehe **Abbildung 39**). Das Eluat wurde in je 1 ml Fraktionen gesammelt.

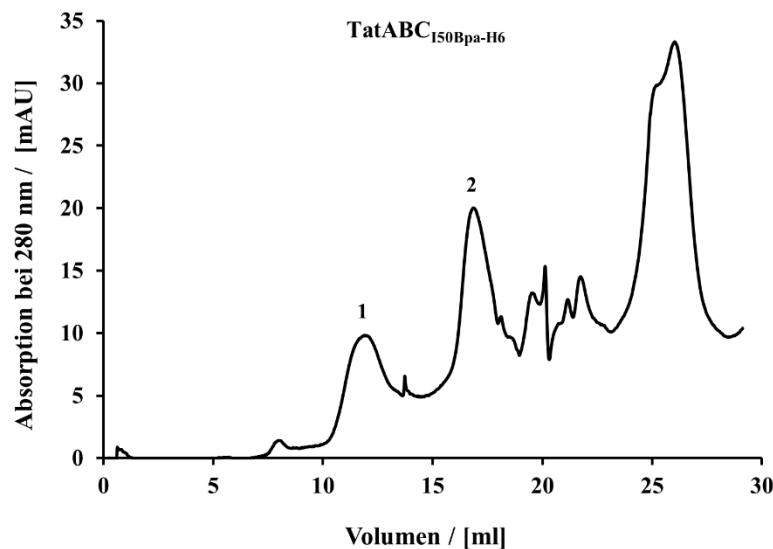


Abbildung 39: Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie mittels Superose 6 10/300 GL. Aufgetragen wurde die Absorption bei 280 nm in mAU gegen das Elutionsvolumen nach der Probeninjektion. Injiziert wurden die Elutionsfraktion 2 und 3 nach einer Reinigung von TatC_{I50Bpa}-H₆ (pDE) mittels Ni-NTA Agarose. Verwendet wurden die Elutionsvolumina von 11 bis 14 ml nach der Probeninjektion.

Nach affinitätschromatographischer Reinigung von TatABC_{I50Bpa}-H₆ und anschließender Größenausschlusschromatographie zeigte das Elutionsprofil zwei deutliche Peaks (siehe **Abbildung 39**, 1 und 2). Diese traten bei einem Elutionsvolumen von 11,88 ml (1) und 16,84 ml (2) auf. Da das Migrationsverhalten der Tat-Komplexe nicht bekannt war, wurden beide Peaks für die weitere Analyse verwendet. Hierfür wurden die Elutionsfraktionen für Peak 1 (11 - 14 ml) und Peak 2 (15 - 18 ml) zusammengeführt. Aufgrund des großen Volumens der

Fraktionen (je 3 ml) wurde nach der Entnahme einer Probe für BN-PAGE/Western-Blot-Analysen (siehe **Abbildung 40**, ÜS) eine Konzentration mittels Ni-NTA-*magnetic beads* durchgeführt. Auf diese Art und Weise wurde eine Konzentration um Faktor 100 erreicht. Sowohl die Proben vor der Konzentration (ÜS) als auch die Elutionsfraktionen nach der Konzentration wurden anschließend mittels BN-PAGE/Western-Blot analysiert. (siehe **Abbildung 40**).

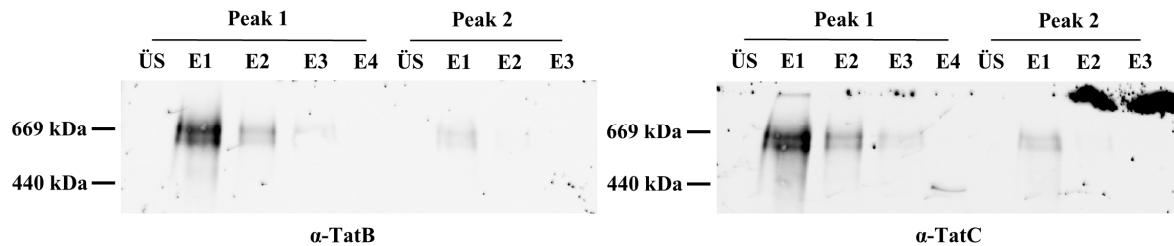


Abbildung 40: Elutionsprofil der Reinigung der Elutionsfraktionen nach Größenausschlusschromatographie mittels Ni-NTA-*magnetic beads*. BN-PAGE/Western-Blot-Analyse. 5 - 13,5 %ige BN-Acrylamidgele. 10 µl Marker- und Probenvolumen.

Nach der erneuten Reinigung von TatC_{I50Bpa-H6} aus den Elutionsfraktionen der Größenausschlusschromatographie konnten die Tat-Komplexe 2S und 3 vor allem aus den zusammengeführten Fraktionen von Peak 1 angereichert werden (Peak 1, E1). Die Notwendigkeit der erneuten Konzentration wurde außerdem dadurch deutlich, dass diese Tat-Komplexe nicht in den Proben detektiert werden konnten, die vor der Konzentration entnommen wurden (ÜS). Die BN-PAGE/Western-Blot-Analyse der zusammengeführten Fraktionen des zweiten Peaks ergab, dass nur geringere Mengen der Tat-Komplexe 2S und 3 nach der anschließenden Konzentration mittels Ni-NTA-*magnetic beads* erhalten werden konnten. (siehe **Abbildung 40**). Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass es sich beim zweiten Peak des Elutionsprofils der Größenausschlusschromatographie nicht um ein Tat-spezifisches Signal handelte.

Die hier verwendeten BN-PAGE/Western-Blot-Analysen zeigten außerdem, dass überschüssiges TatA, welches zur Bildung von Homooligomeren neigt, mithilfe der gewählten Methode entfernt werden konnte. Auf diese Weise konnte TatA nach der Reinigungsstrategie in Kolokalisation mit den Tat-Komplexen 2S und 3 detektiert werden (siehe Abschnitt 3.3.5).

3.4.2.2 Größenausschlusschromatographische Reinigung von TatABC_{WT}-Komplexen

Nach der erfolgreichen Reinigung von TatABC_{I50Bpa-H6}-Komplexen mithilfe von drei aufeinanderfolgenden Reinigungsschritten sollten ebenfalls TatABC_{H6}-Komplexe, die denen des Wildtyp-TatABC-Systems entsprechen, gereinigt werden. Unter Verwendung der beschriebenen Methode (siehe Abschnitt 2.4.5) konnte ein ähnliches Elutionsprofil erhalten werden (siehe **Abbildung 41**).

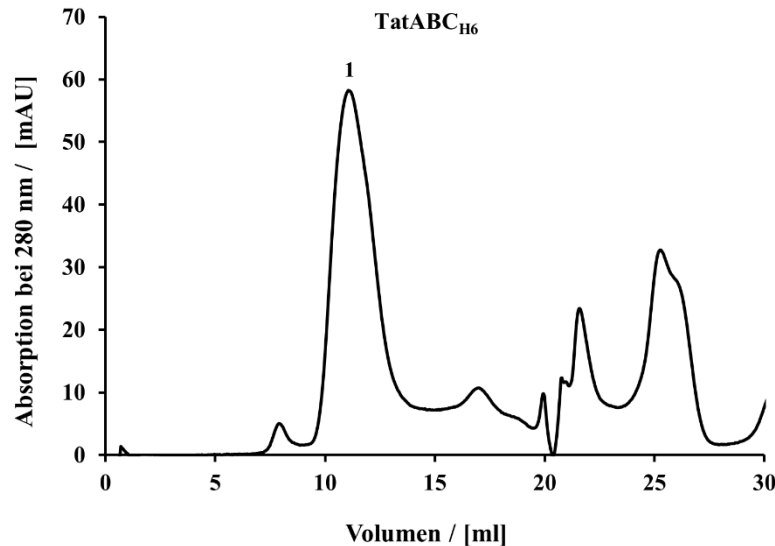


Abbildung 41: Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie mittels Superose 6 10/300 GL. Aufgetragen wurde die Absorption bei 280 nm in mAU gegen das Elutionsvolumen nach der Probeninjektion. Injiziert wurden die Elutionsfraktionen 2 und 3 nach einer Reinigung von TatC_{H6} (pABS) mittels Ni-NTA-Agarose. Verwendet wurden die Elutionsfraktionen von 10 ml bis 13 ml nach der Probeninjektion.

Im Gegensatz zur Reinigung von TatABC_{I50Bpa-H6}-Komplexen konnte Peak 2 bei der Reinigung von TatABC_{H6}-Komplexen nur mit deutlich verringerter Intensität beobachtet werden. Peak 1 hingegen wies eine deutlich höhere Intensität als bei der Reinigung von TatABC_{I50Bpa-H6}-Komplexen auf. (siehe **Abbildung 41**). Aufgrund dieser Tatsache und den Beobachtungen aus dem vorherigen Experiment, bei dem deutlich wurde, dass die gewünschten Tat-Komplexe hauptsächlich in Verbindung mit dem Auftreten des ersten Peaks stehen, wurden nur die Elutionsfraktionen für Peak 1 zusammengeführt. Die zusammengeführten Elutionsfraktionen (10 - 13 ml) wurden ebenfalls nach der Entnahme einer Probe (ÜS) für die BN-PAGE/Western-Blot-Analyse zwecks Konzentration für eine weitere Reinigung von TatC_{H6} mittels Ni-NTA-*magnetic beads* verwendet. Die erhaltenen Proben wurden zusammen mit der vorher entnommenen Probe (ÜS) mittels BN-PAGE/Western-Blot analysiert (siehe **Abbildung 42**).

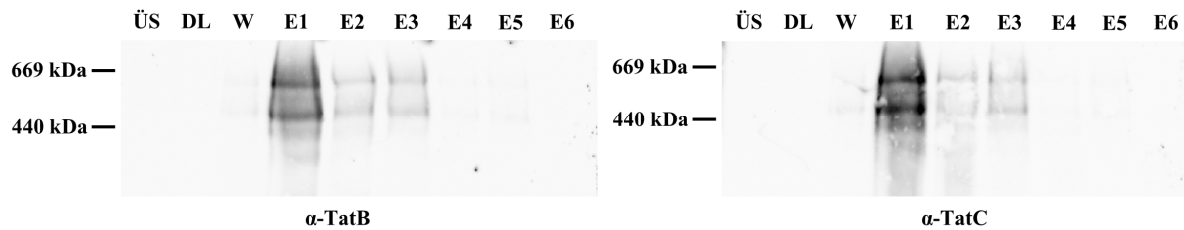
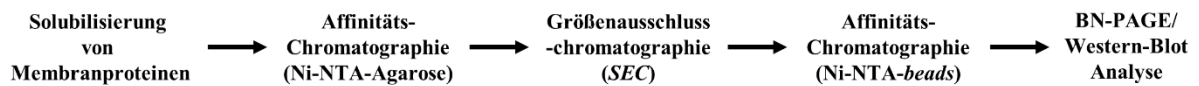


Abbildung 42: Elutionsprofil der Reinigung der Elutionsfraktionen von Peak 1 (10 - 13 ml) nach Größenausschlusschromatographie mittels Ni-NTA-*magnetic beads*. BN-PAGE/Western-Blot-Analyse. 5 - 13,5 %ige BN-Acrylamidgele. 10 µl Marker- und Probenvolumen. Aufgetragen wurde die Probe vor der letzten Reinigung (ÜS) sowie der Durchlauf (DL), die Waschfraktion (W) und die Elutionsfraktionen (E1 - E6) der Reinigung mittels Ni-NTA-*magnetic beads*. Die verwendeten Größenstandards sind links neben- und die verwendeten Antikörper unter den Blots indiziert.

Auch bei der Reinigung von TatABC_{H6}-Komplexen konnten die erwarteten Tat-Komplexe 1 und 2 nach der finalen Konzentration mit Ni-NTA-*magnetic beads* in den Elutionsfraktionen detektiert werden (siehe **Abbildung 42**, E1 - E3). Die Notwendigkeit der finalen Konzentration wurde ebenfalls deutlich, da in der Probe, die vor der finalen Konzentration entnommen wurde, keine Tat-Komplexe detektiert werden konnten (**Abbildung 42**, ÜS).



Schema 1: Arbeitsschema für die Reinigung von Tat-Komplexen.

Anhand der beschriebenen Reinigungsstrategie, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt wurde (siehe **Schema 1**), konnten die Tat-Komplexe 1, 2, 2S und 3 gereinigt werden. Ziel der Reinigung war jedoch die Generation von Material in ausreichender Menge, um strukturelle Studien durchzuführen. Hierfür sollten die Tat-Komplexe nach dem letzten Reinigungsschritt zumindest in solcher Quantität vorliegen, dass diese mithilfe einer Coomassie-Färbung eines BN-Acrylamidgels detektiert werden können. Dies war mit der verwendeten Reinigungsstrategie nicht möglich. Aus diesem Grund sollte eine weitere Strategie entwickelt werden sollte.

3.4.3 Kombination zweier affinitätschromatographischer Reinigungsschritte

Aufgrund der geringen Ausbeute während der Reinigung wurde im Folgenden auf die Größenausschlusschromatographie verzichtet. Stattdessen wurden zwei aufeinanderfolgende affinitätschromatographische Reinigungen durchgeführt. Um trotzdem eine möglichst hohe Reinheit zu erreichen, sollten die beiden Reinigungsschritte mit unterschiedlichen stationären Phasen durchgeführt werden. Auf diese Weise konnten Koeluenten, die unspezifisch an eine der stationären Phasen binden, durch einen zweiten Reinigungsschritt entfernt werden.

3.4.3.1 Reinigung von Substrat-assoziierten TatABC Komplexen

Die Reinigung sollte anhand von His-Tag-Fusionsproteinen sowie Strep-Tag[®] II-Fusionsproteinen durchgeführt werden. Für die Detektion von substratassoziierten-Tat-Komplexen wurde bereits in vorherigen Experimenten (siehe Abschnitte 3.2.2, 3.2.4 und 3.2.5) ein DNA-Konstrukt (pBW-*efeB_{Strep}*) verwendet, welches zur heterologen Produktion von EfeB_{Strep}-Fusionsproteinen eingesetzt wurde. Das codierende Gen *efeB_{Strep}* wird dabei unter der Kontrolle eines Rhamnose-induzierbaren Promotors (P_{rha}) exprimiert. EfeB ist ein Tat-Substrat, welches im Laufe der Translokation mit dem Translokase-Komplex interagiert. Die Interaktion mit der Tat-Translokase ist dabei im Vergleich zu anderen Tat-Substraten so stark, dass EfeB-Tat-Komplexe solubilisiert und nach BN-PAGE/Western-Blot-Analyse detektiert werden können (Behrendt und Brüser 2014).

In vorherigen Experimenten wurde bereits ein Stamm (*E. coli* DADE D6 ara^R) verwendet, der neben EfeB_{Strep} (pBW) auch TatABC_{H6} (pABS) produziert. Dieser Stamm wurde auch im Rahmen der Etablierung einer neuen Reinigungsstrategie verwendet. Nach der Präparation von Membranen wurden die Membranproteine solubilisiert. Anschließend wurde Tat_{H6} mittel Ni-NTA *magnetic beads* gereinigt. Die Elutionsfraktion wurde anschließend für die Reinigung von EfeB_{Strep} mittels Strep-Tactin[®]XT *magnetic beads* verwendet. Anschließend wurde mittels BN-PAGE/Western-Blot-Analyse überprüft, ob EfeB-Tat-Komplexe erhalten wurden (siehe **Abbildung 43**).

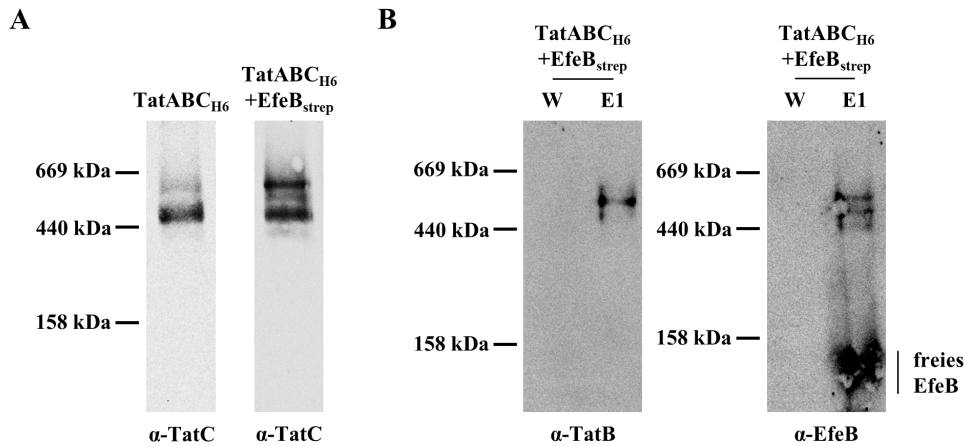
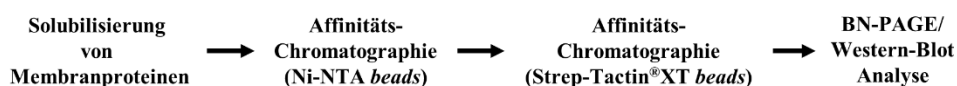


Abbildung 43: Reinigung von Tat-Komplexen, die mit dem Tat-Substrat EfeB assoziiert sind. BN-PAGE/Western-Blot-Analyse, 5 - 13.5 %ige BN-Acrylamidgele, 10 µl Marker- und Probenvolumen. **(A)** EfeB-Tat-Komplexe im Vergleich zu TatABC-Komplexen. **(B)** Waschfraktion (W) und erste Elutionsfraktion (E1) nach der Reinigung mit Strep-Tactin[®]XT *magnetic beads*. Die verwendeten Größenstandards sind links neben- und die verwendeten Antikörper unter den Blots indiziert.

Nach der zweistufigen Reinigung, bei der zunächst Ni-NTA- und dann Strep-Tactin[®]XT *magnetic beads* verwendet wurden, konnten sowohl für TatB als auch für EfeB Signale im Bereich von Tat-Komplexen detektiert werden. Bei der Verwendung eines Antikörpers gegen EfeB konnten zwei Signale beobachtet werden, die wahrscheinlich den substratassoziierten Tat-Komplexen 1S und 2S entsprechen. Es konnte jedoch auch freies EfeB detektiert werden, welches entweder unspezifisch an die Ni-NTA *magnetic beads* gebunden hat oder während der Reinigung aus der Disassemblierung von EfeB-Tat-Komplexen resultierte (siehe **Abbildung 43B**). Bei der Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen TatB sollten eigentlich die drei Tat-Komplexe 1, 1S und 2S detektiert werden (siehe **Abbildung 43A**). Nach zwei affinitätschromatographischen Reinigungen konnte einer der Tat-Komplexe klar detektiert werden. Die extrem schwachen Signale darunter und darüber lassen vermuten, dass es sich dabei um Tat-Komplex 1S handelt. Für eine genauere Aussage müsste das Experiment allerdings mit einer größeren Menge Ausgangsmaterials wiederholt werden.



Schema 2: Arbeitsschema für die Reinigung von Tat-Komplexen mittels affinitätschromatographischer Methoden.

Mithilfe der gewählten Reinigungsstrategie (siehe **Schema 2**) konnten substratassoziierte Tat-Komplexe bzw. EfeB-Tat-Komplexe gereinigt werden. Für die Detektion von EfeB-Tat-Komplexen ist es jedoch nötig, dass EfeB in großen Mengen produziert wird. Auf diese Weise wird das Gleichgewicht zwischen den einzelnen Tat-Komplexen so beeinflusst, dass vermehrt EfeB-Tat-Komplexe assemblieren. Aus diesem Grunde sollte der Strep-Tag[®] II an TatB fusioniert werden, sodass auch Tat-Komplexe gereinigt werden können, die nicht mit Tat-Substraten assoziiert sind.

3.4.3.2 Reinigung von TatAB_{Strep}C_{H6}-Komplexen

Durch die Verwendung von Strep-Tag[®] II- und Hexahistidin-Tag-Fusionsproteinen konnten erfolgreich EfeB-Tat-Komplexe gereinigt werden. Diese Strategie sollte im Anschluss für die Reinigung von Tat-Komplexen verwendet werden, die nicht Substrat-assoziiert vorliegen.

Hierfür wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene DNA-Konstrukte erstellt. Aufgrund seines geringen Einflusses auf die Funktionalität und die Assemblierung von Tat-Komplexen sollte TatC als Fusionsprotein mit einem Hexahistidin-Tag verwendet werden. Um einen Strep-Tag[®] II für die Reinigung verwenden zu können, sollte außerdem TatB als Strep-Tag[®] II-Fusionsprotein oder TatC als Fusionsprotein mit einem Hexahistidin-Tag und einem Strep-Tag[®] II verwendet werden. In allen Fällen wurde ein kurzer, flexibler Aminosäurelinker, bestehend aus Glycin und Serin, zwischen dem Protein und dem Tag bzw. zwischen den Tags positioniert (TatB_{GS-Strep} und TatC_{GS-Strep-GS-H6}). Die Einflüsse dieser Fusionsproteine auf die Assemblierung der Tat-Komplexe wird im folgenden Abschnitt 3.4.4 detailliert beschrieben. Neben einem TatC_{H6}-Fusionsprotein (mit GS-Linker) wurde ein TatB_{Strep}-Fusionsprotein (ohne GS-Linker) für die Reinigung von Tat-Komplexen verwendet.

Für die Reinigung wurde die in Abschnitt 3.4.3.1 beschriebene Strategie aus zwei aufeinanderfolgenden affinitätschromatographischen Reinigungen mittels Ni-NTA- und Strep-Tactin[®] XT *magnetic beads* durchgeführt. Für die Beurteilung wurden die erhaltenen Proben anschließend mittels BN-PAGE/Western-Blot analysiert (siehe **Abbildung 44**).

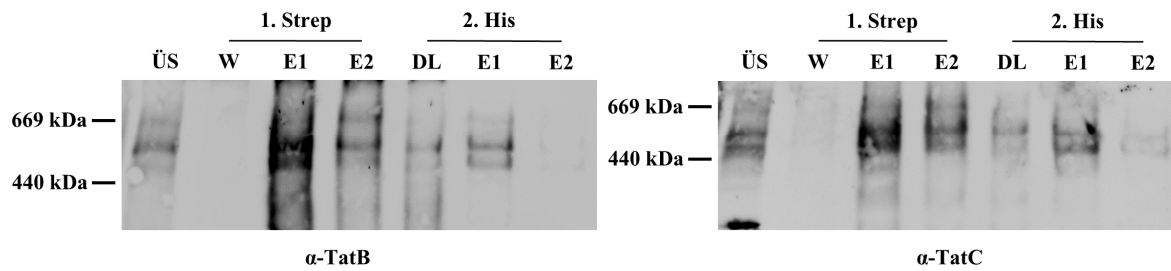


Abbildung 44: Reinigung von TatAB_{Strep}C_{H6}-Komplexen (pBW). BN-PAGE/Western-Blot-Analyse. 4 - 12 %ige BN-Acrylamidgele. 10 µl Marker- und Probenvolumen. Aufgetragen wurden die solubilisierten Membranproteine vor der Reinigung (ÜS), die Waschfraktion (W), die ersten beiden Elutionsfraktionen (E1, E2) der ersten Reinigung sowie der Durchlauf (DL) und die ersten beiden Elutionsfraktionen (E1, E2) der zweiten Reinigung. Die verwendeten Größenstandards sind links neben- und die verwendeten Antikörper unter den Blots indiziert.

Die BN-PAGE/Western-Blot-Analysen nach der Reinigung von TatAB_{Strep}C_{H6}-Komplexen anhand zweier aufeinanderfolgender affinitätschromatographischer Reinigungen (Strep-Tactin[®]XT- gefolgt von Ni-NTA-*magnetic beads*) zeigte, dass erfolgreich die Tat-Komplexe 1 und 2 sowie ein weiterer leichterer Tat-Komplex erhalten werden konnten (siehe **Abbildung 44**, His E1). Es wurde jedoch auch deutlich, dass anhand dieser Methode keine Konzentration der gewünschten Komplexe erreicht werden konnte. So zeigte der Vergleich von Elutionsfraktion 1 der ersten Reinigung (Strep E1) mit der Probe vor der Reinigung (ÜS) zwar, dass deutlich stärkere Signale detektiert werden konnten, was für eine Konzentration durch den ersten Reinigungsschritt spricht. Jedoch zeigte gerade die Detektion von TatB, dass sehr viel TatB gereinigt wurde, welches nicht mit den Tat-Komplexen 1 oder 2 assoziiert war. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass im ersten Schritt TatB_{Strep}-Fusionsproteine gereinigt wurden. Aufgrund der Reihenfolge im *tatABC*-Operon liegt mehr TatB als TatC vor. Im ersten Reinigungsschritt wurden daher wahrscheinlich auch freie TatB_{Strep}-Protomere gereinigt, die nicht Bestandteil von Tat-Komplexen waren. Der Vergleich der Elutionsfraktion des zweiten Reinigungsschritts (His E1) mit der Probe vor der Reinigung (ÜS) zeigt jedoch deutlich, dass Verluste während der beiden Reinigungen dazu führten, dass keine Konzentration der Tat-Komplexe erreicht werden konnte.

Aus den oben genannten Gründen sollte die Reinigungsstrategie in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt werden. Durch die Reinigung von TatC_{H6}-Fusionsproteinen im ersten Reinigungsschritt sollte erreicht werden, dass überschüssige TatB_{Strep}-Protomere entfernt werden, da nur TatB_{Strep}-Protomere koeluieren, die mit TatC_{H6}-Protomeren interagieren. Anschließend sollten TatB_{Strep}-Fusionsproteine mittels Strep-Tactin[®]XT *magnetic beads* gereinigt werden, sodass nur TatC_{H6}-Protomere koeluieren, die mit TatB_{Strep}-Protomeren interagieren (siehe **Abbildung 45**).

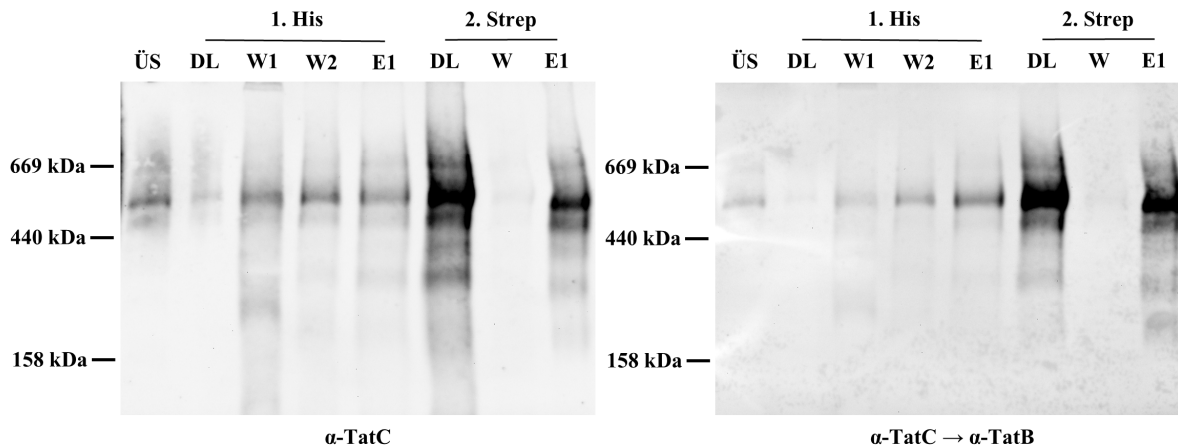


Abbildung 45: Reinigung von TatAB_{Strep}CH₆-Komplexen (pBW) in veränderter Reihenfolge. BN-PAGE/Western-Blot-Analyse. 4 - 12 %ige BN-Acrylamidgele. 10 µl Marker- und Probenvolumen. Aufgetragen wurden die solubilisierten Membranproteine vor der Reinigung (ÜS), der Durchlauf (DL), zwei Waschfraktionen (W1 und W2), die erste Elutionsfraktion (E1) der ersten Reinigung sowie der Durchlauf (DL), die Waschfraktion (W) und die erste Elutionsfraktion (E1) der zweiten Reinigung. Die verwendeten Größenstandards sind links neben- und die verwendeten Antikörper unter den Blots indiziert. Aufgrund des Probenvolumens konnte nur eine BN-PAGE/Western-Blot-Analyse durchgeführt werden. Die Membran wurde mittels *AB stripping* für den Nachweis von TatB und TatC verwendet.

Nach der Reinigung von TatAB_{Strep}CH₆-Komplexen in umgekehrter Reihenfolge und BN-PAGE/Western-Blot-Analyse konnte beobachtet werden, dass auch hier die Tat-Komplexe 1 und 2 sowie ein leichterer Tat-Komplex gereinigt werden konnten (siehe **Abbildung 45**, His E1). Des Weiteren zeigte der Vergleich der Elutionsfraktion der zweiten Reinigung (His E1) mit der Probe vor der Reinigung (ÜS), dass vor allem eine Konzentration von Tat-Komplex 1, erreicht werden konnte. Jedoch wurde auch deutlich, dass die verwendeten Fusionsproteine nur sehr schlecht an das verwendete Säulenmaterial gebunden hatten. Aus diesem Grund konnten in den Waschfraktionen der ersten Reinigung (Strep W1 und W2) sowie im Durchlauf der zweiten Reinigung (His DL) große Mengen von Tat-Komplexen detektiert werden. Dies kann einerseits daran liegen, dass zu wenig Säulenmaterial verwendet wurde oder daran, dass die Interaktion zwischen den *Tags* und dem Säulenmaterial nur sehr schwach war.

Auffällig war auch, dass in fast allen Fraktionen kleinere Disassemblierungsprodukte der Tat-Komplexe detektiert werden konnten. Dies spricht dafür, dass die Komplexe unter den gewählten Bedingungen nicht stabil genug waren, sodass ein Teil der Komplexe im Laufe der Reinigungen disassemblierte.

3.4.4 Tags können Tat-Komplexe destabilisieren

Wie oben erwähnt, wurde im Rahmen dieser Dissertation stets ein Tat_{C_{H6}}-Fusionsprotein genutzt. Dieser Hexahistidin-Tag sollte im späteren Verlauf für die affinitätschromatographische Reinigung von Tat-Komplexen verwendet werden. Um eine höhere Reinheit zu erreichen, sollte auch TatB als Fusionsprotein mit einem anderen Tag produziert werden. Hierfür wurde TatB als Fusionsprotein mit einem Strep-Tag[®] II produziert. Um eine höhere strukturelle Flexibilität zu gewährleisten wurden der Strep-Tag[®] II und TatB nicht direkt miteinander fusioniert, sondern durch einen GS-Aminosäurelinker voneinander getrennt. Auf diese Weise sollte eine höhere Beweglichkeit des Tags erreicht werden und mögliche Einflüsse des Tags auf Protein-Protein-Interaktionen minimiert werden. Vor der Reinigung sollte jedoch eine mögliche Destabilisierung der Tat-Komplexe durch die Verwendung eines TatB_{Strep}-Fusionsproteins ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck wurde mittels BN-PAGE/Western-Blot überprüft ob eine normale Assemblierung der Tat-Komplexe stattfindet (siehe **Abbildung 46**).

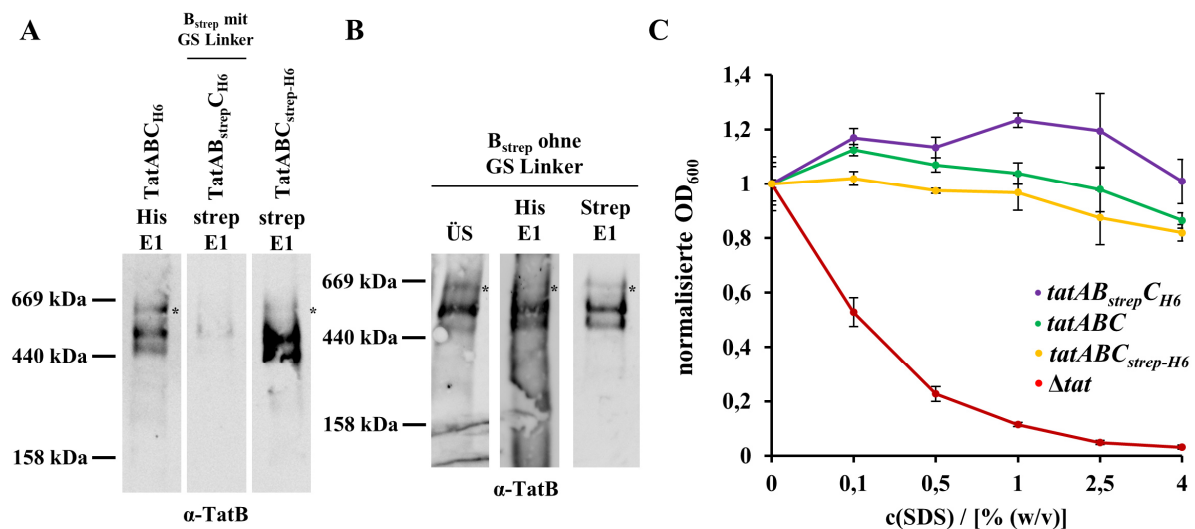


Abbildung 46: Die Destabilisierung von Tat-Komplexen durch C-terminale Fusionsproteine geht nicht mit einer Inaktivierung des Tat-Systems einher. Analyse von TatABC-Komplexen unter Verwendung von TatB_{Strep}, Tat_{C_{H6}}- und TatC_{Strep}-H₆-Fusionsproteinen. **(A)** BN-PAGE/Western-Blot-Analyse von Stämmen, die TatABC_{H6}, TatAB_{Strep}_{C_{H6}} (TatB_{Strep} mit GS Linker) und TatABC_{Strep}_{H6} produzieren (pBW). **(B)** BN-PAGE/Western-Blot-Analyse zweier aufeinanderfolgender Reinigungen von TatAB_{Strep}_{C_{H6}} (TatB_{Strep} ohne GS Linker, pBW, 1. mittels Ni-IMAC und 2. mittels Strep-Tactin[®]XT magnetic Beads). **(C)** SDS-Sensitivitätsmessung von Stämmen, die TatAB_{Strep}_{C_{H6}} und TatABC_{Strep}_{H6} produzieren. Aufgetragen ist die normalisierte optische Dichte bei 600 nm gegen die prozentuale SDS-Konzentration des LB-Medium. 4 - 12%ige BN-Acrylamidgele, 10 µl Marker- und Probenvolumen.

Die Verwendung von TatB_{Strep}-Fusionsproteinen zeigte deutlich, dass bereits kleine Modifikationen des C-Terminus gravierende Auswirkungen auf die Assemblierung bzw. Stabilität der Tat-Komplexe haben. Während für TatC_{H6}-Fusionsproteine keinen nachweisbaren Einfluss auf die detektierbaren Tat-Komplexe hatte, konnten nach einer Reinigung nur Spuren von Tat-Komplex 1 detektiert werden, wenn ein TatB_{Strep}-Fusionsprotein mit einem GS-Aminosäurelinker zwischen TatB und dem Strep-Tag[®] II verwendet wurde. Auch die Verwendung von TatC_{Strep-H6}-Fusionsproteinen führte dazu, dass nach einer Reinigung mittels Strep-Tactin[®]XT *magnetic beads* deutlich mehr kleinere Tat-Komplexe detektiert werden konnten (siehe **Abbildung 46A**). Aus diesem Grund wurde der GS-Aminosäurelinker zwischen TatB und dem Strep-Tag[®] II entfernt. Dies führte zu einer deutlich erhöhten Stabilität der Tat-Komplexe, sodass die Tat-Komplexe 1, 2 und ein leichterer Tat-Komplex nicht nur nach der Solubilisierung von Membranen (ÜS), sondern auch nach einer ersten Reinigung mittels Ni-IMAC (His E1) und nach einer zweiten Reinigung mittel Strep-Tactin[®]XT *magnetic beads* (Strep E1) detektiert werden konnten (siehe **Abbildung 46B**). Dies lässt darauf schließen, dass die verwendeten TatB_{Strep} (mit GS Linker) und TatC_{Strep-H6}-Fusionsproteine einen Einfluss auf die Interaktion zwischen den einzelnen Tat-Komponenten ausüben, wodurch auch die Stabilität der Tat-Komplexe beeinflusst wird. Diese sind, außer bei der Verwendung TatB_{Strep} (ohne GS Linker) und TatC_{H6}-Fusionsproteinen, nicht mehr stabil genug, um nach der affinitätschromatographischen Reinigung mittels BN-PAGE/Western-Blot detektiert zu werden.

Außerdem wurden SDS-Sensitivitätsmessungen von Tat-Systemen mit TatB_{Strep} (ohne GS Linker) oder TatC_{Strep-H6}-Fusionsproteinen durchgeführt, um sicherzustellen, dass Tat-Komplexe von funktionalen Tat-Systemen gereinigt werden. Obwohl die BN-PAGE/Western-Blot-Analyse von TatABC_{Strep-H6} darauf hinweisen, dass die Stabilität von Tat-Komplex 2 durch die Verwendung von TatC_{Strep-H6}-Fusionsproteinen deutlich abnimmt, konnte keine SDS-Sensitivität beobachtet werden (siehe **Abbildung 46C**). Das bestätigt die Annahme, dass die Modifikationen am N-Terminus von TatC hauptsächlich die Stabilität von Tat-Komplexen beeinflussen. Möglicherweise wird die Aktivität des Tat-Systems hiervon nicht beeinflusst, da die Komplexe *in vivo* einem ständigen Gleichgewicht unterliegen.

Um möglichst intakte Tat-Komplexe reinigen zu können, wurden die Konzentrationen einiger Bestandteile des Puffers variiert. Auf diese Weise sollte der Einfluss dieser Pufferbestandteile auf die Stabilität der Tat-Komplexe analysiert werden.

3.4.5 Tat-Komplexe können durch Saccharose stabilisiert werden

Im Laufe dieser Arbeit stellte sich heraus, dass die im Puffer enthaltene Saccharose zu den meisten Einschränkungen in Bezug auf die Handhabung führte. Für die Präparation und Reinigung von Tat-Komplexen wurde konsequent mit einem Puffersystem gearbeitet, welches von Silke Richter (Richter und Brüser 2005) optimiert und etabliert wurde [50 mM Bis-Tris HCl (pH 7,0), 20 % (w/v) Saccharose, 10 mM MgCl₂]. Dieses Puffersystem wurde nach Bedarf modifiziert. So wurde zum Beispiel für die Solubilisierung von Membranproteinen Digitonin- oder für die Elution von gebundenen Komplexen Imidazol oder Biotin zugegeben. Vor allem für die strukturelle Analyse von Proteinkomplexen (bspw. mittels Kryo-Elektronenmikroskopie) stellt Saccharose jedoch ein Problem dar, da es zu einer Verringerung des Kontrasts führt. Aus diesem Grund muss vor der Analyse ein Pufferaustausch mit unbekanntem Auswirkungen auf die Stabilität der Komplexe durchgeführt werden. Auch für die Reinigung von Tat-Komplexen mittels FPLC/Größenausschlusschromatographie bei 4 °C führt die hohe Viskosität des Puffers dazu, dass nur sehr geringe Flussraten genutzt werden können. Aus diesen Gründen sollte untersucht werden, ob die Präparation und Reinigung auch in Abwesenheit oder mit reduzierter Konzentration von Saccharose durchgeführt werden kann.

Zu diesem Zweck wurden drei identische Experimente durchgeführt, bei denen Membranen von Stämmen (*E. coli* DADE D6 ara^R), die TatABC_{H6} produzierten (pABS), aus 1 L Kulturvolumen (OD₆₀₀ = 1,0) präpariert wurden. Aus den solubilisierten Membranproteinen wurden anschließend TatABC_{H6}-Komplexe mittels Ni-NTA-Agarose und der bereits beschriebenen Methode (siehe Abschnitt 3.4.1) gereinigt. Einzig die Konzentration von Saccharose wurde variiert. Als Referenz wurde Experiment 1 mit 20 % (w/v) Saccharose in allen Puffern durchgeführt (siehe **Abbildung 47**). Für Experiment 2 wurde 10 % (w/v) Saccharose in allen Puffern verwendet (siehe **Abbildung 48**). Letztlich wurde in Experiment 3 auf Saccharose in allen Puffern verzichtet (siehe **Abbildung 49**).

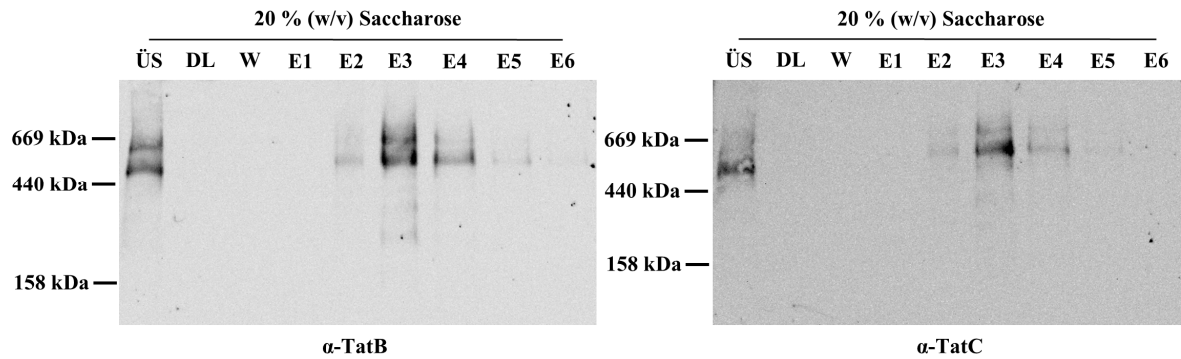


Abbildung 47: Elutionsprofil der Reinigung von TatABC_{H6}-Komplexen mittels Ni-NTA Agarose bei einer Saccharose-Konzentration von 20 % (w/v). BN-PAGE/Western-Blot-Analyse, 5 - 13.5 %ige BN-Acrylamidgelle, 10 µl Marker- und Probenvolumen. Gereinigt wurde TatC_{H6} aus Membranen, die aus 1 l Kulturvolumen präpariert wurden. Aufgetragen wurden die solubilisierten Membranen vor der Reinigung (ÜS), der Durchlauf (DL), die Waschfraktion (W) sowie sechs Elutionsfraktionen (E1 - E6). Die verwendeten Größenstandards sind links neben- und die verwendeten Antikörper unter den Blots indiziert.

Die BN-PAGE/Western-Blot-Analyse der Reinigung von TatABC_{H6}-Komplexen aus Membranen, die aus einem Liter Kulturvolumen präpariert wurden, zeigte, dass sowohl Tat-Komplex 1 als auch Tat-Komplex 2 mit der gewählten Methode gereinigt werden konnten (siehe **Abbildung 47**, E3). Im Durchlauf und der Waschfraktion konnten keine Tat-Komplexe nachgewiesen werden. Dies spricht für eine starke Interaktion sowohl zwischen TatC_{H6} und dem Säulenmaterial als auch zwischen den einzelnen Komponenten der Tat-Komplexe unter den gewählten Bedingungen. Außerdem konnten in den Elutionsfraktionen nur sehr geringe Mengen von Disassemblierungsprodukten detektiert werden.

Im Anschluss wurde ein identisches Experiment (2) durchgeführt, bei dem 10 % (w/v) Saccharose in allen Puffern verwendet wurde (siehe **Abbildung 48**).

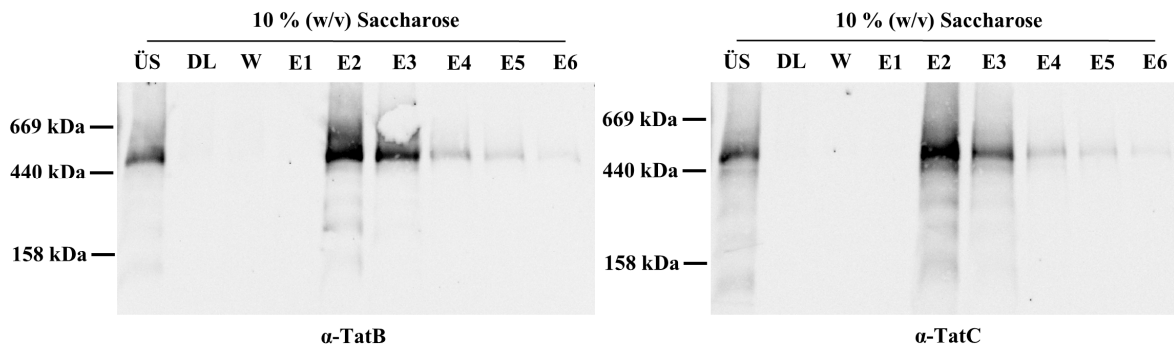


Abbildung 48: Elutionsprofil der Reinigung von TatABC_{H6}-Komplexen mittels Ni-NTA Agarose bei einer Saccharose-Konzentration von 10 % (w/v). BN-PAGE/Western-Blot-Analyse, 5 - 13.5 %ige BN-Acrylamidgele, 10 µl Marker- und Probenvolumen. Gereinigt wurde TatC_{H6} aus Membranen, die aus 1 l Kulturvolumen präpariert wurden. Aufgetragen wurden die solubilisierten Membranen vor der Reinigung (ÜS), der Durchlauf (DL), die Waschfraktion (W) sowie sechs Elutionsfraktionen (E1 - E6). Die verwendeten Größenstandards sind links neben- und die verwendeten Antikörper unter den Blots indiziert.

Nach der Reinigung von TatABC_{H6}-Komplexen unter Verwendung des bekannten Puffer-systems mit 10 % (w/v) Saccharose wurden deutlich schwächere Signale für den (oberen) Tat-Komplex 2 erhalten (siehe **Abbildung 48**, E2). Tat-Komplex 1 hingegen konnte in guten Ausbeuten gereinigt werden. Schon die Analyse der Probe vor der Reinigung zeigte, dass sich das Verhältnis zwischen Tat-Komplex 1 und 2 deutlich von dem Verhältnis, das in Experiment 1 (20 % (w/v) Saccharose) beobachtet wurde, unterschied (siehe **Abbildung 47** und **Abbildung 48**, ÜS). Des Weiteren fiel auf, dass in den Elutionsfraktionen deutlich stärkere Signale für die Disassemblierungsprodukte der Tat-Komplexe erhalten werden konnten als in Experiment 1 (siehe **Abbildung 47**, E3 und **Abbildung 48**, E2).

Nachfolgend wurde ein drittes, identisches Experiment durchgeführt, bei dem auf Saccharose in allen Puffern verzichtet wurde (siehe **Abbildung 49**).

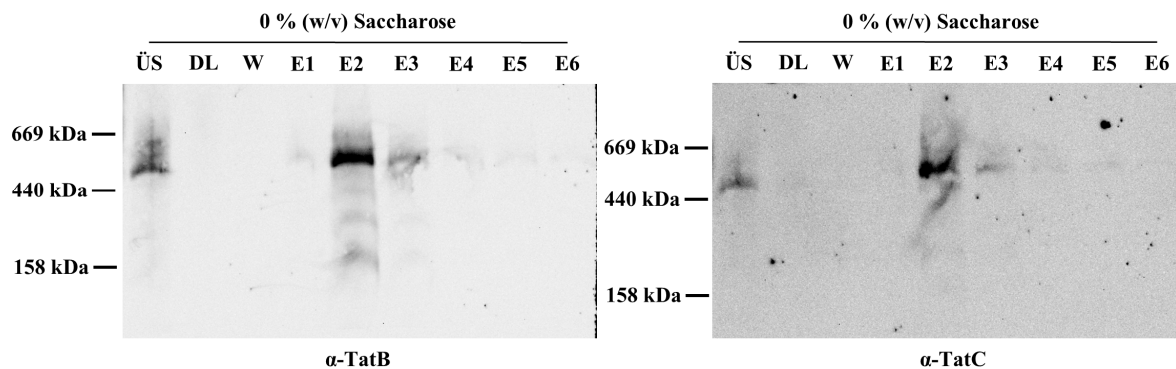


Abbildung 49: Elutionsprofil der Reinigung von TatABC_{H6}-Komplexen mittels Ni-NTA Agarose bei einer Saccharose-Konzentration von 0 % (w/v). BN-PAGE/Western-Blot-Analyse, 5 - 13.5 %ige BN-Acrylamidgele, 10 µl Marker- und Probenvolumen. Gereinigt wurde TatC_{H6} aus Membranen, die aus 1 l Kulturvolumen präpariert wurden. Aufgetragen wurden die solubilisierten Membranen vor der Reinigung (ÜS), der Durchlauf (DL), die Waschfraktion (W) sowie sechs Elutionsfraktionen (E1 - E6). Die verwendeten Größenstandards sind links neben- und die verwendeten Antikörper unter den Blots indiziert.

Die Verwendung von Puffern ohne Saccharose bei der Präparation und Reinigung von TatABC_{H6}-Komplexen führte dazu, dass bereits in der Probe vor der Reinigung deutlich schwächere Signale erhalten wurden. Tat-Komplex 1 konnte detektiert werden, während für Tat-Komplex 2 keine definierten Signale mehr erhalten wurden (siehe **Abbildung 49**, ÜS). Durch die Reinigung konnte eine Anreicherung von Tat-Komplex 1 erreicht werden, während nur geringe Spuren von Tat-Komplex 2 detektiert werden konnten (siehe **Abbildung 49**, E2). Im Vergleich zu Experiment 2 (10 % (w/v) Saccharose) konnten in den Elutionsfraktion ähnlich starke Signale von Disassemblierungsprodukten der Tat-Komplexe erhalten werden.

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse aus allen drei Experimenten zeigte deutlich, dass Saccharose einen großen Einfluss auf die detektierbare Menge von Tat-Komplex 2 hatte. Schon die Analyse der Proben, die vor der Reinigung entnommen wurden, zeigte, dass mit steigender Saccharose-Konzentration auch stärkere Signale für Tat-Komplex 2 erhalten werden konnten (siehe **Abbildung 47**, **Abbildung 48** und **Abbildung 49**, ÜS). Des Weiteren wurden mit der Reduktion der Saccharose-Konzentration mehr Disassemblierungsprodukte der Tat-Komplexe sichtbar. Tat-Komplex 1 konnte jedoch in allen drei Experimenten in ähnlichen Mengen gereinigt werden. Dies lässt darauf schließen, dass das Entstehen von Disassemblierungsprodukten hauptsächlich mit der Disassemblierung von Tat-Komplex 2 in Verbindung steht (siehe **Abbildung 47**, **Abbildung 48** und **Abbildung 49**, ÜS). Dieser Einfluss von Saccharose scheint sich dabei nicht erst bei der Reinigung von Tat-Komplexen bemerkbar zu machen. Die geringere Stabilität der Tat-Komplexe durch die Reduktion der Saccharose-Konzentration könnte bereits nach der Solubilisierung eine Disassemblierung bis hin zu Monomeren zur Folge haben. Diese sind aufgrund ihres geringen Molekulargewichts, mittels BN-PAGE/Western-Blot nicht detektierbar. Diese würde erklären, warum bereits nach der Solubilisierung geringere Mengen der Tat-Komplexe detektiert werden konnten.

4 DISKUSSION

4.1 Einfluss von TatC₁₅₀ auf die Stabilität und Funktionalität von Tat-Komplexen

Das Wissen über die Interaktionen zwischen den einzelnen Tat-Komponenten sowie die Einflüsse einzelner Regionen der Tat-Komponenten auf diese Interaktionen ist von zentraler Bedeutung für das Verständnis des Tat-Systems und des zugrunde liegenden Mechanismus. Im Rahmen vorheriger Studien zur Oligomerisierung des Tat-Translokons von Dr. Eyleen Sabine Heidrich sowie zur Oligomerisierung von TatC in *E. coli* von Christoph Stefan Nikolin konnten einige Positionen identifiziert werden, die bei der Interaktion einzelner Tat-Komponenten eine zentrale Rolle spielen. Im Rahmen dieser Studien konnte beobachtet werden, dass der Austausch von Isoleucin 50 durch den UV-aktivierbaren *cross-linker* *p*-Benzoyl-L-phenylalanin (Bpa) in TatC zur UV-abhängigen Dimerisierung von TatC-Protomeren führt. Des Weiteren zeigten BN-PAGE/Western-Blot-Analysen, dass dieser Austausch die Stabilisierung eines neuen Tat-Komplexes bewirkte, welcher ein höheres Molekulargewicht aufwies als die zuvor charakterisierten Tat-Komplexe (Richter und Brüser 2005).

Auf Basis dieser Studien wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Einflüsse von TatC Position 50 auf die Funktionalität und die Assemblierung der Tat-Translokase genauer untersucht und sollen im Folgenden diskutiert werden.

4.1.1 TatC_{150Bpa}-Dimere belegen eine Dynamik der Tat-Translokase

Die Interaktionen zwischen den einzelnen Tat-Komponenten wurden bereits eingehend im Rahmen von Quervernetzungsstudien untersucht. In der Regel werden hierbei einzelne Aminosäuren durch Aminosäurederivate ausgetauscht, die zur Bildung einer kovalenten Bindung genutzt werden können. Bei der bidirektionalen Quervernetzung werden zwei Cysteine in direkter Nachbarschaft durch die Bildung einer Disulfidbindung kovalent miteinander verknüpft. Bei der monodirektionalen Quervernetzung hingegen muss nur eine Aminosäure ausgetauscht werden. Normalerweise werden hierbei aromatische Aminosäuren verwendet, die nach der Bestrahlung mit UV-Licht in einer radikalischen Reaktion unspezifisch mit beispielsweise Amidbindungen in der Nachbarschaft reagieren. Auf diese Weise können Interaktionen zwischen zwei Proteinen untersucht werden. Die Bildung von Dimeren oder Oligomeren kann mittels SDS-PAGE/Western-Blot analysiert werden.

Anhand von TatC wurden bereits einige Quervernetzungsstudien durchgeführt. Die Struktur von TatC aus *Aquifex aeolicus* konnte von Rollauer und Kollegen (2012) sowie Ramasamy und Kollegen (2013) aufgelöst werden (Rollauer *et al.* 2012; Ramasamy *et al.* 2013). Aufgrund einer Sequenzidentität von 40 % (Rollauer *et al.* 2012) zwischen TatC aus *A. aeolicus* und TatC aus *E. coli* kann die Struktur von TatC aus *A. aeolicus* prinzipiell auf TatC aus *E. coli* übertragen werden. Anhand dieser Struktur von TatC sowie der anderen Tat-Komponenten und Quervernetzungsstudien wurden bereits einige Modelle zur Assemblierung der Tat-Translokase entwickelt. Die hier erhaltenen Ergebnisse sollen nachfolgend im Zusammenhang mit den bereits vorhandenen Modellen zur Assemblierung der Tat-Translokase diskutiert werden.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand nicht die Untersuchung der Interaktionen zwischen den Tat-Komponenten mittels *in-vivo photo cross-linking* und SDS-PAGE/Western-Blot. Es sollten vielmehr die Einflüsse der unterschiedlichen Modifikationen auf die Assemblierung von Tat-Komplexen mittels BN-PAGE/Western-Blot genauer analysiert werden. Im Gegensatz zu den von Dr. Eyleen Sabine Heidrich durchgeführten Experimenten wurde ein Plasmid mit höherer Kopienzahl (pDE) für die Expression der Tat-Gene verwendet. Dadurch wurde erreicht, dass die Untersuchungen anhand eines geringeren Kulturvolumens durchgeführt werden konnten. Mit diesem Expressionssystem konnten die Ergebnisse von Dr. Eyleen Sabine Heidrich reproduziert werden und eine UV-abhängige Dimerisierung von TatC_{I50Bpa}-Protomeren beobachtet werden. Außerdem konnten die Untersuchungen auf TatBC_{I50Bpa}-Systeme erweitert und bestätigt werden (siehe **Abbildung 13**). Die Tatsache, dass nur mit einem TatC-spezifischen Antikörper ein Signal bei etwa 55 kDa erhalten werden konnte, nicht aber mit einem TatB-spezifischen Antikörper, deutet darauf hin, dass dieses Signal von einem kovalent verknüpften TatC-Dimer stammt (Geise *et al.* 2019).

Die Beobachtung von TatC_{I50Bpa}-Dimeren verdeutlicht die Dynamik des Tat-Systems unter Rücksichtnahme auf bisher durchgeführte Studien zu Interaktionen zwischen den Tat-Komponenten. In vielen Studien wurden die erhaltenen Daten zu Quervernetzungen zwischen den Tat-Komponenten gesammelt und in passenden Modellen zusammengeführt. In diesen Modellen wurden achsensymmetrische Assemblierungen von 2, 3, 4, 6, 7 oder 8 TatC-Protomeren vorgeschlagen, bei denen die Substratbindetasche in der Regel dem Mittelpunkt zugewandt ist. TatC-Protomere sind dabei in der Regel räumlich durch TatA- und TatB-Protomere getrennt, welche mit den Transmembranhelices 5 und 6 von TatC interagieren und so die Detektion von kovalent verknüpften TatAC und TatBC Heterodimeren erklären (Aldridge *et al.* 2014; Alcock *et al.* 2016; Habersetzer *et al.* 2017; Blümmel *et al.* 2017).

Auffällig ist jedoch gerade bei Studien zu Interaktionen zwischen TatC-Protomeren, dass in der Regel nach der Knüpfung von kovalenten Bindungen TatC-Dimere jedoch keine TatC-Tri- oder Tetramere beobachtet wurden (Punginelli *et al.* 2007; Cléon *et al.* 2015; Habersetzer *et al.* 2017; Blümmel *et al.* 2017). Nur in Einzelfällen konnten bisher Oligomere aus mehr als zwei TatC-Protomeren erhalten werden. Hierbei fällt auf, dass TatC-Hexamere nur in der Abwesenheit von TatB beobachtet werden konnten (Behrendt und Brüser 2014; Blümmel *et al.* 2015). TatC-Tetramere konnten zwar in Anwesenheit von TatB, jedoch bisher nur in einer Studie erhalten werden (Blümmel *et al.* 2015). Bei einer achsensymmetrischen Assemblierung von 3, 4 oder 6 TatC-Protomeren stellt sich jedoch die Frage, warum der Großteil der durchgeführten Studien kovalente Quervernetzungen von zwei TatC-Protomeren lieferte, die teilweise bei niedrigen Temperaturen nicht mehr erhalten werden konnten (Punginelli *et al.* 2007).

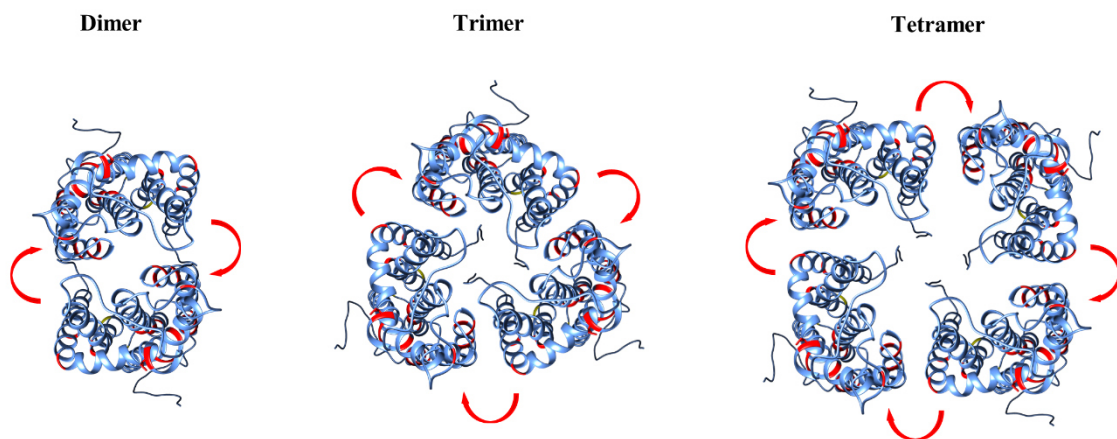


Abbildung 50: Schematische Darstellung eines TatC-Di-, Tri- und Tetramers. TatA- und TatB-Protomere wurden zur besseren Übersicht nicht berücksichtigt. Sicht aus dem Periplasma. Die für die Substratbindung essenziellen Aminosäuren F94 und E103 sind gelb markiert, einige bekannte TatC-TatC Interaktionsstellen rot. Rote Pfeile zeigen die Nachbarschaft zweier TatC-Protomere an.

Abbildung 50 soll exemplarisch für TatC-Tri- und Tetramere verdeutlichen, dass achsensymmetrische Anordnungen keine Erklärung für die Beobachtung von kovalent verknüpften TatC-Dimeren eines Tat-Komplexes liefern können. Jede Interaktion, die bei der Quervernetzung zu einer kovalenten Bindung zwischen zwei TatC-Protomeren eines Tat-Komplexes führt, müsste bei einer tri- oder tetrameren Anordnung zur Bildung von kovalent verknüpften Tri- oder Tetrameren führen. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte sein, dass das Tat-System einer hohen Dynamik unterliegt. Es ist zu beachten, dass jedes Quervernetzungs-Experiment nur eine Momentaufnahme abbildet. Durch die Quervernetzung werden genau die Protomere kovalent miteinander verknüpft, die sich zu einem bestimmten

Zeitpunkt in direkter Nachbarschaft befinden. Da im Laufe des Transportes unterschiedliche Tat-Komplexe assemblieren, die wahrscheinlich nach dem Transport wieder disassemblieren, werden genau die Assemblierungen beobachtet, die besonders langlebig sind und daher in größerer Menge vorliegen als andere, kurzlebige Assemblierungen. Dies schließt keinesfalls aus, dass TatC-Protomere tri-, tetra- oder hexamere Assemblierungen bilden. Die häufige Beobachtung von TatC-Dimeren lässt jedoch darauf schließen, dass TatC-Protomere größtenteils nur mit einem weiteren TatC-Protomer interagieren (Maldonado *et al.* 2011; Rollauer *et al.* 2012; Aldridge *et al.* 2014).

Diese Dynamik wird auch durch die Menge der bisher gefundenen Interaktionsstellen unterstrichen. Solche Interaktionsstellen konnten bisher in fast allen helikalen- und periplasmatischen Bereichen von TatC gefunden werden. Dies verdeutlicht, dass zwar alle bisherigen Modelle durch experimentelle Daten unterstützt werden, diese wahrscheinlich nur eine von vielen temporären Assemblierungen darstellen.

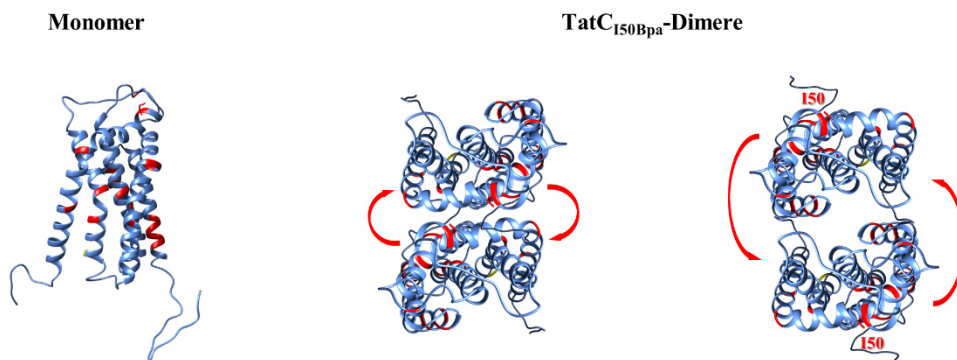


Abbildung 51: TatC_{150Bpa}-Dimere suggerieren eine Interaktion von zwei TatC-Protomeren über die konvexe Seite der TatC-Struktur. Schematische Darstellung eines TatC-Monomers sowie möglicher TatC_{150Bpa}-Dimere. TatA- und TatB-Protomere wurden zur besseren Übersicht nicht berücksichtigt. Einige bekannte TatC-TatC Interaktionsstellen sind rot markiert. Rote Pfeile zeigen die Nachbarschaft zweier TatC-Protomere an.

Die Verteilung der bisher gefundenen Interaktionsstellen (siehe **Abbildung 51**, Monomer) zwischen zwei TatC-Protomeren lässt vermuten, dass entweder nicht alle Interaktionsstellen einer einzigen Assemblierung zugeordnet werden können oder die Flexibilität einiger Bereiche stark unterschätzt wurde. So wurde bei den bisherigen Modellen davon ausgegangen, dass die Bindung des Substrates im Zentrum der Translokase stattfindet (Aldridge *et al.* 2014; Alcock *et al.* 2016; Blümmel *et al.* 2017). Die für die Substratbindung essenziellen Aminosäuren F94 und E103 auf der konkaven Seite der TatC-Struktur wurden daher in der Regel in Richtung des Zentrums der Translokase ausgerichtet (siehe **Abbildung 50**). Die bekannten Kristallstrukturen

von TatC hingegen suggerieren, dass Position I50 nicht in die angenommene Richtung des Substrates ausgerichtet ist, sondern sich eher auf der konvexen Seite der TatC-Struktur befindet. Die Bildung eines TatC_{I50Bpa}-Dimers könnte dann zum Beispiel durch eine deutlich höhere Flexibilität des ersten periplasmatischen Loops als von der Kristallstruktur suggeriert, erklärt werden. Außerdem wäre auch eine Interaktion von zwei TatC-Protomeren über die konkave Seite der Struktur denkbar. Dies würde, sofern man von einer Substratbindung im Zentrum des Tat-Komplexes ausgeht, eine Interaktion zwischen unterschiedlichen Tat-Komplexen implizieren. Aufgrund der hohen Dynamik kann ebenso in Erwägung gezogen werden, dass TatC-Dimere nicht immer in der gleichen Orientierung vorliegen (Alcock *et al.* 2016). Eine temporäre, ggf. durch TatC_{I50Bpa} stabilisierte Dimerisierung von TatC-Protomeren in differierender Orientierung könnte dann durchaus zur Bildung von TatC_{I50Bpa}-Dimeren führen (siehe **Abbildung 51**). Da nicht genau bestimmt werden kann, welcher Zeitpunkt des Tat-Transportes durch die Quervernetzung fixiert und welche Verknüpfung von TatC_{I50Bpa} gebildet wird, könnten massenspektrometrische Methoden zur genaueren Analyse des TatC_{I50Bpa}-Dimers genutzt werden.

4.1.2 TatC_{I50Bpa} führt zu einer Stabilisierung der Tat-Translokase

Im Rahmen der Masterarbeit von Dr. Eyleen Sabine Heidrich (2013) wurden bereits Funktionalitätsanalysen von TatABC_{I50Bpa}-Systemen in Form von *in-vivo*-Translokationsanalysen des Tat-Substrates HiPIP aus *Allochromatium vinosum* durchgeführt. Diese wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit wiederholt und konnten reproduziert werden. So konnte für das Tat-Substrat HiPIP aus *A. vinosum* für das TatABC_{I50Bpa}-System aus *E. coli* kein Transport in das Periplasma beobachtet werden. Jedoch wurde das Tat-Substrat EfeB aus *E. coli* für die Analyse von Substrat-assoziierten Tat-Komplexen verwendet, welches sich aufgrund der starken Interaktion mit der Tat-Translokase hierfür eignet. Aus praktischen Gründen wurden für die Durchführung von *in-vivo*-Translokationsanalysen des Substrates EfeB Stämme verwendet, die zuvor für die Analyse von EfeB-assoziierten Tat-Komplexen verwendeten wurden. Für das Tat-Substrat EfeB konnte ein Transport in das Periplasma nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 15A**). Aufgrund dieser nicht übereinstimmenden Ergebnisse wurden weitere Funktionalitätsanalysen für das TatABC_{I50Bpa}-System durchgeführt. Dabei konnte weder eine SDS-Sensitivität, noch die Ausbildung des Kettenphänotyps beobachtet werden (siehe **Abbildung 15B** und **C**). Das deutet darauf hin, dass TatC_{I50Bpa} nicht zu einer Inaktivierung des Tat-Systems führt.

Position I50 befindet sich innerhalb des ersten periplasmatischen *Loops* von TatC. Dieser erstreckt sich in etwa von Position Y36 bis F68 und besteht nicht nur aus einer unstrukturierten Region ohne Sekundärstruktur, sondern auch aus dem Ende der ersten Transmembranhelix, welche fast wie eine amphipathische Helix auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran aufliegt (siehe **Abbildung 52**). Dieser Bereich wurde bereits eingehend untersucht und beinhaltet eine verhältnismäßig große Anzahl an Aminosäuren, die essenziell für die Aktivität des Tat-Systems von *E. coli* sind. **Abbildung 52** zeigt eine schematische Darstellung von TatC aus *E. coli*. Aminosäuren, die sich innerhalb des ersten periplasmatischen Loops befinden und deren Einflüsse auf die Aktivität des Tat-Systems bereits untersucht wurde sind farblich hervorgehoben.

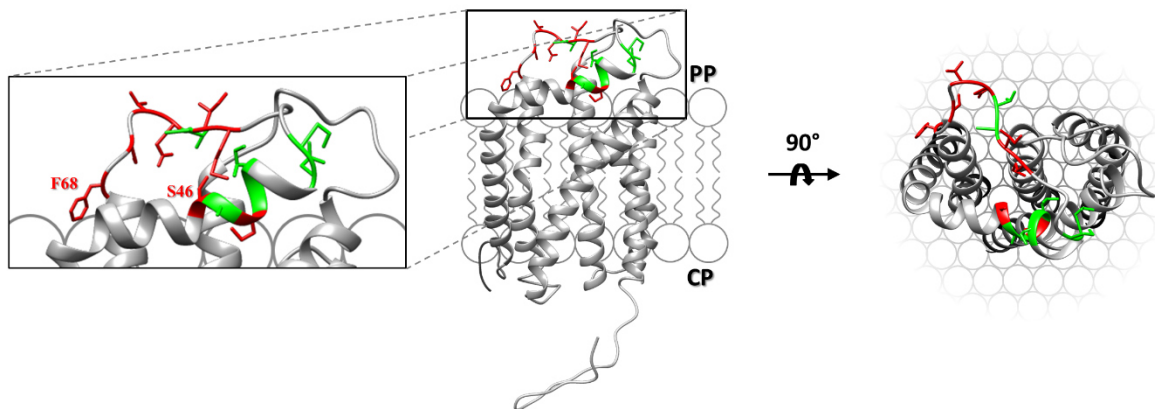


Abbildung 52: Schematische Darstellung von TatC aus *E. coli*. Hervorgehoben sind Aminosäuren, die sich innerhalb des ersten periplasmatischen *Loops* befinden und deren Einfluss auf die Aktivität des Tat-Systems von *E. coli* bereits untersucht wurde (Allen *et al.* 2002; Barrett *et al.* 2005; Kneuper *et al.* 2012). Aminosäuren, deren Austausch zu einer Inaktivierung des Tat-Systems führte sind rot hervorgehoben. Aminosäuren, deren Austausch nicht zu einer Inaktivierung des Tat-Systems führte sind grün hervorgehoben.

Auffällig ist hierbei vor allem die Nähe von I50 zu P48. TatC_{P48} wurde bereits gegen Alanin, Leucin und Serin ausgetauscht. Dabei führte jeder bisher untersuchte Austausch zu einer Inaktivierung des Tat-Systems (Allen *et al.* 2002; Barrett *et al.* 2005; Kneuper *et al.* 2012). Neben P48A, P48L und P48S führten auch die Austausche S46F, M59K, I60N, D63V, V64A und F68S zur Inaktivierung des Tat-Systems, während dieses durch die Austausche A47T, L49S, L49P, P54L, A61T, A61V, T62A, P67S nicht inaktiviert wurde (Kneuper *et al.* 2012).

Die Vielzahl der Modifikationen innerhalb des ersten periplasmatischen Loops, die zu einer Inaktivierung des Tat-Systems führten sowie die starken Einflüsse einzelner Aminosäuren auf

die Stabilität der Tat-Translokase verdeutlichen die Wichtigkeit dieser Region für die Funktionalität des Tat-Systems. Die Tatsache, dass TatC_{I50Bpa} die Funktionalität des Tat-Systems nicht beeinflusst und weitergehend zu einer effektiven kovalenten Dimerisierung von TatC führt, lässt vermuten, dass möglicherweise sogar eine Stabilisierung der Tat-Translokase vorliegen könnte (Geise *et al.* 2019). Aus diesem Grund sollten weitergehend die Effekte von TatC_{I50Bpa} auf die Tat-Komplexe untersucht werden.

4.1.3 Aromaten an Position 50 von TatC beeinflussen Stabilität und Funktionalität

Vor allem aufgrund des bekannten destabilisierenden Effektes von TatC_{P48A} auf die Tat-Komplexe (Allen *et al.* 2002; Behrendt und Brüser 2014) wurden bereits im Rahmen der Masterarbeit von Christoph Stefan Nikolin vergleichende Analysen der TatABC_{I50Bpa}-Komplexe mittels BN-PAGE/Western-Blot durchgeführt. Dabei fiel auf, dass für TatABC_{I50Bpa}-Systeme ein starkes Signal für einen zuvor nicht beobachteten Tat-Komplex erhalten werden konnte. Im Vergleich zu den Tat-Komplexen 1 und 2 des Wildtyp-TatABC-Systems migrierte dieser Tat-Komplex bei signifikant höherem Molekulargewicht und soll aus diesem Grund fortan als Tat-Komplex 3 bezeichnet werden. Des Weiteren wurde der Effekt der Bestrahlung mit UV-Licht bzw. der kovalenten Quervernetzung auf diesen Tat-Komplex untersucht. Hierfür wurden zwei identische Kulturen verwendet, von denen eine vor der Zellernte mit UV-Licht bestrahlt wurde (+UV). Bei der zweiten Kultur wurde auf die Bestrahlung mit UV-Licht verzichtet (-UV). Die Analyse der solubilisierten Membranproteine aus beiden Kulturen mittels BN-PAGE/Western-Blot lieferte jedoch entgegen den Erwartungen keine unterschiedlichen Tat-Komplexe.

Die beschriebenen Ergebnisse aus der Masterarbeit von Christoph Stefan Nikolin konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit reproduziert werden (siehe **Abbildung 16**). So konnte ein Unterschied zwischen der mit UV-Licht bestrahlten Probe und der nicht bestrahlten Probe nur mittels SDS-PAGE/Western-Blot beobachtet werden. Hier konnten UV-abhängige TatC-Dimere detektiert werden. Mittels BN-PAGE/Western-Blot konnte in beiden Fällen ein starkes Signal für Tat-Komplex 3 erhalten werden, der im Vergleich zu den Tat-Komplexen bei signifikant höherem Molekulargewicht migrierte. Des Weiteren konnte ein zweiter Tat-Komplex mit geringerem Molekulargewicht detektiert werden. Anhand eines Vergleiches mit den Tat-Komplexen 2 und 2S konnte allerdings nicht genau zugeordnet werden, um welchen Komplex es sich dabei handelt. Diese Frage konnte im Rahmen späterer Experimente beantwortet werden (siehe Abschnitt 4.2.2).

Die Tatsache, dass Tat-Komplex 3 nicht von der Bildung eines kovalent verknüpften TatC-Dimers abhängig war, ließ darauf schließen, dass einzig der Austausch von Isoleucin 50 durch Bpa der Grund für die Stabilisierung dieses Komplexes war. Aus diesem Grund wurden weitere Mutagenesen durchgeführt, bei denen TatC₁₅₀ durch die natürlichen aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (F), Tyrosin (Y) und Tryptophan (W) ausgetauscht wurde. Für TatABC_{150F}- und TatABC_{150W}-Systeme konnte weder eine Aktivität des Tat-Systems (siehe **Abbildung 18**) noch die Bildung von Tat-Komplexen beobachtet werden. Dies konnte auf einen Abbau von TatC_{150F} und TatC_{150W} zurückgeführt werden. Für TatABC_{150Y}-Systeme hingegen konnte sowohl die Aktivität des Tat-Systems als auch die Assemblierung von Tat-Komplexen beobachtet werden. Vergleichende Analysen von TatABC-, TatABC_{150Bpa}- und TatABC_{150Y}-Systemen zeigten außerdem, dass TatC_{150Y} nicht nur zur Stabilisierung des Tat-Komplexes 3 führte, sondern auch Tat-Komplex 1 detektiert werden konnte. Dies war für TatABC_{150Bpa}-Systeme nicht der Fall (siehe **Abbildung 18**) (Geise *et al.* 2019).

Die Inaktivierung des Tat-Systems durch TatC_{150F} und TatC_{150W} zeigt, dass nicht jede aromatische Aminosäure an Position 50 zu einer Stabilisierung des Tat-Komplexes 3 führt und verdeutlicht den zuvor beschriebenen Einfluss des ersten periplasmatischen *Loops* auf die Aktivität des Tat-Systems sowie die Stabilität der Tat-Translokase. Anhand der Strukturformeln von Bpa und Tyrosin lassen sich Rückschlüsse darauf ziehen, welche strukturellen Eigenschaften hierbei entscheidend für die Stabilisierung des Tat-Komplexes 3 sind. Bpa und Tyrosin unterscheiden sich von Phenylalanin durch die Funktionalisierung des Benzolrings in *para*-Position mit einer Benzophenon- bzw. Hydroxygruppe. Die Struktur von Tryptophan unterscheidet sich aufgrund des Indolringes noch deutlicher von den anderen aromatischen Aminosäuren (siehe **Abbildung 53**). Es liegt daher nahe, dass eine entsprechend funktionalisierte Seitenkette für die Stabilisierung des Tat-Komplexes 3 nötig ist.

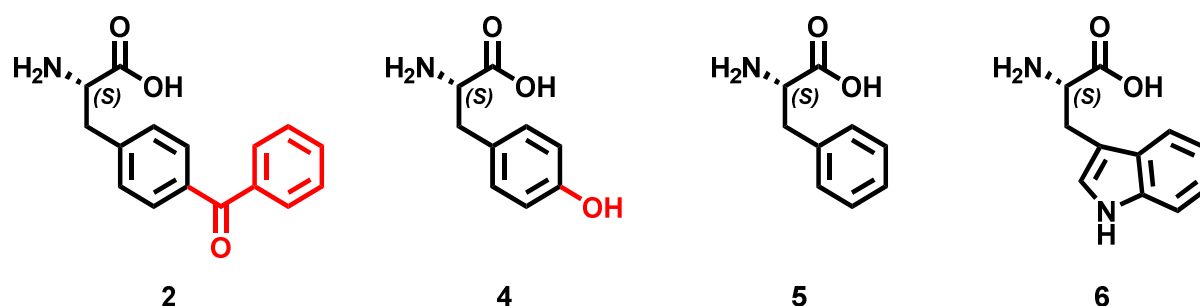


Abbildung 53: Strukturformeln von *para*-Benzoyl-L-Phenylalanin **2** (Bpa), L-Tyrosin **4** (Y), L-Phenylalanin **5** (F) und L-Tryptophan **6** (W). Die polaren Reste in *para*-Position der Benzolringe wurden rot markiert.

Genauere Untersuchungen von TatABC_{P48A}-Systemen zeigten, dass deren Inaktivierung strukturelle Ursachen hatte. So führte TatC_{P48A} zu einer Disassemblierung der Tat-Translokase. Anhand von BN-PAGE/Western-Blot-Analysen von TatABC_{P48A}-Systemen konnten nur noch Spuren der Tat-Komplexe 1 und 2 detektiert werden. Stattdessen wurden starke Signale für kleinere Disassemblierungsprodukte der Tat-Translokase erhalten (Allen *et al.* 2002; Behrendt und Brüser 2014). Ein möglicher Grund hierfür könnten die strukturellen Einflüsse sein, die Proline in Proteinen ausüben. Durch die eingeschränkte Rotation der Amidbindung verändern Proline die Orientierung von Helices und beeinflussen damit die räumliche Struktur (Chou und Fasman 1974; Richardson 1981; Barlow und Thornton 1988). Des Weiteren konnte für Membranproteine gezeigt werden, dass Proline für die Knüpfung von Inter-Helix-Kontakten verantwortlich sind. Diese haben ebenfalls bedeutenden Einfluss auf die Faltung (Lu *et al.* 2001).

Trotz der räumlichen Nähe von TatC₁₅₀ und TatC_{P48} konnten anhand von BN-PAGE/Western-Blot-Analysen keine destabilisierenden Effekte von TatC_{150Bpa} und TatC_{150Y} beobachtet werden. So konnten für TatABC_{150Bpa} keine und für TatABC_{150Y}-Systeme nur sehr geringe Mengen von Disassemblierungsprodukten nachgewiesen werden. TatC_{150Bpa} scheint Tat-Komplex 3 sogar so stark zu stabilisieren, dass Tat-Komplex 1 nicht mehr detektiert werden kann. Für TatABC_{150Y}-Systeme hingegen konnten die Tat-Komplexe 1, 2 und 3 detektiert werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass TatC_{150Bpa} einen größeren stabilisierenden Einfluss auf Tat-Komplex 3 ausübt als TatC_{150Y} (siehe **Abbildung 18**).

Da die unterschiedlichen Molekulargewichte der Tat-Komplexe in der Vergangenheit immer auf die Zusammensetzung dieser Komplexe zurückgeführt werden konnten, lag es nahe, dass Tat-Komplex 3 sich in seiner Zusammensetzung von den bereits bekannten Tat-Komplexen 1, 1S, 2 und 2S unterscheidet. Aufgrund des erhöhten Molekulargewichts könnte es sich dabei möglicherweise um ein spätes Intermediat der Tat-Translokase handeln, welches aufgrund eines oder mehrerer gebundener Substrat-Protomere ein erhöhtes Molekulargewicht aufweist. Aus diesem Grund sollten nachfolgend die Einflüsse einzelner Tat-Komponenten, des Substrates und der Substratbindung auf Tat-Komplex 3 genauer untersucht werden.

4.2 Die Tat(A)BC_{150Bpa}-Komplexe

Betrachtet man die Unterschiede zwischen den literaturbekannten Tat-Komplexen, so fällt auf, dass diese sich vor allem durch ihr Molekulargewicht voneinander unterscheiden. Verursacht werden diese Unterschiede durch die Zusammensetzung der Tat-Komplexe. Bei Analysen von TatABC-Komplexen konnte für Tat-Komplex 1 in der Regel das stärkste Signal erhalten werden (Oates *et al.* 2005; Richter und Brüser 2005). Spätere Untersuchungen zeigten, dass Tat-Komplex 1 auch in der Abwesenheit von TatA beobachtet werden kann. Tat-Komplex 2 hingegen konnte bei geringen TatB-Konzentrationen, nur in Anwesenheit von TatA detektiert werden. Dies führte zu dem Schluss, dass es sich bei Tat-Komplex 1 um einen TatBC- und bei Tat-Komplex 2 um einen TatABC-Komplex handelt (siehe **Abbildung 54**). Wurde zusätzlich das Tat-Substrat EfeB (früher YcdB) überproduziert, konnten zwei Substrat-assoziierte Tat-Komplexe erhalten werden. Hierbei wies einer der beiden Komplexe ein etwas geringeres und der andere ein etwas höheres Molekulargewicht als Tat-Komplex 2 auf. Daraus wurde geschlossen, dass diese jeweils die Tat-Komplexe 1 und 2 mit gebundenem Substrat repräsentieren (Behrendt und Brüser 2014). Im Rahmen dieser Arbeit werden diese Komplexe daher als Tat-Komplexe 1S und 2S bezeichnet (siehe **Abbildung 54**).

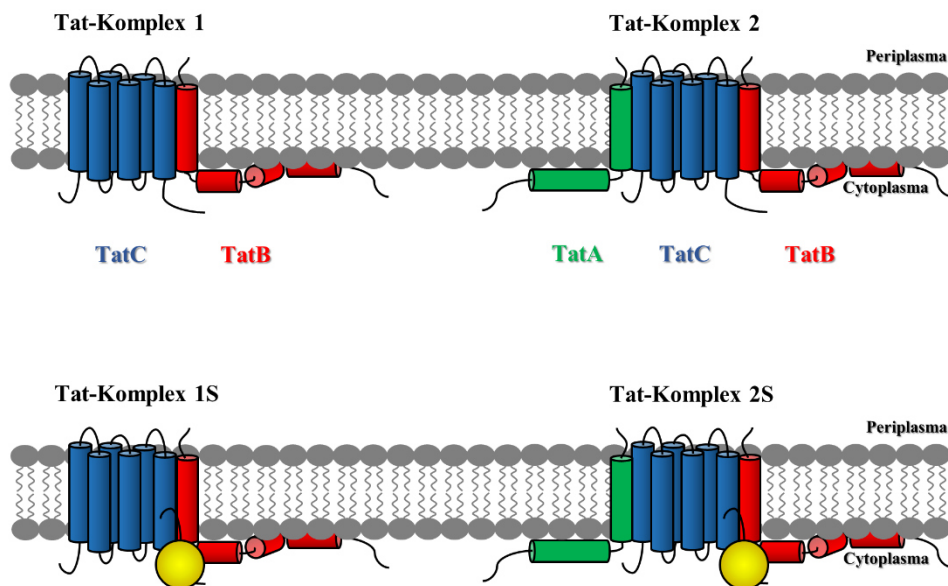


Abbildung 54: Schematische Darstellung der Tat-Komplexe 1, 1S, 2 und 2S nach bisherigem Wissensstand (Behrendt und Brüser 2014). Zu beachten ist, dass die Anzahl der Protomere pro Komplex nicht bekannt ist und aus Gründen der Übersichtlichkeit so weit wie möglich reduziert wurde. Die Darstellung soll dient der Verdeutlichung welche Tat-Komponenten Bestandteile der Komplexe sind.

Zur Untersuchung der Einflüsse einzelner Tat-Komponenten, des Substrats und der Substratbindung stehen unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung. Beispielsweise kann die Analyse von TatBC-Komplexen in der Abwesenheit von TatA hilfreiche Hinweise auf den Einfluss von TatA auf die Assemblierung von Tat-Komplexen liefern. Mithilfe der Überproduktion einzelner Tat-Substrate (im speziellen EfeB) kann die vermehrte Assemblierung von Substrat-assoziierten Tat-Komplexen erreicht werden. Diese konnten dann mittels BN-PAGE/Western-Blot und spezifischen Antikörpern gegen diese Substrate nachgewiesen werden (Behrendt und Brüser 2014). Auf der anderen Seite kann die Bindung von Substraten an die Tat-Translokase durch den Austausch der für die Substratbindung essenziellen Aminosäuren gezielt verhindert werden. Hierbei spielen vor allem TatC_{F94} und TatC_{E103} eine große Rolle. Die Austausche TatC_{F94A}, TatC_{F94Q} und TatC_{E103A} führen nicht nur zu einer Inaktivierung des Tat-Systems (Buchanan *et al.* 2002), sondern auch dazu, dass *in vitro* und *in vivo* keine Bindung von Substraten an die Tat-Translokase beobachtet wird (Holzapfel *et al.* 2007; Behrendt und Brüser 2014; Huang *et al.* 2017).

4.2.1 TatC_{I50Bpa} zeigt eine erhöhte Affinität zu TatA und TatB

Um zu untersuchen, ob das erhöhte Molekulargewicht von Tat-Komplex 3 durch die Assoziation von Substraten an die Tat-Translokase verursacht wird, wurde der Stamm verwendet, der bereits für die Translokationsanalyse von EfeB verwendet wurde. Dieser produziert neben TatABC_{I50Bpa} auch das Tat-Substrat EfeB. Durch eine Überproduktion von EfeB sollte eine vermehrte Assemblierung von EfeB-Tat-Komplexen erreicht werden (Behrendt und Brüser 2014). BN-PAGE/Western-Blot-Analysen führten jedoch nicht dazu, dass EfeB-Tat-Komplexe detektiert werden konnten. Des Weiteren wurden die Aminosäureaustausche I50Bpa, F94Q und E103A in TatC kombiniert, um den Einfluss der Substratbindung auf Tat-Komplex 3 zu untersuchen. Diese zeigten keinen Einfluss auf die Assemblierung von Tat-Komplex 3 (siehe **Abbildung 20**). Jedoch führte die Modifikation der Substratbindung von TatABC_{I50Bpa}-Systemen dazu, dass der leichtere Tat-Komplex (2 oder 2S) nur noch in deutlich geringeren Mengen detektiert werden konnte (siehe **Abbildung 20**). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass es sich bei Tat-Komplex 3 nicht um einen Substrat-assoziierten Komplex handelt und das erhöhte Molekulargewicht nicht durch die Bindung von Substraten verursacht wird. Jedoch scheint die Verhinderung der Substratbindung die Assemblierung des kleineren Komplexes zu beeinflussen. Dies deutet darauf hin, dass es sich hierbei um Tat-Komplex 2S handeln könnte.

Da kein Einfluss der Substratassoziation auf die Assemblierung von Tat-Komplex 3 nachgewiesen werden konnte, sollte nachfolgend der Einfluss von TatA untersucht werden. Hierfür wurden TatBC_{150Bpa}- und TatBC_{150Y} in der Abwesenheit von TatA produziert. Die Analyse der solubilisierten Membranproteine mittels BN-PAGE/Western-Blot zeigte, dass Tat-Komplex 3 weder für TatBC_{150Bpa} noch für TatBC_{150Y} in der Abwesenheit von TatA detektiert werden kann. Stattdessen konnte für TatBC_{150Bpa} nur der leichtere Tat-Komplex, welcher dem Tat-Komplex 2 oder 2S entspricht, erhalten werden (Geise *et al.* 2019). Für TatBC_{150Y} hingegen konnte auch dieser in der Abwesenheit von TatA nicht beobachtet werden. So konnte nach der Produktion von TatBC_{150Y} in der Abwesenheit von TatA nur Tat-Komplex 1 detektiert werden (siehe **Abbildung 21**).

Das deutet darauf hin, dass eine Assoziation von TatA für das erhöhte Molekulargewicht von TatABC_{150Bpa}-Komplex 3 verantwortlich ist. Demzufolge könnte das erhöhte Molekulargewicht von Tat-Komplex 3 auf eine erhöhte Affinität von TatC_{150Bpa} zu TatA zurückzuführen sein. Die Tat-Komplexe 2 und 2S können für Wildtyp-Tat-Systeme nur in der Anwesenheit von Tata erhalten werden. Dass jedoch für TatBC_{150Bpa} auch in Abwesenheit von Tata ein Tat-Komplex mit entsprechendem Molekulargewicht zu beobachten war, deutet darauf hin, dass auch die Affinität von TatC_{150Bpa} zu TatB erhöht ist. So könnten TatA-Bindestellen durch TatB besetzt werden, was zur Detektion von TatBC_{150Bpa}-Komplexen führt, die ein ähnliches Molekulargewicht wie die Wildtyp-TatABC-Komplexe 2 oder 2S aufweisen (siehe **Abbildung 55**).

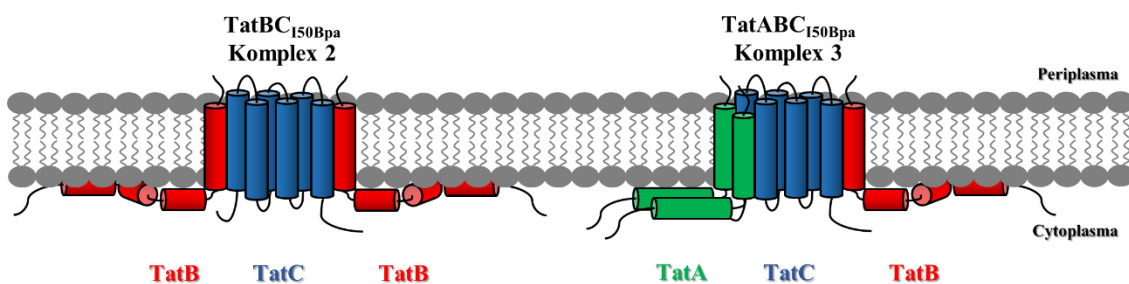


Abbildung 55: Schematische Darstellung des TatBC_{150Bpa}-Komplexes 2 und des TatABC_{150Bpa}-Komplexes 3. Die Anzahl der Protomere pro Komplex ist nicht bekannt und wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit so weit wie möglich reduziert. Das erhöhte Molekulargewicht von Tat-Komplex 3 ist durch eine Assoziation von Tata bedingt.

Auffällig ist, dass TatC_{150Bpa} eine erhöhte Affinität sowohl zu TatA als auch zu TatB aufzuweisen scheint. Jedoch konnte für TatBC_{150Bpa}-Systeme keine Aktivität nachgewiesen werden. Das könnte bedeuten, dass die Assemblierung dieser TatBC_{150Bpa}-Komplexe nur in Abwesenheit von TatA stattfindet, da TatB-Protomere mit TatA-Bindestellen interagieren. Das würde in der Folge bedeuten, dass es sich bei beiden Komplexen, die für TatABC_{150Bpa}-Systeme beobachtet werden können, um TatABC-Komplexe handelt. Jedoch resultiert aus der erhöhten Affinität von TatC_{150Bpa} zu TatB in der Abwesenheit von TatA eine Besetzung der TatA-Bindestellen durch TatB-Protomere, was die Detektion von TatBC_{150Bpa}-Komplex 2 oder 2S erklärt.

4.2.2 TatC_{150Bpa} stabilisiert neben Tat-Komplex 3 den Tat-Komplex 2S

Es konnten keine Hinweise darauf erhalten werden, dass das erhöhte Molekulargewicht von TatABC_{150Bpa}-Komplex 3 im Zusammenhang mit der Assoziation von Substrat an das Tat-Translokon steht. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, sollte in der Folge ausgeschlossen werden, dass eine Assoziation von Substrat an den leichteren Tat-Komplex 2 oder 2S zu einer Erhöhung des Molekulargewichts führt. Hierfür wurde ein Stamm verwendet, welcher TatBC_{150Bpa} in der Abwesenheit von TatA produziert und damit den beobachteten TatBC_{150Bpa}-Komplex 2 oder 2S bildet. Durch die Überproduktion von EfeB sollte untersucht werden, ob dieses an den TatBC_{150Bpa}-Komplex 2 oder 2S bindet und so zu einer Erhöhung des Molekulargewichts bzw. der Assemblierung von Tat-Komplex 3 führen kann.

Vergleichende BN-PAGE/Western-Blot-Analysen mit dem TatBC_{150Bpa}-Komplex 2 oder 2S und dem TatABC_{150Bpa}-Komplex 3 zeigten, dass mithilfe der Überproduktion von EfeB keine Erhöhung des Molekulargewichtes von TatBC_{150Bpa}-Komplex 2 oder 2S erreicht werden konnte. Die Überproduktion von EfeB führte jedoch zur Detektion eines zusätzlichen Signals nach der Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen EfeB. Dieses entsprach in etwa dem Molekulargewicht des TatBC_{150Bpa}-Komplexes 2 oder 2S (siehe **Abbildung 22**). Aus diesem Grund wurde die Membran, die für die Detektion von TatB verwendet wurde, erneut für die Detektion von EfeB verwendet. Zu diesem Zweck wurden die Antikörper entfernt (*AB stripping*, siehe Abschnitt 2.4.11). Die erhaltenen Signale für TatB und EfeB wurden unterschiedlich eingefärbt, anhand der Größenstandards ausgerichtet und multipliziert (*Overlay*). Das *Overlay* zeigte, dass die erhaltenen Signale für EfeB und TatB vom gleichen Komplex stammten (siehe **Abbildung 23**). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem TatBC_{150Bpa}-Komplex um Komplex 2S handelt. Da keine Änderung des Molekulargewichts beobachtet werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass dieser Komplex bereits ohne die Überproduktion

von Substrat als Substrat-assoziiertes-Komplex vorliegt. Die Überproduktion von EfeB führt lediglich dazu, dass größere Mengen an EfeB-Tat-Komplexen vorliegen, sodass EfeB in Kollokalisierung mit TatB detektiert werden kann (siehe **Abbildung 56**).

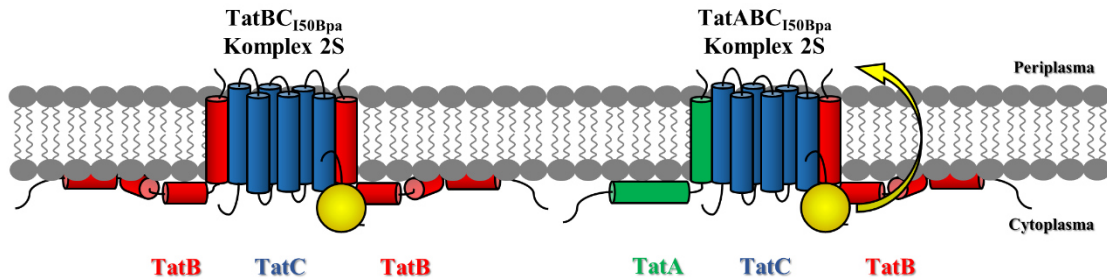


Abbildung 56: Schematische Darstellung des TatBC_{150Bpa}-Komplexes 2S und des TatABC_{150Bpa}-Komplexes 2S. Die Anzahl der Protomere pro Komplex ist nicht bekannt und wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit so weit wie möglich reduziert. Das erhöhte Molekulargewicht von Tat-Komplex 3 ist von TatA abhängig.

Abbildung 56 zeigt eine schematische Darstellung des Substrat-assoziierten TatBC_{150Bpa}-Komplexes (links). Wie bereits erwähnt, sind TatBC_{150Bpa}-Systeme nicht funktionell (siehe **Abbildung 28**). Das gebundene Substrat kann daher nicht in das Periplasma transportiert werden. Aus diesem Grund akkumulieren EfeB-Tat-Komplexe in der Membran, sodass diese detektiert werden können (siehe **Abbildung 23**) (Geise *et al.* 2019).

Wird EfeB hingegen in Anwesenheit von TatABC_{150Bpa}-Komplexen überproduziert, kann EfeB nicht in diesem Komplex nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 20**). Jedoch sind TatABC_{150Bpa}-Komplexe funktionell und können Substrate in das Periplasma transportieren. Wird EfeB überproduziert, bilden sich zwar vermehrt EfeB-Tat-Komplexe, das gebundene EfeB wird jedoch anschließend in das Periplasma transportiert (siehe **Abbildung 15A**). Aus diesem Grund akkumulieren keine EfeB-Tat-Komplexe in der Membran und können nicht detektiert werden (siehe **Abbildung 56**, rechts). Analog zu Abschnitt 4.2.1 ist es wahrscheinlich, dass der EfeB-TatBC_{150Bpa}-Komplex 2S nur aufgrund der erhöhten Affinität von TatC_{150Bpa} zu TatB in Abwesenheit von TatA als TatBC-Komplex assembliert. Es ist nicht davon auszugehen, dass es sich bei diesem Komplex auch in Anwesenheit von TatA um einen reinen EfeB-TatBC-Komplex handelt, sondern eher um einen EfeB-TatABC-Komplex. Dies konnte anhand von später durchgeführten Reinigungen von TatABC_{150Bpa}-Komplexen bestätigt werden, mithilfe derer TatA in beiden Tat-Komplexen nachgewiesen werden konnte (siehe **Abbildung 32**).

Einen weiteren Hinweis lieferten Modifikationen der Substratbindung (siehe Abschnitt 3.2.2). Die TatC-Aminosäureaustausche F94Q, E103A sowie deren Kombination verhindern die Bindung von Substraten an die Tat-Translokase (Holzapfel *et al.* 2007; Huang *et al.* 2017). Wurden diese Mutationen mit TatC_{150Bpa} kombiniert, so konnten für TatABC-Systeme nur noch Spuren dieses Komplexes detektiert werden (siehe **Abbildung 20, ■**). Dies weist darauf hin, dass es sich hierbei auch in TatABC_{150Bpa}-Systemen um einen Substrat-assoziierten Tat-Komplex 2S handelt.

4.2.3 Die Modifikation der Substratbindung induziert die Bildung von Tat-Komplex 3

Es stellte sich nun die Frage, ob die verstärkte Assoziation von TatA-Protomeren und die Dissoziation des Substrates miteinander gekoppelt sind und ob letztere den Transport repräsentiert. Eine Kopplung von TatA-Assoziation und Substrat-Dissoziation würde bedeuten, dass Tat-Komplex 3 nicht nur von TatA, sondern auch von der Existenz eines Vorläufer-Komplexes abhängig ist, der mit einem oder mehreren Substraten assoziiert ist. Hierfür sollen im Folgenden die Einflüsse einer modifizierten Substratbindung auf die Assemblierung von Tat-Komplex 3 diskutiert werden. In Abschnitt 4.2.2 wurde bereits auf den Einfluss der Substratbindung auf TatABC_{150Bpa}-Komplex 2S diskutiert. Im Rahmen dieses Experiments konnte beobachtet werden, dass die Kombination von TatC_{150Bpa} mit F94Q und E103A zu einer reduzierten Assemblierung von Tat-Komplex 2S führt. Das bestätigt, dass es sich bei diesem Komplex um den Substrat-assoziierten Tat-Komplex 2S handelt. Des Weiteren konnte auch beobachtet werden, dass die vorgenommene Unterbindung der Substratbindung keinen Einfluss auf die Assemblierung von Tat-Komplex 3 hatte. So konnten ähnlich starke Signale für Tat-Komplex 3 erhalten werden wie bei TatABC_{150Bpa}-Systemen, deren Substratbindung nicht modifiziert wurde (siehe **Abbildung 20**).

Auch für TatBC-Systeme wurden die Aminosäureaustausche TatC_{150Bpa}, TatC_{F94Q} und TatC_{E103A} kombiniert. Da TatBC_{150Bpa}-Systeme bereits bei endogenen Substrat-Konzentrationen Tat-Komplex 2S bilden, wurde hier davon ausgegangen, dass das Verhindern der Substratbindung zu kleineren Tat-Komplexen führt. Erwartungsgemäß wurden deutlich schwächere Signale für Tat-Komplex 2S erhalten. Jedoch konnte Entgegen der Erwartungen beobachtet werden, dass es zu einer Assemblierung von Tat-Komplex 3 in der Abwesenheit von TatA kam (siehe **Abbildung 24**).

Möglicherweise verursacht TatC_{I50Bpa} eine so starke Stabilisierung von Tat-Komplex 3, dass dieser sich auch unabhängig von der Substratbindung bilden kann. Auffällig ist hierbei, dass TatA sowohl bei modifizierter als auch bei nicht modifizierter Substratbindung an das Tat-Translokon assoziiert, sodass Tat-Komplex 3 detektiert werden kann. TatB hingegen assembliert nur in höherem Maße an das Tat-Translokon, wenn die Substratbindung modifiziert wurde. Dies könnte durch eine erhöhte Affinität von TatC-Protomeren mit modifizierter Substratbindung zu TatB erklärt werden. Es ist jedoch auch denkbar, dass die Affinität zu Substraten unter natürlichen Umständen höher ist als zu TatB und eine TatB-Assoziation nur möglich ist, wenn keine Assoziation von Substraten stattfinden kann. **Abbildung 57** zeigt schematische Darstellungen der TatBC_{I50Bpa,F94Q,E103A}- und TatABC_{I50Bpa,F94Q,E103A}-Komplexe.

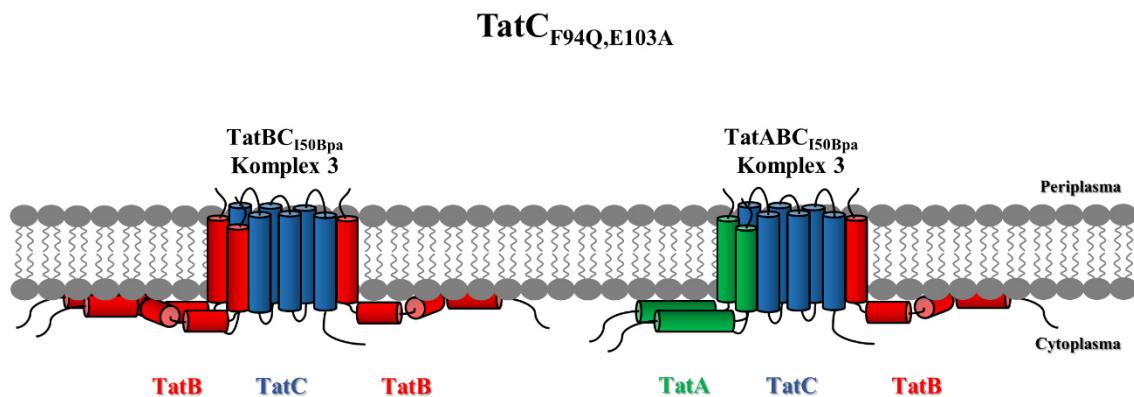


Abbildung 57: Schematische Darstellung des TatBC_{I50Bpa,F94Q,E103A}-Komplexes 3 und des TatABC_{I50Bpa,F94Q,E103A}-Komplexes 3. Die Anzahl der Protomere pro Komplex ist nicht bekannt und wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit so weit wie möglich reduziert.

Die beobachteten Komplexe deuten darauf hin, dass Tat-Komplex 2S in Abwesenheit von Tata und bei intakter Substratbindung die stabilste Assemblierung darstellt. Wird die Bindung von Substraten verhindert, kann noch mehr TatB mit dem Tat-Translokon interagieren, sodass Tat-Komplex 3 in Abwesenheit von Tata assemblieren kann (siehe **Abbildung 57**). Da die Substrate sich strukturell untereinander teils stark unterscheiden, kann die Modifikation der Substratbindung durch TatC_{F94Q} und TatC_{E103A} nicht mit vergleichbarer Effektivität die Bindung aller Substrate unterbinden (Holzapfel *et al.* 2007). Diese Tatsache könnte eine Erklärung dafür liefern, warum auch nach modifizierter Substratbindung immer noch Spuren von Tat-Komplex 2S detektiert wurden.

In Anwesenheit von TatA hingegen scheint Tat-Komplex 3 auch bei intakter Substratbindung die stabilste Assemblierung darzustellen. Jedoch kann Tat-Komplex 3 auch bei verminderter Substratbindung beobachtet werden. Einen möglichen Grund hierfür könnte die erhöhte Affinität von TatC_{I50Bpa} zu TatA liefern. Möglicherweise ist die Assoziation von TatA in der Folge kinetisch so stark bevorzugt, dass dieses auch ohne funktionellen Transport an das Tat-Translokon bindet, um Tat-Komplex 3 zu bilden. Andererseits darf auch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass die starke Erhöhung der Affinität von TatC_{I50Bpa} zu TatA zur Assemblierung eines nicht funktionalen, artifiziellen Tat-Komplexes führen könnte, welcher in keinem Zusammenhang mit dem Tat-Transport steht.

Zusammenfassend können für TatABC_{I50Bpa}-Systeme zwei Tat-Komplexe beobachtet werden. Ein kleinerer Komplex, welcher dem Tat-Komplex 2S entspricht und in Assoziation mit Substraten vorliegt sowie Komplex 3, welcher keinem der vorher charakterisierten Komplexe entspricht. Dieser kann, unabhängig von der Substratbindung, in Anwesenheit von TatA erhalten werden, ist jedoch nicht mit Substrat assoziiert und kann bei modifizierter Substratbindung auch in Abwesenheit von TatA erhalten werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die erhöhte Affinität von TatC_{I50Bpa} zu TatA und TatB liefern. Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass nur Tat-Komplexe mit höherem Molekulargewicht beobachtet werden können, die bei Wildtyp-TatABC-Systemen nur in Anwesenheit von TatA assemblieren. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen außerdem frühere Studien, im Rahmen derer gezeigt werden konnte, dass TatB im Laufe des Transportes an TatA-Bindestellen von TatC bindet (Habersetzer *et al.* 2017). All dies legt die Stabilisierung zweier später Intermediate des Tat-abhängigen Proteintransportes durch TatC_{I50Bpa} nahe. Möglicherweise stellt Tat-Komplex 2S eines der letzten Intermediate vor dem Transport dar. Die verstärkte Assoziation von TatA-Protomeren an diesen Komplex und die Dissoziation des Substrates könnten zur Bildung von Tat-Komplex 3 führen. Sofern die Dissoziation des Substrates auf der periplasmatischen Seite geschieht, wäre Tat-Komplex 3 ein posttranslokationales Intermediat, welches die Tat-Translokase nach dem Transport repräsentiert (Geise *et al.* 2019). Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Intermediate existieren, die mit der bisher verwendeten Methodik nicht identifiziert werden können.

4.3 Die Rolle der Komponenten bei der Assemblierung von Tat-Komplexen

In *E. coli* sind die Gene *tatA*, *tatB* und *tatC* unter natürlichen Bedingungen gemeinsam im *tatABCD*-Operon organisiert. Dieses steht unter der Kontrolle des gemeinsamen *tatA*-Promotors (P_{tatA}), sodass bei der Transkription eine polycistronische mRNA entsteht. Ausgehend von dieser polycistronischen mRNA entstehen nach der Translation die Proteinprodukte TatA, TatB und TatC. Diese liegen unter natürlichen Bedingungen im Verhältnis 25:1:0,5 vor (Sargent *et al.* 2001). Eine Möglichkeit die Einflüsse von TatA genauer zu untersuchen sind vergleichende Analysen von TatABC- und TatBC-Systemen. Bereits im Rahmen früherer Studien wurde gezeigt, dass die Tat-Komplexe 1 und 2 auch in Abwesenheit von TatA erhalten werden können, sofern TatB überproduziert wird. Auch wenn *tatA* aus dem *tatABCD*-Operon entfernt wird, sodass *tatB* und *tatC* unter der Kontrolle des *tatA*-Promotors exprimiert werden, können die Tat-Komplexe 1 und 2 in der Abwesenheit von TatA erhalten werden (Behrendt *et al.* 2007). Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass TatB und TatC nach der Deletion von *tatA* im Verhältnis 25:1 vorliegen. Dies entspricht einem massiven Überschuss an TatB, ähnlich wie bei der bei Überproduktion von TatB. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten von TatA und TatB können beide mit den gleichen Regionen von TatC interagieren (Habersetzer *et al.* 2017). Wird TatB im Überschuss verwendet, bindet dieses in Abwesenheit von TatA trotz niedrigerer Affinität an die TatA-Bindestellen von TatC. In der Folge assemblieren TatBC-Komplexe, deren Oberfläche der der TatABC-Komplexe 1 und 2 ähnelt, wodurch diese ein identisches Migrationsverhalten in der BN-PAGE zeigen. Werden *tatB* und *tatC* jedoch unter der Kontrolle des *tet*-Promotors exprimiert, liegt weniger überschüssiges TatB vor, sodass nur Tat-Komplex 1 in Abwesenheit von TatA erhalten werden kann (Behrendt und Brüser 2014).

Die Einflüsse der verschiedenen Tat-Komponenten auf die Assemblierung der Tat-Komplexe und die Funktionalität des Tat-Systems wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit für das Wildtyp-Tat-System genauer untersucht und teilweise auf den zuvor charakterisierten Tat-Komplex 3 des TatABC_{150Bpa}-Systems übertragen. Die erhaltenen Ergebnisse sollen nachfolgend diskutiert werden.

4.3.1 TatA kann strukturell, jedoch nicht funktionell durch TatB ersetzt werden

Neben den bereits untersuchten Expressionssystemen, bei denen *tatB* und *tatC* unter der Kontrolle des *tatA*- und des *tet*-Promotors exprimiert werden (Behrendt *et al.* 2007; Behrendt und Brüser 2014), wurde ein weiteres Expressionssystem verwendet, welches von Dr. Michael Thomas Ringel etabliert wurde. Bei diesem Expressionssystem werden die Gene *tatB* und *tatC* unter der Kontrolle eines modifizierten *tatA*-Promotors ($P_{tat(B)}$) exprimiert. Dieser beinhaltet anstelle der zu *tatA* gehörigen ribosomalen Bindestelle die für *tatB* spezifische ribosomale Bindestelle. Da sowohl die Sequenz als auch die Entfernung der ribosomalen Bindestelle zum Startcodon einen Einfluss auf die Translationseffizienz und damit auf die Konzentration der Proteinprodukte hat (Ma *et al.* 2002), sollte anhand dieser Modifikation eine TatB-Konzentration erreicht werden, die eher den natürlichen Umständen entspricht.

Des Weiteren wurde ein Expressionssystem etabliert, welches auf einem modifizierten Rhamnose-Promotor (P_{rha}) basiert. Hierfür wurde die ursprüngliche ribosomale Bindestelle entfernt und *tatABC_{H6}* bzw. *tatBC_{H6}* inklusive der entsprechenden ribosomalen Bindestellen für *tatA* bzw. *tatB* inseriert (fortan $P_{rha(A)}$ und $P_{rha(B)}$). Die solubilisierten Membranen der entsprechenden Stämme wurden mittels BN-PAGE/Western-Blot analysiert (siehe **Abbildung 25** und **Abbildung 26**). Außerdem wurden Funktionalitätsanalysen mithilfe der entsprechenden Stämme durchgeführt (siehe **Abbildung 28**).

Für alle beschriebenen *tatBC_{H6}*-Expressionssysteme konnten in Abwesenheit von TatA TatBC-Komplexe erhalten werden, die auch für die entsprechenden TatABC-Systeme erwartet wurden. Dies gilt nicht nur für die bereits untersuchten Wildtyp-Tat-Komplexe 1 und 2 (Behrendt *et al.* 2007), sondern auch für Tat-Komplex 3. Dieser konnte sowohl für das TatBC_{I50Bpa}-System als auch für TatBC_{I50Y}-System in der Abwesenheit von TatA erhalten werden (siehe **Abbildung 25**). Die Funktionalität der entsprechenden TatBC-Systeme konnte hingegen für keinen der analysierten Stämme nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 28**). Auch nach Überproduktion beider Komponenten, TatB und TatC, konnten die Tat-Komplexe 1 und 2 in der Abwesenheit von TatA beobachtet werden (siehe **Abbildung 26**). Die erhaltenen Wildtyp-TatBC-Komplexe sind in **Abbildung 58** schematisch dargestellt.

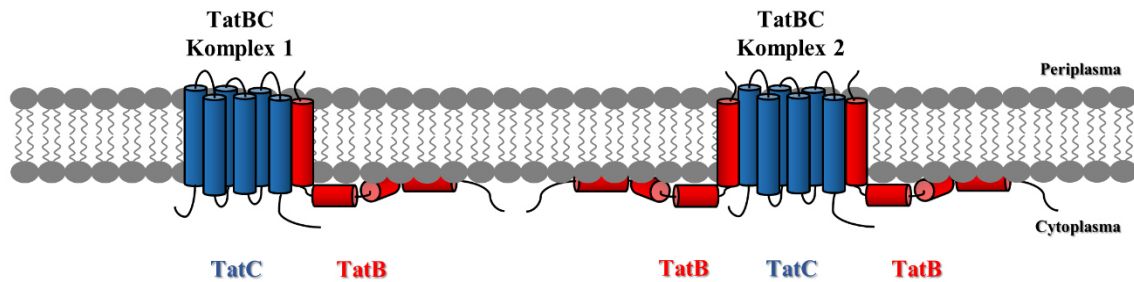


Abbildung 58: Schematische Darstellung der TatBC-Komplexe 1 und 2. Alle Tat-Komplexe können auch in der Abwesenheit von TatA abhängig von der TatB-Konzentration erhalten werden. Die Anzahl der Protomere pro Komplex ist nicht bekannt und wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit so weit wie möglich reduziert.

Eine Begründung für die gemachten Beobachtungen könnte die Interaktion von TatB-Protomeren mit TatA-Bindestellen von TatC liefern (Habersetzer *et al.* 2017). So konnten bei der Verwendung eines TatB-Überschusses alle Tat-Komplexe, die auch in der Anwesenheit von TatA zu beobachten sind, als TatBC-Komplexe erhalten werden. Das deutet darauf hin, dass die Konzentrationen von TatA und TatB von entscheidender Bedeutung für den Tat-Transport sind. So kann TatB offensichtlich, wenn auch mit geringerer Affinität, mit TatA-Bindestellen interagieren. In Abwesenheit von TatA können folglich alle TatA-Bindestellen mit TatB-Protomeren besetzt werden, was zur Assemblierung von TatBC-Komplexen führt, deren Migrationsverhalten dem von TatABC-Komplexen gleicht. Da jedoch für keines der untersuchten TatBC-Systeme Funktionalität beobachtet werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass TatA immer ein Bestandteil der Tat-Komplexe ist, sofern TatA anwesend ist (siehe **Abbildung 28**). Die Tatsache, dass die Tat-Komplexe 2 und 3 erst unter Verwendung eines Überschusses an TatB auch in Abwesenheit von TatA erhalten werden können, legt nahe, dass es sich bei den zu beobachtenden Tat-Komplexen 1, 2 und 3 um verschiedene Assemblierungsstadien handelt. Die unterschiedlichen Mengen assoziierter TatA-Protomere bedingen würden in der Folge in unterschiedlichen Molekulargewichten resultieren. All diese Beobachtungen sprechen dafür, dass TatBC-Komplexe unter natürlichen Umständen nicht existieren und lediglich aufgrund struktureller Ähnlichkeiten in der Abwesenheit von TatA assemblieren. Bei TatBC-Komplexen handelt es sich unter natürlichen Bedingungen wahrscheinlich um eine Art Kern-Komplexe, welche erst durch die Assoziation mit TatA-Protomeren aktiv am Tat-Transporte teilnehmen.

Es stellt sich folglich die Frage, ob es sich bei Tat-Komplex 1 tatsächlich unter natürlichen Umständen um einen reinen TatBC-Komplex handelt (Behrendt und Brüser 2014). Die erhobenen Daten lassen ebenso den Schluss zu, dass die Verwendung des *tet*-Promotors allgemein zu einer geringeren Konzentration von TatB und TatC führt (siehe **Abbildung 21**). In der Folge würden weniger Tat-Komplexe assemblieren. Betrachtet man die Tat-Komplexe des Wildtyp-Tat-Systems fällt auf, dass Tat-Komplex 1 immer in größeren Mengen vorliegt als Tat-Komplex 2. Bei geringerer Konzentration von TatB und TatC wäre eine logische Folge, dass geringere Mengen beider Tat-Komplexe assemblieren. Die Konzentration von Tat-Komplex 2 könnte dann unter die Nachweisgrenze fallen, sodass nur Tat-Komplex 1 detektiert werden kann. Ein Beweis, dass TatA Bestandteil des Tat-Komplexes 1 ist, kann jedoch nur durch den Nachweis von TatA innerhalb des Komplexes, beispielsweise durch *AB stripping*, erbracht werden. Entsprechende Experimente wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt und sollen im folgenden Abschnitt 4.3.2 diskutiert werden.

Zusammenfassend konnte anhand der Verwendung unterschiedlicher Expressionssysteme gezeigt werden, dass auch in der Abwesenheit von TatA alle bisher bekannten Tat-Komplexe erhalten werden können. Für die Assemblierung der Tat-Komplexe 2 und 3 wird dabei ein Überschuss an TatB benötigt. Damit konnte bestätigt werden, dass TatB und TatA aufgrund ähnlicher Interaktionen mit dem Tat-Translokon assoziiert sind und lässt. Dies lässt durchaus die Möglichkeit eines Positionstausches von TatA- und TatB-Protomeren im Laufe des Tat-abhängigen Transportes zu (Habersetzer *et al.* 2017).

4.3.2 Die Tat-Komplexe 1, 2, 2S und 3 sind TatABC-Komplexe

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Strategien zur Reinigung von Tat-Komplexen unter nicht-denaturierenden Bedingungen entwickelt (siehe Abschnitt 3.4). Bei der Etablierung dieser Reinigungsstrategien konnte auch beobachtet werden, dass freies TatA mithilfe der Größenausschlusschromatographie effizient entfernt werden kann. Freie TatA-Protomere sind nicht mit der Tat-Translokase assoziiert und neigen dazu, homooligomere Strukturen unterschiedlicher Größen zu bilden. Diese können nach BN-PAGE/Western-Blot-Analysen als eine Art Leiter detektiert werden und verhindern eine Aussage über die Lokalisation von TatA innerhalb der Tat-Komplexe. Nach der Entfernung dieser freien TatA-Assemblierungen konnten für TatA Signale erhalten werden, die etwa dem Molekulargewicht der Tat-Komplexe entsprachen.

Um zu untersuchen, welche der Tat-Komplexe in Assoziation mit TatA vorliegen, wurden Tat-Komplexe von Wildtyp-TatABC- (siehe **Abbildung 31**) und TatABC_{150Bpa}-Systemen (siehe **Abbildung 32**) anhand dreier aufeinander folgender Reinigungsschritte präpariert und mittels BN-PAGE/Western-Blot analysiert. Hierbei konnten TatB und TatC als Bestandteile der Tat-Komplexe 1 und 2 (Wildtyp-Tat-System) sowie die Komplexe 2S und 3 (TatABC_{150Bpa}-System) detektiert werden. Nach der Detektion von TatB und TatC wurden die Antikörper mittels *AB stripping* von den Membranen entfernt. Die Membranen wurden anschließend für die Detektion von TatA verwendet. Die erhaltenen Bilder einer Membran wurden unterschiedlich eingefärbt, passend ausgerichtet und multipliziert (*Overlay*), sodass die Kolokalisation zweier Proteine anhand der Kolokalisation zweier Signale bestimmt werden konnte (siehe **Abbildung 31** und **Abbildung 32**).

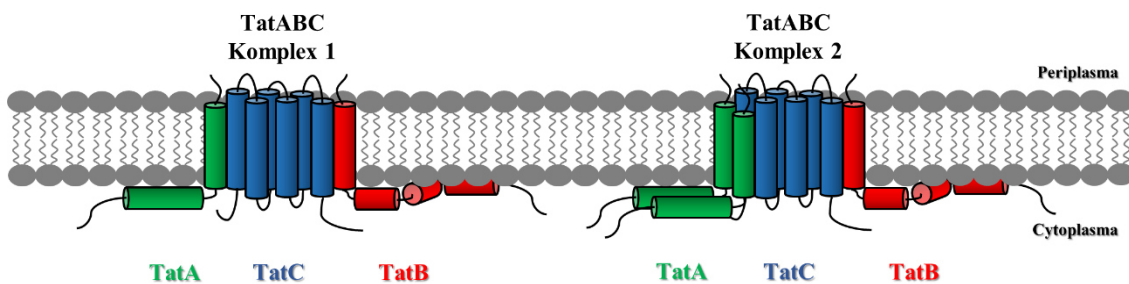


Abbildung 59: Schematische Darstellung der Wildtyp-Tat-Komplexe 1 und 2. Die Tat-Komplexe 1 und 2 sind TatABC-Komplexe.

Nach der Reinigung und Analyse von Tat-Komplexen des Wildtyp-TatABC-Systems konnte TatA in Kolokalisation mit TatC detektiert werden. Dabei konnte jedoch nicht nur ein Signal erhalten werden, welches Tat-Komplex 2 entspricht. Ebenfalls konnte ein Signal erhalten werden, welches Tat-Komplex 1 entspricht (siehe **Abbildung 31**). Vorherige Studien waren davon ausgegangen, dass es sich bei Tat-Komplex 1 um einen TatBC-Komplex handelt, da dieser auch in der Abwesenheit von TatA erhalten werden kann (Behrendt und Brüser 2014). Die erhaltenen Ergebnisse deuten jedoch eher darauf hin, dass es sich bei Tat-Komplex 1 um einen TatABC-Komplex handelt. **Abbildung 59** zeigt eine schematische Darstellung der TatABC-Komplexe 1 und 2.

Alle Tat-Komplexe, die sich für TatABC-Systeme beobachten lassen, können abhängig von der TatB-Konzentration auch in der Abwesenheit von TatA erhalten werden. Die Detektion von Tat-Komplex 1 in der Abwesenheit von TatA bei geringen Konzentrationen von TatB, lässt sich daher wahrscheinlich eher durch die Konzentration der Tat-Komponenten erklären. In der Regel werden stärkere Signale für Tat-Komplex 1 erhalten. Eine geringere Konzentration von TatB und TatC (siehe **Abbildung 21**) würde in der Folge dazu führen, dass nur noch geringe Mengen von Tat-Komplex 1 detektiert werden können. Die Konzentration von Tat-Komplex 2 hingegen fällt unter die Nachweisgrenze, sodass dieser gar nicht mehr detektiert werden kann. Es ist davon auszugehen, dass die unterschiedlichen Molekulargewichte der Tat-Komplexe von unterschiedlichen Mengen assoziierter TatA-Protomere herrühren. Dementsprechend ist auch eine größere Anzahl von TatB-Protomeren nötig, um die Komplexe 2 und 3 in der Abwesenheit von TatA als TatBC-Komplexe zu erhalten.

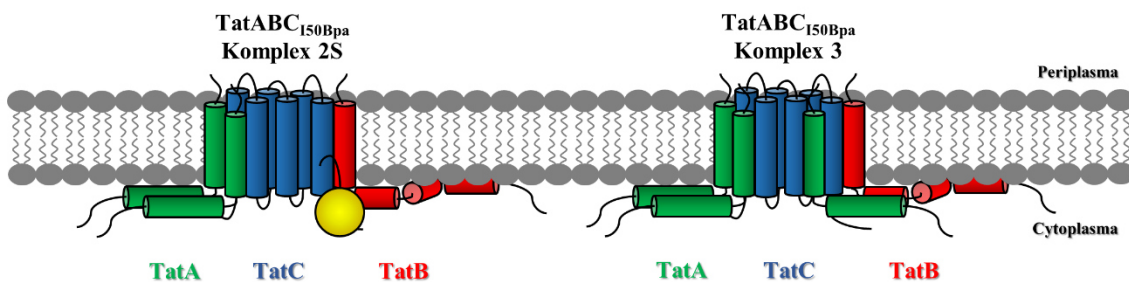


Abbildung 60: Schematische Darstellung der Tat-Komplexe 2S und 3 von TatABC_{150Bpa}-Systemen. Die Komplexe 2S und 3 sind TatABC_{150Bpa}-Komplexe.

Analog zur Reinigung und Analyse von Tat-Komplexen des Wildtyp-TatABC-Systems wurde ebenfalls eine Reinigung und Analyse der Tat-Komplexe des TatABC_{150Bpa}-Systems durchgeführt. TatA konnte in Kolokalisation mit TatB detektiert werden. Präziser konnten für TatA die beiden Signale erhalten werden, die auch für TatB und TatC detektiert wurden und den Tat-Komplexen 2S und 3 entsprechen (siehe **Abbildung 32**). Tat-Komplex 2S konnte in vorherigen Studien nur in Anwesenheit von TatA erhalten werden (Behrendt und Brüser 2014). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dieser für TatBC_{150Bpa}-Systeme auch in der Abwesenheit von TatA erhalten werden (siehe **Abbildung 22**). Da nach der Reinigung und Analyse von TatABC_{150Bpa}-Systemen jedoch TatA in Kolokalisation mit TatB detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass auch hier Tat-Komplex 2S nur in der Abwesenheit von TatA als TatBC-Komplex erhalten wird. Des Weiteren konnte anhand der Analysen bestätigt werden, dass es sich bei Tat-Komplex 3 um einen TatABC_{150Bpa}-Komplex handelt (Geise *et al.* 2019).

Auch dieser konnte bei geringen TatB-Konzentrationen in Abwesenheit von TatA nicht detektiert werden (siehe **Abbildung 22**). Lag TatB hingegen in höheren Konzentrationen vor, konnte auch Tat-Komplex 3 in der Abwesenheit von TatA als TatBC-Komplex erhalten werden (siehe **Abbildung 25**). Diese Beobachtungen unterstreichen, dass es sich bei den Tat-Komplexen 1, 2, 2S und 3 um TatABC-Komplexe handelt, die in Assoziation mit unterschiedlich vielen TatA-Protomeren vorliegen, was die differierenden Molekulargewichte dieser Tat-Komplexe erklärt. In Abwesenheit von TatA kann TatB mit den TatA-Bindestellen von TatC interagieren, sodass TatBC-Komplexe mit identischem Migrationsverhalten assemblieren. Da das Molekulargewicht mit der Anzahl der assoziierten TatA-Protomere steigt, müssen höhere TatB-Konzentrationen vorliegen, um die schwereren Tat-Komplex 2 und 3 in Abwesenheit von TatA als TatBC-Komplexe zu erhalten. Aufgrund der höheren Affinität von Tat_{I50Bpa} zu TatB kann der TatBC_{I50Bpa}-Komplex 2S bereits bei geringeren TatB-Konzentrationen erhalten werden.

4.3.3 Funktionelle Tat-Komplexe assemblieren nur in Anwesenheit von TatA/E, TatB und TatC

Anhand der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass die Tat-Komplexe 1, 2, 2S und 3 auch in der Abwesenheit von TatA als nicht-funktionale TatBC-Komplexe erhalten werden können. Für die Assemblierung der TatBC-Komplexe 2 und 3 mit höherem Molekulargewicht wird dabei ein Überschuss an TatB benötigt (siehe Abschnitt 4.3.1).

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass TatA und TatB auf ähnliche Weise mit den anderen Komponenten des Tat-Systems interagieren. Es existieren jedoch Unterschiede zwischen TatA und TatB, die bedingen, dass in Abwesenheit von TatA kein funktionaler Tat-Transport stattfinden kann. Um die Einflüsse von TatA und TatB auf die Assemblierung der Tat-Komplexe und die Funktionalität des Tat-Systems genauer zu untersuchen, wurden vergleichende Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Komponenten einzeln und in Kombination mit jeweils einer oder zwei weiteren Tat-Komponenten produziert. Die solubilisierten Membranproteine bzw. Proteinkomplexe wurden anschließend mittels BN-PAGE/Western-Blot analysiert (siehe **Abbildung 29**). **Tabelle 25** zeigt eine Zusammenfassung der beobachteten Proteinkomplexe.

Tabelle 25: Beobachtete Assemblierungen nach der Produktion zweier sowie dreier Tat-Komponenten. Kombinationen für die die Tat-Komplexe 1 und 2 mittels BN-PAGE/Western-Blot detektiert werden konnten, wurden mit „1 + 2“ gekennzeichnet. Kombinationen oder Einzelkomponenten, für die eine Oligomerisation beobachtet wurde, wurden mit „Olig.“ gekennzeichnet. Kombinationen, für die keine Proteinkomplexe detektiert werden konnten, wurden mit „(-)“ gekennzeichnet.

	TatA	TatB	TatC
TatA	Olig.	Olig.	(-)
TatB	Olig.	Olig.	1 + 2
TatC	(-)	1 + 2	(Behrendt und Brüser 2014)
	TatA	TatB	TatC
TatAB			1 + 2
TatAC		1 + 2	
TatBC	1 + 2		

Anhand der Analyse der Proteinkomplexe mittels BN-PAGE/Western-Blot konnte bestätigt werden, dass TatA- und TatB-Protomere zur Homooligomerisation neigen, wobei Homooligomere verschiedener Größen entstehen. TatA zeigte diese Eigenschaft sowohl in der An- als auch in der Abwesenheit von TatB und TatC. Für TatB hingegen können Homooligomere nur erhalten werden, wenn TatB in der Abwesenheit von TatC produziert wurde (Behrendt *et al.* 2007). Zusätzlich zeigte sich, dass TatA einen Einfluss auf die Assemblierung von TatB-Homooligomeren ausübt. So wurden in Anwesenheit von TatA TatB-Assemblierungen mit signifikant höherem Molekulargewicht detektiert. Im Gegensatz zu den TatB-Homooligomeren, die in Abwesenheit von TatA erhalten wurden, konnten diese nicht voneinander differenziert werden (siehe **Abbildung 29**). Anhand des Migrationsverhaltens (bzw. der R_F -Werte) der einzelnen TatB-Homooligomere im Vergleich zum Migrationsverhalten der verwendeten Markerproteine konnten die Differenzen zwischen diesen berechnet werden. So ergab sich eine Differenz des Molekulargewichts zwischen den einzelnen TatB-Homooligomeren zwischen 85 und 110 kDa. Diese entspricht in etwa den Differenzen, die bereits in früheren Studien angegeben wurden (Behrendt *et al.* 2007) und durch trimere Assemblierungen von TatB erklärt wurde (Behrendt und Brüser 2014).

Damit resultieren die strukturellen Ähnlichkeiten von TatA und TatB nicht nur in der Bildung von TatBC-Komplexen, die dem Molekulargewicht von TatABC-Komplexen entsprechen. Auch in Bezug auf die Homooligomerisierung zeigen TatA und TatB auffällige Ähnlichkeiten. Zu beachten ist jedoch, dass sich die TatA-ähnlichen Eigenschaften von TatB ausschließlich in der Abwesenheit von TatA zeigen. Des Weiteren scheinen sich TatB-Homooligomere in der Gegenwart von TatC aufgrund einer TatB-TatC-Interaktion zugunsten der Tat-Komplexe 1 und 2 aufzulösen. Die Aktivität des Tat-Systems kann nur in der Gegenwart von TatA nachgewiesen werden. Dies liefert einen deutlichen Hinweis darauf, dass sowohl die Anwesenheit von TatA als auch von TatB und TatC für die Assemblierung von funktionalen Tat-Komplexen zwingend notwendig ist.

Funktionalitätsanalysen zeigten außerdem, dass die Stöchiometrie der einzelnen Komponenten eine entscheidende Rolle für die Funktionalität des Tat-Systems spielt. So konnte nach der induzierten Überproduktion von TatA und TatB in Gegenwart von TatC die Assemblierung der Tat-Komplexe 1 und 2 beobachtet werden (siehe **Abbildung 29**). Obwohl hierbei mikroskopisch eine Komplementation des Kettenphänotyps beobachtet werden konnte, zeigte sich keine Reduktion der SDS-Sensitivität (siehe **Abbildung 30**). Somit kann nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob erhöhte Konzentrationen von TatA und TatB toleriert werden. Die fehlende SDS-Resistenz könnte einerseits durch eine nicht homogene Aufnahme des Induktors Rhamnose bedingt sein. Andererseits könnte der Tat-abhängige Transport auch durch freie TatA- oder TatB-Protomere gestört sein, sodass zwar Tat-Komplexe assemblieren, jedoch kein Transport stattfinden kann.

Aufgrund der Ähnlichkeiten wird erwartet, dass TatA-Protomere in Abwesenheit von TatB mit TatB-Bindestellen von TatC interagieren, sodass TatAC-Komplexe mit analogen Molekulargewichten assemblieren. Die schwache Interaktion bzw. die starke Detergenz-Sensitivität der Interaktion von TatA mit dem TatBC-Komplex erschwerte schon in früheren Studien den Nachweis von TatAC-Komplexen (Barrett *et al.* 2007; Behrendt *et al.* 2007). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten keine TatAC-Komplexe in Abwesenheit von TatB detektiert werden. Trotzdem weisen Funktionalitätsanalysen von TatAC-Systemen auf eine geringe Funktionalität hin (Ize *et al.* 2002; Blaudeck *et al.* 2005). Auch *in vitro* konnten Interaktionen zwischen TatA und TatC in Abwesenheit von TatB beobachtet werden (Blümmel *et al.* 2015). Damit erscheint die Existenz von funktionalen TatAC-Komplexen als äußerst wahrscheinlich. Jedoch scheinen diese nicht ausreichend stabil zu sein, um mit den momentan angewandten Methoden nachgewiesen zu werden.

Vorherige Studien zeigten außerdem, dass TatC-Protomere zu Homooligomeren assemblierten, die ein Molekulargewicht von etwa 230 - 250 kDa aufwiesen (Orriss *et al.* 2007; Behrendt *et al.* 2007). Die Disassemblierung dieser Homooligomere in harscheren Detergenzien deutete darauf hin, dass diese aus sechs TatC-Protomeren bestehen (Behrendt und Brüser 2014). Solche TatC-Komplexe konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Untersuchungen von TatC-TatC-Interaktionen *in vitro* lieferten jedoch nur in Abwesenheit von TatA und TatB Quervernetzungsaddukte aus sechs TatC-Protomeren (Blümmel *et al.* 2015). In Anwesenheit von TatA und TatB wurden hingegen maximal Quervernetzungsaddukte aus vier TatC-Protomeren detektiert.

Auffällig ist weiterhin, dass korrespondierende Signale zwischen 230 - 250 kDa in An- und in Abwesenheit von TatB bei etwa dem gleichen Molekulargewicht detektiert wurden (Orriss *et al.* 2007). In Anwesenheit von TatB wurden diese jedoch sowohl für TatB als auch für TatC erhalten (Behrendt und Brüser 2014), was darauf hindeutet, dass es sich in Anwesenheit von TatB um TatBC-Komplexe handelt. Diese könnten möglicherweise durch Disassemblierung der Tat-Komplexe 1 und 2 entstehen, während TatC-Komplexe zwar ein ähnliches Molekulargewicht aufweisen, jedoch nur in Abwesenheit von TatA und TatB erhalten wurden. TatBC-Komplexe mit geringerem Molekulargewicht als Tat-Komplex 1 konnten im Rahmen dieser Arbeit für Tat-Systeme mit verringerter Stabilität (wie TatABC_{150Y}) detektiert werden. Die Assemblierung von TatB- und TatC-Oligomeren in Abwesenheit der anderen Tat-Komponenten verdeutlicht jedoch die Bedeutung von TatA/E, TatB und TatC. So weicht das Verhalten der Einzelkomponenten in Abwesenheit der anderen Komponenten teilweise stark vom Verhalten innerhalb funktioneller Tat-Systeme ab. Unklar ist jedoch, ob das Verhalten der einzelnen Komponenten Rückschlüsse auf mechanistische Aspekte des Tat-Transportes zulässt, da stets Zustände untersucht werden, die nicht den natürlichen Bedingungen entsprechen.

Anhand der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass TatA und TatB aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften signifikante Ähnlichkeiten aufweisen. Diese Ähnlichkeiten liefern auch eine Erklärung für die Assemblierung von nicht funktionalen TatBC-Komplexen in Abwesenheit von TatA. Die Notwendigkeit der Anwesenheit von TatA für den funktionellen Tat-Transport wird außerdem durch die Tatsache unterstrichen, dass TatA-ähnliche Eigenschaften von TatB nur in Abwesenheit von TatA beobachtet werden können. Die Funktionalität des Tat-Systems kann nur beobachtet werden, sofern TatA/E, TatB und TatC anwesend sind (Sargent *et al.* 1998; Bogsch *et al.* 1998; Sargent *et al.* 1999). Das verdeutlicht, dass jede der Komponenten im Laufe des Tat-abhängigen Transportes eigene Funktionen erfüllt, die nicht von einer der anderen Komponenten übernommen werden können. Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen TatA und TatB beruhen wahrscheinlich auf einer evolutionären Verwandtschaft der beiden Komponenten.

4.3.4 TatA kann funktionell und strukturell durch TatE ersetzt werden

Die Ähnlichkeiten von TatA und TatB wurden im Rahmen früherer Studien sowohl im Hinblick auf strukturelle als auch auf funktionsgebende Eigenschaften untersucht (Sargent *et al.* 1998; Behrendt *et al.* 2007; Behrendt und Brüser 2014). *E. coli* verfügt außerdem über eine weitere Tat-Komponente, TatE. TatE stellt ein TatA-Paralog dar, welches noch deutlichere Ähnlichkeiten zu TatA ausweist als TatB. In Anwesenheit von TatA ist TatE nicht essenziell für die Funktionalität des Tat-Systems. Die fehlende Funktionalität des Tat-Systems in der Abwesenheit von TatA kann jedoch durch die Produktion von TatE komplementiert werden (Sargent *et al.* 1998). Neben den Einflüssen von TatE auf die Funktionalität des Tat-Systems konnte anhand von *cross-linking*-Experimenten gezeigt werden, dass einige Positionen von TatE sich in ähnlicher Nachbarschaft zu TatB und TatC befinden wie die korrespondierenden Positionen von TatA (Eimer *et al.* 2015). Dies konnte für einige Positionen von TatE auch für die Substrat-Interaktion gezeigt werden. Als Substrat wurde dabei ein Fusionsprotein aus dem Signalpeptid des Tat-Substrates TorA und der maturierten, C-terminalen Domäne des periplasmatischen Maltose-bindenden Proteins MalE verwendet (Eimer *et al.* 2018). Der Einfluss von TatE auf die Assemblierung von TatBC-Komplexen wurde jedoch zuvor nicht untersucht.

Für die Untersuchung des Einflusses von TatE auf die Assemblierung von Tat-Komplexen wurde das für TatABC-Systeme verwendete Expressionssystem modifiziert. Da kein spezifischer Antikörper gegen TatE zur Verfügung stand, wurden die solubilisierten Membranen mittels BN-PAGE/Western-Blot bezüglich der TatBC-Komplexe analysiert. So konnte TatE zwar nicht innerhalb der Tat-Komplexe nachgewiesen werden, jedoch konnten Aussagen über den Einfluss von TatE auf die Assemblierung von TatBC-Komplexen getroffen werden.

Aus dem für die Produktion von TatABC verwendeten pABS-*tatABC_{H6}*-Plasmid wurde hierfür *tatA* entfernt und *tatE* inklusive der dazugehörigen ribosomalen Bindestelle eingefügt. Zur Erhaltung der ribosomalen Bindestelle von *tatB* wurde *tatE* um die letzten neun Basenpaare von *tatA* verlängert. Zur Feststellung der Funktionalität wurde anschließend die SDS-Sensitivität des *tat*-defizienten Stammes bestimmt, welcher TatEBC produziert (**Abbildung 33A**). Die Assemblierung der Tat-Komplexe wurde anhand von BN-PAGE/Western-Blot-Analysen der solubilisierten Membranen des entsprechenden Stammes untersucht (**Abbildung 33B**).

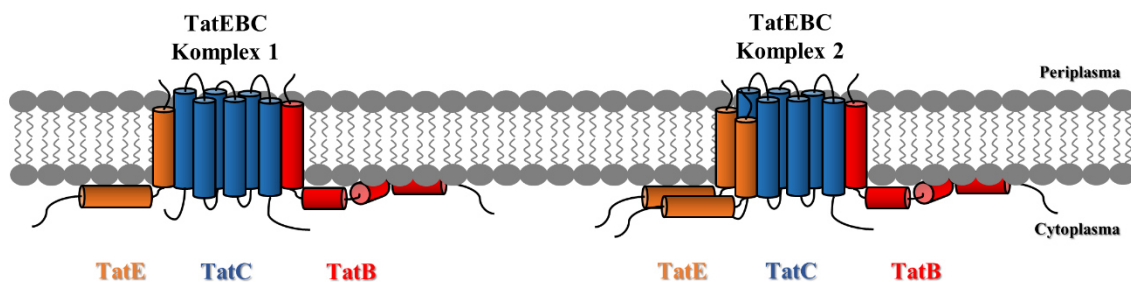


Abbildung 61: In Abwesenheit von TatA kann TatE dieses funktionell und strukturell ersetzen. Schematische Darstellung der TatEBC-Komplexe 1 und 2.

Bei dem Vergleich von TatEBC- und TatABC-Systemen konnte für TatEBC-Systeme auch in Abwesenheit von TatA keine SDS-Sensitivität beobachtet werden. So konnte mit dem verwendeten System zur Produktion von TatEBC eine vollständige Komplementation des Fehlens von TatA durch TatE erreicht werden (siehe **Abbildung 33A**). Außerdem konnten die Tat-Komplexe 1 und 2 mithilfe spezifischer Antikörper gegen TatB und TatC detektiert werden (siehe **Abbildung 33B**). Das zeigt, dass TatA nicht nur funktionell, sondern auch strukturell durch TatE ersetzt werden kann und die Assemblierung der Tat-Komplexe nicht durch das Ersetzen von TatA durch TatE beeinträchtigt wurde. Die TatEBC-Komplexe 1 und 2 sind in **Abbildung 61** schematisch dargestellt und basieren auf den bisherigen Kenntnissen über TatABC-Komplexe.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die für TatABC-Systeme beobachteten Komplexe auch in der Abwesenheit von TatA erhalten werden können. Es ist davon auszugehen, dass das ähnliche Migrationsverhalten bei der nativen Gelelektrophorese durch strukturelle Ähnlichkeiten zwischen TatA, TatB und TatE bedingt ist. Diese strukturellen Ähnlichkeiten führen dazu, dass die Assoziation von TatA, TatB und TatE an das Tat-Translokon auf vergleichbaren Interaktionen beruht. Die Assemblierung von Tat-Komplexen geht jedoch nicht immer auch mit der Funktionalität des Tat-Systems einher. So kann beispielsweise das Fehlen von TatA oder TatE strukturell durch TatB ausgeglichen werden, sodass Tat-Komplexe des zu erwartenden Molekulargewichts assemblieren. Jedoch sind diese TatBC-Komplexe nicht in der Lage, Tat-Substrate über die Cytoplasmamembran in das Periplasma zu transportieren.

Das bedeutet, dass die detektierbaren Tat-Komplexe nicht immer zwangsläufig im Zusammenhang mit der Funktionalität des Tat-Systems stehen. So ist es durchaus denkbar, dass im Laufe des Tat-abhängigen Proteintransportes weitere, bisher unbekannte Komplexe eine entscheidende Rolle spielen. Diese konnten jedoch mithilfe der etablierten Methoden noch nicht untersucht werden. Dies könnte beispielsweise durch deren kurze Lebensdauer oder sehr schwache bzw. nicht Detergens-resistente Interaktionen zu begründen sein. Für die Existenz weiterer Tat-Komplexe spricht ebenfalls, dass für Tat-Systeme Funktionalität beobachtet werden konnte, für die keinerlei Tat-Komplexe detektiert werden konnten (Barrett *et al.* 2007). Dementsprechend sollte berücksichtigt werden, dass es sich hierbei um einen Versuch handelt, den Mechanismus des Tat-Systems anhand der verfügbaren experimentellen Daten zu entschlüsseln. Die Charakterisierung eines jeden, zuvor nicht beobachteten Tat-Komplexes kann dabei helfen, ein detaillierteres Modell des Tat-abhängigen Proteintransportes zu entwickeln.

Anhand der beschriebenen Ergebnisse lässt sich der Mechanismus des Tat-Transportes erweitern. Bisher wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den Tat-Komplexen 1 und 1S um TatBC-Komplexe und bei den Tat-Komplexen 2 und 2S um TatABC-Komplexe handelt (siehe **Abbildung 54**). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich auch bei Tat-Komplex 1 um einen TatABC-Komplex handelt. Die Assemblierung der TatBC-Komplexe 2, 2S und 3 durch die Überproduktion von TatB lässt darauf schließen, dass die Assemblierung der TatABC-Komplexe 2, 2S und 3 unter natürlichen Umständen aus der verstärkten Assoziation von TatA-Protomeren resultiert. Die Tat-Komplexe 2S und 3 werden von TatC_{150Bpa} stabilisiert. Tat-Komplex 3 liegt im Gegensatz zu Tat-Komplex 2S nicht Substrat-assoziiert vor. Jedoch wird eine erhöhte TatA-Konzentration für die Assemblierung von Tat-Komplex 3 benötigt. Es bleibt ungeklärt, ob die Assoziation von TatA-Protomeren mit der Dissoziation des Substrates verknüpft ist und damit den Transport repräsentiert (siehe **Abbildung 62**).

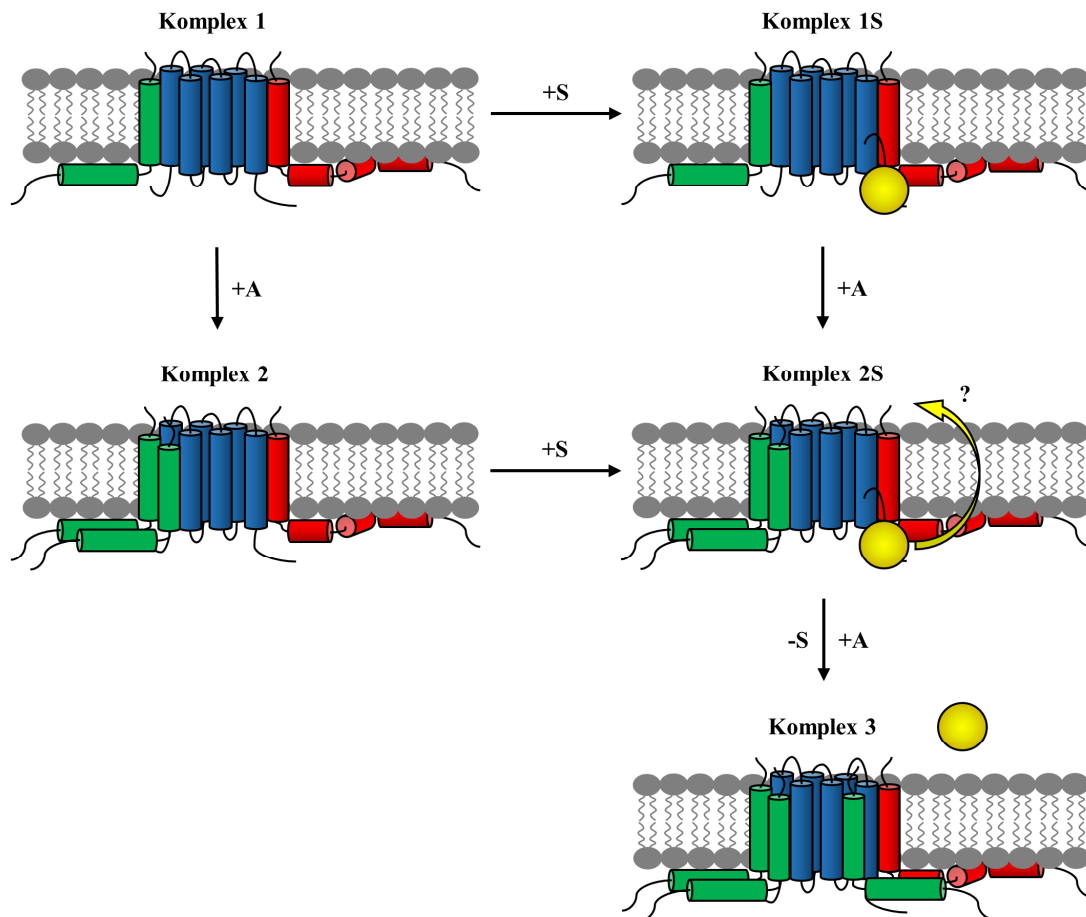


Abbildung 62: Vorgeschlagener Mechanismus des Tat-abhängigen Proteintransportes in *E. coli*. TatA (grün) ist Bestandteil aller bekannten Tat-Komplexe. Die genaue Anzahl der Protomere innerhalb der Komplexe ist unbekannt. „+A“ deutet auf die TatA-Assoziation und „+S“ auf die Substrat-Assoziation an den TatBC-Komplex hin. „-S“ deutet auf die Substrat-Dissoziation und „?“ auf den unbekannten Zusammenhang zwischen Transport und Substrat-Dissoziation hin. TatB wurde rot, TatC blau und das Substrat gelb eingefärbt.

4.4 Anreicherung von Tat-Komplexen

Bereits in vorherigen Studien konnten Tat-Komplexe unter nicht-denaturierenden Bedingungen gereinigt werden. In der Regel wurden die Tat-Komplexe hierbei mittels Größenausschlusschromatographie oder Affinitätschromatographie anhand von TatC-Fusionsproteinen gereinigt. Grundlegende Unterschiede zwischen den durchgeführten Studien zeigen sich vor allem in der Analyse der Tat-Komplexe nach der Reinigung. Eine gut etablierte Methode ist die Analyse der Elutionsfraktionen bezüglich der Einzelkomponenten mittels SDS-PAGE/Western-Blot. Hierbei wird das Molekulargewicht der Tat-Komplexe anhand einer vorher durchgeführten Kalibration mit Proteinen bekannter Größen bestimmt. Proteine mit identischem Molekulargewicht eluieren nach der Größenausschlusschromatographie bei identischem Retentionsvolumen. Die Elution der Proteinkomplexe wird anhand eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgezeichnet. Anschließend werden die Komponenten der eluierten Proteinkomplexe unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und können nach Western-Blot und Immunodetektion bestimmt werden. So lassen sich genaue Aussagen darüber treffen, aus welchen Komponenten die eluierten Komplexe bestehen (Leeuw *et al.* 2001; Bolhuis *et al.* 2001; Barrett *et al.* 2005; McDevitt *et al.* 2006).

Eine weitere Möglichkeit stellt die Analyse der eluierten Proteinkomplexe mittels BN-PAGE/Western-Blot dar. Hierbei kann das Molekulargewicht der Proteinkomplexe nicht nur anhand des Retentionsvolumens bei der Größenausschlusschromatographie, sondern auch anhand des Migrationsverhaltens bei der nativen Gelelektrophorese bestimmt werden. So ist in der Regel eine genauere Bestimmung des Molekulargewichts möglich, während das Molekulargewicht nach der Größenausschlusschromatographie nur auf einen Bereich eingeschränkt werden kann. Sofern die Tat-Komplexe nach der Reinigung mittels BN-PAGE/Western-Blot analysiert wurden, ließ sich bisher nur Tat-Komplex 1 erhalten. Außerdem wurden TatBC-Komplexe aus Stämmen gereinigt, die kein TatA produzierten (Orriss *et al.* 2007; Wojnowska *et al.* 2018). Eine Reinigung des Tat-Komplexes 2 konnte bisher noch nicht durchgeführt werden.

Für Tat-Komplex 3 von TatABC_{150Bpa}-Systemen konnten mittels BN-PAGE/Western-Blot sehr starke Signale erhalten werden. Außerdem konnten bei der Analyse von TatABC_{150Bpa}-Systemen keine kleineren Tat-Komplexe als Tat-Komplex 2S detektiert werden. Auch das Auftreten kleinerer Disassemblierungsprodukte konnte nicht beobachtet werden, was auf eine effiziente Stabilisierung später Intermediate der Tat-Translokase schließen ließ. Aus diesem Grund sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Strategie zur Reinigung von Tat-

Komplex 3 etabliert werden. Im Falle des Erfolgs sollte diese Strategie auch für die Reinigung der anderen bereits bekannten Tat-Komplexe verwendet werden. Die dabei gemachten Beobachtungen sollen im Folgenden in Bezug auf die Stabilität und die Art der erhaltenen Tat-Komplexe diskutiert werden.

4.4.1 Für die Reinigung sind stabilisierende Maßnahmen notwendig

Im Rahmen der Etablierung von Strategien zur Reinigung von Tat-Komplexen wurden sowohl unterschiedliche Methoden als auch unterschiedliche Bedingungen getestet. Dabei konnten in Bezug auf einige Parameter besonders gravierende Einflüsse auf die Menge und die Art der erhaltenen Tat-Komplexe festgestellt werden. Im Folgenden sollen die Einflüsse der Skalierung, der gewählten Reinigungsmethode sowie der stabilisierenden Agenzien diskutiert werden.

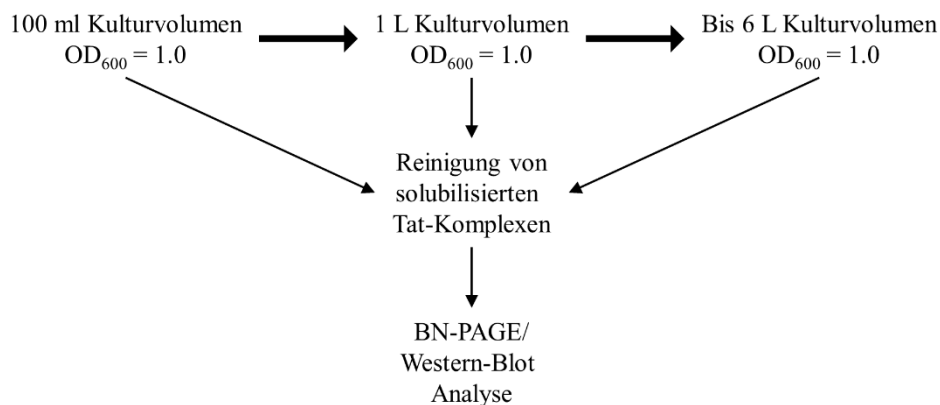
Der Hintergrund für die Reinigung von Tat-Komplexen war vor allem das Ziel, weiterführende Analysen durchzuführen, die nur mit gereinigten Proteinen durchgeführt werden können. Beispielsweise sollten die Tat-Komplexe für strukturbiochemische Studien mittels Kryo-EM (Hauer *et al.* 2015) gereinigt werden. Außerdem können native massenspektrometrische Methoden verwendet werden, um zu ermitteln, wie viele Protomere der einzelnen Komponenten Bestandteil bestimmter Proteinkomplexe sind (Peetz *et al.* 2019).

4.4.1.1 Verdünnungseffekte können zur Disassemblierung der Tat-Komplexe führen

Für die Analyse von Tat-Komplexen mittels BN-PAGE/Western-Blot wurden Membranproteine aus Membranen von 100-ml-Kulturen ($OD_{600} = 1,0$) verwendet. Da auch geringe Proteinmengen mithilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden können, wurden die BN-PAGE/Western-Blot-Analysen für diesen Maßstab optimiert. Für strukturbiochemische Analysen von Proteinkomplexen sind jedoch in der Regel größere Proteinmengen nötig. Beispielsweise werden für *single-particle*-Analysen mittels Kryo-Elektronenmikroskopie genügend Partikel für eine statistische Auswertung benötigt. Hierfür reicht die erhaltene Menge an Proteinkomplexen aus 100 ml Kulturvolumen nicht aus. Dies bedeutet, dass größere Kulturvolumina für die Reinigung der Tat-Komplexe verwendet werden mussten. Für den Test neuer Methoden und Bedingungen wurden zunächst Tat-Komplexe aus 100 ml Kulturvolumen gereinigt. Im Falle der erfolgreichen Reinigung wurde das Kulturvolumen anschließend schrittweise erhöht (siehe **Schema 3**). Folglich mussten auch die folgenden Schritte wie der Zellaufschluss,

die Präparation der Membranen sowie die Solubilisierung der Membranproteine in größeren Volumina durchgeführt werden.

Durch die Reinigung von TatABC_{H6}-Komplexen mittels Ni-NTA-Agarose und Ni-NTA-*magnetic beads* aus einem Kulturvolumen von 100 ml konnten die Tat-Komplexe 1 und 2 ohne nennenswerte Disassemblierungsprodukte angereichert werden (siehe **Abbildung 35** und **Abbildung 36**). Es fiel jedoch auf, dass nach der Verwendung eines Kulturvolumens von 1 l und der Durchführung der folgenden Schritte in entsprechend angepassten Volumina deutlich mehr Disassemblierungsprodukte erhalten wurden (siehe **Abbildung 37**). Die Disassemblierung von Tat-Komplexen, vor allem bei der Verwendung von angepassten, größeren Volumina während der Ultrazentrifugation und der Solubilisierung der Membranproteine, lässt sich eventuell durch Verdünnungseffekte erklären, die zur Destabilisierung einiger Tat-Komplexe führten.



Schema 3: Vorgehensweise für die Etablierung von Strategien zur Reinigung von Tat-Komplexen.

Im weiteren Verlauf wurden die verwendeten Volumina kritischer Schritte daher angepasst und gegebenenfalls in mehreren Ansätzen mit verringertem Volumen durchgeführt. Für die Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie wurde auf eine vorherige Verringerung der Volumina verzichtet, da Disassemblierungsprodukte anhand des differierenden Molekulargewichtes von den gewünschten Tat-Komplexen separiert werden konnten. So konnten keine Disassemblierungsprodukte beobachtet werden, sofern die Reinigungsstrategie eine Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie beinhaltete (siehe **Abbildung 40** und **Abbildung 42**).

Die affinitätschromatographische Reinigung von Tat-Komplexen wurde anhand der Reinigung von Fusionsproteinen, die einen C-terminalen *Tag* trugen, durchgeführt. Dieser bindet an die stationäre Phase. Proteine, die mit diesen Fusionsproteinen interagieren und somit Protein-komplexe bilden, werden aufgrund der Interaktion ebenfalls angereichert (koeluiert). Jedoch beinhalten auch Disassemblierungsprodukte der Tat-Komplexe diese Fusionsproteine. Aufgrund des *Tags* binden diese ebenfalls an die stationäre Phase und können somit nicht von den gewünschten Tat-Komplexen separiert werden. Aus diesem Grund wurde im Falle der Reinigung von Tat-Komplexen anhand einzelner oder mehrerer aufeinanderfolgender affinitätschromatographischer Reinigungen vor allem die Solubilisierung in mehreren, kleineren Ansätzen durchgeführt, um die Disassemblierung von Tat-Komplexen durch Verdünnungseffekte zu vermeiden.

4.4.1.2 Fusionsproteine können die Stabilität der Tat-Komplexe beeinflussen

Die verwendeten Volumina mussten nicht nur dem Kulturvolumen, sondern auch der angewandten Reinigungsmethode angepasst werden. Anhand der Disassemblierung der Tat-Komplexe zeigte sich dabei ein deutlicher Vorteil der Größenausschlusschromatographie, bei der Disassemblierungsprodukte mit geringerem Molekulargewicht von den gewünschten Tat-Komplexen separiert werden konnten. Jedoch zeigte sich auch, dass bei der größenausschlusschromatographischen Reinigung enorme Verluste zu verzeichnen waren. Bedingt durch das Volumen der Elutionsfraktionen und das Migrationsverhalten der Tat-Komplexe waren die Protein-Konzentrationen in den erhaltenen Elutionsfraktionen sehr gering, sodass die Tat-Komplexe final mithilfe von Ni-NTA-*magnetic beads* konzentriert werden mussten. Um vergleichbare Mengen der Tat-Komplexe zu erhalten wie nach einer affinitätschromatographischen Reinigung aus einem Liter Kulturvolumen mussten mindestens drei Liter Kulturvolumen für die Reinigung verwendet werden (Vergleiche **Abbildung 37**, **Abbildung 40** und **Abbildung 42**).

Aus diesem Grund sollte nachfolgend eine Strategie entwickelt werden, die auf der affinitätschromatographischen Reinigung basiert, sodass auf die Größenausschlusschromatographie verzichtet werden konnte. Hierbei zeigte sich jedoch das Problem, dass gerade solubilierte Membranproteine aufgrund ihrer hydrophoben Bereiche oft unspezifisch miteinander oder mit der stationären Phase interagieren (siehe **Abbildung 37**). Eine effiziente Entfernung von unerwünschten Membranproteinen konnte aus diesem Grund nur durch die Kombination zweier unterschiedlicher affinitätschromatographischer Reinigungen erreicht werden. Hierfür

wurde die bereits durchgeführte Reinigung mittels Ni-NTA-Agarose oder Ni-NTA-*magnetic beads* mit einer Reinigung mittels *Strep-Tactin*[®]-*magnetic beads* kombiniert. Sowohl die Produktion von TatB als TatB_{Strep}- als auch die Produktion von TatC als TatC_{Strep-H6}-Fusionsprotein zeigte jedoch, dass die *Tags* erheblichen Einfluss auf die erhaltenen Tat-Komplexe hatten. Einzig für TatAB_{Strep}C_{H6}-Systeme konnten Komplexe erhalten werden, welche mit den Wildtyp-TatABC-Komplexen übereinstimmten (siehe **Abbildung 46**).

Bei der Reinigung von TatAB_{Strep}C_{H6}-Komplexen zeigten sich einige Probleme. Es wurde sowohl versucht die Komplexe zunächst über das TatB_{Strep}- als auch über das TatC_{H6}-Fusionsprotein zu reinigen. Anschließend wurde der jeweils andere *Tag* für den zweiten Reinigungsschritt verwendet. Dabei wurden große Mengen freier TatB_{Strep}-Protomere gereinigt, sofern im ersten Schritt eine Reinigung mittel *Strep-Tactin*[®]-*magnetic beads* durchgeführt wurde (siehe **Abbildung 44**). Einen möglichen Grund hierfür liefert das Verhältnis der Tat-Komponenten. TatB und TatC liegen in der Zelle in einem Verhältnis von 2:1 vor. Die Stöchiometrie der Tat-Komplexe ist nicht endgültig geklärt. Experimentelle Daten weisen jedoch darauf hin, dass TatB und TatC innerhalb der Tat-Komplexe im Verhältnis 1:1 vorliegen (Bolhuis *et al.* 2001). In der Konsequenz würde die gleiche Anzahl an TatB-Protomeren, die in Assoziation mit TatC vorliegt auch frei vorliegen. Dies würde die Reinigung großer Mengen freier TatB-Protomere erklären. Weiterhin ist unklar, ob TatB_{Strep}-Fusionsproteine ähnlich effizient mit TatC zu TatBC-Komplexen assemblieren wie TatB-Protomere ohne *Tag*.

Wurden die Reinigungen in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt, wurde der Großteil der Tat-Komplexe im Durchlauf der zweiten Reinigung detektiert (siehe **Abbildung 45**). Dies könnte darauf hinweisen, dass der *Strep-Tag II*[®] des TatB_{Strep}-Fusionsproteins möglicherweise nicht exponiert vorliegt, sofern TatB_{Strep} in Assoziation mit dem Tat-Komplex vorliegt. Die Folge wäre eine erschwerte Bindung an die stationäre Phase, wodurch nicht gebundene Tat-Komplexe in der Durchlauf-Fraktion detektiert werden.

4.4.1.3 Saccharose beeinflusst die Stabilität der Tat-Komplexe positiv

Für die Reinigung von Tat-Komplexen wurde das Puffersystem verwendet, welches auch für die Analyse von Tat-Komplexen mittels BN-PAGE/Western-Blot verwendet wurde [50 mM Bis-Tris HCl (pH 7,0), 20 % (w/v) Saccharose, 10 mM MgCl₂]. Für die Solubilisierung von Membranproteinen wurde diesem Puffer 1 % (w/v) Digitonin zugegeben. Im Laufe der Reinigung wurde die Digitonin-Konzentration schrittweise auf 0.1 % (w/v) verringert. Bei der Reinigung mittels Ni-NTA-Agarose oder Ni-NTA-*magnetic beads* wurde zur Elution der Tat-

Komplexe der identische Puffer mit 250 mM Imidazol verwendet. Analog wurde dem Elutionspuffer bei der Reinigung mittels *Strep-Tactin*[®]-magnetic beads 50 mM Biotin zugegeben.

Bei der Kryo-Elektronenmikroskopie wird keine Färbung des Analyten durchgeführt, um den Kontrast zu erhöhen. Aus diesem Grund stellt Saccharose für die Kryo-Elektronenmikroskopie ein Problem dar, da es zur Verringerung des Kontrastes führt. Außerdem erhöht Saccharose die Viskosität der Puffer, sodass bei Reinigungen mittels FPLC nur geringe Flussraten möglich sind. Aus diesem Grund wurde untersucht, inwiefern Saccharose die Stabilität der Tat-Komplexe beeinflusst. Hierfür wurde die zuvor etablierte Reinigung mittels Ni-NTA-Agarose unter Verwendung von 20, 10 und 0 % (w/v) Saccharose durchgeführt. Auffällig war hierbei, dass mit steigender Saccharose-Konzentration Tat-Komplex 2 in größeren Mengen erhalten werden konnte, während dieser bei 0 % (w/v) Saccharose nicht detektiert werden konnte. Tat-Komplex 1 hingegen konnte bei allen Saccharose-Konzentrationen in ähnlichen Mengen erhalten werden. Außerdem zeigte sich, dass mit sinkender Saccharose-Konzentration immer größere Mengen kleinerer Tat-Komplexe detektiert wurden, bei denen es sich wahrscheinlich um Disassemblierungsprodukte der Tat-Translokase handelte (siehe **Abbildung 47**, **Abbildung 48** und **Abbildung 49**). Aufgrund der gewählten Reinigungsmethode kann jedoch nicht genau gesagt werden, ob die Tat-Komplexe bereits bei der Solubilisierung oder erst im Laufe der Reinigung disassemblierten, da auch kleinere Tat-Komplexe an das verwendete Säulenmaterial binden können. Der Vergleich mit vorherigen Studien unter Berücksichtigung der vorliegenden Beobachtungen verdeutlicht, warum die verwendeten Reinigungsstrategien nur Tat-Komplex 1 liefern konnten. Für die Präparation der Membranen, die Solubilisierung der Membranproteine und die Reinigung wurden Puffersysteme ohne den Zusatz von stabilisierenden Agenzien wie Saccharose verwendet. Nach der anschließenden Analyse der Elutionsfraktionen mittels BN-PAGE/Western-Blot konnte nur Tat-Komplex 1 detektiert werden (Barrett *et al.* 2005; Oates *et al.* 2005; Orriss *et al.* 2007; Wojnowska *et al.* 2018). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Komponenten Einfluss auf die erhaltenen Komplexe haben, da ebenfalls verschiedene Puffersysteme verwendet wurden.

Für die Größenausschlusschromatographischen Reinigungen lässt sich nur schwer eine konkrete Aussage bezüglich der Molekulargewichte der erhaltenen Tat-Komplexe treffen. Anhand der für die Kalibration verwendeten Proteine wurden Komplexe mit Molekulargewichten zwischen 400 und 550 kDa (McDevitt *et al.* 2006) und 600 kDa (Bolhuis *et al.* 2001; Sargent *et al.* 2001; Barrett *et al.* 2005; Oates *et al.* 2005) identifiziert. Vergleiche der ermittelten Molekulargewichte anhand von BN-PAGE/Western-Blot und Größenausschlusschromatographie zeigten jedoch auch, dass die ermittelten Molekulargewichte sich teilweise deutlich unterschieden (Barrett *et al.* 2005; Oates *et al.* 2005). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass sich die Molekulargewichte anhand ihres Retentionsvolumens bei der Größenausschlusschromatographie nur schwer differenzieren lassen. So konnten sowohl die Tat-Komplexe 2S und 3 (siehe **Abbildung 39** und **Abbildung 40**) als auch die Tat-Komplexe 1 und 2 (siehe **Abbildung 41** und **Abbildung 42**) nicht anhand ihres Retentionsvolumens, sondern nur anhand ihres Migrationsverhaltens nach BN-PAGE differenziert werden. Da jedoch auch das Migrationsverhalten der Tat-Komplexe bei der BN-PAGE bspw. in Abhängigkeit der Gel-Konzentrationen, des Detergens oder der Größenstandards variiert, wurden die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tat-Komplexe immer mithilfe der Tat-Komplexe 1 und 2 des Wildtyp-Tat-System und 2S und 3 des TatABC_{I50Bpa}-Systems identifiziert.

Der Verzicht auf Saccharose scheint einen ähnlichen destabilisierenden Effekt auf die Tat-Komplexe (vor allem auf Tat-Komplex 2) zu haben wie die Durchführung destabilisierender Aminosäureaustausche, sodass in der Folge kleinere Disassemblierungsprodukte der Tat-Komplexe erhalten werden (Allen *et al.* 2002; Orriss *et al.* 2007; Behrendt und Brüser 2014). Ein möglicher Grund, dass diese kleineren Tat-Komplexe bei der Verwendung von 20 % (w/v) Saccharose nur in sehr geringen Mengen detektiert werden, stellt der stabilisierende Effekt dar, den Saccharose auf Makromoleküle wie Proteine ausübt. Diese liegen bevorzugt durch die Interaktion mit Wassermolekülen hydratisiert vor. Die Faltung von Proteinen beruht auf intramolekularen Wechselwirkungen und geht mit einer Minimierung der Oberfläche und folglich der freien Energie einher, da weniger Wassermoleküle für die Hydratisierung benötigt werden. Saccharose liegt in Lösung ebenfalls hydratisiert vor. Die geringere Verfügbarkeit von Wassermolekülen führt zu einer Erhöhung der freien Energie. Dieser Effekt steigt mit der Oberfläche eines Makromoleküls (Timasheff *et al.* 1976). Da ungefaltete Proteine eine größere Oberfläche als gefaltete Proteine oder Proteinkomplexe aufweisen wird die ungefaltete Form in Anwesenheit von Saccharose energetisch noch ungünstiger (Gekko und Timasheff 1981; Lee und Timasheff 1981; Timasheff 1993). Auf diese Art und Weise werden native Proteine und Proteinkomplexe stabilisiert.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Strategien zur Reinigung von TatABC-Komplexen etabliert werden. Mithilfe der Affinitätschromatographie können im Vergleich zur Größenausschlusschromatographie große Mengen gereinigter Tat-Komplexe aus vergleichsweise wenig Kulturvolumen erhalten werden. Aufgrund der Verwendung von *Tags* können hierbei die größeren Tat-Komplexe nicht von kleineren Disassemblierungsprodukten separiert werden. Bei der Größenausschlusschromatographie können diese aufgrund des geringeren Molekulargewichtes entfernt werden. Die Ausbeute ist bei der Größenausschlusschromatographie jedoch deutlich geringer, weshalb mehr Kulturvolumen verwendet werden muss, damit vergleichbare Mengen gereinigter Tat-Komplexe erhalten werden. Während Tat-Komplex 1 gegebenenfalls in Abwesenheit von Saccharose für strukturelle Studien gereinigt werden kann, scheint die Zugabe von Saccharose für die Reinigung von Tat-Komplex 2 zwingend notwendig zu sein. Für die Reinigung von Tat-Komplex 2 in Abwesenheit von Saccharose müssten daher weitere Methoden zur Stabilisierung etabliert werden.

5 LITERATURVERZEICHNIS

Alami, M.; Lüke, I.; Deitermann, S.; Eisner, G.; Koch, H.-G.; Brunner, J.; Müller, M. (2003): Differential Interactions between a Twin-Arginine Signal Peptide and Its Translocase in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* 12 (4), S. 937 - 946. DOI: 10.1016/S1097-2765(03)00398-8.

Alcock, F.; Baker, M. A. B.; Greene, N. P.; Palmer, T.; Wallace, M. I.; Berks, B. C. (2013): Live cell imaging shows reversible assembly of the TatA component of the twin-arginine protein transport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (38), E3650-9. DOI: 10.1073/pnas.1306738110.

Alcock, F.; Stansfeld, P. J.; Basit, H.; Habersetzer, J.; Baker, M. A.; Palmer, T.; Wallace, M. I.; Berks, B. C. (2016): Assembling the Tat protein translocase. *Elife* 5. DOI: 10.7554/eLife.20718.

Aldridge, C.; Ma, X.; Gerard, F.; Cline, K. (2014): Substrate-gated docking of pore subunit Tha4 in the TatC cavity initiates Tat translocase assembly. *J. Cell. Biol.* 205 (1), S. 51 - 65. DOI: 10.1083/jcb.201311057.

Allen, S. C. H.; Barrett, C. M. L.; Ray, N.; Robinson, C. (2002): Essential cytoplasmic domains in the *Escherichia coli* TatC protein. *J. Biol. Chem.* 277 (12), S. 10362 - 10366. DOI: 10.1074/jbc.M109135200.

Baglieri, J.; Beck, D.; Vasisht, N.; Smith, C. J.; Robinson, C. (2012): Structure of TatA paralog, TatE, suggests a structurally homogeneous form of Tat protein translocase that transports folded proteins of differing diameter. *J. Biol. Chem.* 287 (10), S. 7335 - 7344. DOI: 10.1074/jbc.M111.326355.

Barlow, D. J.; Thornton, J. M. (1988): Helix geometry in proteins. *J. Mol. Biol.* 201 (3), S. 601 - 619. DOI: 10.1016/0022-2836(88)90641-9.

Barrett, C. M. L.; Freudl, R.; Robinson, C. (2007): Twin arginine translocation (Tat)-dependent export in the apparent absence of TatABC or TatA complexes using modified *Escherichia coli* TatA subunits that substitute for TatB. *J. Biol. Chem.* 282 (50), S. 36206 - 36213. DOI: 10.1074/jbc.M704127200.

Barrett, C. M. L.; Mangels, D.; Robinson, C. (2005): Mutations in subunits of the *Escherichia coli* twin-arginine translocase block function via differing effects on translocation activity or tat complex structure. *J. Mol. Biol.* 347 (2), S. 453 - 463. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.01.026.

- Beck, K.; Eisner, G.; Trescher, D.; Dalbey, R. E.; Brunner, J.; Müller, M. (2001): YidC, an assembly site for polytopic *Escherichia coli* membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. *EMBO Rep.* 2 (8), S. 709 - 714. DOI: 10.1093/embo-reports/kve154.
- Beck, K.; Wu, L. F.; Brunner, J.; Müller, M. (2000): Discrimination between SRP- and SecA/SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor. *EMBO J.* 19 (1), S. 134 - 143. DOI: 10.1093/emboj/19.1.134.
- Behrendt, J.; Brüser, T. (2014): The TatBC complex of the Tat protein translocase in *Escherichia coli* and its transition to the substrate-bound TatABC complex. *Biochemistry* 53 (14), S. 2344 - 2354. DOI: 10.1021/bi500169s.
- Behrendt, J.; Lindenstrauss, U.; Brüser, T. (2007): The TatBC complex formation suppresses a modular TatB-multimerization in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 581 (21), S. 4085 - 4090. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.07.045.
- Berks, B. C. (1996): A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol. Microbiol.* 22 (3), S. 393 - 404. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1996.00114.x.
- Bernhardt, T. G.; Boer, P. A. J. de (2003): The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol. Microbiol.* 48 (5), S. 1171 - 1182. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03511.x.
- Berthelmann, F.; Brüser, T. (2004): Localization of the Tat translocon components in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 569 (1-3), S. 82 - 88. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.05.054.
- Blaudeck, N.; Kreutzenbeck, P.; Freudl, R.; Sprenger, G. A. (2003): Genetic analysis of pathway specificity during posttranslational protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *J. Bacteriol.* 185 (9), S. 2811 - 2819. DOI: 10.1128/jb.185.9.2811-2819.2003.
- Blaudeck, N.; Kreutzenbeck, P.; Müller, M.; Sprenger, G. A.; Freudl, R. (2005): Isolation and characterization of bifunctional *Escherichia coli* TatA mutant proteins that allow efficient tat-dependent protein translocation in the absence of TatB. *J. Biol. Chem.* 280 (5), S. 3426 - 3432. DOI: 10.1074/jbc.M411210200.

- Blümmel, A.-S.; Drepper, F.; Knapp, B.; Eimer, E.; Warscheid, B.; Müller, M.; Fröbel, J. (2017): Structural features of the TatC membrane protein that determine docking and insertion of a twin-arginine signal peptide. *J. Biol. Chem.* 292 (52), S. 21320 - 21329. DOI: 10.1074/jbc.M117.812560.
- Blümmel, A.-S.; Haag, L. A.; Eimer, E.; Müller, M.; Fröbel, J. (2015): Initial assembly steps of a translocase for folded proteins. *Nat. Commun.* 6, S. 7234. DOI: 10.1038/ncomms8234.
- Bogsch, E.; Brink, S.; Robinson, C. (1997): Pathway specificity for a Δ pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein. *EMBO J.* 16 (13), S. 3851 - 3859. DOI: 10.1093/emboj/16.13.3851.
- Bogsch, E. G.; Sargent, F.; Stanley, N. R.; Berks, B. C.; Robinson, C.; Palmer, T. (1998): An Essential Component of a Novel Bacterial Protein Export System with Homologues in Plastids and Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273 (29), S. 18003 - 18006. DOI: 10.1074/jbc.273.29.18003.
- Bolhuis, A.; Mathers, J. E.; Thomas, J. D.; Barrett, C. M.; Robinson, C. (2001): TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276 (23), S. 20213 - 20219. DOI: 10.1074/jbc.M100682200.
- Breyton, C.; Haase, W.; Rapoport, T. A.; Kühlbrandt, W.; Collinson, I. (2002): Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* 418 (6898), S. 662 - 665. DOI: 10.1038/nature00827.
- Brüser, T. (2007): The twin-arginine translocation system and its capability for protein secretion in biotechnological protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76 (1), S. 35 - 45. DOI: 10.1007/s00253-007-0991-z.
- Brüser, T.; Sanders, C. (2003): An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiol. Res.* 158 (1), S. 7 - 17. DOI: 10.1078/0944-5013-00176.
- Buchanan, G.; Leeuw, E. de; Stanley, N. R.; Wexler, M.; Berks, B. C.; Sargent, F.; Palmer, T. (2002): Functional complexity of the twin-arginine translocase TatC component revealed by site-directed mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 43 (6), S. 1457 - 1470. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02853.x.
- Celedon, J. M.; Cline, K. (2012): Stoichiometry for binding and transport by the twin arginine translocation system. *J. Cell. Biol.* 197 (4), S. 523 - 534. DOI: 10.1083/jcb.201201096.

- Chaddock, A. M.; Mant, A.; Karnauchov, I.; Brink, S.; Herrmann, R. G.; Klösgen, R. B.; Robinson, C. (1995): A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the Δ pH-dependent thylakoidal protein translocase. *EMBO J.* 14 (12), S. 2715 - 2722.
- Chou, M. M.; Kendall, D. A. (1990): Polymeric sequences reveal a functional interrelationship between hydrophobicity and length of signal peptides. *J. Biol. Chem.* 265 (5), S. 2873 - 2880.
- Chou, P. Y.; Fasman, G. d. (1974): Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13 (2), S. 222 - 245. DOI: 10.1021/bi00699a002.
- Chun, S. Y.; Randall, L. L. (1994): *In vivo* studies of the role of SecA during protein export in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176 (14), S. 4197 - 4203. DOI: 10.1128/jb.176.14.4197-4203.1994.
- Cléon, F.; Habersetzer, J.; Alcock, F.; Kneuper, H.; Stansfeld, P. J.; Basit, H.; Wallace, M. I.; Berks, B. C.; Palmer, T. (2015): The TatC component of the twin-arginine protein translocase functions as an obligate oligomer. *Mol. Microbiol.* 98 (1), S. 111 - 129. DOI: 10.1111/mmi.13106.
- Cline, K. (2015): Mechanistic Aspects of Folded Protein Transport by the Twin Arginine Translocase (Tat). *J. Biol. Chem.* 290 (27), S. 16530 - 16538. DOI: 10.1074/jbc.R114.626820.
- Cline, K.; Ettinger, W. F.; Theg, S. M. (1992): Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two luminal proteins are transported in the absence of ATP. *J. Biol. Chem.* 267 (4), S. 2688 - 2696.
- Cline, K.; Mori, H. (2001): Thylakoid Δ pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J. Cell. Biol.* 154 (4), S. 719 - 729. DOI: 10.1083/jcb.200105149.
- Corey, R. A.; Ahdash, Z.; Shah, A.; Pyle, E.; Allen, W. J.; Fessl, T.; Lovett, J. E.; Politis, A.; Collinson, I. (2019): ATP-induced asymmetric pre-protein folding as a driver of protein translocation through the Sec machinery. *Elife* 8. DOI: 10.7554/eLife.41803.
- Cristóbal, S.; Gier, J. W. de; Nielsen, H.; Heijne, G. von (1999): Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 18 (11), S. 2982 - 2990. DOI: 10.1093/emboj/18.11.2982.

- Dabney-Smith, C.; Cline, K. (2009): Clustering of C-terminal stromal domains of Tha4 homooligomers during translocation by the Tat protein transport system. *Mol. Biol. Cell* 20 (7), S. 2060 - 2069. DOI: 10.1091/mbc.e08-12-1189.
- Dabney-Smith, C.; Mori, H.; Cline, K. (2006): Oligomers of Tha4 organize at the thylakoid Tat translocase during protein transport. *J. Biol. Chem.* 281 (9), S. 5476 - 5483. DOI: 10.1074/jbc.M512453200.
- Dalbey, R. E.; Kuhn, A. (2012): Protein traffic in Gram-negative bacteria--how exported and secreted proteins find their way. *FEMS Microbiol. Rev.* 36 (6), S. 1023 - 1045. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00327.x.
- Deitermann, S.; Sprie, G. S.; Koch, H.-G. (2005): A dual function for SecA in the assembly of single spanning membrane proteins in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 280 (47), S. 39077 - 39085. DOI: 10.1074/jbc.M509647200.
- DeLisa, M. P.; Tullman, D.; Georgiou, G. (2003): Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (10), S. 6115 - 6120. DOI: 10.1073/pnas.0937838100.
- Driessen, A. J.; Wickner, W. (1991): Proton transfer is rate-limiting for translocation of precursor proteins by the *Escherichia coli* translocase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (6), S. 2471 - 2475. DOI: 10.1073/pnas.88.6.2471.
- Driessen, A. J. M.; Nouwen, N. (2008): Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 77, S. 643 - 667. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.061606.160747.
- Dubini, A.; Sargent, F. (2003): Assembly of Tat-dependent [NiFe] hydrogenases: identification of precursor-binding accessory proteins. *FEBS Lett.* 549 (1-3), S. 141 - 146.
- Duong, F.; Wickner, W. (1997): The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J.* 16 (16), S. 4871 - 4879. DOI: 10.1093/emboj/16.16.4871.
- Economou, A.; Pogliano, J. A.; Beckwith, J.; Oliver, D. B.; Wickner, W. (1995): SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell* 83 (7), S. 1171 - 1181.
- Economou, A.; Wickner, W. (1994): SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* 78 (5), S. 835 - 843.

- Egea, P. F.; Shan, S.-O.; Napetschnig, J.; Savage, D. F.; Walter, P.; Stroud, R. M. (2004): Substrate twinning activates the signal recognition particle and its receptor. *Nature* 427 (6971), S. 215 - 221. DOI: 10.1038/nature02250.
- Eimer, E.; Fröbel, J.; Blümmel, A.-S.; Müller, M. (2015): TatE as a Regular Constituent of Bacterial Twin-arginine Protein Translocases. *J. Biol. Chem.* 290 (49), S. 29281 - 29289. DOI: 10.1074/jbc.M115.696005.
- Eimer, E.; Kao, W.-C.; Fröbel, J.; Blümmel, A.-S.; Hunte, C.; Müller, M. (2018): Unanticipated functional diversity among the TatA-type components of the Tat protein translocase. *Sci. Rep.* 8 (1), S. 1326. DOI: 10.1038/s41598-018-19640-3.
- Fekkes, P.; Driessen, A. J. M. (1999): Protein Targeting to the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 (1), S. 161 - 173.
- Fincher, V.; Dabney-Smith, C.; Cline, K. (2003): Functional assembly of thylakoid Δ pH-dependent/Tat protein transport pathway components *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* 270 (24), S. 4930 - 4941. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2003.03894.x.
- Focia, P. J.; Shepotinovskaya, I. V.; Seidler, J. A.; Freymann, D. M. (2004): Heterodimeric GTPase core of the SRP targeting complex. *Science* 303 (5656), S. 373 - 377. DOI: 10.1126/science.1090827.
- Freudl, R. (2018): Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. *Microb. Cell Fact.* 17 (1), S. 52. DOI: 10.1186/s12934-018-0901-3.
- Fröbel, J.; Rose, P.; Lausberg, F.; Blümmel, A.-S.; Freudl, R.; Müller, M. (2012): Transmembrane insertion of twin-arginine signal peptides is driven by TatC and regulated by TatB. *Nat. Commun.* 3, S. 1311. DOI: 10.1038/ncomms2308.
- Fröbel, J.; Rose, P.; Müller, M. (2011): Early contacts between substrate proteins and Tata translocase component in twin-arginine translocation. *J. Biol. Chem.* 286 (51), S. 43679 - 43689. DOI: 10.1074/jbc.M111.292565.
- Geise, H.; Heidrich, E. S.; Nikolin, C. S.; Mehner-Breitfeld, D.; Brüser, T. (2019): A Potential Late Stage Intermediate of Twin-Arginine Dependent Protein Translocation in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 10, S. 1482. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01482.
- Gekko, K.; Timasheff, S. N. (1981): Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* 20 (16), S. 4667 - 4676. DOI: 10.1021/bi00519a023.

- Gérard, F.; Cline, K. (2006): Efficient twin arginine translocation (Tat) pathway transport of a precursor protein covalently anchored to its initial cpTatC binding site. *J. Biol. Chem.* 281 (10), S. 6130 - 6135. DOI: 10.1074/jbc.M512733200.
- Gérard, F.; Cline, K. (2007): The thylakoid proton gradient promotes an advanced stage of signal peptide binding deep within the Tat pathway receptor complex. *J. Biol. Chem.* 282 (8), S. 5263 - 5272. DOI: 10.1074/jbc.M610337200.
- Gohlke, U.; Pullan, L.; McDevitt, C. A.; Porcelli, I.; Leeuw, E. de; Palmer, T.; Saibil, H. R.; Berks, B. C. (2005): The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (30), S. 10482 - 10486. DOI: 10.1073/pnas.0503558102.
- Goldstein, J.; Lehnhardt, S.; Inouye, M. (1991): *In vivo* effect of asparagine in the hydrophobic region of the signal sequence. *J. Biol. Chem.* 266 (22), S. 14413 - 14417.
- Habersetzer, J.; Moore, K.; Cherry, J.; Buchanan, G.; Stansfeld, P. J.; Palmer, T. (2017): Substrate-triggered position switching of TatA and TatB during Tat transport in *Escherichia coli*. *Open Biol.* 7 (8), S. 170091. DOI: 10.1098/rsob.170091.
- Hamsanathan, S.; Anthonymuthu, T. S.; Bageshwar, U. K.; Musser, S. M. (2017): A Hinged Signal Peptide Hairpin Enables Tat-Dependent Protein Translocation. *Biophys. J.* 113 (12), S. 2650 - 2668. DOI: 10.1016/j.bpj.2017.09.036.
- Hamsanathan, S.; Musser, S. M. (2018): The Tat protein transport system: intriguing questions and conundrums. *FEMS Microbiol. Lett.* 365 (12), fny123. DOI: 10.1093/femsle/fny123.
- Hauer, F.; Gerle, C.; Fischer, N.; Oshima, A.; Shinzawa-Itoh, K.; Shimada, S.; Yokoyama, K.; Fujiyoshi, Y.; Stark, H. (2015): GraDeR: Membrane Protein Complex Preparation for Single-Particle Cryo-EM. *Structure* 23 (9), S. 1769 - 1775. DOI: 10.1016/j.str.2015.06.029.
- Heidrich, C.; Templin, M. F.; Ursinus, A.; Merdanovic, M.; Berger, J.; Schwarz, H.; Pedro, M. A. de; Höltje, J.-V. (2001): Involvement of *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 41 (1), S. 167 - 178. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02499.x.
- Heidrich, E. S. (2013): Untersuchungen zur Oligomerisierung des Tat-Translokons. Masterarbeit, Leibniz Universität Hannover.
- Heijne, G. von (1984): How signal sequences maintain cleavage specificity. *J. Mol. Biol.* 173 (2), S. 243 - 251. DOI: 10.1016/0022-2836(84)90192-x.

Holzappel, E.; Eisner, G.; Alami, M.; Barrett, C. M. L.; Buchanan, G.; Lüke, I.; Betton, J.-M.; Robinson, C.; Palmer, T.; Moser, M.; Müller, M. (2007): The entire N-terminal half of TatC is involved in twin-arginine precursor binding. *Biochemistry* 46 (10), S. 2892 - 2898. DOI: 10.1021/bi062205b.

Hou, B.; Heidrich, E. S.; Mehner-Breitfeld, D.; Brüser, T. (2018): The TatA component of the twin-arginine translocation system locally weakens the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* upon protein substrate binding. *J. Biol. Chem.* 293 (20), S. 7592 - 7605. DOI: 10.1074/jbc.RA118.002205.

Houben, E. N. G.; Hagen-Jongman, C. M. ten; Brunner, J.; Oudega, B.; Luirink, J. (2004): The two membrane segments of leader peptidase partition one by one into the lipid bilayer via a Sec/YidC interface. *EMBO Rep.* 5 (10), S. 970 - 975. DOI: 10.1038/sj.embor.7400261.

Huang, Q.; Alcock, F.; Kneuper, H.; Deme, J. C.; Rollauer, S. E.; Lea, S. M.; Berks, B. C.; Palmer, T. (2017): A signal sequence suppressor mutant that stabilizes an assembled state of the twin arginine translocase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114 (10), E1958-E1967. DOI: 10.1073/pnas.1615056114.

Inouye, S.; Soberon, X.; Franceschini, T.; Nakamura, K.; Itakura, K.; Inouye, M. (1982): Role of positive charge on the amino-terminal region of the signal peptide in protein secretion across the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79 (11), S. 3438 - 3441. DOI: 10.1073/pnas.79.11.3438.

Ize, B.; Gérard, F.; Zhang, M.; Chanal, A.; Voulhoux, R.; Palmer, T.; Filloux, A.; Wu, L.-F. (2002): *In vivo* dissection of the Tat translocation pathway in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 317 (3), S. 327 - 335. DOI: 10.1006/jmbi.2002.5431.

Ize, B.; Stanley, N. R.; Buchanan, G.; Palmer, T. (2003): Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity. *Mol. Microbiol.* 48 (5), S. 1183 - 1193. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03504.x.

Jack, R. L.; Buchanan, G.; Dubini, A.; Hatzixanthis, K.; Palmer, T.; Sargent, F. (2004): Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins. *EMBO J.* 23 (20), S. 3962 - 3972. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600409.

Jongbloed, J. D. H.; Grieger, U.; Antelmann, H.; Hecker, M.; Nijland, R.; Bron, S.; van Dijl, J. M. (2004): Two minimal Tat translocases in *Bacillus*. *Mol. Microbiol.* 54 (5), S. 1319 - 1325. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04341.x.

- Källberg, M.; Margaryan, G.; Wang, S.; Ma, J.; Xu, J. (2014): RaptorX server: a resource for template-based protein structure modeling. *Methods Mol. Biol.* 1137, S. 17 - 27. DOI: 10.1007/978-1-4939-0366-5_2.
- Karamyshev, A. L.; Karamysheva, Z. N.; Kajava, A. V.; Ksenzenko, V. N.; Nesmeyanova, M. A. (1998): Processing of *Escherichia coli* alkaline phosphatase: role of the primary structure of the signal peptide cleavage region. *J. Mol. Biol.* 277 (4), S. 859 - 870. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1617.
- Kerner, M. J.; Naylor, D. J.; Ishihama, Y.; Maier, T.; Chang, H.-C.; Stines, A. P.; Georgopoulos, C.; Frishman, D.; Hayer-Hartl, M.; Mann, M.; Hartl, F. U. (2005): Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. *Cell* 122 (2), S. 209 - 220. DOI: 10.1016/j.cell.2005.05.028.
- Kiefer, D.; Kuhn, A. (2007): YidC as an Essential and Multifunctional Component in Membrane Protein Assembly. *Int. Rev. Cytol.* 259, S. 113 - 138. DOI: 10.1016/S0074-7696(06)59003-5.
- Kline, K. A.; Dodson, K. W.; Caparon, M. G.; Hultgren, S. J. (2010): A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. *Trends Microbiol.* 18 (5), S. 224 - 232. DOI: 10.1016/j.tim.2010.03.002.
- Kneuper, H.; Maldonado, B.; Jäger, F.; Krehenbrink, M.; Buchanan, G.; Keller, R.; Müller, M.; Berks, B. C.; Palmer, T. (2012): Molecular dissection of TatC defines critical regions essential for protein transport and a TatB–TatC contact site. *Mol. Microbiol.* 85 (5), S. 945 - 961. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08151.x.
- Knowles, T. J.; Scott-Tucker, A.; Overduin, M.; Henderson, I. R. (2009): Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (3), S. 206 - 214. DOI: 10.1038/nrmicro2069.
- Kreutzenbeck, P.; Kröger, C.; Lausberg, F.; Blaudeck, N.; Sprenger, G. A.; Freudl, R. (2007): *Escherichia coli* twin arginine (Tat) mutant translocases possessing relaxed signal peptide recognition specificities. *J. Biol. Chem.* 282 (11), S. 7903 - 7911. DOI: 10.1074/jbc.M610126200.
- Kuhn, A. (1988): Alterations in the extracellular domain of M13 procoat protein make its membrane insertion dependent on secA and secY. *Eur. J. Biochem.* 177 (2), S. 267 - 271. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb14372.x.

- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), S. 680 - 685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lausberg, F.; Fleckenstein, S.; Kreutzenbeck, P.; Fröbel, J.; Rose, P.; Müller, M.; Freudl, R. (2012): Genetic evidence for a tight cooperation of TatB and TatC during productive recognition of twin-arginine (Tat) signal peptides in *Escherichia coli*. *PLoS One* 7 (6), e39867. DOI: 10.1371/journal.pone.0039867.
- Leake, M. C.; Greene, N. P.; Godun, R. M.; Granjon, T.; Buchanan, G.; Chen, S.; Berry, R. M.; Palmer, T.; Berks, B. C. (2008): Variable stoichiometry of the TatA component of the twin-arginine protein transport system observed by *in vivo* single-molecule imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (40), S. 15376 - 15381. DOI: 10.1073/pnas.0806338105.
- Lee, J. C.; Timasheff, S. N. (1981): The stabilization of proteins by sucrose. *J. Biol. Chem.* 256 (14), S. 7193 - 7201.
- Lee, P. A.; Buchanan, G.; Stanley, N. R.; Berks, B. C.; Palmer, T. (2002): Truncation analysis of TatA and TatB defines the minimal functional units required for protein translocation. *J. Bacteriol.* 184 (21), S. 5871 - 5879. DOI: 10.1128/jb.184.21.5871-5879.2002.
- 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. (2006): Cysteine-scanning mutagenesis and disulfide mapping studies of the conserved domain of the twin-arginine translocase TatB component. *J. Biol. Chem.* 281 (45), S. 34072 - 34085. DOI: 10.1074/jbc.M607295200.
- Leeuw, E. de; Granjon, T.; Porcelli, I.; Alami, M.; Carr, S. B.; Müller, M.; Sargent, F.; Palmer, T.; Berks, B. C. (2002): Oligomeric properties and signal peptide binding by *Escherichia coli* Tat protein transport complexes. *J. Mol. Biol.* 322 (5), S. 1135 - 1146. DOI: 10.1016/s0022-2836(02)00820-3.
- Leeuw, E. de; Porcelli, I.; Sargent, F.; Palmer, T.; Berks, B. C. (2001): Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway. *FEBS Lett.* 506 (2), S. 143 - 148. DOI: 10.1016/s0014-5793(01)02904-0.
- Lindenstrauss, U.; Matos, C. F. R. O.; Graubner, W.; Robinson, C.; Brüser, T. (2010): Malfolded recombinant Tat substrates are Tat-independently degraded in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 584 (16), S. 3644 - 3648. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.07.039.
- Lu, H.; Marti, T.; Booth, P. J. (2001): Proline residues in transmembrane α helices affect the folding of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* 308 (2), S. 437 - 446. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4605.

- Luirink, J.; Sinning, I. (2004): SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim. Biophys. Acta* 1694 (1-3), S. 17 - 35. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2004.03.013.
- Ma, J.; Campbell, A.; Karlin, S. (2002): Correlations between Shine-Dalgarno Sequences and Gene Features Such as Predicted Expression Levels and Operon Structures. *J. Bacteriol.* 184 (20), S. 5733 - 5745. DOI: 10.1128/JB.184.20.5733-5745.2002.
- Ma, X.; Cline, K. (2010): Multiple precursor proteins bind individual Tat receptor complexes and are collectively transported. *EMBO J.* 29 (9), S. 1477 - 1488. DOI: 10.1038/emboj.2010.44.
- Maldonado, B.; Buchanan, G.; Müller, M.; Berks, B. C.; Palmer, T. (2011): Genetic evidence for a TatC dimer at the core of the *Escherichia coli* twin arginine (Tat) protein translocase. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 20 (3), S. 168 - 175. DOI: 10.1159/000329076.
- Mangels, D.; Mathers, J.; Bolhuis, A.; Robinson, C. (2005): The core TatABC complex of the twin-arginine translocase in *Escherichia coli*: TatC drives assembly whereas TatA is essential for stability. *J. Mol. Biol.* 345 (2), S. 415 - 423. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.10.043.
- Martin, J. R.; Harwood, J. H.; McCaffery, M.; Fernandez, D. E.; Cline, K. (2009): Localization and integration of thylakoid protein translocase subunit cpTatC. *Plant J.* 58 (5), S. 831 - 842. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.03816.x.
- Maurer, C.; Panahandeh, S.; Jungkamp, A.-C.; Moser, M.; Müller, M. (2010): TatB functions as an oligomeric binding site for folded Tat precursor proteins. *Mol. Biol. Cell* 21 (23), S. 4151 - 4161. DOI: 10.1091/mbc.E10-07-0585.
- McDevitt, C. A.; Buchanan, G.; Sargent, F.; Palmer, T.; Berks, B. C. (2006): Subunit composition and *in vivo* substrate-binding characteristics of *Escherichia coli* Tat protein complexes expressed at native levels. *FEBS J.* 273 (24), S. 5656 - 5668. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05554.x.
- McDevitt, C. A.; Hicks, M. G.; Palmer, T.; Berks, B. C. (2005): Characterisation of Tat protein transport complexes carrying inactivating mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329 (2), S. 693 - 698. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.02.038.
- Mehner, D.; Osadnik, H.; Lünsdorf, H.; Brüser, T. (2012): The Tat system for membrane translocation of folded proteins recruits the membrane-stabilizing Psp machinery in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 287 (33), S. 27834 - 27842. DOI: 10.1074/jbc.M112.374983.

- Méjean, V.; Iobbi-Nivol, C.; Lepelletier, M.; Giordano, G.; Chippaux, M.; Pascal, M. C. (1994): TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the tor operon. *Mol. Microbiol.* 11 (6), S. 1169 - 1179. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00393.x.
- Mori, H.; Cline, K. (2002): A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid Δ pH/Tat translocase. *J. Cell. Biol.* 157 (2), S. 205 - 210. DOI: 10.1083/jcb.200202048.
- Mori, H.; Summer, E. J.; Cline, K. (2001): Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid Δ pH-dependent protein transport. *FEBS Lett.* 501 (1), S. 65 - 68. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)02626-6.
- Mori, H.; Summer, E. J.; Ma, X.; Cline, K. (1999): Component Specificity for the Thylakoidal Sec and Delta pH-Dependent Protein Transport Pathways. *J. Cell. Biol.* 146 (1), S. 45 - 56. DOI: 10.1083/jcb.146.1.45.
- Moser, C.; Mol, O.; Goody, R. S.; Sinning, I. (1997): The signal recognition particle receptor of *Escherichia coli* (FtsY) has a nucleotide exchange factor built into the GTPase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (21), S. 11339 - 11344. DOI: 10.1073/pnas.94.21.11339.
- Mould, R. M.; Robinson, C. (1991): A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *J. Biol. Chem.* 266 (19), S. 12189 - 12193.
- Murén, E. M.; Suciu, D.; Topping, T. B.; Kumamoto, C. A.; Randall, L. L. (1999): Mutational alterations in the homotetrameric chaperone SecB that implicate the structure as dimer of dimers. *J. Biol. Chem.* 274 (27), S. 19397 - 19402. DOI: 10.1074/jbc.274.27.19397.
- Natale, P.; Brüser, T.; Driessen, A. J. M. (2008): Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (9), S. 1735 - 1756. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.07.015.
- Nikolin, C. S. (2016): Untersuchungen zur Oligomerisierung von TatC in *Escherichia coli*. Masterarbeit, Leibniz Universität Hannover.
- Nishiyama, K.; Fukuda, A.; Morita, K.; Tokuda, H. (1999): Membrane deinsertion of SecA underlying proton motive force-dependent stimulation of protein translocation. *EMBO J.* 18 (4), S. 1049 - 1058. DOI: 10.1093/emboj/18.4.1049.

- Nivière, V.; Wong, S. L.; Voordouw, G. (1992): Site-directed mutagenesis of the hydrogenase signal peptide consensus box prevents export of a beta-lactamase fusion protein. *J. Gen. Microbiol.* 138 (10), S. 2173 - 2183. DOI: 10.1099/00221287-138-10-2173.
- Oates, J.; Barrett, C. M. L.; Barnett, J. P.; Byrne, K. G.; Bolhuis, A.; Robinson, C. (2005): The *Escherichia coli* twin-arginine translocation apparatus incorporates a distinct form of TatABC complex, spectrum of modular TatA complexes and minor TatAB complex. *J. Mol. Biol.* 346 (1), S. 295 - 305. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.11.047.
- Oates, J.; Mathers, J.; Mangels, D.; Kühlbrandt, W.; Robinson, C.; Model, K. (2003): Consensus structural features of purified bacterial TatABC complexes. *J. Mol. Biol.* 330 (2), S. 277 - 286. DOI: 10.1016/s0022-2836(03)00621-1.
- Orriss, G. L.; Tarry, M. J.; Ize, B.; Sargent, F.; Lea, S. M.; Palmer, T.; Berks, B. C. (2007): TatBC, TatB, and TatC form structurally autonomous units within the twin arginine protein transport system of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 581 (21), S. 4091 - 4097. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.07.044.
- Peetz, O.; Hellwig, N.; Henrich, E.; Mezhyrova, J.; Dötsch, V.; Bernhard, F.; Morgner, N. (2019): LILBID and nESI: Different Native Mass Spectrometry Techniques as Tools in Structural Biology. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 30 (1), S. 181 - 191. DOI: 10.1007/s13361-018-2061-4.
- Peng, J.; Xu, J. (2011): RaptorX: exploiting structure information for protein alignment by statistical inference. *Proteins* 79 Suppl 10, S. 161 - 171. DOI: 10.1002/prot.23175.
- Petrů, M.; Wideman, J.; Moore, K.; Alcock, F.; Palmer, T.; Doležal, P. (2018): Evolution of mitochondrial TAT translocases illustrates the loss of bacterial protein transport machines in mitochondria. *BMC Biol.* 16 (1), S. 141. DOI: 10.1186/s12915-018-0607-3.
- Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. (2004): UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25 (13), S. 1605 - 1612. DOI: 10.1002/jcc.20084.
- Pogliano, J. A.; Beckwith, J. (1994): SecD and SecF facilitate protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 13 (3), S. 554 - 561.

- Pommier, J.; Méjean, V.; Giordano, G.; Iobbi-Nivol, C. (1998): TorD, A Cytoplasmic Chaperone That Interacts with the Unfolded Trimethylamine *N*-Oxide Reductase Enzyme (TorA) in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 273 (26), S. 16615 - 16620. DOI: 10.1074/jbc.273.26.16615.
- Pop, O.; Martin, U.; Abel, C.; Müller, J. P. (2002): The twin-arginine signal peptide of PhoD and the TatAd/Cd proteins of *Bacillus subtilis* form an autonomous Tat translocation system. *J. Biol. Chem.* 277 (5), S. 3268 - 3273. DOI: 10.1074/jbc.M110829200.
- Pop, O. I.; Westermann, M.; Volkmer-Engert, R.; Schulz, D.; Lemke, C.; Schreiber, S.; Gerlach, R.; Wetzker, R.; Müller, J. P. (2003): Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatA_d indicates protein-mediated targeting of the Tat export in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 278 (40), S. 38428 - 38436. DOI: 10.1074/jbc.M306516200.
- Punginelli, C.; Maldonado, B.; Grahl, S.; Jack, R.; Alami, M.; Schröder, J.; Berks, B. C.; Palmer, T. (2007): Cysteine scanning mutagenesis and topological mapping of the *Escherichia coli* twin-arginine translocase TatC Component. *J. Bacteriol.* 189 (15), S. 5482 - 5494. DOI: 10.1128/JB.00647-07.
- Ramasamy, S.; Abrol, R.; Suloway, C. J.M.; Clemons, W. M. (2013): The glove-like structure of the conserved membrane protein TatC provides insight into signal sequence recognition in twin-arginine translocation. *Structure* 21 (5), S. 777 - 788. DOI: 10.1016/j.str.2013.03.004.
- Randall, L. L.; Hardy, S. J. S. (2002): SecB, one small chaperone in the complex milieu of the cell. *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (10), S. 1617 - 1623.
- Ray, N.; Nenninger, A.; Mullineaux, C. W.; Robinson, C. (2005): Location and mobility of twin arginine translocase subunits in the *Escherichia coli* plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 280 (18), S. 17961 - 17968. DOI: 10.1074/jbc.M413521200.
- Richardson, J. S. (1981): The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure. In: Christian Boehmer Anfinsen, Frederic Middlebrook Richards und John Tileston Edsall (Hg.): Advances in protein chemistry. Volume 34, Bd. 34. New York, London: Academic Press (Advances in Protein Chemistry, v. 34), S. 167 - 339.
- Richter, S.; Brüser, T. (2005): Targeting of unfolded PhoA to the TAT translocon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 280 (52), S. 42723 - 42730. DOI: 10.1074/jbc.M509570200.

- Rodrigue, A.; Chanal, A.; Beck, K.; Müller, M.; Wu, L. F. (1999): Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. *J. Biol. Chem.* 274 (19), S. 13223 - 13228. DOI: 10.1074/jbc.274.19.13223.
- Rodriguez, F.; Rouse, S. L.; Tait, C. E.; Harmer, J.; Riso, A. de; Timmel, C. R.; Sansom, M. S. P.; Berks, B. C.; Schnell, J. R. (2013): Structural model for the protein-translocating element of the twin-arginine transport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (12), E1092-101. DOI: 10.1073/pnas.1219486110.
- Rollauer, S. E.; Tarry, M. J.; Graham, J. E.; Jääskeläinen, M.; Jäger, F.; Johnson, S.; Krehenbrink, M.; Liu, S.-M.; Lukey, M. J.; Marcoux, J.; McDowell, M. A.; Rodriguez, F.; Roversi, P.; Stansfeld, P. J.; Robinson, C. V.; Sansom, M. S. P.; Palmer, T.; Högbom, M.; Berks, B. C.; Lea, S. M. (2012): Structure of the TatC core of the twin-arginine protein transport system. *Nature* 492 (7428), S. 210 - 214. DOI: 10.1038/nature11683.
- Rose, P.; Fröbel, J.; Graumann, P. L.; Müller, M. (2013): Substrate-dependent assembly of the Tat translocase as observed in live *Escherichia coli* cells. *PLoS One* 8 (8), e69488. DOI: 10.1371/journal.pone.0069488.
- Santini, C. L.; Ize, B.; Chanal, A.; Müller, M.; Giordano, G.; Wu, L. F. (1998): A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 17 (1), S. 101 - 112. DOI: 10.1093/emboj/17.1.101.
- Sargent, F.; Bogsch, E. G.; Stanley, N. R.; Wexler, M.; Robinson, C.; Berks, B. C.; Palmer, T. (1998): Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J.* 17 (13), S. 3640 - 3650. DOI: 10.1093/emboj/17.13.3640.
- Sargent, F.; Gohlke, U.; Leeuw, E. de; Stanley, N. R.; Palmer, T.; Saibil, H. R.; Berks, B. C. (2001): Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure. *Eur. J. Biochem.* 268 (12), S. 3361 - 3367. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2001.02263.x.
- Sargent, F.; Stanley, N. R.; Berks, B. C.; Palmer, T. (1999): Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. A distinct and pivotal role for the TatB protein. *J. Biol. Chem.* 274 (51), S. 36073 - 36082. DOI: 10.1074/jbc.274.51.36073.
- Schägger, H.; Jagow, G. von (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199 (2), S. 223 - 231. DOI: 10.1016/0003-2697(91)90094-a.

- Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9 (7), S. 671 - 675. DOI: 10.1038/nmeth.2089.
- Settles, A. M. (1997): Sec-Independent Protein Translocation by the Maize Hcf106 Protein. *Science* 278 (5342), S. 1467 - 1470. DOI: 10.1126/science.278.5342.1467.
- Stanley, N. R.; Findlay, K.; Berks, B. C.; Palmer, T. (2001): *Escherichia coli* strains blocked in Tat-dependent protein export exhibit pleiotropic defects in the cell envelope. *J. Bacteriol.* 183 (1), S. 139 - 144. DOI: 10.1128/JB.183.1.139-144.2001.
- Steiner, J. M.; Köcher, T.; Nagy, C.; Löffelhardt, W. (2002): Chloroplast SecE: evidence for spontaneous insertion into the thylakoid membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (2), S. 747 - 752. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)00285-1.
- Stolle, P.; Hou, B.; Brüser, T. (2016): The Tat Substrate CueO Is Transported in an Incomplete Folding State. *J. Biol. Chem.* 291 (26), S. 13520 - 13528. DOI: 10.1074/jbc.M116.729103.
- Sturm, A.; Schierhorn, A.; Lindenstrauss, U.; Lilie, H.; Brüser, T. (2006): YcdB from *Escherichia coli* reveals a novel class of Tat-dependently translocated hemoproteins. *J. Biol. Chem.* 281 (20), S. 13972 - 13978. DOI: 10.1074/jbc.M511891200.
- Suo, Y.; Hardy, S. J. S.; Randall, L. L. (2011): Orientation of SecA and SecB in complex, derived from disulfide cross-linking. *J. Bacteriol.* 193 (1), S. 190 - 196. DOI: 10.1128/JB.00975-10.
- Tarry, M.; Arends, S. J. R.; Roversi, P.; Piette, E.; Sargent, F.; Berks, B. C.; Weiss, D. S.; Lea, S. M. (2009): The *Escherichia coli* cell division protein and model Tat substrate SufI (FtsP) localizes to the septal ring and has a multicopper oxidase-like structure. *J. Mol. Biol.* 386 (2), S. 504 - 519. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.12.043.
- Taubert, J.; Hou, B.; Risselada, H. J.; Mehner, D.; Lünsdorf, H.; Grubmüller, H.; Brüser, T. (2015): TatBC-independent TatA/Tat substrate interactions contribute to transport efficiency. *PLoS One* 10 (3), e0119761. DOI: 10.1371/journal.pone.0119761.
- Thomas, J. d.; Daniel, R. A.; Errington, J.; Robinson, C. (2001): Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 39 (1), S. 47 - 53. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02253.x.
- Timasheff, S. N. (1993): The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22, S. 67 - 97. DOI: 10.1146/annurev.bb.22.060193.000435.

- Timasheff, S. N.; Lee, J. C.; Pittz, E. P.; Tweedy, N. (1976): The interaction of tubulin and other proteins with structure-stabilizing solvents. *J. Journal of Colloid and Interface Science* 55 (3), S. 658 - 663. DOI: 10.1016/0021-9797(76)90076-X.
- Tokuda, H.; Matsuyama, S. (2004): Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1693 (1), S. 5 - 13. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2004.02.005.
- Tullman-Ereck, D.; DeLisa, M. P.; Kawarasaki, Y.; Iranpour, P.; Ribnicky, B.; Palmer, T.; Georgiou, G. (2007): Export pathway selectivity of *Escherichia coli* twin arginine translocation signal peptides. *J. Biol. Chem.* 282 (11), S. 8309 - 8316. DOI: 10.1074/jbc.M610507200.
- Ulbrandt, N. D.; Newitt, J. A.; Bernstein, H. D. (1997): The *E. coli* signal recognition particle is required for the insertion of a subset of inner membrane proteins. *Cell* 88 (2), S. 187 - 196. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81839-5.
- Ulfig, A.; Freudl, R. (2018): The early mature part of bacterial twin-arginine translocation (Tat) precursor proteins contributes to TatBC receptor binding. *J. Biol. Chem.* 293 (19), S. 7281 - 7299. DOI: 10.1074/jbc.RA118.002576.
- Ulfig, A.; Fröbel, J.; Lausberg, F.; Blümmel, A.-S.; Heide, A. K.; Müller, M.; Freudl, R. (2017): The h-region of twin-arginine signal peptides supports productive binding of bacterial Tat precursor proteins to the TatBC receptor complex. *J. Biol. Chem.* 292 (26), S. 10865 - 10882. DOI: 10.1074/jbc.M117.788950.
- Weiner, J. H.; Bilous, P. T.; Shaw, G. M.; Lubitz, S. P.; Frost, L.; Thomas, G. H.; Cole, J. A.; Turner, R. J. (1998): A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell* 93 (1), S. 93 - 101. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81149-6.
- Welte, T.; Kudva, R.; Kuhn, P.; Sturm, L.; Braig, D.; Müller, M.; Warscheid, B.; Drepper, F.; Koch, H.-G. (2012): Promiscuous targeting of polytopic membrane proteins to SecYEG or YidC by the *Escherichia coli* signal recognition particle. *Mol. Biol. Cell* 23 (3), S. 464 - 479. DOI: 10.1091/mbc.E11-07-0590.
- Wexler, M.; Sargent, F.; Jack, R. L.; Stanley, N. R.; Bogsch, E. G.; Robinson, C.; Berks, B. C.; Palmer, T. (2000): TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export. *J. Biol. Chem.* 275 (22), S. 16717 - 16722. DOI: 10.1074/jbc.M000800200.

- White, G. F.; Schermann, S. M.; Bradley, J.; Roberts, A.; Greene, N. P.; Berks, B. C.; Thomson, A. J. (2010): Subunit organization in the TatA complex of the twin arginine protein translocase: a site-directed EPR spin labeling study. *J. Biol. Chem.* 285 (4), S. 2294 - 2301. DOI: 10.1074/jbc.M109.065458.
- Wickström, D.; Wagner, S.; Baars, L.; Ytterberg, A. J.; Klepsch, M.; van Wijk, K. J.; Luirink, J.; Gier, J.-W. de (2011): Consequences of depletion of the signal recognition particle in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 286 (6), S. 4598 - 4609. DOI: 10.1074/jbc.M109.081935.
- Wittinghofer, A.; Vetter, I. R. (2011): Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. *Annu. Rev. Biochem.* 80, S. 943 - 971. DOI: 10.1146/annurev-biochem-062708-134043.
- Wojnowska, M.; Gault, J.; Yong, S. C.; Robinson, C. V.; Berks, B. C. (2018): Precursor–Receptor Interactions in the Twin Arginine Protein Transport Pathway Probed with a New Receptor Complex Preparation. *Biochemistry* 57 (10), S. 1663 - 1671. DOI: 10.1021/acs.biochem.8b00026.
- Xie, K.; Dalbey, R. E. (2008): Inserting proteins into the bacterial cytoplasmic membrane using the Sec and YidC translocases. *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (3), S. 234 - 244. DOI: 10.1038/nrmicro3595.
- Xu, Z.; Knafels, J. D.; Yoshino, K. (2000): Crystal structure of the bacterial protein export chaperone SecB. *Nat. Struct. Biol.* 7 (12), S. 1172 - 1177. DOI: 10.1038/82040.
- Yen, M.-R.; Tseng, Y.-H.; Nguyen, E. H.; Wu, L.-F.; Saier, M. H. (2002): Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. *Arch. Microbiol.* 177 (6), S. 441 - 450. DOI: 10.1007/s00203-002-0408-4.
- Young, T. S.; Ahmad, I.; Yin, J. A.; Schultz, P. G. (2010): An enhanced system for unnatural amino acid mutagenesis in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 395 (2), S. 361 - 374. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.10.030.
- Zhang, Y.; Wang, L.; Hu, Y.; Jin, C. (2014): Solution structure of the TatB component of the twin-arginine translocation system. *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (7), S. 1881 - 1888. DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.03.015.
- Zhou, J.; Xu, Z. (2003): Structural determinants of SecB recognition by SecA in bacterial protein translocation. *Nat. Struct. Biol.* 10 (11), S. 942 - 947. DOI: 10.1038/nsb980.

Zhou, J.; Xu, Z. (2005): The structural view of bacterial translocation-specific chaperone SecB: implications for function. *Mol. Microbiol.* 58 (2), S. 349 - 357. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04842.x.

Zhu, L.; Klenner, C.; Kuhn, A.; Dalbey, R. E. (2012): Both YidC and SecYEG are required for translocation of the periplasmic loops 1 and 2 of the multispanning membrane protein TatC. *J. Mol. Biol.* 424 (5), S. 354 - 367. DOI: 10.1016/j.jmb.2012.09.026.

Zoufaly, S.; Fröbel, J.; Rose, P.; Flecken, T.; Maurer, C.; Moser, M.; Müller, M. (2012): Mapping precursor-binding site on TatC subunit of twin arginine-specific protein translocase by site-specific photo cross-linking. *J. Biol. Chem.* 287 (16), S. 13430 - 13441. DOI: 10.1074/jbc.M112.343798.

PUBLIKATIONSLISTE

1. Geise, Hendrik; Heidrich, Eyleen Sabine; Nikolin, Christoph Stefan; Mehner-Breitfeld, Denise; Brüser, Thomas (2019): A Potential Late Stage Intermediate of Twin-Arginine Dependent Protein Translocation in *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology* 10, S. 1482. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01482.

LEBENS LAUF

HENDRIK GEISE

M. Sc. Life Science

geboren am 26.11.1988 in Emden

HOCHSCHULBILDUNG

- **PROMOTIONSSTUDIUM BIOLOGIE**
Institut für Mikrobiologie, Leibniz Universität Hannover
 „Studien zur Assemblierung der Tat-Translokase von *Escherichia coli*“

11/2015 – 10/2019
- **PROMOTIONSSTUDIUM CHEMIE**
Zentrum für Biomolekulare Wirkstoffe, Leibniz Universität Hannover
 “Entwicklung neuer katalytischer Werkzeuge für die Synthese chiraler, mehrfachsubstituierter Heterozyklen”

12/2014 – 06/2015
- **STUDIUM LIFE SCIENCES (M. Sc.)**
Leibniz Universität Hannover
 Masterarbeit am Institut für Organische Chemie
 “Biokatalytische Studien zur Bildung von konservierten Strukturmotiven bei Typ I Polyketiden“

10/2012 – 09/2014
- **STUDIUM LIFE SCIENCES (B. Sc.)**
Leibniz Universität Hannover
 Bachelorarbeit am Institut für Organische Chemie
 “Mutasyntetische Darstellung von neuen Ansamitocin Derivaten“

10/2009 – 09/2012

AUSLANDSERFAHRUNG

- **FORSCHUNGSPRAKTIKUM**
Schulich Faculty of Chemistry, Technion - Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

08/2013 – 10/2013

STIPENDIUM

- **DEUTSCHE TECHNION-GESELLSCHAFT e.V.**
Stipendium für einen Auslandsaufenthalt in Haifa, Israel

08/2013 – 10/2013

BERUFSERFAHRUNG

- **WISSENSCHAFTLICHER MITARBEITER**
Institut für Mikrobiologie und Zentrum für Biomolekulare Wirkstoffe (BMWZ), Leibniz Universität Hannover

12/2014 – 10/2019
- **WISSENSCHAFTLICHE HILFSKRAFT**
Institut für Mikrobiologie, Leibniz Universität Hannover

01/2012 – 02/2012
01/2013 – 02/2013
01/2014 – 02/2014
- **RETTUNGSSANITÄTER**
Krankenbeförderung KBH Medical Service GmbH

03/2010 – 10/2010
- **RETTUNGSHelfER**
Rettungsdienst des Landkreises Aurich gGmbH, Norden

06/2008 – 08/2009

BERUFS AUSBILDUNG

- **AUSBILDUNG ZUM RETTUNGSSANITÄTER**
Rettungsschule Mebino, Hannover

03/2010
- **AUSBILDUNG ZUM RETTUNGSHelfER**
Rettungsschule Life Time, Norden

06/2008

SCHULISCHE BILDUNG

- **ALLGEMEINE HOCHSCHULREIFE**
Ulrichsgymnasium Norden

2001 – 2008

DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Brüser danke ich für die Übergabe des Themas, die gute Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft während der Promotion. Ich bedanke mich ebenfalls für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Die ausgewogene Mischung aus gewährter Selbstständigkeit und Betreuung bildete die Grundlage dieser Arbeit und motivierte mich stets dazu, eigene Ideen zu entwickeln und umzusetzen.

Professor Dr. Kürşad Turgay danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie für zahlreiche hilfreiche Ratschläge nach Vorträgen im Rahmen des Seminars. Professor Dr. Andreas Kirschning danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und die gute organisch chemische Ausbildung während der Bachelor- und der Masterarbeit, die auch während der Promotion im Fachbereich Biologie stets von Vorteil war.

Ein besonderer Dank gilt meinen Kollegen aus dem Labor 2 und dem Büro 135. Eike-Jendrik Schniete, Dr. Eyleen Heidrich, Marie Pape-Bub und Lena Hoffmann danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und den ständigen Austausch von Ideen. Bei Dr. Eyleen Heidrich möchte ich mich besonders für zahlreiche Hilfestellungen und den Austausch von Ideen bedanken, die maßgeblich die Gestaltung meines Promotionsthemas beeinflusst haben. Dr. Bo Hou danke ich für die Unterstützung während des Beginns meiner Promotion. Außerdem danke ich Inge Reupke und Sybille Traupe für exzellente technische Unterstützung sowie Dr. Michael Ringel für zahlreiche Hilfestellungen, insbesondere beim Umgang mit Messinstrumenten. Dr. Patrick Stolle danke ich für seine organisatorische Arbeit, die zu jeder Zeit den reibungslosen Laborbetrieb ermöglichte. Für geleistete Vorarbeiten, die maßgeblich zu Gestaltung meines Promotionsthemas beigetragen haben, möchte ich mich bei Christoph Nikolin, Dr. Eyleen Heidrich, Dr. Denise Mehner-Breitfeld und Jana Behrendt bedanken. Max Werner danke ich für die Durchführung von Experimenten im Rahmen eines Forschungsmoduls, deren Ergebnisse in diese Arbeit eingeflossen sind.

Außerdem danke ich neben den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Brüser auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Turgay und Horn sowie dem Sekretariat und dem technischen Personal des Instituts für Mikrobiologie für stete Hilfsbereitschaft, das angenehme Arbeitsklima und eine gute Zeit.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Dr. Eyleen Heidrich und meiner Schwester Kerstin Geise.

Meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Holger Stark, Dr. David Hasselbach und Dr. Jan-Erik Schliep von der Abteilung Strukturelle Dynamik am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen sowie JunProf. Dr. Nina Morgner und Dr. Jan Hoffmann vom Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Goethe-Universität Frankfurt danke ich für viele interessante und lehrreiche Besuche und die Zeit, die sie sich für mich genommen haben.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Freunden und meiner Familie, die mich während der gesamten Promotionszeit unterstützt haben.