

**Struktur- und Funktionsuntersuchungen
der Tat-abhängigen Translokase aus
*Bacillus subtilis***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich
genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Biologin Christina Gottselig

aus

Alma-Ata

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Anne S. Ulrich

Korreferent: Prof. Dr. Wolfgang Wenzel

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom September 2010 bis März 2014 am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl Biochemie, im Arbeitskreis von Prof. Dr. Anne S. Ulrich unter Anleitung des KIT-Nachwuchsgruppenleiters Dr. Torsten H. Walther angefertigt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die bereits angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher noch nicht als Prüfungsschrift eingereicht, weder an dieser noch an einer anderen Hochschule.

Karlsruhe, den 03.03.2014

Danksagung

Prof. Anne S. Ulrich danke ich sehr für die freundliche Aufnahme in Ihren Arbeitskreis und die herzliche Arbeitsatmosphäre. Ein großes Dankeschön auch für die Unterstützung, wertvollen Ratschläge und die exzellenten Arbeitsbedingungen in den Laboren sowie die Möglichkeit alle zur Verfügung stehenden Ressourcen nutzen zu können.

Dr. Torsten Walther möchte ich für seine exzellente Betreuung, die grenzenlose Hilfsbereitschaft und das Korrekturlesen meiner Arbeit ganz herzlich danken! Torsten, ein riesengroßes Dankeschön an Dich! Du bist einfach ein toller Young Investigator Gruppenleiter!

Für eine herausragende Zusammenarbeit möchte ich mich beim TatA-Team bedanken! Ich danke Eva Stockwald für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung! Bei Stefanie Vollmer möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei der Mutagenese der TatA_d-Mutanten ganz herzlich bedanken!

Bei Prof. Katja Schmitz, Prof. Wolfgang Wenzel und Prof. Anne S. Ulrich bedanke ich mich für die Teilnahme an meinen TAC-Meetings und die wertvollen Diskussionen!

Für die gute Zusammenarbeit beim in vitro Tat-Translokationsprojekt danke ich Prof. G. Ulrich Nienhaus, René Dörlich und Florian Stockmar. Florian danke ich für die gemeinsame Messzeit, seine ständige Hilfsbereitschaft und das Korrigieren der FCS/FCCS-Auswertung.

Im Rahmen des Charge Zipper Projekts möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei Prof. Wolfgang Wenzel, Dr. Moritz Wolf und Julia Setzler bedanken.

Dr. Johannes Reichert danke ich für seine Ratschläge, Hilfsbereitschaft sowie die gemeinsame Messzeit am Spektralphotometer.

Dr. Sergii Afonin danke ich für die Durchführung der MALDI-TOF-Messungen sowie die wertvolle Hilfe an der HPLC.

Dr. Olga Nolandt und Dr. Marco J. Klein danke ich für die Überlassung der TatC_d und SP-GFPuv Proteinkonstrukte.

PD Dr. Jörg Müller (Universität Jena) danke ich für die Überlassung der PhoD und TatA_d Antikörper.

Dr. Robyn Eijlander (Universität Groningen, Niederlande) danke ich für die Bereitstellung der Tat-Konstrukte und der Bacillus Stämme. Darüber hinaus möchte ich mich für ihre freundliche Hilfsbereitschaft bedanken.

Allen weiteren Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für die ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie die wunderbare Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderer Dank geht an meine lieben Arbeitskollegen und Freunde Dr. Tamta Turzeladze, Dr. Marco J. Klein und Dr. Mareike Hartmann, bei denen ich mich für Ihre moralische Unterstützung, Wiederaufbauen bei Rückschlägen und das gemeinsame Freuen bei Erfolgen herzlich bedanke! Ein großes Dankeschön an Euch auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Liebe Silke Büchler auch ein Dankeschön an Dich für die wertvollen Gespräche während der Studien- sowie Doktorandenzeit!

Der größte Dank gilt meinen Eltern, Großeltern und meinem Bruder für Ihre immerwährende Unterstützung. Vielen vielen Dank für Euren Rückhalt! Die vorliegende Arbeit ist Ihnen gewidmet.

Abkürzungsverzeichnis

Zur Abkürzung der Aminosäuren werden die Einbuchstabenkodierungen nach Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für Biochemische Nomenklatur verwendet (Eur. J. Biochem. 138 (1984) 9-37).

Å	Ångström
<i>A. aeolicus</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>
Abb.	Abbildung
APH	Amphiphile Helix
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>Absorption unit</i>
BCIP/NBT	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat/Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
BN	Blue-Native
BSA	Bovines Serum Albumin
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bp	Basenpaare
cm ²	Quadratcentimeter
Da	Dalton
DCR	<i>densely charged region</i>
ddH ₂ O	bidestiliertes Wasser
dH ₂ O	destiliertes Wasser
DDM	n-Dodecylmaltosid
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocolin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphate
DPC	n-Dodecylphosphocholin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
FCS	<i>Fluorescence correlation spectroscopy</i>
FCCS	<i>Fluorescence cross-correlation spectroscopy</i>

2c2fsFCCS	<i>Dual color two focus line-scanning fluorescence cross-correlation spectroscopy</i>
fl	Femtoliter
g	Gramm
GC-Gehalt	Guanin-Cytosin Gehalt
GUV	<i>Giant unilamellar vesicle</i>
h	Stunden
His-Tag	Hexahistidin-Anhang
HPDM	<i>high phosphate defined medium</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
Kan	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria Bertani
LPDM	<i>low phosphate defined medium</i>
M	molar
mA	Milliampere
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
M/O	Monomer zu Oligomer Verhältnis
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
m/z	Masse/Ladung
N	Nukleotid
NLS	Natriumlauroylsarcosin
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-Puffer)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
pH	<i>pondus/potentia Hydrogenii</i> (pH-Wert)

PhoD	Phosphodiesterase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
PVDF	<i>polyvinylidene fluoride</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
Sec	sekretorischer Translokationsweg
sec	Sekunden
SMM	Spizizen Minimalmedium
Tat	<i>twin arginine translocation</i>
TCA	Trichloressigsäure (<i>trichloroacetic acid</i>)
TCEP	Tris(2-Carboxyethyl)phosphin
TEMED	Tetramethyldiamin
TFA	Triflouressigsäure
TMH	Transmembranhelix
T _m	Schmelzpunkt
TMS	Transmembransegment
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
WB	Western Blot
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
λ	Wellenlänge
λ _{abs}	Absorptionsmaximum
λ _{fl}	Maximum der Fluoreszenzemission

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Zwei Haupttrouten der Proteintranslokation.....	2
Abb. 2: Nutzung des Tat-Systems von verschiedenen Proteinkomplextypen.....	4
Abb. 3: Das Tat- und Sec-Signalpeptid.....	5
Abb. 4: N-terminales Sequenzalignment von TatA, TatB, TatE aus <i>E. coli</i> und TatA _d , TatA _y aus <i>B. subtilis</i>	7
Abb. 5: Die TatA _d Struktur	8
Abb. 6: Die TatC Struktur	9
Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen. A) TatA Homooligomere. B) TatBC Komplexe mit und ohne Substratprotein SufI.....	11
Abb. 8: Modell der Tat-Translokation in <i>E. coli</i>	12
Abb. 9: PhoD Translokation in <i>B. subtilis</i>	13
Abb. 10: Das komplementäre Ladungsmotiv in TatA _d aus <i>B. subtilis</i>	16
Abb. 11: Das komplementäre Ladungsmotiv in TatA Proteinen	17
Abb. 12: A) <i>Helical Wheel Plot</i> der APH. B) Flache Projektion der APH-Oberfläche.....	18
Abb. 13: Postulierte Salzbrückenausbildung in TatA _d	19
Abb. 14: Postulierte TatA _d Porenbildung durch einen Charge Zipper Mechanismus.....	20
Abb. 15: Ladungsabstoßungsmutanten	21
Abb. 16: Ladungswiederherstellungsmutanten	22
Abb. 17: Nachbarschaftsumkehrmutanten.....	23
Abb. 18: Inter- und intramolekulare Komplettabstoßungsmutanten.....	24
Abb. 19: Western Blots (WB) von der BN-PAGE der Ladungsabstoßungsmutanten (A) und Ladungswiederherstellungsmutanten (B).....	26
Abb. 20: Western Blots (WB) von der BN-PAGE der Komplettabstoßungsmutanten (A) und Nachbarschaftsumkehrmutanten (B)	27
Abb. 21: Monomer zu Oligomer Verhältnis der Ladungsabstoßungsmutanten und Ladungswiederherstellungsmutanten.....	28
Abb. 22: Monomer zu Oligomer Verhältnis der Komplettabstoßungsmutanten	29
Abb. 23: Monomer zu Oligomer Verhältnis der Nachbarschaftsumkehrmutanten	30
Abb. 24: TatC Homologiemodelle	31
Abb. 25: TatA _d -Mutanten mit einem geladenen N-Terminus und einer verlängerten TMH	33
Abb. 26: Ergebnisse der PhoD Translokation von Mutanten mit geladenem N-Terminus	34
Abb. 27: Ergebnisse der PhoD Translokation von TatA _d Mutanten mit einer verlängerten Transmembranhelix (TMH).....	35
Abb. 28: Schematische Illustration des <i>in vitro</i> Translokationsassays.....	36
Abb. 29: Das Tat-abhängige Substrat SP-GFPuv für den <i>in vitro</i> Translokationsassay	37
Abb. 30: Aufreinigung von SP-GFPuv	38

Abb. 31: SDS-PAGE von TatA _d -G70C	39
Abb. 32: HPLC-Chromatogramme der TatA _d -Atto647N Aufreinigung	40
Abb. 33: MALDI-TOF Spektrum vom aufgereinigten TatA _d -Atto647N und TatA _d -Alexa568...41	41
Abb. 34: SDS-PAGE vom aufgereinigten TatC _d	42
Abb. 35: GUV-Ausbildung durch Elektroformation	43
Abb. 36: GUVs mit rekonstituierten TatA _d -Atto647N, TatA _d und TatC _d nach Zugabe von SP-GFPuv	45
Abb. 37: GUVs ohne TatA _d und TatC _d	46
Abb. 38: GUVs mit rekonstituierten TatC _d	47
Abb. 39: GUVs mit rekonstituierten TatA _d	48
Abb. 40: BN-PAGE von TatA _d und TatA ₂₋₄₅	49
Abb. 41: GUVs mit rekonstituierten TatA ₂₋₄₅ und TatC _d	50
Abb. 42: Das Prinzip der 2c2f-sFCCS	52
Abb. 43: TatA _d C _d -GUVs mit rekonstituierten TatA _d -Atto647N und TatA _d -Alexa568	53
Abb. 44: GUVs mit rekonstituierten TatA _d -Atto647N, TatA _d -Alexa568, TatA _d und TatC _d nach Zugabe von SP-GFPuv.....	54
Abb. 45: Kreuz-Korrelationsmessung von TatA _d -Atto647N und TatA _d -Alexa568 in einem aktiven TatA _d C _d -GUV.....	55
Abb. 46: Kreuz-Korrelationsmessung von TatA _d -Atto647N und TatA _d -Alexa568 in einem inaktiven TatA _d C _d -GUV	56
Abb. 47: Kreuzkorrelationsdaten aus drei substratgefüllten und drei leeren GUVs	56
Abb. 48: Assemblierung von drei TatA _d <i>Hairpins</i>	59
Abb. 49: TatA _d Porenmodell	60
Abb. 50: Interaktionsmodell von Tat-Komponenten in <i>Aquifex aeolicus</i>	62
Abb. 51: Modell des Tat-Mechanismus nach Rodriguez et al.	63
Abb. 52: HPLC-Gradienten der TatA _d -Atto647N (A) und TatA _d -Alexa568 (B) Aufreinigung...92	92
Abb. 53: Autokorrelationsfunktion von Atto488	96
Abb. 54: Autokorrelationsfunktion von SP-GFPuv	97
Abb. 55: Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten TatA _d -Atto647N durch Absorptionsspektroskopie.....	98
Abb. 56: Autokorrelationsfunktion von Alexa568.....	99
Abb. 57: Autokorrelationsfunktion von TatA _d -Alexa568.....	100

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Proteinsekretion in Bakterien	1
1.2.	Das Tat-Proteinexportsystem.....	3
1.3.	Das Tat-Signalpeptid	5
1.4.	Die Komponenten des Tat-abhängigen Transports	6
1.4.1.	Die TatA (TatE) und TatB Struktur.....	6
1.4.2.	Die TatC Struktur.....	8
1.5.	Die Rolle der Tat-Komponenten im Translokationsprozess.....	10
1.6.	Das TatA _d C _d -System in <i>Bacillus subtilis</i>	13
2.	Aufgabenstellung	15
3.	Ergebnisse	16
3.1.	Selbstassemblierung von TatA _d über einen Charge Zipper Mechanismus	16
3.1.1.	Experimenteller Beweis der Charge Zipper Hypothese.....	20
3.1.2.	Darstellung von TatA _d Ladungsmutanten für den experimentellen Beweis der Charge Zipper Hypothese.....	20
3.1.3.	Das Oligomerisierungsverhalten der TatA _d Ladungsmutanten analysiert mittels Blue-Native PAGE	24
3.2.	Die Rolle der Transmembranhelix von TatA bei der Tat-Translokation.....	31
3.3.	Entwicklung eines <i>in vitro</i> Tat-Translokationsassays basierend auf TatA _d C _d aus <i>B. subtilis</i>	36
3.3.1.	Darstellung von SP-GFPuv.....	37
3.3.2.	Darstellung von fluoreszenzmarkiertem TatA _d	38
3.3.3.	Darstellung von TatC _d	42
3.3.4.	Tat-abhängiger Transport von SP-GFPuv in GUVs	43
3.3.5.	Untersuchung der TatA _d -TatA _d Interaktion in GUVs mittels Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie.....	51
4.	Diskussion	57
4.1.	TatA _d Assemblierung aufgrund des Charge Zipper Mechanismus.....	57
4.2.	Die Rolle der kurzen TatA _d -Transmembranhelix bei der Tat-abhängigen Translokation	61
4.3.	Der <i>B. subtilis in vitro</i> Translokationsassay	64
5.	Zusammenfassung	68
6.	Material und Methoden	70
6.1.	Material	70
6.1.1.	Geräte	70
6.1.2.	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	72
6.1.3.	Verwendete Stämme und Plasmide.....	75
6.1.4.	Primer.....	75

6.1.5. Proteinmarker.....	78
6.1.6. Enzyme	78
6.1.7. Fluoreszenzfarbstoffe	78
6.1.8. Verwendete Kits	79
6.1.9. Puffer, Medien und Lösungen.....	79
6.1.9.1. Medien und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	79
6.1.9.2. Puffer für SDS-PAGE	81
6.1.9.3. Puffer für Western Blot.....	82
6.1.9.4. Puffer für Blue-Native PAGE.....	83
6.1.9.5. Puffer für Proteinisolierung	84
6.1.9.6. Medien und Puffer für PhoD-Translokationsassay	85
6.1.10. Software	86
6.2. Methoden.....	86
6.2.1. Mikrobiologische Methoden	86
6.2.1.1. Steriltechnik	86
6.2.1.2. Animpfen einer Übernachtskultur.....	86
6.2.1.3. Ansetzen eines Glycerin-Stocks	86
6.2.1.4. Gießen von Agar-Platten	86
6.2.2. Molekularbiologische Methoden	87
6.2.2.1. Mutagenese.....	87
6.2.2.2. Transformation	88
6.2.2.3. Plasmidisolierung.....	89
6.2.3. Proteinbiochemische Methoden.....	89
6.2.3.1. Proteinexpression	89
6.2.3.2. Zellaufschluss.....	90
6.2.3.3. Nickel-Affinitätschromatographie	90
6.2.3.4. HPLC.....	91
6.2.3.5. Kovalente Fluoreszenzmarkierung von TatA _d	91
6.2.4. Analytische Methoden	92
6.2.4.1. SDS-Gelelektrophorese	92
6.2.4.2. Blue-Native PAGE	94
6.2.4.3. Western Blot	94
6.2.4.4. Massenbestimmung mittels MALDI-TOF	95
6.2.4.5. Konzentrationsbestimmung von SP-GFPuv mittels FCS.....	95
6.2.4.6. Konzentrationsbestimmung von fluoreszenzmarkiertem TatA _d	98
6.2.5. PhoD-Translokationsassay.....	100
6.2.6. GUV Präparation für den <i>in vitro</i> Translokationsassay.....	101
7. Literaturverzeichnis	102
Publikationsliste	
Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1. Proteinsekretion in Bakterien

In allen lebenden Organismen sind Proteine (von griechisch: *proteios* = erstrangig) eine der wichtigsten Grundbausteine des Lebens [1]. Sie setzen sich aus verschiedenen Aminosäurebausteinen zusammen, die durch Peptidbindungen zu langen Aminosäureketten chemisch verknüpft werden. Diese Proteinbiosynthese wird in der Zelle von hochmolekularen Proteinfabriken, den Ribosomen, bewerkstelligt. Dabei übersetzen Ribosome die genetische Information des kodierenden Gens in die Primärsequenz der Proteine. Ausgehend von der Primärstruktur können sich Proteine durch Wasserstoffbrückenausbildung zu Sekundärstrukturen wie α -Helix oder β -Faltblatt ausbilden. Durch weitere Wechselwirkungen wie van-der-Waals-Kräfte, kovalente Disulfidbrücken, polare Wechselwirkungen oder ionische Bindungen können sich Proteine zu komplexen dreidimensionalen Strukturen auffalten. Zudem können mehrere gefaltete Proteine der gleichen oder verschiedenen Spezies sich zu großen Komplexen assoziieren, die als Quartärstruktur bezeichnet wird.

Diese Strukturvariabilität der Proteine machen sie zu den vielseitigsten Biomolekülen in lebenden Organismen. Sie übernehmen wichtige Funktionen in der Zelle und sind an Prozessen wie Aufrechterhaltung der Zellstruktur, Signaltransduktion, Immunabwehr, Katalyse, Speicherung und Transport von Molekülen beteiligt. Dabei müssen viele Proteine die hydrophobe Barriere der Biomembran passieren um an den Bestimmungsort zu gelangen, wo sie ihre Aufgabe erfüllen können. Um diese Proteinsekretion zu bewerkstelligen werden besondere Membrantransportsysteme benötigt.

Grundsätzlich umfasst der Begriff Proteinsekretion den Prozess der Erkennung (*targeting*) vom translozierenden Protein anhand einer spezifischen Signalsequenz, das Heranführen (*docking*) an den Translokationskomplex und das Durchschleusen (*translocation*) des Proteins über die Membran.

In Bakterien existieren unterschiedliche Translokasen, die wichtige Proteine wie Enzyme und Virulenzfaktoren exportieren. Die zwei wichtigsten Haupttrouten über die Zytoplasmamembran stellen der generelle Sekretionsweg (Sec) und der Tat (*twin arginine translocation*) Weg dar (Abb. 1) [2-4].

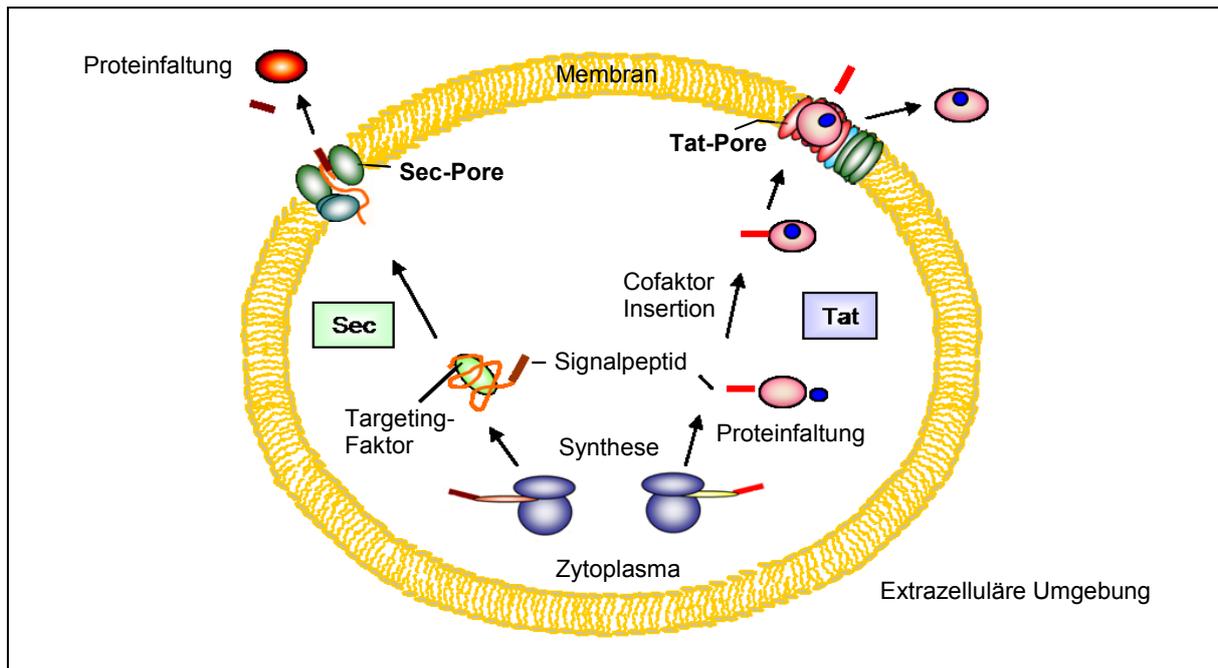


Abb. 1: Zwei Hauptwegen der Proteintranslokation. Über den Sec-Weg werden Proteine im ungefalteten Zustand durch eine Sec-Pore transloziert. Tat-abhängige Proteine nehmen hingegen schon im Zytosol ihre richtige Konformation ein. Die gefaltete Konformation ermöglicht cofaktorhaltigen Proteinen den Einbau des Cofaktors bereits im Zytoplasma. Anschließend können sie im gefalteten Zustand durch die Tat-Pore exportiert werden. Abb. verändert nach [4].

Der Sec-Translokationsweg wird durch die ATP Hydrolyse angetrieben. Hierbei werden Proteine im ungefalteten Zustand durch einen Sec-Transporter transloziert. Dieser Transporter kann durch einfache Konformationsänderung der Helices einen engen Kanal öffnen, in den eine Polypeptidkette mit dem Durchmesser von ca. 12 Å eingeführt werden kann [5-6]. Nachdem das Sec-abhängige Protein von dem Sec-Komplex erkannt und exportiert wurde, wird das N-terminale Signalpeptid von einer Peptidase abgespalten und das Protein kann seine funktionsfähige Konformation einnehmen. Bei cofaktorhaltigen Proteinen wird der Cofaktor mit Hilfe von Chaperonen, den Faltungshelfern, eingebaut. Dies geschieht bei Gram-negativen Bakterien vor allem im Periplasma. Um die periplasmatischen Proteine über die äußere Membran ins Medium zu sekretieren, bedarf es weiterer Exporttranslokasen des Typs I bis V [7].

Durch den Tat-abhängigen Transport werden Proteine im fertig gefalteten Zustand transloziert. Dabei kann die variable Tat-Pore einen Durchmesser von bis zu 70 Å annehmen [8]. Die Energie für den Tat-Translokationsprozess wird allein aus der protonenmotorischen Kraft gewonnen (ΔpH), die durch das Aufrechterhalten des Protonengradienten an der Membran entsteht [9-11]. Cofaktoren Tat-abhängiger Proteine werden bereits im Zytoplasma inseriert. Die Entlassung des gefalteten Proteins ins äußere Milieu erfolgt erst nach Abspaltung des N-terminalen Tat-Signalpeptids durch die Signalpeptidase I [12].

1.2. Das Tat-Proteinexportsystem

Das Tat-Translokationssystem wurde erstmals 1991 von Mould und Robinson in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten entdeckt [10]. Homologe Tat-Translokasen wurden später auch in Bakterien und Archaea gefunden [13-14]. Durch dieses ΔpH -abhängige Exportsystem werden gefaltete Proteine durch die Zytoplasmamembran geschleust.

Es gibt unterschiedliche Gründe weshalb bestimmte Proteine den Tat-Sekretionsweg einschlagen und nicht durch den generellen Sec-Weg transportiert werden. Zum einen weisen manche Proteine eine schnelle Faltungskinetik auf, sodass eine Translokation im ungefalteten Zustand durch den Sec-Weg ungünstig ist [15]. Oft werden dafür bestimmte zytoplasmatische Chaperone als Faltungshelfer benötigt, um eine korrekte Faltung der Proteine zu gewährleisten oder aber um den Einbau eines komplexen Cofaktors, wie im Falle der Trimethylamin-N-Oxid-Reduktase (Abb. 2 A), zu vermitteln [16-17]. Zum Beispiel werden die Proteine in vielen halophilen Archaea mit Hilfe von Chaperonen im Zytoplasma gefaltet, da sie sonst durch die hohe Salzkonzentration im Außenmedium aggregieren würden [18].

Ein weiterer Grund ist die Kontrolle der Metallionen-Inkorporation bei cofaktorhaltigen Proteinen. Durch die zytoplasmatische Insertion eines Cofaktors wird die Konzentration von konkurrierenden Metallionen aus dem Periplasma gesenkt. So gewährleistet der zytoplasmatische Einbau von Mn^{2+} -Ionen in das MncA Protein den Ausschluss eines Cu^{2+} -Einbaus im Periplasma (Abb. 2 B) [19]. Auch werden zum Beispiel Proteine mit einem Eisen-Schwefel-Cluster durch die zytoplasmatische Insertion vor einem Co^{2+} - oder Cu^{2+} -Einbau geschützt [20].

Einige Tat-abhängige Substrate, wie das SoxYZ Protein oder die DMSO Reduktase (*dimethyl sulfoxide reductase*), sind heterooligomere Proteinkomplexe (Abb. 2 C) [15, 21]. Erst wenn die Untereinheiten ihre richtige Konformation einnehmen, können sich diese zu einem Komplex zusammenfinden. Eine Untereinheit trägt das Tat-Signalpeptid, welches durch die Tat-Translokase erkannt und gemeinsam transportiert wird.

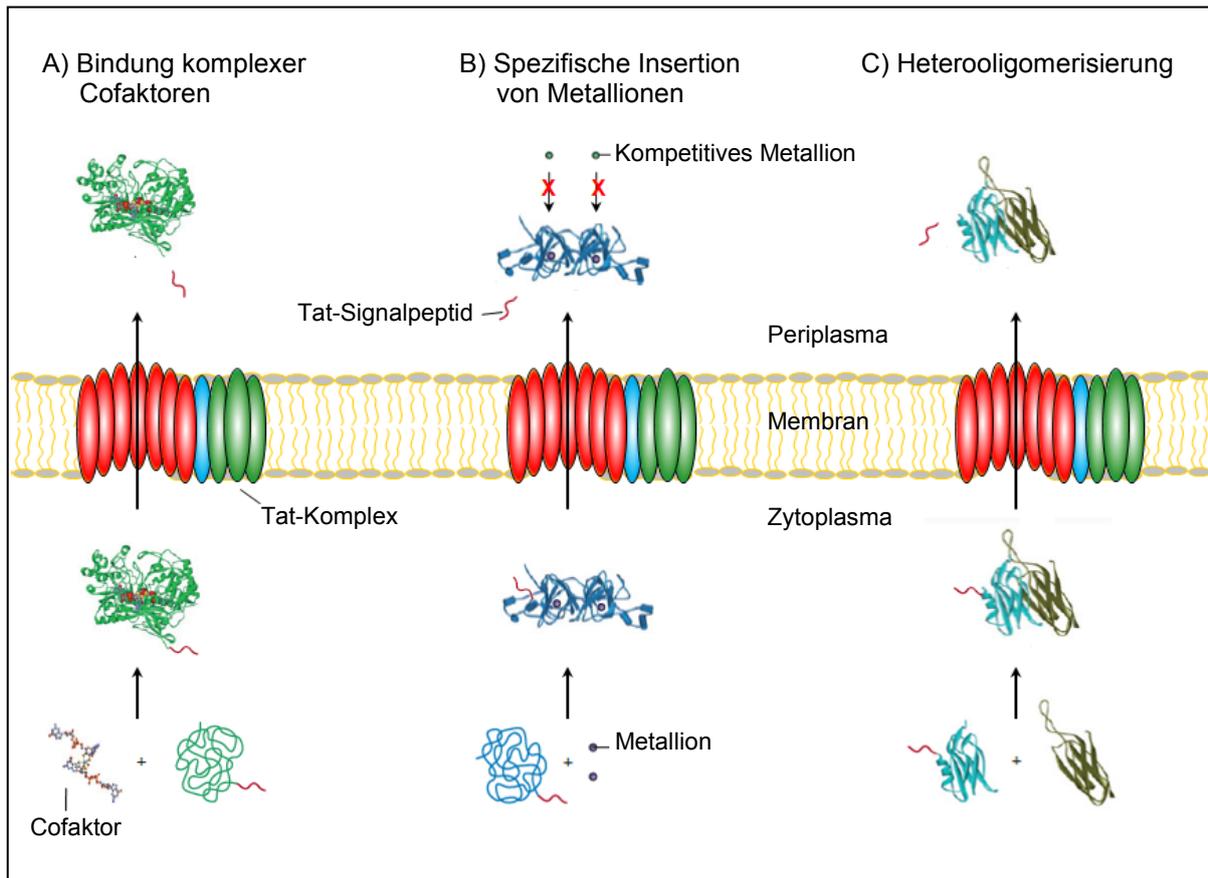


Abb. 2: Nutzung des Tat-Systems von verschiedenen Proteinkomplextypen. A) Insertion eines Molybdopterin-Cofaktors in die Trimethylamin-N-Oxid-Reduktase vor der Tat-Translokation. B) Kontrolle der Metallioneninsertion. Das Metallion Mn^{2+} wird in das periplasmatische Protein MncA bereits im Zytosol eingebaut, um die Insertion von kompetitiven Ionen im Periplasma zu verhindern. C) Heterooligomere Proteinkomplexe, wie das dargestellte SoxYZ, können sich im Zytosol zusammenlagern. Das Tragen von nur einem Tat-Signalpeptid an einer Untereinheit gewährleistet den Export des Heterooligomers durch die Tat-Schleuse. Abb. verändert nach [5].

Tat-abhängige Substrate spielen eine Schlüsselrolle in vielen zellulären Prozessen, wie Photosynthese [22], Zellatmung [23], Zellteilung [24], Zellmotilität [25-26], Stickstofffixierung [27] und Nahrungsbeschaffung [28]. Bei einigen human-pathogenen Bakterien wie *Mycobacterium tuberculosis*, enterohämorrhagische *E. coli* O157:H7 oder *Pseudomonas aeruginosa* stellt das Tat-System einen Virulenzfaktor dar und kann somit als Angriffsziel für die Entwicklung neuer antibakterieller Medikamente fungieren [29-30]. Aus der biotechnologischen und pharmazeutischen Sicht, ist der Tat-Weg ebenfalls von hohem Interesse, denn durch die Optimierung des bakteriellen Tat-Systems könnten rekombinante Proteine effizient und in hoher Ausbeute durch die anpassungsfähige Tat-Schleuse sekretiert werden [31].

1.3. Das Tat-Signalpeptid

Ein Signalpeptid setzt sich meist aus drei Domänen zusammen, der basischen N-terminalen Region gefolgt von einer hydrophoben H-Region und einer polaren C-Region am C-Terminus. Zwischen der N- und H-Region liegt beim Tat-Signalpeptid ein konserviertes Doppelarginin-Motiv, das in der Literatur oft mit der Konsensussequenz „SRRXFLK“ definiert wird. Neben den beiden hochkonservierten Argininen treten die restlichen Aminosäuren mit einer Wahrscheinlichkeit von über 50 % auf. Deswegen wurde in der Abb. 3 das Sequenzmotiv mit „R R X # #“ vereinfacht. Das X steht in den meisten Fällen für eine polare Aminosäure, an die sich zwei hydrophobe Aminosäuren (als # dargestellt) anschließen [32-34].

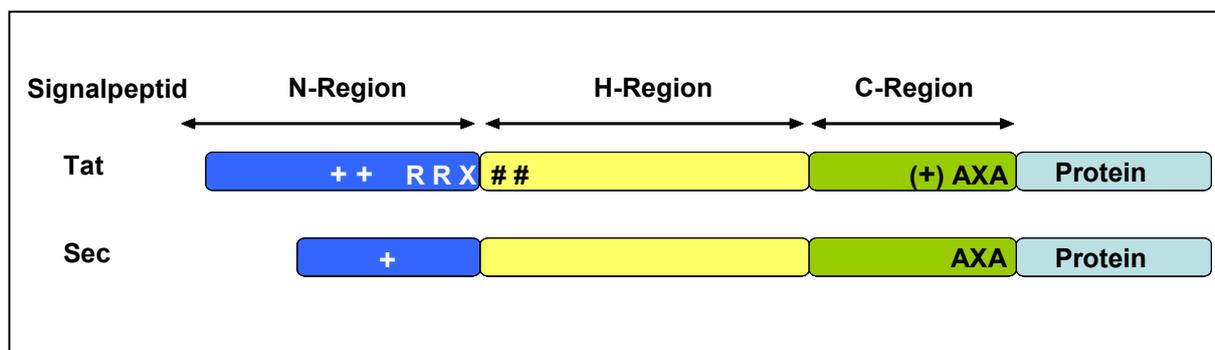


Abb. 3: Das Tat- und Sec-Signalpeptid. Beide Signalpeptide lassen sich in drei Bereiche aufteilen: eine basische N-Region, eine hydrophobe H-Region und eine C-Region mit der „AXA“ Signalpeptidase Erkennungssequenz. Das Plus stellt eine positiv geladene Aminosäure dar, das RR steht für das Doppelarginin-Motiv, das X für eine polare und # für eine hydrophobe Aminosäure. Abb. verändert nach [32].

Mutationen in dieser konservierten Sequenzregion können unterschiedliche Ausmaße in der Translokationseffizienz bewirken, vor allem die zwei Arginine sind nahezu invariant. Selbst durch eine Substitution durch zwei Lysine lässt sich der Translokationsvorgang nicht regenerieren [34]. Weitere Mutationsanalysen konnten jedoch zeigen, dass für die Tat-Route nicht allein das Konsensus-Motiv wichtig ist. Durch eine Erhöhung der Hydrophobizität in der N- oder H-Region wird das Tat-Substrat zum Sec-Weg rekrutiert [35]. Generell ist die Tat N-Region länger als vom Sec-Signalpeptid. Die Tat H-Region weist mehr Glycine auf, wohingegen in der Sec H-Region vermehrt Leucine auftreten. Die C-Region vom Tat-Signalpeptid ist im Vergleich zum Sec-Signalpeptid basischer. Diese basischen Aminosäuren scheinen die Interaktion mit der Sec-Maschinerie zu verhindern (*Sec-avoidance-motif*) [36]. Jedoch sind diese nicht notwendig für die Erkennung der Tat-Translokase. In der C-Region befindet sich ebenfalls eine Erkennungssequenz „AXA“ für die Signalpeptidase I, die das Signalpeptid vom Protein nach dem Transport abspaltet [12].

1.4. Die Komponenten des Tat-abhängigen Transports

Die Tat-Translokase besteht in Gram-negativen Bakterien sowie in Chloroplasten aus den Membranproteinen TatA, TatB und TatC (Tha4, Hcf106 und cpTatC in Pflanzen). Das TatA Protein wird als die porenbildende Untereinheit angesehen, da es eine Tendenz zur Bildung von Homooligomeren aufweist und in einem Überschuss zu den anderen Tat-Komponenten exprimiert wird [37-38]. In *E. coli* zum Beispiel werden die *tatA*-, *tatB*- und *tatC*-Gene konstitutiv im Verhältnis 50 (TatA) : 2 (TatB) : 1 (TatC) exprimiert [39]. TatC kann mit dem Tat-Signalpeptid und TatB interagieren, weshalb ihm die Rezeptorfunktion zugeschrieben wird und weiterhin scheint es die TatA Porenbildung zu induzieren [40-41]. Dem TatB Protein wird bisweilen eine Vermittlerrolle zwischen TatA und TatC zugewiesen.

Bei den meisten Gram-positiven Bakterien und Archaea besteht der Tat-Translokon nur aus den beiden Membranproteinen TatA und TatC, welche meist (im Gegensatz zu *E. coli*) substratspezifisch transportieren [4, 13]. Die Funktion der fehlenden TatB Komponente wird bei diesen Organismen durch das TatA Protein kompensiert [42]. Durch Mutationen am N-Terminus des Gram-negativen *E. coli* TatA konnte die Bifunktionalität eines Gram-positiven TatA Proteins hergestellt werden. Das mutierte TatA war in der Lage, die Funktion von TatB zu übernehmen und auszugleichen [43]. Zudem besitzt dieser Organismus ein TatE Protein, das zu TatA eine Sequenzhomologie von 53 % aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass beide Proteine die gleiche Funktion übernehmen. Jedoch wird TatA in einer 100 bis 200-fach höheren Menge exprimiert. Das TatE scheint demnach ein Resultat der Genduplikation von TatA zu sein, da es zudem monozystronisch transkribiert wird [39, 44-45]. Ein *knock-out* von *tatE* beeinträchtigt jedoch den Export von einigen Tat-abhängigen Substraten, somit ist das Protein eine aktive Tat-Komponente in *E. coli* [44]. Die *tatABCD*-Gene liegen dagegen auf einem konstitutiv aktiven Operon vor. Das zusätzlich vorhandene *tatD*-Gen codiert eine zytosolische Desoxyribonuklease, welche nicht am Tat-Export beteiligt ist [46].

1.4.1. Die TatA (TatE) und TatB Struktur

Strukturvorhersagen auf der Grundlage von Sequenzvergleichen zeigten eine ähnliche Struktur von TatA, TatE und TatB. Diese besteht am N-Terminus aus einem α -helikalen Transmembransegment (TMS), welches durch eine Hinge-Region mit einer amphiphilen α -Helix verbunden ist. Nach der amphiphilen α -Helix folgt ein langer unstrukturierter C-Terminus (Abb. 4) [47-49].

TatA aus *E. coli* besteht aus 89 Aminosäuren (9.6 kDa), das entsprechende TatB aus 171 Aminosäuren (18.5 kDa). TatB weist eine bis zu 20 %ige Sequenzidentität zu TatA auf [50-51]. Im Gegensatz zu TatA und TatE (siehe Kapitel 1.4.) sind die beiden Membranproteine TatA und TatB trotz der Homologie zwei funktionell verschiedene Proteine

[52]. Für TatB konnte gezeigt werden, dass der C-terminale Teil für die Funktion nicht relevant ist. Auch das am C-Terminus um 40 Aminosäuren verkürzte TatA Protein aus *E. coli* zeigte nur eine schwache Reduktion der Aktivität, solange ein azidisches „DDE“-Motiv direkt nach der amphiphilen Helix erhalten bleibt. Dieses ist für eine TatA Interaktion wichtig und somit für die Tat-Translokase Aktivität von hoher Bedeutung [53-54].

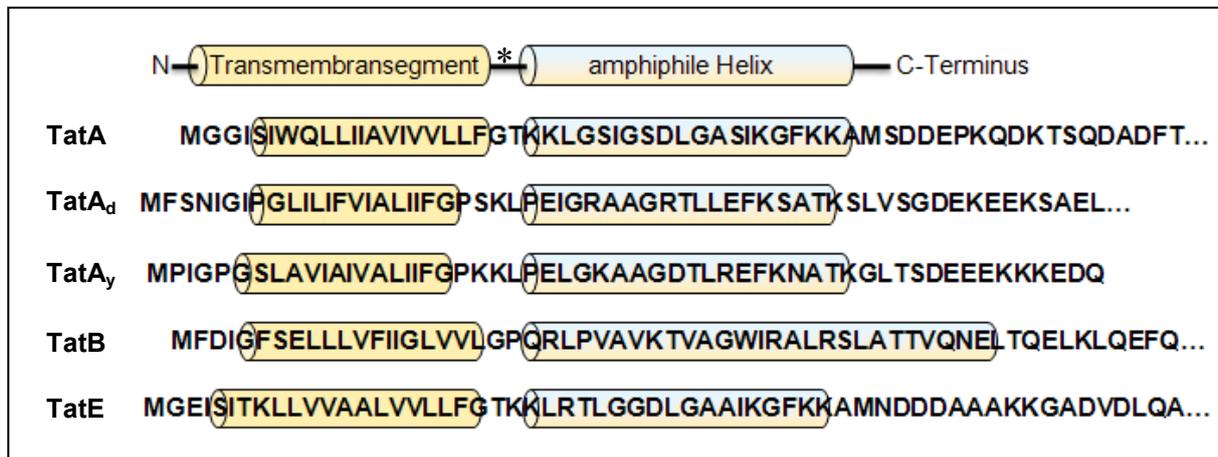


Abb. 4: N-terminales Sequenzalignment von TatA, TatB, TatE aus *E. coli* und TatA_d, TatA_y aus *B. subtilis*. Das Transmembransegment (TMS) ist über eine Hinge-Region (*) mit der amphiphilen α -Helix (APH) verbunden. Der C-Terminus scheint unstrukturiert vorzuliegen. TatA: 89 AS (9.6 kDa), TatA_d: 70 AS (7.3 kDa), TatA_y: 57 AS (6.0 kDa), TatB: 171 AS (18.5 kDa), TatE: 67 AS (7.0 kDa). Abb. verändert nach [51].

Die dreidimensionale Struktur des TatA_d Monomers aus *B. subtilis* wurde mit Hilfe der Flüssig-, und Festkörper-NMR-Spektroskopie aufgeklärt (Abb. 5), wobei die lokale Struktur aus Flüssig-NMR-Daten und die Membranorientierung aus Festkörper-NMR-Daten gewonnen wurde [49, 55-56]. Das Protein nimmt durch die Hinge-Region zwischen der TMS und APH eine L-förmige Struktur in einer Lipidumgebung ein. Ein in DMPC-Bicellen rekonstituiertes TatA₂₋₄₅ Proteinfragment, zeigte eine um 13° geneigte TMS und eine ungewöhnliche APH Orientierung in der Lipiddoppelschicht. Durch das kurze TMS wurde ein Teil der APH in die Membran gezogen. Dabei ragten einige geladene Aminosäurereste der APH in die hydrophobe Lipiddoppelschicht anstatt in die wässrige Umgebung, was nur durch die Ausbildung von intramolekularen Salzbrücken in diesem verkürzten TatA-Fragment erklärt werden kann.

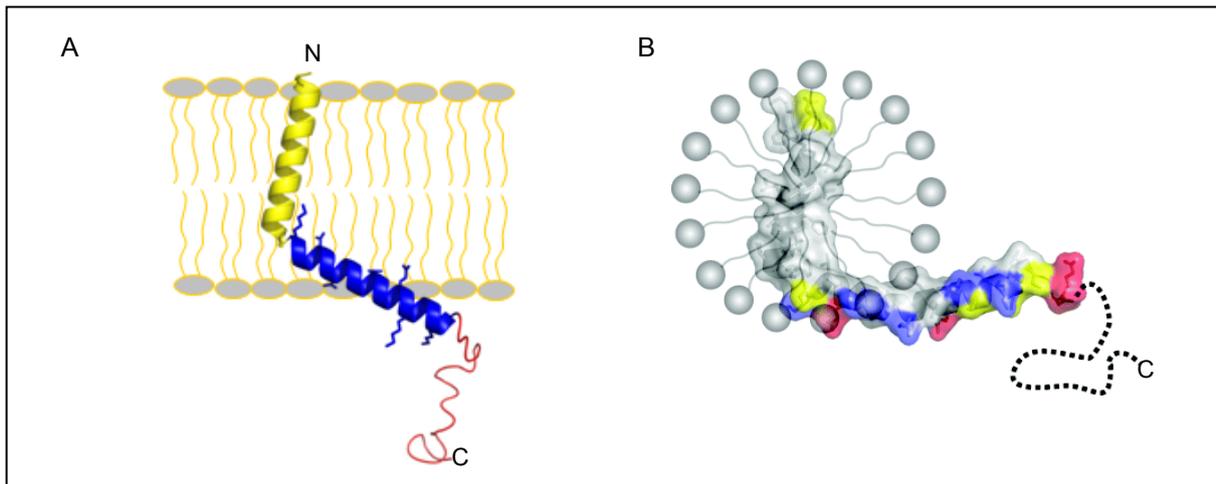


Abb. 5: Die TatA_d Struktur. A) TatA_d 3D-Strukturmodell aus experimentellen Festkörper-NMR Daten. TatA_d rekonstituiert in DMPC-Bicellen (gelb: hydrophobes Transmembransegment, blau: amphiphile α -Helix, rot: unstrukturierter C-Terminus. Abbildung verändert nach [56]. B) TatA_d 3D-Strukturmodell in DPC-Micellen aus Flüssig-NMR Daten. Abb. übernommen aus [55].

Die Topologie des TatA Proteins in der Zellmembran wird kontrovers diskutiert. Studien über die TatA Zugänglichkeit für Proteasen und Oxidantien deuteten auf eine periplasmatische Ausrichtung des N-Terminus hin [57-58]. Dagegen sprechen aber Cystein-Crosslinking Studien und die Ergebnisse der Ausrichtung von TatA Proteinen, welche mit topologischen Markerproteinen fusioniert waren [59-60]. Vermutlich kann sich die Orientierung des N-Terminus während des Transportvorgangs ändern.

1.4.2. Die TatC Struktur

Das Membranprotein TatC besteht in *E. coli* aus 258 Aminosäuren (28.9 kDa). Anhand von Sequenzanalysen konnte eine Struktur mit sechs Transmembranhelices vorhergesagt werden (Abb. 6 A). Diese Annahme stützt ein topologisches Mapping durch Thiol-Markierung, bei dem TatC einer Cystein-Scanning Mutagenese unterzogen wurde und eine weitere Studie basierend auf TatC Fusionsproteinen mit topologischen Markerproteinen [61-62].

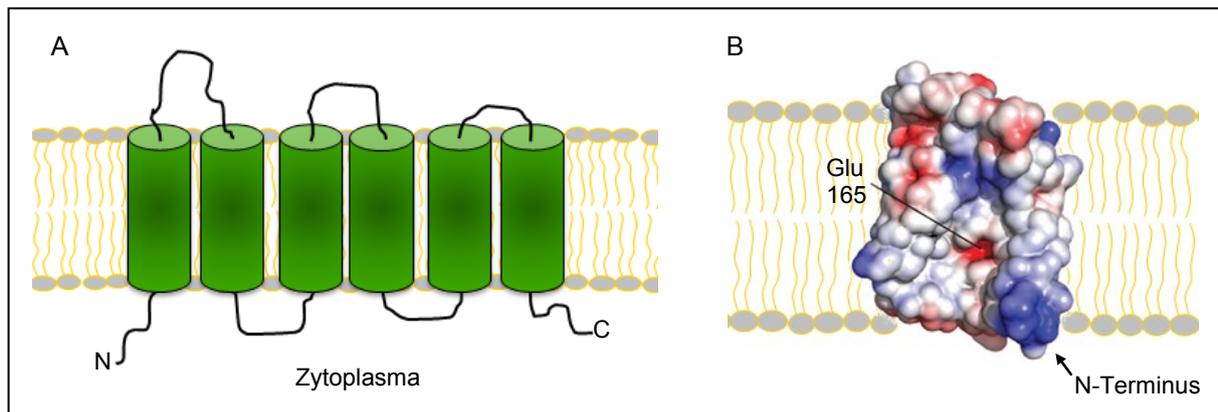


Abb. 6: Die TatC Struktur. A) Anhand der Sequenzanalyse und experimentellen Daten besteht das *E. coli* TatC aus 6 Transmembranhelices. Abb. verändert nach [51]. B) Die Kristallstruktur von TatC aus *Aquifex aeolicus* zeigt eine Baseballhandschuhförmige Proteinstruktur mit einer konkaven Tasche in der Mitte. In der gezeigten elektrostatische Oberfläche sind die negativ geladenen Regionen in rot und die positiven in blau dargestellt. Ungewöhnlich sind die geladenen Aminosäuren (z.B. Glutaminsäure 165) in der konkaven Tasche, welche in der hydrophoben Membran eingebettet sind. Der Pfeil markiert den N-Terminus, an der es zu einer Interaktion mit dem Tat-Signalpeptid kommen kann. Abb. verändert nach [63].

Vor kurzem wurde die TatC Kristallstruktur des thermophilen Bakteriums *Aquifex aeolicus* aufgeklärt (Abb. 6 B) [63]. Die Sequenzidentität zu TatC aus *E. coli* beträgt 40 %. Die Kristallstruktur zeigte ein Baseballhandschuhförmiges TatC Protein, dessen Flexibilität in der Membran eingeschränkt ist. Der in der Membran eingebettete hydrophobe Kern des Proteins besitzt eine konkave Tasche, die mit geladenen Aminosäuren ausgekleidet ist. Diese Struktur ist sehr ungewöhnlich für ein Membranprotein, da das Auftreten von polaren oder geladenen Aminosäuren in einer hydrophoben Umgebung energetisch ungünstig ist. Rollauer et al. stellten daraufhin eine Hypothese auf, in der die konkave Einkerbung eine mögliche Interaktionsstelle für die TatA-Transmembranhelix darstellt.

Mutationsanalysen in TatC konnten für bestimmte Aminosäuren am N-Terminus und im ersten zytoplasmatischen Loop (zwischen der zweiten und dritten Transmembranhelix) eine Interaktion zum Tat-Signalpeptid zeigen [64-65] (in Abb. 6 B wird der Bereich durch einen Pfeil markiert). Anhand TatC-TatB Interaktionsstudien, soll TatB an der C-terminalen Seite mit TatC eine Bindung eingehen können.

1.5. Die Rolle der Tat-Komponenten im Translokationsprozess

TatA ist ein kleines Membranprotein, das eine hohe Affinität zur Selbstassemblierung aufweist. Die Größe von isolierten TatA Komplexen variieren zwischen 100 und 700 kDa [66-67]. In Blue-Nativ PAGE Analysen konnten TatA Oligomerbanden detektiert werden, die sich aufgrund der Interaktion zwischen TatA Monomeren ausgebildet hatten [66]. In mehreren Studien wurde beobachtet, dass TatA zum Tetramer assoziiert und sich für den Transportvorgang zu höheren Homooligomere assemblieren kann. Für eine Homooligomerisierung sind die APH und ein konserviertes azidisches „DDE“-Motiv von Bedeutung [54, 57-58, 68-70]. Wegen der starken Tendenz zur Selbstassoziation und der Tatsache, dass TatA in einem hohen Überschuss zu den anderen Tat-Komponenten vorliegt, ist es wahrscheinlich, dass es sich hierbei um die porenbildende Einheit der Tat-Translokase handeln muss. Dazu passend konnten elektronenmikroskopische Aufnahmen ringförmiger TatA Homooligomere visualisiert werden, die eine Größe zwischen 130-390 kDa und einen Kanalinnendurchmesser von 3 bis 7 nm zeigten (Abb. 7 A) [38]. In einer Lipiddoppelschicht rekonstituierten TatA₄ Proteine aus *Bacillus subtilis* zeigten ebenfalls 10 nm große Aggregate [71]. Das TatA kann aber auch mit TatB homogene Komplexe mit einem Innendurchmesser von 6 nm bilden [37]. Bei Anwesenheit von TatC konnten *in vivo* tubuläre *E. coli* TatA Strukturen detektiert werden, die einen Innendurchmesser von 6.7 nm aufwiesen [72]. Wurde TatA₄ in *E. coli* überexprimiert, so konnten 150-250 kDa große lösliche Partikel im Zytosol beobachtet werden [71]. Diesen Ergebnissen zufolge scheint TatA die Fähigkeit zu besitzen, variable Poren durch Selbstassemblierung auszubilden, die sich dem Substrat anpassen können.

Dem TatB Protein wird eine Vermittlerrolle zwischen den TatA Proteinen und dem Rezeptorprotein TatC zugeschrieben. Das Protein kann sowohl mit TatA interagieren als auch ein TatBC Komplex bilden [37]. Zudem scheint es ebenfalls die Tendenz zur Homooligomerisierung zu besitzen. Dies zeigte sich in Crosslinking-Studien in denen Dimere bis Pentamere des TatBs detektiert werden konnten [68, 73]. In *E. coli* bindet das TatB an TatC in einer 1:1 Stöchiometrie [41]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten ovalförmige TatBC Komplexe mit einem Durchmesser von 10 nm (Abb. 7 B) zeigen. Das entspricht 6 bis 8 sich zusammenlagernden TatBC Dimeren [74]. Dabei könnte das TatC einen peripheren Ring ausbilden, in dessen Zentrum sich das TatB befindet [73]. In dieser Komposition kann der TatBC Komplex zwei Präkursor-Proteine binden (siehe Abb. 7 B) [74-75]. Zudem konnte beobachtet werden, dass TatC auch mit sich selbst dimerisieren kann [62].

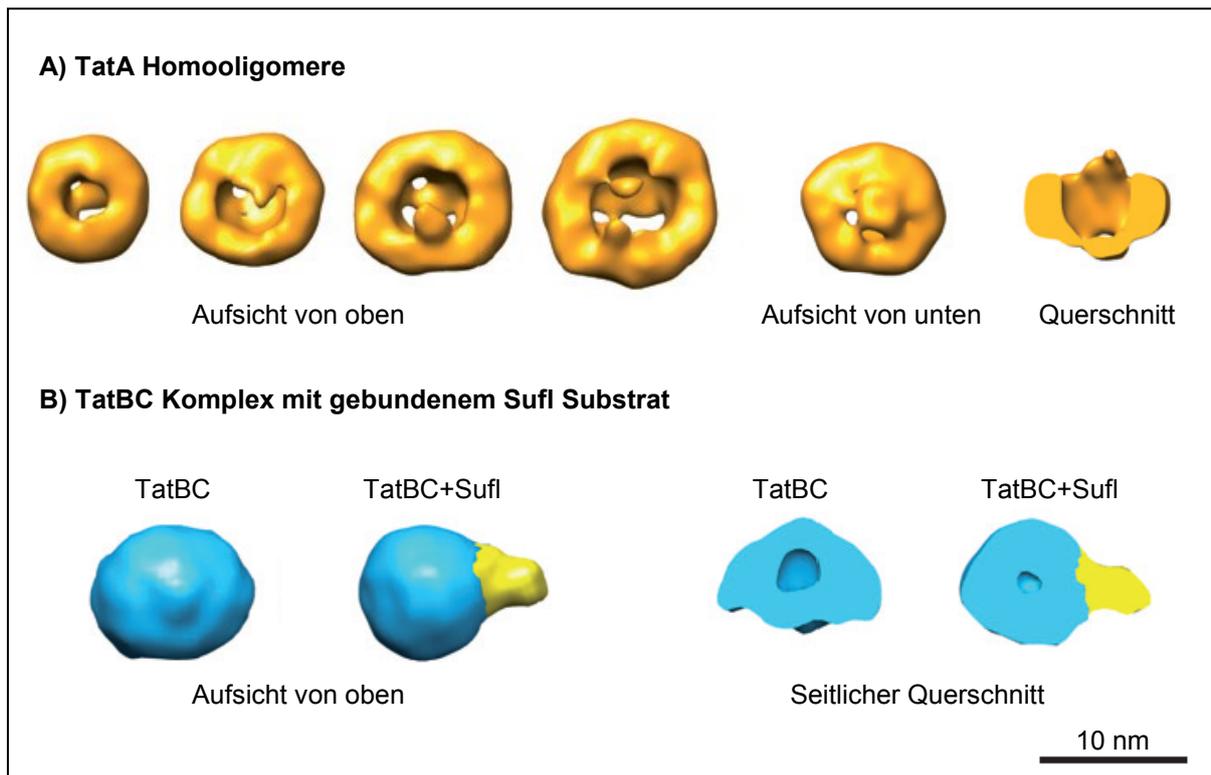


Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen. A) TatA Homooligomere. B) TatBC Komplexe mit und ohne Substratprotein Sufl. Abb. verändert nach [5].

In Abb. 8 ist ein Modell der Tat-Translokation in *E. coli* dargestellt. Im ersten Schritt ist die Bindung des Tat-Signalpeptids an den TatBC Komplex gezeigt [40, 76]. TatC kann das Doppelarginin-Motiv vom Signalpeptid erkennen und es an seinem N-terminalen Bereich binden [65], die anschließende H-Region des Signalpeptids kann dadurch mit dem an TatC gebundenen TatB interagieren [77-79].

Hat ein TatBC Dimer ein Präkursor-Protein gebunden, so wird die TatA Assemblierung an den BC Komplex veranlasst [69-70], dabei können sich bis zu 24 TatA Untereinheiten anlagern [80]. Diese TatABC Assoziation ist von der protonenmotorischen Kraft abhängig (Abb. 8, Schritt 2) [81]. Nachdem sich die Tat-Translokase assembliert hat, kann das Substrat durch die Tat-Pore geschleust werden (Abb. 8, Schritt 3). Ob für die Sekretion des Substrats ebenfalls Energie in Form von PMK benötigt wird, ist bislang unklar. Nach der Substratentlassung zerfällt der TatABC Komplex wieder in seine Untereinheiten (Abb. 8, Schritt 4).

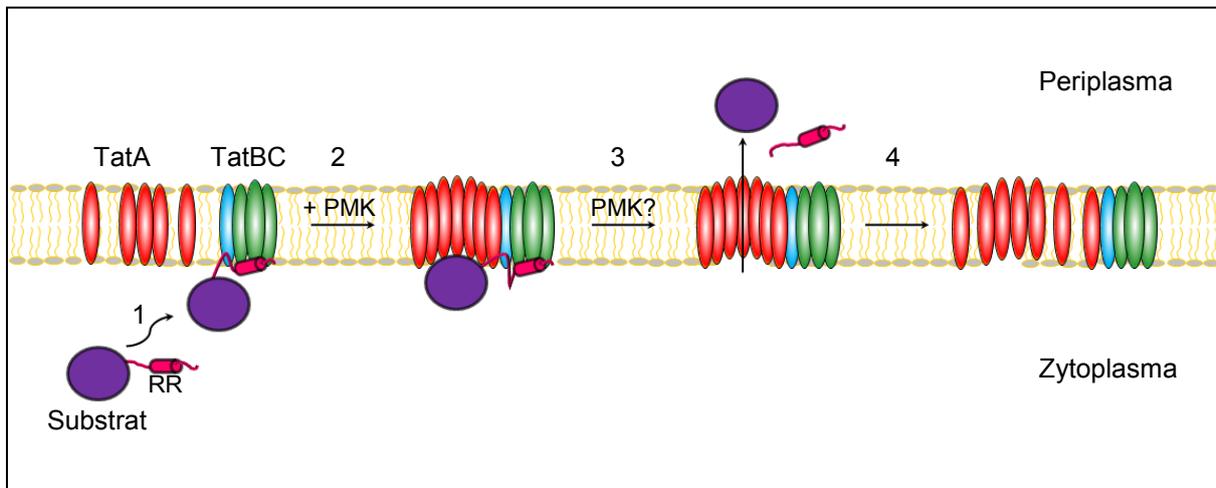


Abb. 8: Modell der Tat-Translokation in *E. coli*. 1) Tat-Signalpeptid Bindung vom TatBC Komplex. 2) Rekrutierung von TatA an den ternären TatBC/Substrat Komplex, dieser Vorgang ist abhängig von der protonenmotorische Kraft (PMK). 3) Die TatA Assemblierung schreitet voran bis das Tat-Translokon vollständig ausgebildet ist und das Substrat transloziert werden kann. 4) Nach dem Export zerfällt der Tat-Komplex wieder in seine Untereinheiten. Abb. verändert nach [5].

Insgesamt betrachtet stellt die Tat-Translokase eine komplexe Maschinerie dar, die mit wenigen Komponenten eine Vielzahl an Funktionen erfüllt:

- Die Erkennung und Bindung eines Tat-abhängigen Substrats
- Die Rekrutierung und Assemblierung der Tat-Komponenten zu einer variablen Pore
- Die Nutzung der protonenmotorischen Kraft für den Translokationsprozess
- Aufrechterhaltung der Ionenundurchlässigkeit der Membran

Obwohl viele intensive Studien am Tat-System durchgeführt wurden, konnte bislang die Struktur der Tat-Pore nicht aufgeklärt werden. Weder der Assemblierungsvorgang der TatA Untereinheiten, noch die Rolle von TatB im TatBC Komplex sind ausreichend verstanden. Ebenfalls ungewiss ist die Nutzung der protonenmotorischen Kraft eines Tat-Translokons. Um den genauen Translokationsmechanismus zu verstehen sind somit noch weitere Studien notwendig.

1.6. Das TatA_dC_d-System in *Bacillus subtilis*

Im Gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* existieren zwei minimale Tat-Translokasen, die nur aus den Membranproteinen TatA und TatC bestehen [42]. Zum einen die TatA_YC_Y-Translokase, welche eine Eisen-abhängige Peroxidase (YwbN) aus der Zelle schleust, zum anderen die TatA_dC_d-Translokase, welches spezifisch das Enzym Phosphodiesterase-D (PhoD) unter Phosphatmangel ins Medium sekretiert (Abb. 9) [82-83]. Weiterhin wurde ein zusätzliches *tatA_c*-Gen in diesem Organismus gefunden, für welches jedoch kein dazugehöriges TatC Protein identifiziert werden konnte. Eine Funktion in der Tat-Translokation konnte für dieses TatA_c Protein ebenfalls nicht nachgewiesen werden [84]. Obwohl durch Sequenzanalysen 69 Substratproteine mit einem Tat-Signalpeptid identifiziert wurden, konnte nur der Export von YwbN und PhoD in *Bacillus* experimentell bestätigt werden [85].

In *B. subtilis* wird die Sekretion von PhoD durch eine Zwei-Komponenten Phosphorylierungskaskade reguliert. Durch die Limitierung der Phosphatkonzentration im Medium wird das Membran-Sensorprotein PhoR phosphoryliert. Das aktivierte PhoR phosphoryliert daraufhin das zytosolische PhoP Protein.

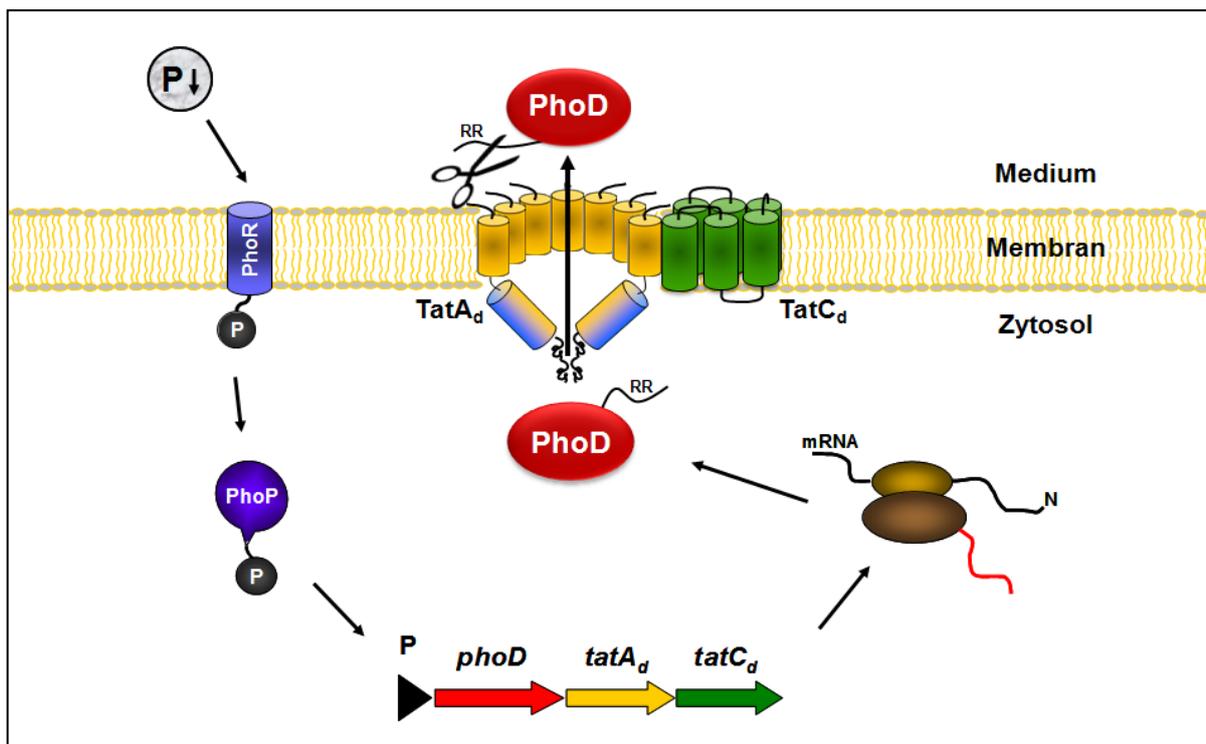


Abb. 9: PhoD Translokation in *B. subtilis*. Unter Phosphatmangel wird eine Phosphorylierungskaskade von PhoR und PhoP in Gang gesetzt, die die Transkription der *tat*-Gene induziert. Die Gene für *phoD*, *tatA_d* und *tatC_d* befinden sich auf einem Operon. Nach der Expression werden die TatA_dC_d Komponenten in die Membran integriert. Die TatA_dC_d-Pore transloziert prePhoD, eine Signalpeptidase spaltet das Signalpeptid ab und das PhoD wird ins Medium sekretiert. Abb. verändert nach [32].

Das PhoP Protein kann nun seine Aufgabe als Transkriptionsfaktor wahrnehmen, indem es den Tat-Promotor zur Transkription der Gene induziert, dabei liegen die Gene der Tat-Komponenten zusammen mit ihrem Substrat auf einem Operon [32, 86]. Die exprimierten TatA_d und TatC_d Proteine werden anschließend in die Membran eingebaut. Nun kann die TatA_dC_d-Translokase das prePhoD Substrat erkennen und durch die Pore transportieren. Schließlich wird das PhoD ins Medium sekretiert, nachdem eine Signalpeptidase, die sich auf der Membranaußenseite befindet, das Signalpeptid erkennt und abspaltet.

Neue Studien belegen, dass die TatA_dC_d-Pore auch in der Lage ist das YwbN Protein zu transportieren, wenn dieses überexprimiert wird [84]. Durch die Expression des TatA_dC_d-Systems in *E. coli* konnten weitere Tat-abhängige Proteine (TorA, AmiA, DmsA und MdoD) durch diesen Transporter transloziert werden [42, 87]. Eine andere Studie konnte zeigen, dass die Umweltbedingungen einen Einfluss auf die Spezifität der Tat-Translokase in *B. subtilis* nehmen. Bei geringen Salzkonzentrationen im Medium wurde der Export des YwbN Substrats nur durch das TatA_yC_y-Translokon vermittelt. Bei hohen Salzkonzentrationen hingegen ist sowohl TatA_y als auch TatA_d am Transport beteiligt und ein Teil von YwbN wurde sogar Tat-unabhängig transportiert [88-90].

2. Aufgabenstellung

Die Tat-Translokase verfügt über die besondere Eigenschaft gefaltete Proteine durch die Membran zu transportieren. Obwohl sich das Translokon nur aus wenigen Proteinkomponenten (TatA(B)C)) zusammensetzt, konnte die Struktur der Tat-Pore bislang nicht aufgeklärt werden. Auch der genaue Tat-Translokationsmechanismus ist noch weitgehend unbekannt.

Am Anfang dieser Studie wurde im Arbeitskreis von Prof. Anne S. Ulrich eine neue Hypothese ausgearbeitet, die den Selbstassemblierungsmechanismus von TatA zu einer Pore erklären könnte. Aufgrund der TatA Strukturdaten und der genauen Betrachtung der TatA Aminosäuresequenz konnte ein komplett neues Assemblierungsmodell für Membranproteine aufgestellt werden. Dieses „Charge Zipper“ Modell beschreibt die Verbrückung von Transmembransegmenten über eine Reihe von Salzbrücken in einer hydrophoben Umgebung [91]. Das Protein TatA besitzt ein hochkonserviertes Motiv komplementärer Ladungen zwischen der amphiphilen Helix und der direkt benachbarten Region. Eine Salzbrückenausbildung zwischen den Proteinen würde zum einen die TatA Monomere verbrücken und zum anderen die geladenen Aminosäuren neutralisieren, sodass diese in die Membran eintauchen können. Hierdurch würde sich die Porenöffnung erklären lassen, welche es erlaubt das gefaltete Proteinsubstrat nach außen zu schleusen. Somit war das erste Ziel dieser Arbeit die TatA Selbstassemblierung via Charge Zipper mit experimentellen Beweisen zu belegen. Dafür sollten spezifische TatA Mutanten hergestellt werden, in denen die postulierten Salzbrücken zuerst unterbunden und dann wieder regeneriert werden. Das Oligomerisierungsverhalten dieser Mutanten sollte unter nativen Bedingungen analysiert werden.

Der kurzen TatA-Transmembranhelix wird eine wichtige Rolle im Translokationsprozess zugeschrieben. Zum einen wird diese für eine Störung der Lipiddoppelschicht verantwortlich gemacht, die den Durchtritt des Substrats erleichtern soll und zum anderen wird sie als möglicher Interaktionspartner zu TatC postuliert [63, 92]. Die zweite Zielsetzung dieser Arbeit bestand deshalb darin, den Einfluss der außergewöhnlich kurzen TatA-Transmembranhelix auf den Tat-Transport aufzuklären. Für diesen Zweck sollten spezifische TatA Mutanten mit einer veränderten Transmembranhelix hergestellt und auf die Transportfunktionalität mithilfe eines *in vivo* Translokationsassays in *B. subtilis* untersucht werden.

Um weitere Aufschlüsse über den Mechanismus der Tat-abhängigen Translokation zu gewinnen, sollte ein *in vitro* Translokationsassay generiert werden, der mit Hilfe von Fluoreszenzspektroskopie visualisiert werden kann. Dafür sollte TatA mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und ein fluoreszierendes Tat-abhängiges Substrat hergestellt werden. Zudem sollten Bedingungen gefunden werden, die es erlauben eine funktionsfähige Tat-Translokase in große Lipidvesikel zu rekonstituieren.

3. Ergebnisse

3.1. Selbstassemblierung von TatA_d über einen Charge Zipper Mechanismus

Das TatA_d Protein aus *Bacillus subtilis* besteht aus 70 Aminosäuren (Abb. 10). Nach genauer Betrachtung der Aminosäureabfolge konnte ein Ladungsmuster innerhalb der Primärsequenz entdeckt werden [91]. Die Ladungen der amphiphilen Helix (APH) sind komplementär zu einer direkt benachbarten hochgeladenen Region, welche als *densely charged region* (DCR) bezeichnet wird.

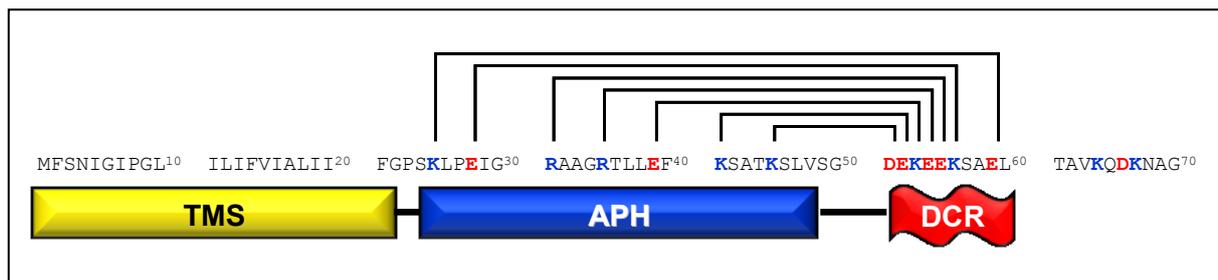


Abb. 10: Das komplementäre Ladungsmotiv in TatA_d aus *B. subtilis*. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von TatA_d. An das hydrophobe Transmembransegment (TMS in gelb) grenzt die überwiegend positiv geladene amphiphile Helix (APH in blau) und die vorwiegend negativ geladene DCR (*densely charged region* in rot). Markiert sind die komplementär geladenen Aminosäuren, die zusammen eine Salzbrücke ausbilden könnten. Insgesamt wäre die Ausbildung von sieben Salzbrücken möglich. Abb. übernommen aus [91].

Um auszuschließen, dass es sich nur um eine zufällig komplementäre Ladungsverteilung in TatA_d handelt, wurde ein Abgleich der Ladungsverteilung von TatA Proteinen aus verschiedenen Organismen durchgeführt (Abb. 11). In allen TatA Proteinen sowie TatE aus *E. coli* und dem pflanzlichen Homolog Tha4 ist ein intrinsisch komplementäres Ladungsmuster zwischen der APH und DCR-Region zu beobachten, jedoch nicht in TatB und seinem Homolog Hcf106. Dabei wird deutlich, dass die APH immer überwiegend positiv geladen ist und die DCR-Region vor allem eine negative Ladung trägt. Die Nettoladung der Proteine ist jedoch trotz dieser auffallend vielen Ladungen für ein Membranprotein meist neutral (Ausnahme *H. influenzae*). Die Ladungsverteilung zwischen der APH und DCR könnte zu einer Interaktion der beiden Segmente durch komplementäre Salzbrückenausbildung führen. Die azidische DCR-Region des Proteins kann die basische Nettoladung der APH durch das Eingehen von Salzbrücken ausgleichen. Somit wäre das Eintauchen der assemblierten Segmente als „Hairpin“-Struktur in eine hydrophobe Lipiddoppelschicht möglich. Diese Art der Assemblierung wird als „Charge Zipper“ Mechanismus bezeichnet. In *B. subtilis* TatA_d wären dafür die Ausbildung von sieben Salzbrücken nötig (siehe Abb. 10).

Name	Ladungssequenz entlang der APH [und TMS]	Ladungssequenz entlang der DCR [und C-Terminus]	K/R	D/E	Netto
<i>B.subtilis_TatA_d</i>	+ . - . + . + . + . + . + .	- - - + - - - + - - - [. + . - +]	7/2	2/6	+1
<i>B.subtilis_TatA_y</i>	+ + . - . + . + . + . + . + .	- - - - - + - - - + + - - -	8/1	3/6	0
<i>E.coli_TatA</i>	+ + . - . + . + . + . + .	- - - - - + - - - + - - - [- . + . - + . - . - . + . - - . + + . - + + . - + -]	12/1	10/4	-1
<i>E.coli_TatE</i>	[- . +] + + . + . - . + . + . + .	- - - - - + + - - - - - - + [. + -]	10/1	6/3	+2
<i>V.cholerae_TatA</i>	+ + . + . - . + . + . + .	- - - - - + - - - - - [. + . - + . - . + + - + -]	11/1	4/7	+1
<i>Y.pestis_TatA</i>	+ + . - . + . + . + . + .	- - - - - + - - - - - [. + . - + . + . - - . + . - + -]	10/1	6/5	0
<i>S.enterica_TatA</i>	+ + . - . + . + . + . + .	- - - - - + - - - - - [. - . + . - + . - . + + - - - . + . - + -]	13/0	10/3	0
<i>H.pylorii_TatA</i>	+ + . - . + . + . + . + . + .	- - - - - - - + - - - - - + - - - [. + . - . - . + + . -]	12/0	3/8	+1
<i>A.tumefaciens_TatA</i>	+ + . - . + . + . + . + . + .	- - - - - - - + - - - - - + - - - [. +]	8/1	6/3	0
<i>P.aeruginosa_TatA</i>	[- . +] + + . + . - . + . + . + .	- - - - - - - + - - - - - + - - - [. + . - - . + + -]	9/3	7/5	0
<i>H.influenzae_TatA</i>	+ + . + . - . + . + . + . + .	- - - - - + + - - - - - + - - - [. - . + + . + + + + - + . +]	13/4	4/5	+8
<i>M.tuberculosis_TatA</i>	+ + . - . + . + . + . + . - . + .	- - - . + - - - - - + - - - - - [. +]	5/5	3/6	+1
<i>P.sativum_Tha4</i>	... [- . +] + + . - . + . + . + .	- - - - - + + - - - - - + - - - [- . - . - + . - . + . + -]	13/4	1/12	+4
<i>E.coli_TatB</i>	[- . - .] + . + . + . + . - . - . + . - . - . + + . - + . - . + . - . - . + . - . + . - . - . + .		13/5	8/16	-6
<i>P.sativum_Hcf106</i>	... [- . +] + . - . + . + . + . - . + - . - . + - . + . - . + - . - . + . - . - . + . - . - . + . - . - . + . - . - . + .		20/8	7/20	+1

Abb. 11: Das komplementäre Ladungsmotiv in TatA Proteinen. Übersicht der Ladungsverteilung entlang der APH (TMS in Klammern) und DCR (C-Terminus in Klammern). Die komplementären Ladungen sind farblich markiert, blau für basische und rot für azidische Aminosäuren. Ein Plus steht für eine positive, ein Minus für eine negative Aminosäure und ein Punkt für eine beliebige Anzahl von Aminosäuren zwischen den Ladungen. Links ist die Anzahl der basischen (R, K) und azidischen (D, E) Aminosäuren, sowie die gesamte Nettoladung des Proteins zusammengefasst. In TatB aus *E. coli* und dem pflanzlichen Homolog Hcf106 ist ein Ladungsmotiv nicht zu erkennen. Abb. übernommen aus [91].

Im TatA_d Protein würde bei einer α-helikalen Faltung der APH (bestehend aus 21 Aminosäuren) und einer β-Faltblatt-Struktur der DCR (bestehend aus 9 Aminosäuren) jedes dieser Segmente eine Länge von 31.5 Å aufweisen, was der typischen Dicke einer Membran entspricht. Die APH könnte sich also mit der DCR wie ein Reißverschluss, bestehend aus Salzbrücken, zusammenlagern. In einem *Helical Wheel Plot* der APH sind zwei räumlich getrennte Ladungspatches ersichtlich, die aus sieben geladenen Aminosäuren bestehen. Ein 2er *Patch* bestehend aus den Aminosäuren K41, K45 und ein 5er *Patch* mit den Aminosäuren E39, R35, R31, E28, K25 (Abb. 12). Betrachtet man das Ladungsmuster auf der flachen Projektion der APH Oberfläche so wird deutlich, dass der 5er und 2er Patch durch das hydrophobe L38 und S42 getrennt sind. Das hydrophobe L38 könnte die flexible DCR daran hindern sich an die eigene APH anzulegen und nur mit ihr eine Wechselwirkung einzugehen. Durch diese beiden Ladungsgruppen könnten sich mehrere TatA_d Monomere verbinden, indem sich die DCR entlang der APH ausrichtet und sowohl mit der eigenen als auch mit benachbarter APH Salzbrücken ausbildet.

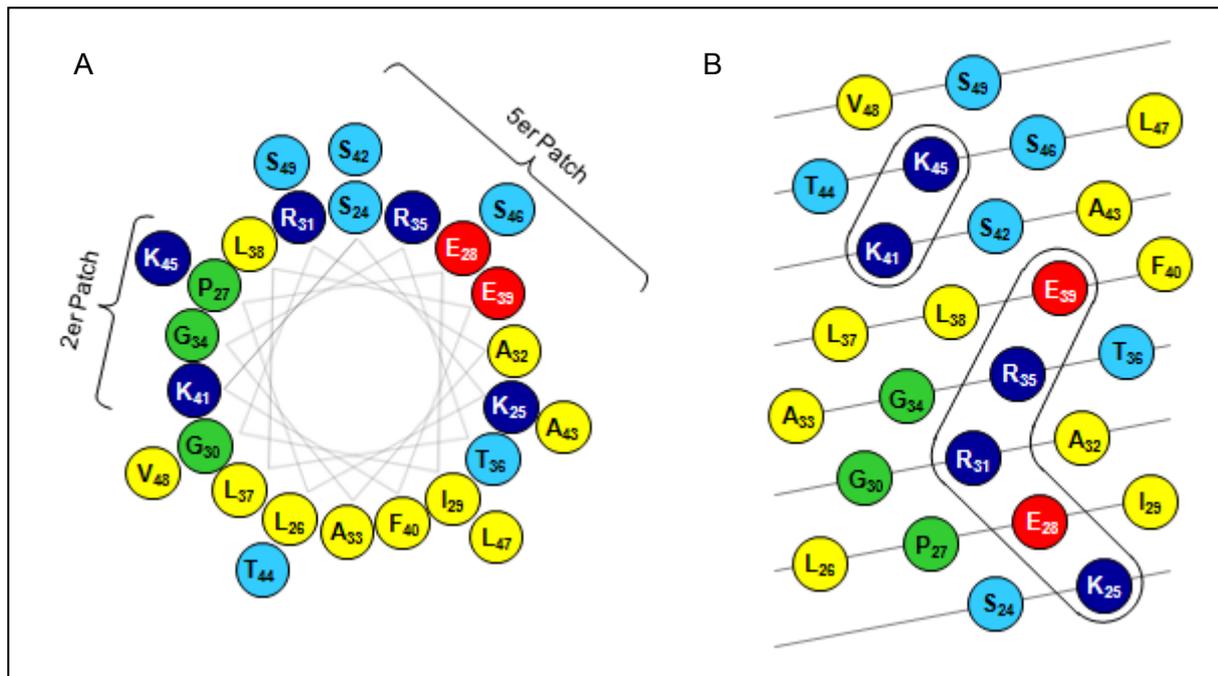


Abb. 12: A) Helical Wheel Plot der APH. B) Flache Projektion der APH-Oberfläche. Die zwei Ladungspatches sind in A und B markiert. Farbcode der Aminosäuren: gelb = hydrophob, grün = Helixbrecher, hellblau = polar, dunkelblau = positiv geladen, rot = negativ geladen. Abb. übernommen aus [91].

Es besteht somit die Möglichkeit, dass die $TatA_d$ Assemblierung zu einer Pore durch Ausbildung von fünf inter- und zwei intramolekularen Salzbrücken oder aber auch durch zwei inter- und fünf intramolekularen Salzbrücken zwischen der APH und DCR-Region zustande kommen könnte. Welche der beiden Möglichkeiten zutrifft, muss erst durch experimentelle Daten bestimmt werden. In Abb. 13 ist die Salzbrückenausbildung zwischen APH und DCR dargestellt, wie sie in den experimentellen Daten (siehe unter Kapitel 3.1.3) gefunden wurde. Es wird postuliert, dass ein *Hairpin* durch zwei intramolekulare Salzbrücken (K41:E52 und K45:D51) stabilisiert wird, während mehrere *Hairpins* sich durch fünf intermolekulare Salzbrücken zwischen $APH_{(i)}$ und der benachbarten $DCR_{(i+1)}$ assemblieren können (K25_(i):E59_(i+1), E28_(i):K56_(i+1), R31_(i):E55_(i+1), R35_(i):E54_(i+1) und E39_(i):K53_(i+1)). Durch die frei rotierbare C β -C γ Bindung der Aminosäurereste entlang des DCR- β -Faltblattes, könnten sich die geladenen Aminosäuren nach rechts oder links zur nächstgelegenen komplementär geladenen Aminosäure, entweder zur eigenen oder benachbarter APH, ausrichten. Dadurch entsteht auch keine Torsion der DCR- β -Faltblattstruktur.

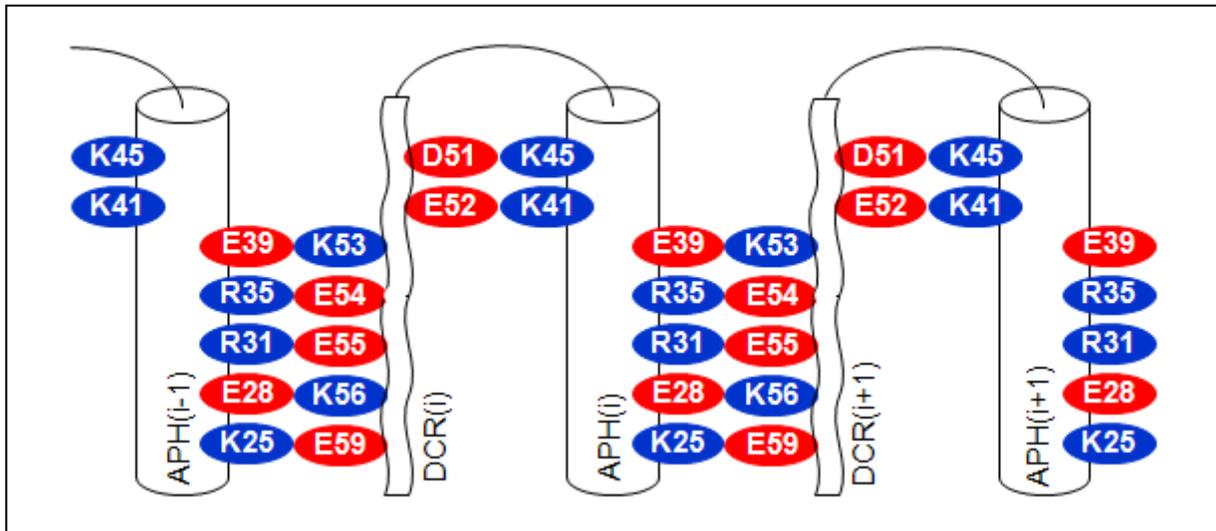


Abb. 13: Postulierte Salzbrückenausbildung in $TatA_d$. Durch zwei intramolekulare Salzbrücken könnten sich die DCR (i) und APH (i) stabilisieren, während fünf intermolekulare Salzbrücken zwischen APH (i) und dem benachbarten DCR (i + 1) zur Assemblierung einer $TatA_d$ -Pore führen könnten. Abb. übernommen aus [91].

Der postulierte Charge Zipper Mechanismus lässt genug Freiraum für die Spekulation einer möglichen $TatA_d$ Porenbildung. In Abb. 14 ist eine $TatA_d$ Assemblierung in der Membran mittels Charge Zipper Mechanismus dargestellt. Die mit der TMS in der Membran verankerten $TatA_d$ Proteine könnten sich durch die Salzbrückenausbildung zwischen APH und DCR zusammenlagern. Diese assemblierten $TatA_d$ Proteine wären in der Lage eine Palisade zu errichten, wobei sich die APH-DCR *Hairpins* auf der Membranoberfläche ausdehnen und eine hydrophile Plattform für eine Interaktion mit dem Tat-Substrat bilden. Die Palisade könnte sich um das Substrat spiralisieren und eine kreisförmige Pore bilden. Diese Pore könnte sich durch das Eintauchen der Palisade in die Membran öffnen, wobei die Transmembransegmente eine hydrophobe Pore in der Membran bilden und die eingetauchten APH-DCR Segmente das hydrophile Innere der Pore auskleiden. Durch diesen postulierten „Charge Zipper“ Mechanismus wäre es möglich die Tat-abhängige Porenbildung mit variabler Größe zu erklären.

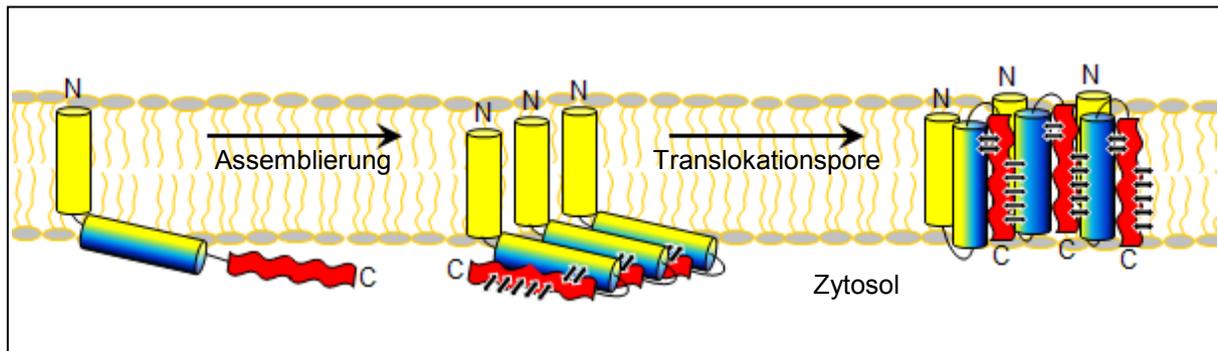


Abb. 14: Postulierte TatA_d Porenbildung durch einen Charge Zipper Mechanismus. Durch die Ausbildung von Salzbrücken zwischen APH und DCR könnten sich TatA_d Proteine zu Oligomeren zusammenlagern. Diese TatA_d Palisade wäre in der Lage in die Membran einzutauchen und diese zu durchspannen. Dadurch würde sich ein hydrophober peripherer Ringes aus TMS bilden, während die APH und DCR Segmente das Innere der Pore hydrophil Auskleidung würden. Abbildung verändert nach [91].

3.1.1. Experimenteller Beweis der Charge Zipper Hypothese

Das Ziel der folgenden Experimente war die Erbringung erster experimenteller Beweise für die Charge Zipper Hypothese. Die Idee bestand darin, jede einzelne postulierte Salzbrücke in den TatA_d Homooligomeren erst durch Ladungsabstoßung zu zerstören und dann wieder zu generieren. Für eine Ladungsabstoßung sollten Aminosäuren innerhalb eines postulierten Ladungspaares ausgetauscht werden und für eine Wiederherstellung die Position der zwei Aminosäuren innerhalb eines Ladungspaares vertauscht werden. Diese Ladungsmutanten sollten durch Mutagenese hergestellt und dann mittels Blue-Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) auf das Oligomerisierungsverhalten untersucht werden.

3.1.2. Darstellung von TatA_d Ladungsmutanten für den experimentellen Beweis der Charge Zipper Hypothese

Für den experimentellen Beweis der TatA_d Assemblierung durch den Charge Zipper Mechanismus wurden verschiedene spezifische Ladungsmutanten hergestellt. Die Mutationen wurden mittels einem „QuikChange II Site-Directed“ Mutagenese Kit eingefügt und die anschließend erhaltenen TatA_d Mutanten in *E. coli* BL21 Zellen überexprimiert. Vor der Zellernte wurde die optischen Dichte bestimmt, um Proben mit der gleichen Zellmenge für die SDS-PAGE zu preparieren. Die Expressionsrate der Ladungsmutanten sind in den folgenden SDS-Gelen dargestellt (Abb. 15 bis Abb. 18). Zu Beginn sollte untersucht werden wie sich das TatA_d Oligomerisierungsverhalten ändert, wenn jeweils eine der postulierten Salzbrücken zerstört wird. Dafür wurden Ladungsabstoßungsmutanten hergestellt, in denen jeweils eine der sieben postulierten Salzbrücken zerstört wurde. Dabei wurde eine

Aminosäure der APH bzw. der DCR innerhalb eines postulierten Ladungspaars mutiert, so dass die zwei gleich geladene Aminosäuren gegenüberstehen.

In Abb. 15 A ist exemplarisch die K53E Ladungsabstoßungsmutante dargestellt. Hier wurde das positiv geladene Lysin (K) gegen eine negativ geladene Glutaminsäure (E) an der Position 53 ausgetauscht, welches sich mit der gegenüberliegenden negativ geladenen Glutaminsäure E39 abstoßen sollte. Die Salzbrücke sollte sich dadurch nicht mehr ausbilden können und die Selbstassemblierung geschwächt werden.

Solche Ladungsabstoßungsmutanten wurden für alle sieben postulierten Salzbrücken hergestellt. In Abb. 15 B ist die Expressionsrate der Ladungsabstoßungsmutanten gezeigt. Es ist zu erkennen, dass alle bis auf die K25E Mutante gut exprimierten. Auffällig ist, dass Mutanten, die in der Aminosäureposition 53 und 56 mutiert sind, höher im SDS-Gel laufen. Dies lässt sich auf eine Konformationsänderung der Proteine zurückführen, welche durch die Mutation möglicherweise hervorgerufen wird.

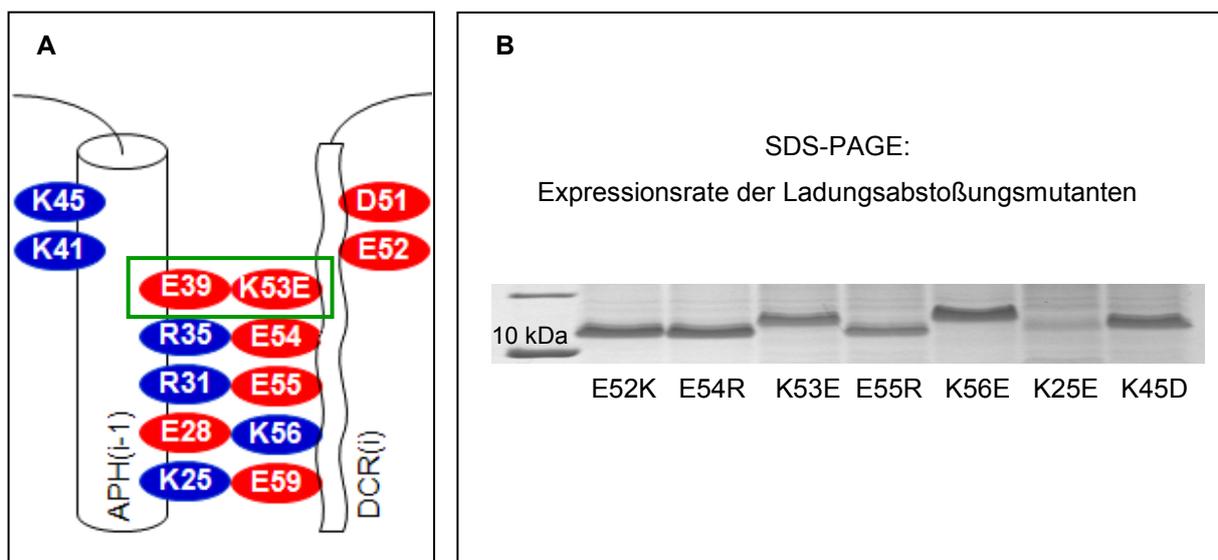


Abb. 15: Ladungsabstoßungsmutanten. A: K53E Mutante. Das mutierte Ladungsabstoßungspaar ist grün umrandet. B: SDS-Gel der Ladungsabstoßungsmutanten zur Überprüfung der Expressionsrate. Alle Ladungsabstoßungsmutanten, mit Ausnahme der K25E, exprimieren sehr gut.

Durch eine weitere Mutation sollte nun auch die Ladung der zweiten Aminosäure innerhalb der Salzbrücke umgekehrt werden. Hierdurch sollte sich die Salzbrücke wieder ausbilden können, weshalb die entsprechenden Mutanten als Ladungswiederherstellungsmutanten bezeichnet werden. In Abb. 16 A ist wieder exemplarisch die E39K-K53E Mutante dargestellt. Hier wurde auf Grundlage der Ladungsabstoßungsmutante K53E, die negativ geladene Glutaminsäure 39 in ein positiv geladenes Lysin mutiert, was die Ausbildung einer Salzbrücke wieder erlauben würde. Für sechs von sieben postulierten Salzbrücken konnten Ladungswiederherstellungsmutanten produziert werden und alle zeigten eine gute Expressionsrate (Abb. 16 B).

Nur für die Salzbrücke K25:E59 wurde keine Ladungswiederherstellungsmutante hergestellt, da bereits die K25E Ladungsabstoßungsmutante eine sehr schwache Expression aufwies.

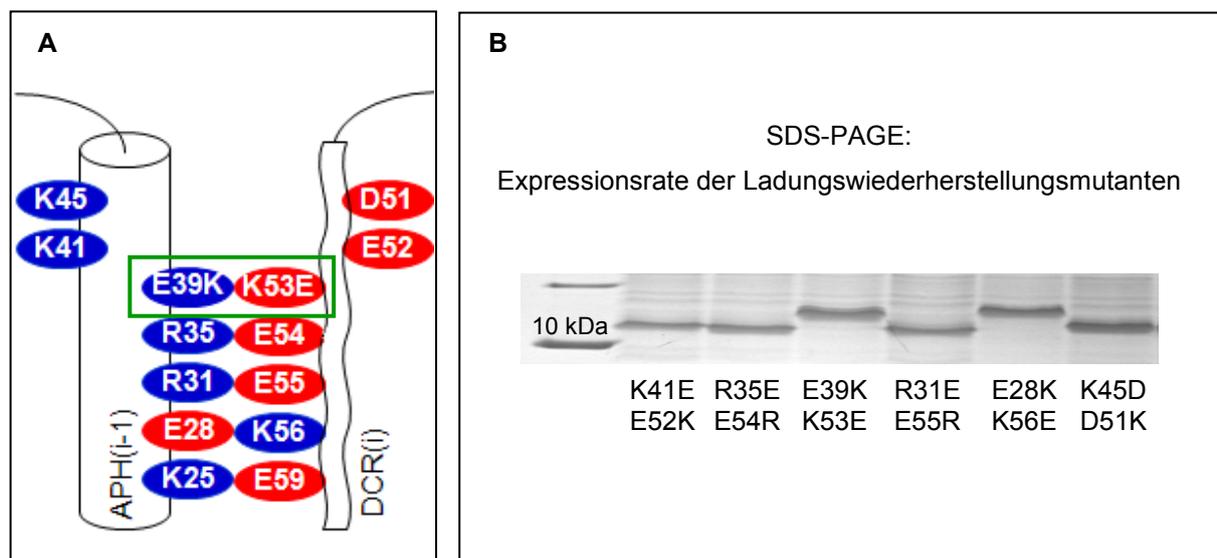


Abb. 16: Ladungswiederherstellungsmutanten. A: E39K-K53E Mutante. Das Ladungswiederherstellungspaar ist grün umrandet. B: SDS-Gel der Ladungswiederherstellungsmutanten zur Überprüfung der Expressionsrate. Alle sechs Ladungswiederherstellungsmutanten zeigen eine gute Expression.

Die bisherigen Ladungsabstoßungsmutanten verändern die Nettoladung des Proteins, was das Oligomerisierungsverhalten unerwünscht beeinflussen könnte. Aus diesem Grund wurden die Nachbarschaftsumkehrmutanten hergestellt, welche die Nettoladung des Proteins nicht verändern. Bei diesen Mutanten werden zwei der postulierten Salzbrücken zerstört, indem man alle benachbarten Ladungen entlang der Primärsequenz miteinander vertauscht. Dies ist wieder exemplarisch für die K53E-E54R Mutante in Abb. 17 A gezeigt. Das positiv geladene Lysin 53 wird in die negativ geladene Glutaminsäure mutiert und gleichzeitig wird in der benachbarten Salzbrücke die negativ geladene Glutaminsäure 54 in das positiv geladene Arginin ausgetauscht. Somit wird die Nettoladung nicht beeinflusst und zwei postulierte Salzbrücken zerstört. In Abb. 17 B sind die Expressionsraten der Mutanten dargestellt. Sieben von acht Nachbarschaftsumkehrmutanten konnten gut exprimiert werden. Die K25E-E28K Mutante zeigte eine etwas schwächere Expressionsrate. Wie auch schon aus der Expressionsrate in Abb. 15 B ersichtlich wurde, scheint eine K25E Mutation einen negativen Effekt auf die Proteinexpression zu bewirken.

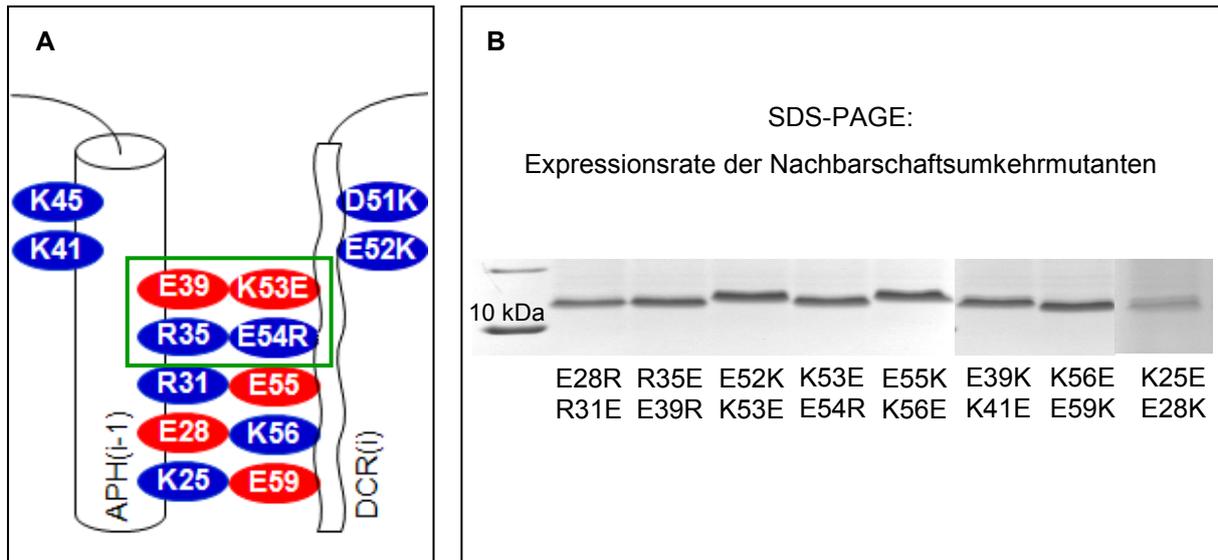


Abb. 17: Nachbarschaftsumkehrmutanten. A: K53E-E54R Mutante. Durch die Mutation erfolgt eine Repulsion von zwei Ladungspaaren (grün umrandet). Die Nettoladung des Proteins wird nicht beeinflusst. B: SDS-Gel der Nachbarschaftsumkehrmutanten zur Überprüfung der Expressionsrate. Sieben von acht Nachbarschaftsumkehrmutanten zeigen eine gute Expression. Die K25E-E28K exprimiert etwas schwächer.

Während in den Nachbarschaftsumkehrmutanten zwei Salzbrücken zerstört wurden, sollten auch Mutanten hergestellt werden, bei denen alle inter- bzw. alle intramolekularen Salzbrücken unterbunden werden.

In der Mutante K53E/E54R/E55R/K56E/E59K wurden alle postulierten intermolekularen Salzbrücken zerstört (Abb. 18 A), während für die Repulsion der beiden postulierten intramolekularen Salzbrücken die Mutanten D51K-E52K und K41E-K45D erstellt wurden (Mutationen auf der DCR bzw. APH, siehe Abb. 18 B). In Abb. 18 C ist die Expressionsrate der Komplettabstoßungsmutanten gezeigt aus der ersichtlich wird, dass alle drei Mutanten exprimiert werden konnten.

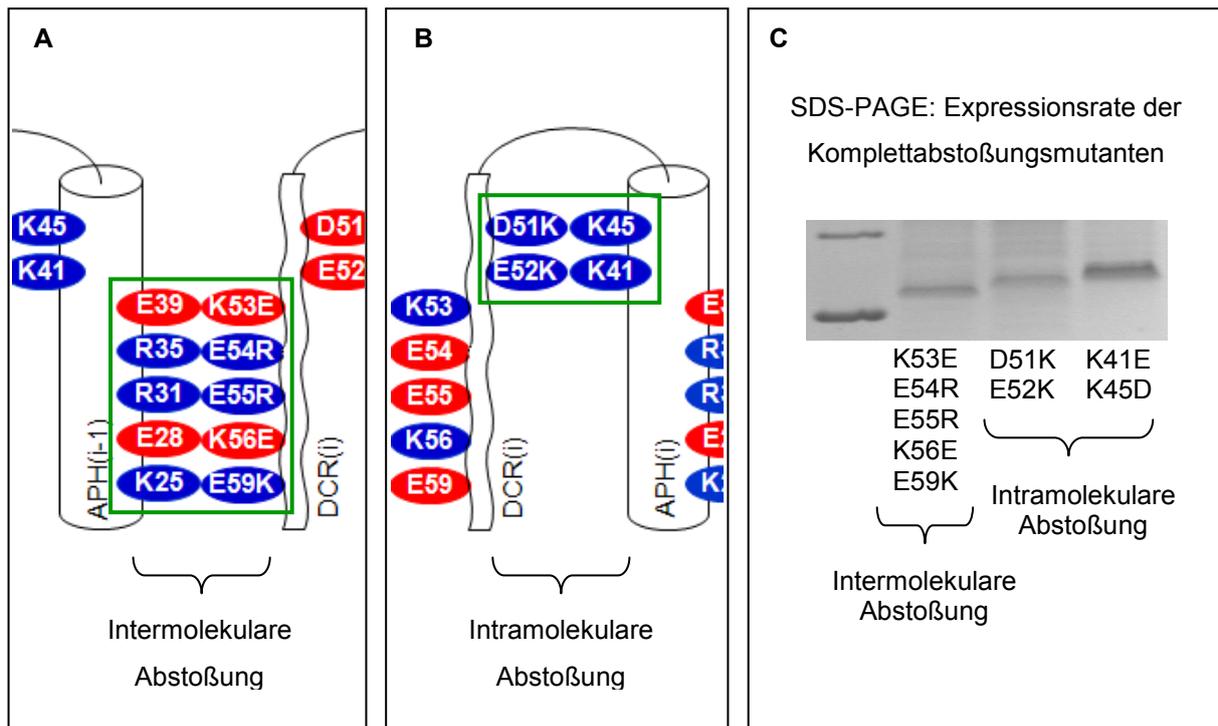


Abb. 18: Inter- und intramolekulare Komplettabstoßungsmutanten. A: Intermolekulare Komplettabstoßungsmutante. B: Intramolekulare Komplettabstoßungsmutanten (D51K-E52K). C: SDS-Gel der Komplettabstoßungsmutanten zur Überprüfung der Expressionsrate. Alle Komplettabstoßungsmutanten konnten exprimiert werden.

3.1.3. Das Oligomerisierungsverhalten der TatA_d Ladungsmutanten analysiert mittels Blue-Native PAGE

Nachdem erfolgreich alle Ladungsmutanten (außer K25E) exprimiert werden konnten, sollte das Oligomerisierungsverhalten mittels der Blue-Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) geprüft werden.

Die BN-PAGE ist eine Methode zur nativen Auftrennung von Membranproteinen, wobei die nativen Proteinkomplexe mit einem milden, nichtionischen Detergens aus der Membran herausgelöst werden. Nach Zugabe von Coomassie-Blue, welcher an die Proteinkomplexe bindet, erhalten diese eine negative Ladung und können durch Elektrophorese nach ihrer Größe auftrennen werden.

Die TatA_d Ladungsmutanten wurden in *E. coli* BL21 Zellen überexprimiert. Nach Zellernte und Aufschluss wurden die Membranen isoliert und durch Zugabe von Dodecylmaltosid solubilisiert. Dadurch konnten die Membranproteinkomplexe weitgehend unter nativen Bedingungen aus der Membran herausgelöst und per BN-PAGE aufgetrennt werden. Anschließend wurden die TatA_d Oligomere mithilfe von Western Blot detektiert.

Die Western Blots aller Ladungsmutanten sind in Abb. 19 und Abb. 20 dargestellt. Die unterste Proteinbande stellt das TatA_d Monomer dar und die weiteren Banden zeigen verschiedene TatA_d Oligomere. Dieses charakteristische TatA Oligomer-Bandenmuster wurde auch in anderen Studien beobachtet [38, 66, 93].

Um eine quantitative Aussage über das Assemblierungsverhalten der Mutanten treffen zu können, wurde das Verhältnis von Monomer (M) zu Oligomer (O) bestimmt und mit dem TatA_d Wildtyp verglichen. Zur Berechnung der jeweiligen M/O Verhältnisse wurde ein Intensitätsprofil erstellt. Die daraus erhaltene M/O Werte sind unter dem Intensitätsprofil des Western Blots angegeben. Liegt der M/O Wert wesentlich höher als der vom TatA_d Wildtyp, so disassembliert diese Mutante verstärkt zum Monomer aufgrund der Ladungsabstoßung innerhalb der postulierten Salzbrücke. In rot sind Mutanten markiert, bei denen eine verstärkte Disassemblierung durch die Beeinflussung der intermolekularen Salzbrücken beobachtet wurde. In Abb. 19 erkennt man bei den Ladungswiederherstellungsmutanten E39K-K53E und E28K-K56E eine stark überladene Proteinbande. Aufgrund dessen wurde die Proteinmenge im BN-Gel angepasst. Das BN-PAGE Ergebnis dieser Mutanten mit verringerter Proteinmenge ist in Abb. 19 C dargestellt. Zum Vergleich wurden die dazugehörigen Ladungsabstoßungsmutanten mit aufgetragen, damit diese als interne Referenz genutzt werden konnte.

Um eine bessere Übersicht über das Oligomerisierungsverhalten der Ladungsmutanten zu bekommen, wurden die Ergebnisse der Blue-Native PAGE in Balkendiagrammen zusammengefasst (Abb. 21/ Abb. 22/ Abb. 23), an denen auch die BN-Ergebnisse erklärt werden. Dabei ist zu erwähnen, dass im Balkendiagramm aus Abb. 21 die berechneten M/O Werte der beiden wiederholenden Ladungswiederherstellungsmutanten folgendermaßen angepasst wurden (exemplarisch an E39K-K53E gezeigt):

$$[\text{E39K-K53E (Wiederholung)} \times \text{K53E}] / [\text{K53E (Wiederholung)}] = \text{M/O Wert von E39K-K53E}$$

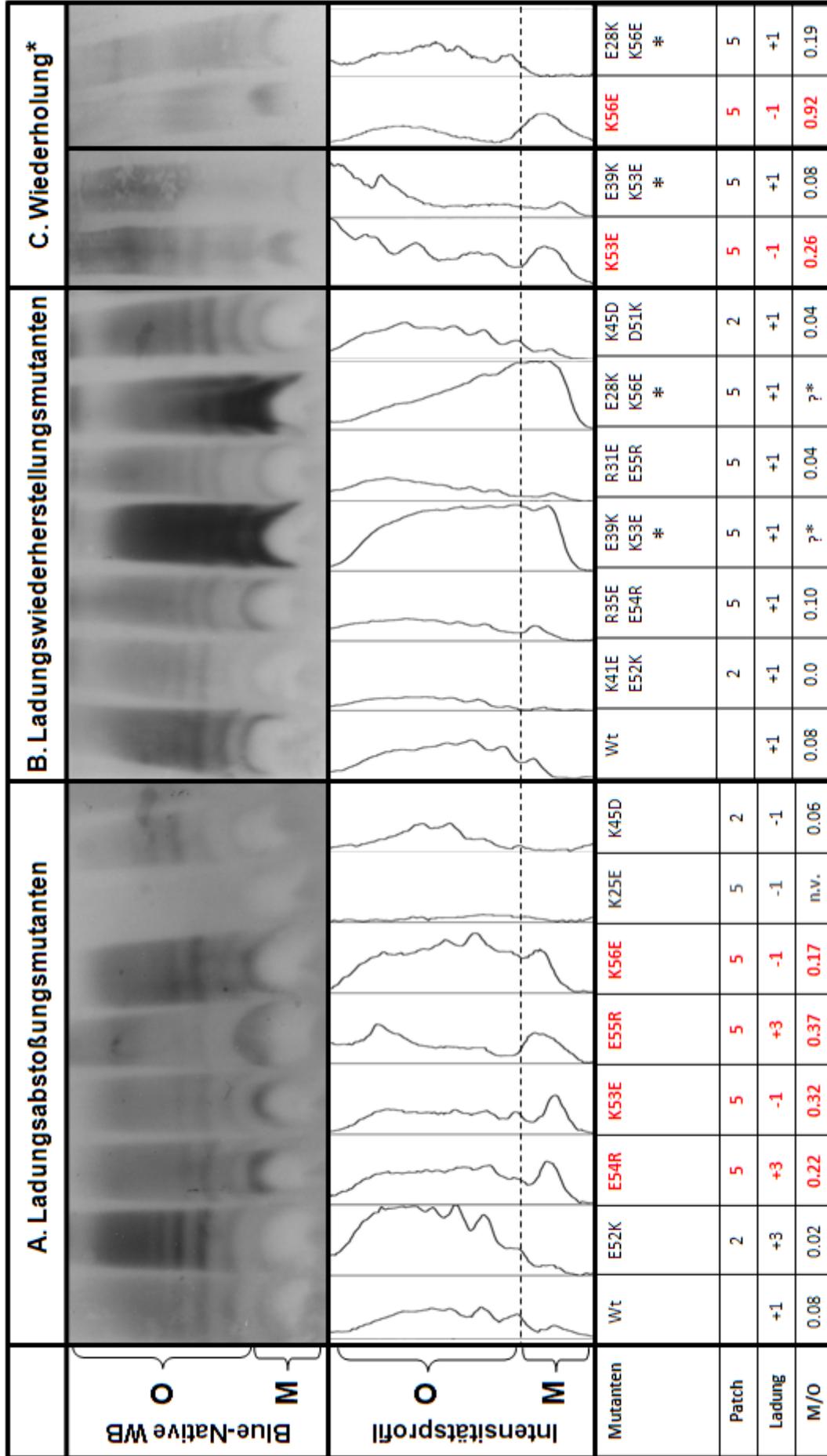


Abb. 19: Western Blots (WB) von der BN-PAGE der Ladungsabstoßungsmutanten (A) und Ladungswiederherstellungsmutanten (B). C: Wiederholung von Mutanten (*) mit überladenen Proteinbanden. Ein deutlich größeres Monomer zu Oligomer Verhältnis (M/O) bedeutet eine verstärkte Disassemblierung der $TatA_d$ Oligomere aufgrund einer Destabilisierung des postulierenden Charge Zippers. In rot sind Mutanten markiert, die im 5er Patch mutiert wurden und einen wesentlich größeren Oligomer Zerfall als der Wildtyp (Wt) aufweisen. Ein M/O Wert für die K25E Mutante (in grau) konnte aufgrund einer schwachen Expression nicht berechnet werden und ist somit nicht vorhanden (n.v.).

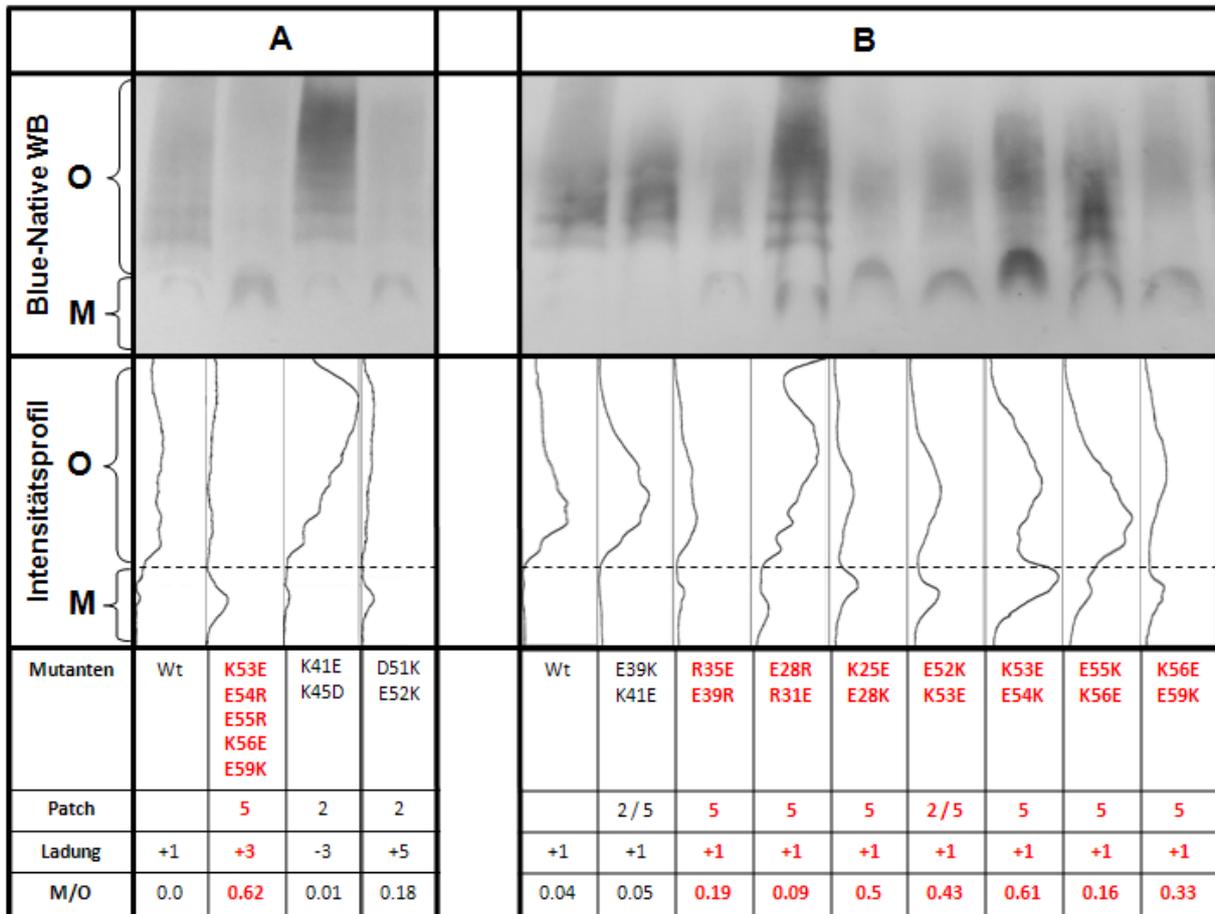


Abb. 20: Western Blots (WB) von der BN-PAGE der Komplettabstoßungsmutanten (A) und Nachbarschaftsumkehrmutanten (B). Ein deutlich größeres Monomer zu Oligomer Verhältnis (M/O) bedeutet eine verstärkte Disassemblierung der TatA_d Oligomere aufgrund einer Destabilisierung des postulierenden Charge Zippers. In rot sind Mutanten markiert, die im 5er Patch mutiert wurden und einen wesentlich größeren Oligomer Zerfall als der Wildtyp (Wt) aufweisen.

In Abb. 21 illustrieren die Balken das Monomer zu Oligomer Verhältnis der Ladungsabstoßungsmutanten und der Ladungswiederherstellungsmutanten, welches aus der Auswertung der BN-PAGE erhalten wurde. Das Balkendiagramm erleichtert den Vergleich der Oligomer Disassemblierung mit dem TatA_d Wildtyp (Wt). Ein großer M/O Wert entspricht einem langen Balken und bedeutet einen starken Zerfall der Oligomere hin zum Monomer. Die Ladungsabstoßungsmutanten zeigen eine verstärkte Disassemblierung bei den intermolekularen Salzbrücken. Diese Tatsache war zu erwarten, da eine Repulsion innerhalb der intermolekularen Salzbrücken eine TatA_d Assemblierung negativ beeinflussen würde. Die intramolekularen Abstoßungsmutanten zeigen hingegen das gleiche Oligomer-Muster wie der Wildtyp, das bedeutet, dass die Interaktion zwischen zwei TatA_d Proteinen nicht gestört wurde und somit kein Zerfall in Monomere zu beobachten ist. Es scheint also so zu sein, dass die Zerstörung einer intramolekularen Salzbrücke durchaus toleriert werden kann, da diese nur den intramolekularen *Hairpin* stabilisiert, aber im Gegensatz zu den intermolekularen Salzbrücken keine TatA_d Monomere miteinander verbrückt.

Für die intermolekulare K25E Abstoßungsmutante konnte kein M/O Wert bestimmt werden, da aufgrund einer schwachen Expressionsrate (siehe Abb. 15) zu wenig Protein in die Membran insertiert wurde. Vergleicht man die Ladungsabstoßungsmutanten mit den zugehörigen Wiederherstellungsmutanten, so zeigen alle einen verringerten Oligomer Zerfall. Diese Wiederherstellungsmutanten verhalten sich also wieder wie der Wildtyp und beweist, dass vier von fünf postulierten intermolekularen Salzbrücken wiederhergestellt werden konnten. Für das intermolekulare Ladungspaar K25:E59 kann keine Aussage getroffen werden, da schon die K25E Abstoßungsmutante zu einer sehr schwachen Expression führte (siehe Expressionsrate in Abb. 15 und Abb. 16) und somit eine Detektion im Gel nicht möglich war.

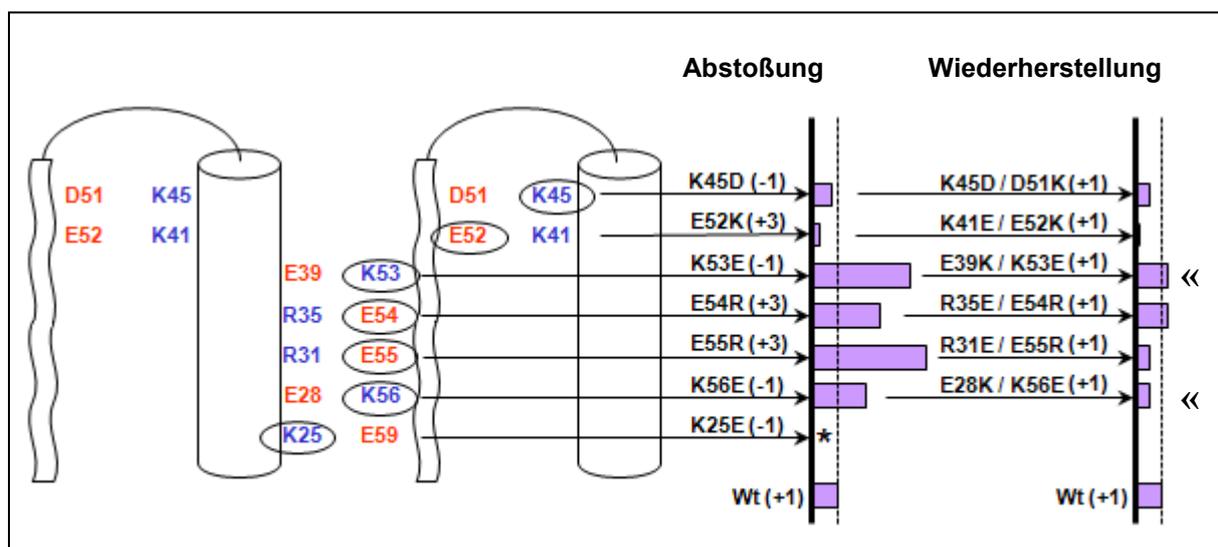


Abb. 21: Monomer zu Oligomer Verhältnis der Ladungsabstoßungsmutanten und Ladungswiederherstellungsmutanten. Die M/O Werte wurden aus der BN-PAGE Auswertung entnommen und sind in Form eines Balken illustriert. Ein längerer Balken als der des TatA_d Wildtyps (Wt) bedeutet eine stärkere Disassemblierung der Mutanten. Fehlender M/O Wert für die K25E Mutante aufgrund schwacher Expression (*). In Klammern ist die Nettoladung des Proteins angegeben. Das « Zeichen markierten die Mutanten aus dem wiederholten BN-Western Blot (siehe Abb. 19 C), dessen M/O Wert relativ zur ebenfalls wiederholten Abstoßungsmutante skaliert wurde.

Die Abb. 22 sind die Ergebnisse der Komplettabstoßungsmutanten zusammengefasst. Bei der intermolekularen Komplettabstoßungsmutante konnte ein vollständiger Zerfall zum Monomer beobachtet werden. Das Ergebnis belegt die Hypothese, da nach dem Charge Zipper Modell alle fünf intermolekularen Salzbrücken, welche die TatA_d Monomere miteinander verbrücken, zerstört wurden. Eine der beiden intramolekularen Komplettabstoßungsmutante (K41E-K45D) zeigt wie erwartet das gleiche TatA_d Assemblierungsverhalten wie der Wildtyp. Hier wird die Zerstörung der zwei intramolekularen Salzbrücke toleriert, da sie nur den intramolekularen *Hairpin* zwischen der APH und DCR

stabilisieren. Die andere D51K-E52K Mutante disassembliert überraschenderweise. Betrachtet man jedoch die Nettoladung der Mutante (+5), so wird deutlich, dass sich diese extrem von der Nettoladung des Wildtyps (+1) unterscheidet. Die hohe Nettoladung und die damit verbundene elektrostatische Abstoßung, scheint einen negativen Effekt auf die Assemblierung der TatA_d Proteine zu bewirken.

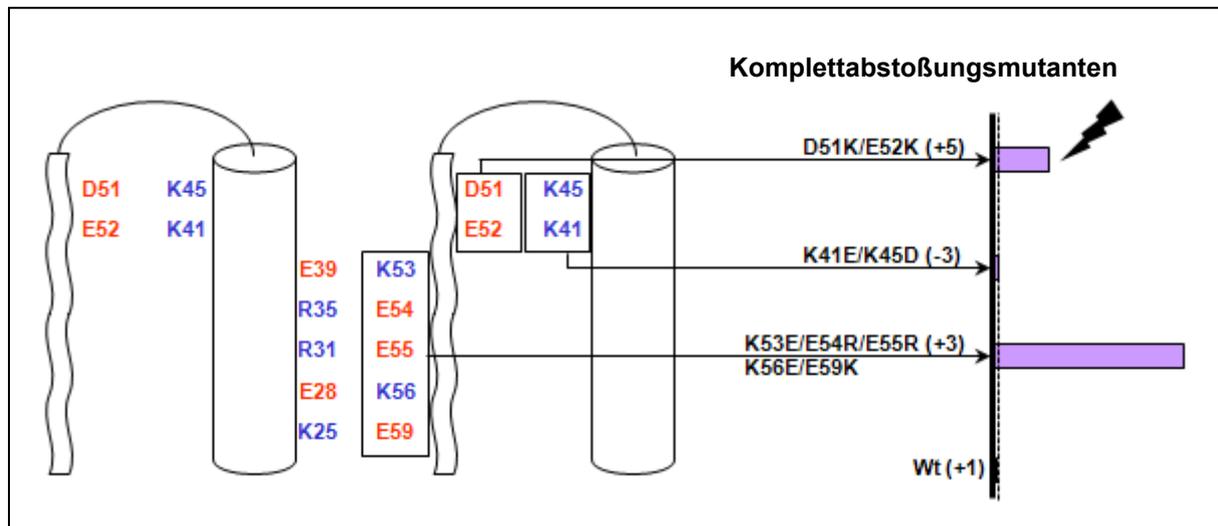


Abb. 22: Monomer zu Oligomer Verhältnis der Komplettabstoßungsmutanten. Die intermolekulare Komplettabstoßungsmutante zeigt einen vollständigen Zerfall zum Monomer (hoher M/O Wert = langer Balken). Die intramolekulare K41E-K45D Komplettabstoßungsmutante zeigt keinen Zerfall der Oligomere, wohingegen die andere intramolekulare D51K-E52K Komplettabstoßungsmutante eine stärkere Disassemblierung zeigt (⚡). Dieser Effekt lässt sich wahrscheinlich auf die hohe Nettoladung der Mutante (+5) zurückführen.

Um den Effekt einer veränderten Proteinnettoladung auf die TatA_d Assemblierung zu vermeiden, wurden die Nachbarschaftsumkehrmutanten produziert. Die dazugehörigen Western Blot Ergebnisse der BN-PAGE sind in Abb. 23 zusammengefasst. Hier besitzen alle Mutanten die gleiche Nettoladung wie der Wildtyp (+1) und durch den Vertausch zweier benachbarter Ladungen entlang der Primärsequenz werden zwei postulierte Salzbrücken zerstört. Dadurch wird ein noch stärkerer Zerfall zum Monomer hin erwartet, als bei den Einfachabstoßungsmutanten, da in den meisten Fällen zwei intermolekulare Salzbrücken zerstört werden. Wie erwartet disassemblieren die meisten TatA_d Nachbarschaftsumkehrmutanten (bis auf E39K-K41E) durch die Zerstörung zweier Salzbrücken verstärkt zum Monomer. Dabei zeigen besonders vier von acht Nachbarschaftsumkehrmutanten einen sehr starken Zerfall (K25E-E28K, E52K-K53E, K53E-E54K, K56E-E59K).

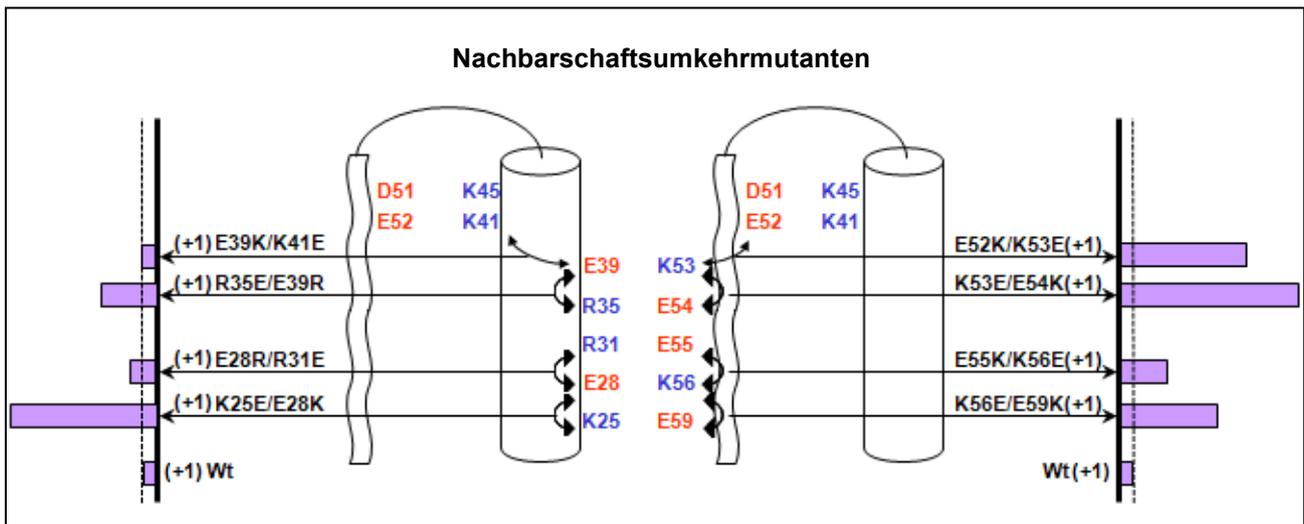


Abb. 23: Monomer zu Oligomer Verhältnis der Nachbarschaftsumkehrmutanten. Die Pfeile markieren zwei Aminosäuren, die in ihrer Position vertauscht wurden. Dadurch sollen zwei der postulierten Salzbrücken zerstört werden. Betrachtet man z.B. die K53E-E54K Mutante, so erkennt man eine starke Disassemblierung zum Monomer im Vergleich zum TatA_d Wildtyp (Wt). Hier wurden die Salzbrücken K53:E39 und E54:R35 zerstört. Die Nettoladung aller Nachbarschaftsumkehrmutanten entspricht der des Wildtyps (+1).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Ergebnisse der TatA_d Ladungsmutanten einen ersten Beweis für den postulierten Charge Zipper Mechanismus erbringen konnten und dieses völlig neuartige Faltungsmotiv erstmals bestätigen.

Zudem konnten die Ladungsabstoßungsmutanten einen Aufschluss darüber geben, welche der beiden Ladungspatches, die aus dem *Helical Wheel Plot* der APH ersichtlich wurden (Abb. 12), an der intra- und intermolekularen Salzbrückenausbildung beteiligt sind. Demnach scheint der 5er *Patch* tatsächlich für die intermolekulare und der 2er *Patch* für die intramolekulare Salzbrückenausbildung verantwortlich zu sein, denn Ladungsabstoßungen innerhalb des 5er *Patches* führten zur Disassemblierung der TatA_d Oligomeren, dagegen zeigten Ladungszerstörungen im 2er *Patch* keinen negativen Effekt auf die Assemblierung.

Somit ist die Anordnung der sieben postulierten Salzbrücken, bestehend aus fünf intermolekularen Salzbrücken zwischen den benachbarten APH und DCR Segmenten und zwei intramolekularen Salzbrücken innerhalb eines APH-DCR Segments nach den Ergebnissen zufolge am wahrscheinlichsten und kommt dem dargestellten Schema in Abb. 13 nahe.

3.2. Die Rolle der Transmembranhelix von TatA bei der Tat-Translokation

Rollauer et al. gelang es die Kristallstruktur von TatC aus *Aquifex aeolicus* aufzuklären. Sie postulierten eine mögliche Interaktion der TatA-Transmembranhelix (TMH) mit der konkaven TatC-Seite. Dabei sollen vor allem die konservierten polaren Aminosäuren im vorderen Segment der TatA-Transmembranhelix mit der konkaven TatC-Einkerbung, welche mit geladenen Aminosäureresten ausgekleidet ist, eine Wechselwirkung eingehen können [63].

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Ladungsverteilung innerhalb der TatC-Einkerbung in *A. aeolicus* auch in anderen Organismen konserviert ist, wurden anhand der TatC Kristallstrukturdaten homologe Strukturmodelle von TatC_d aus *B. subtilis* und TatC aus *E. coli*, in Kooperation mit Prof. Wolfgang Wenzel, erstellt. Diese TatC Homologiemodelle, mit der Sicht auf die konkave Seite, sind in Abb. 24 dargestellt. Die geladenen Aminosäuren, welche die Oberfläche der TatC-Einkerbung auskleiden, sind blau (für positive Ladung) und rot (für negative Ladung) markiert.

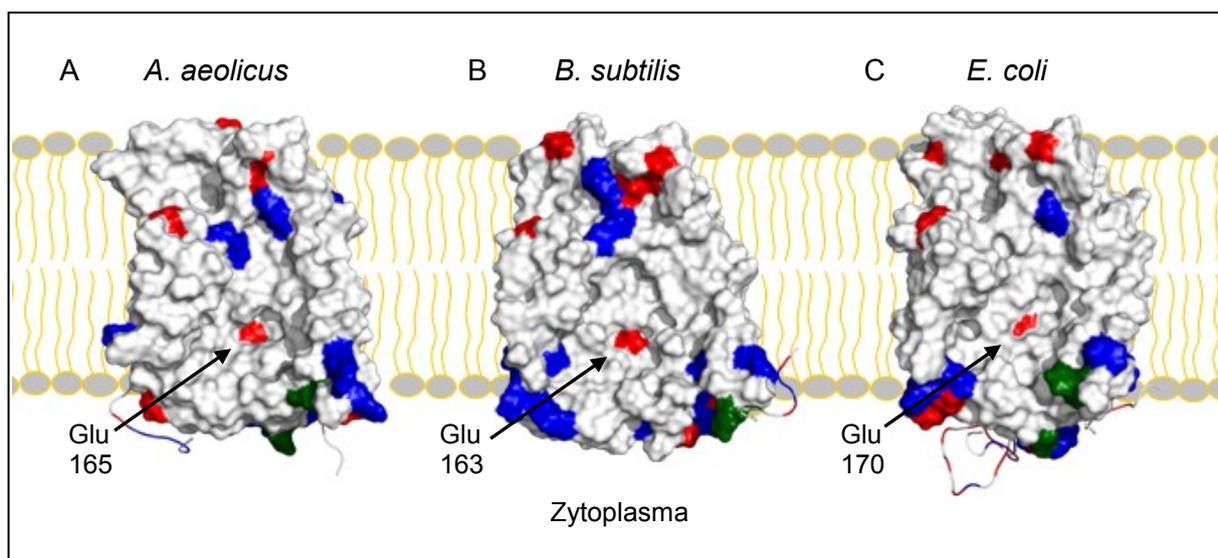


Abb. 24: TatC Homologiemodelle. A: Kristallstruktur von TatC aus *A. aeolicus*. B: Homologiemodell von TatC_d aus *B. subtilis* C: Homologiemodell von TatC aus *E. coli*. Farbcode der Aminosäuren: grün steht für Histidin, dunkelblau für positiv und rot für negativ geladene Aminosäuren.

Die Ladungsverteilung scheint in der dreidimensionalen Struktur hochkonserviert zu sein. Die TatA-TMH könnte nun eine Wechselwirkung mit dieser geladenen TatC-Einkerbung eingehen. Nachdem die TatC Kristallstruktur veröffentlicht wurde, postulierte Rodriguez et al., dass die kurzen TatA-Transmembranhelices der TatA-Pore durch eine Interaktion mit dem TatBC Komplex in die Lipiddoppelschicht gezogen werden könnten, was zu einer Deformation und Ausdünnung der Lipiddoppelschicht führen würde [92]. Diese deformierte Membran könnte das Durchdringen des Tat-abhängigen Substrats erleichtern.

Den Interaktionsmodellen zufolge, sollte ein positiv oder negativ geladener TatA N-Terminus die Interaktion zwischen TMH und der konkaven TatC-Seite verhindern, da eine Insertion der TMH in die hydrophobe Membran aufgrund der N-terminalen Ladung energetisch ungünstig wäre. Durch die Interaktionsunterbindung der beiden Tat-Komponenten könnte der Translokationsvorgang negativ beeinträchtigt werden. Auch eine Verlängerung der TMH würde den Tat-Transport verhindern, da ein verlängertes Transmembransegment die Membran komplett durchspannen würde. Das Eintauchen der TMH und die damit verbundene TatC Interaktion sowie die Lipiddoppelschicht-Ausdünnung wäre nicht mehr gewährleistet, wodurch die Porenausbildung und der Substrat-Export zum Erliegen kommen würden. Um den Einfluss durch ein am N-Terminus geladenes TatA_d Protein sowie die Auswirkung einer verlängerte TatA_d-TMH auf den Tat-Translokationsprozess zu untersuchen, wurden folgende TatA_d Mutanten hergestellt, die auch in Abb. 25 illustriert sind: Für die Untersuchung eines geladenen TatA_d N-Terminus:

- 1) TatA_d-F2E → Phenylalanin an Position 2 durch Glutaminsäure ersetzt
→ negativ geladener N-Terminus.
- 2) TatA_d-F2K → Phenylalanin an Position 2 durch Lysin ersetzt
→ positiv geladener N-Terminus.
- 3) TatA_d-F2A → Phenylalanin an Position 2 durch Alanin
→ keine Veränderung der Ladung → Kontrollmutante

Für die Untersuchung einer verlängerten TatA_d-TMH wurden vor Isoleucin 13 zusätzliche Leucin und Alanin Aminosäuren in die Sequenz eingebaut:

- 1) TatA_d-LAL → Verlängerung der TMH um drei Aminosäuren
- 2) TatA_d-LALAL → Verlängerung der TMH um fünf Aminosäuren
- 3) TatA_d-LALALAL → Verlängerung der TMH um sieben Aminosäuren (= zwei Helixturns)

Diese TatA_d Mutanten wurden auf PhoD Sekretion durch das Tat-System getestet. Für diesen Zweck wurde ein *in vivo* Translokationsassay in *Bacillus subtilis* gewählt, welcher von Dr. Robyn Eijlander (Universität Groningen, Niederlande) entwickelt wurde [94]. Hierbei dient der *B. subtilis* Wildtyp (Wt) 168 Stamm als eine Positivkontrolle für die natürliche PhoD Sekretion und TatA_d Expression. Als Negativkontrolle wurde ein *B. subtilis* Δ tatA_dC_d-Deletionsstamm verwendet, bei dem die *tatA_dC_d*-Gene im PhoD-Operon durch ein Chloramphenicol Resistenzgen ersetzt wurden. Für eine Komplementation des Δ tatA_dC_d-Deletionsstammes wird das Plasmid pGDL48-*tatA_dC_d* genutzt. Das Plasmid trägt die *tatA_dC_d*-Gene, deren Expression ebenfalls wie das genomische PhoD-Operon durch einen Phosphatmangel im Medium induziert wird. Dieses Plasmid diente als Träger für die untersuchten TatA_d Mutationen und wurde für den Translokationstest in den Deletionsstamm transformiert.

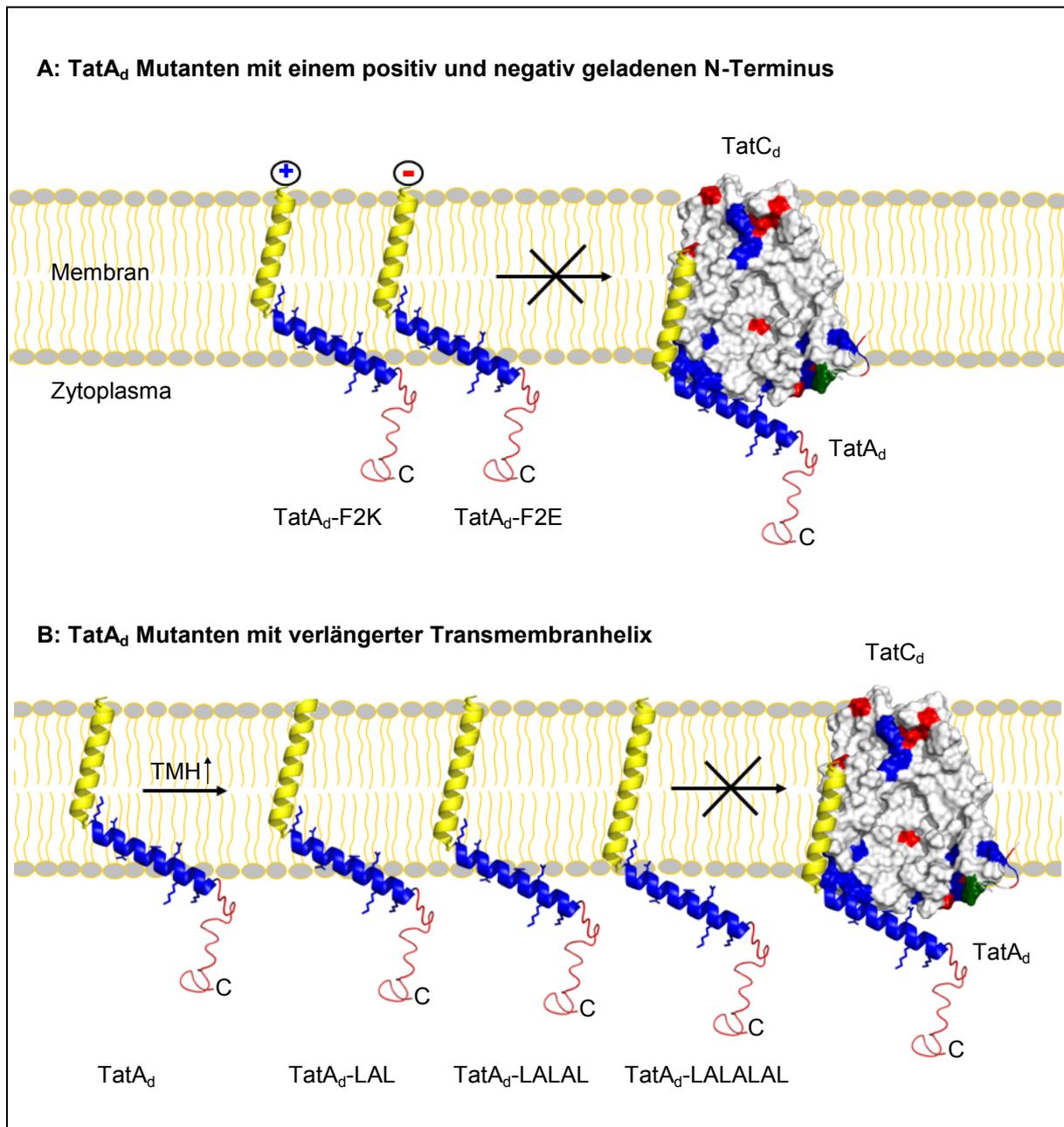


Abb. 25: TatA_d-Mutanten mit einem geladenen N-Terminus und einer verlängerter TMH. Sowohl ein geladener TatA_d N-Terminus (A) als auch eine verlängerte Transmembranhelix (B) sollte das Eintauchen in die Membran verhindern.

Für den PhoD Nachweis im Medium wurden die *B. subtilis* Zellen in einem Phosphatmangelmedium herangezogen, um die PhoD Sekretion zu induzieren. Nach sechs Stunden wurden die Zellen geerntet und der Kulturüberstand abgenommen. Durch eine TCA-Fällung wurden alle Proteine im Kulturüberstand präzipitiert, um darin das sekretierte PhoD nachzuweisen. Der PhoD Nachweis erfolgte durch die SDS-PAGE und einer anschließenden Immunodetektion. Da eine Mutation auch immer das Expressionsverhalten beeinflussen kann, wurde die Menge des TatA_d Proteins in der Membran bestimmt. Dafür wurden die geernteten Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen und die Membran durch

Ultrazentrifugation isoliert. Nach der Solubilisierung der Membranpellets erfolgte die Auftrennung der Membranproteine durch eine SDS-PAGE und eine TatA_d Detektion mittels Western Blot.

Die Ergebnisse der PhoD Translokation von Mutanten mit geladenem N-Terminus sind in Abb. 26 dargestellt. Der *B. subtilis* Wildtyp zeigt erwartungsgemäß eine starke PhoD und TatA_d Bande. Das bedeutet, dass die Anzuchtbedingungen für eine Induktion des PhoD-Operon optimal waren und PhoD ins Medium sekretiert wurde. Der Δ tatA_dC_d-Deletionsstamm konnte erfolgreich durch das Plasmid pDGL48-tatA_dC_d komplementiert werden (TatA_dC_d). Hier ist im Gegensatz zum Wildtyp eine schwächere PhoD Bande zu erkennen, was sich aufgrund einer geringeren TatA_d Konzentration in der Membran erklären lässt.

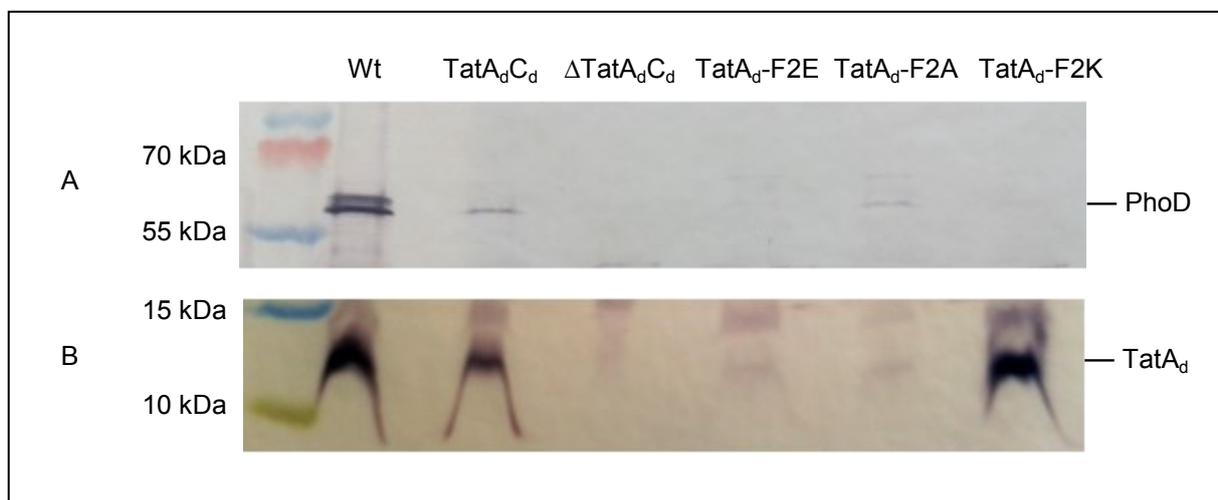


Abb. 26: Ergebnisse der PhoD Translokation von Mutanten mit geladenem N-Terminus. Die *B. subtilis* Stämme wurden unter Phosphatmangel angezogen. Im oberen Western Blot (A) wurde das sekretierte PhoD im Kulturüberstand detektiert. Im unteren Western Blot (B) erfolgte der Proteinnachweis von TatA_d in der Membran. Wt: Wildtyp als Positivkontrolle, Δ TatA_dC_d: tatA_dC_d-Deletionsstamm als Negativkontrolle, TatA_dC_d: Deletionsstamm komplementiert durch das Plasmid pDGL48-tatA_dC_d, TatA_d-F2E: TatA_d mit negativ geladenem N-Terminus, TatA_d-F2K: TatA_d mit positiv geladenem N-Terminus, TatA_d-F2A: Alanin Substitution → neutrale Ladung (Kontrollmutante).

Der Δ tatA_dC_d-Deletionsstamm als Negativkontrolle weist wie erwartet keine PhoD und TatA_d Proteinbande auf, da hier die tatA_dC_d-Gene ausgeschaltet sind und das exprimierte prePhoD nicht durch die Tat-Translokase sekretiert werden kann. Betrachtet man die TatA_d Mutanten, so wird deutlich, dass die am N-Terminus geladenen TatA_d Proteine (TatA_d-F2E und TatA_d-F2K) PhoD nicht sekretieren können. Die Kontrollmutante TatA_d-F2A mit einem ungeladenen N-Terminus weist hingegen eine schwache PhoD Bande auf (Abb. 26 A). Die recht schwache PhoD Sekretion lässt sich auf eine geringe TatA_d-F2A-Konzentration in der Membran zurückführen (Abb. 26 B). Das zeigt, dass diese Mutation die TatA_d Expression

stark beeinflusst, das Protein aber trotzdem transportaktiv ist. Auch die TatA_d-F2E Mutante verzeichnet eine ebenso schlechte Expressionsrate, wobei in diesem Fall keine PhoD Sekretion nachweisbar ist. Die TatA_d-F2E Mutante ist somit transportinaktiv. Die TatA_d-F2K Mutante zeigt hingegen eine sehr intensive TatA_d Bande und trotz der hohen Proteinmenge führt die positive Ladung am N-Terminus zu einer deutlichen Inhibition der PhoD Translokation.

In Abb. 27 sind die Ergebnisse der PhoD Sekretionsanalyse von TatA_d Mutanten mit einer verlängerten Transmembranhelix zu sehen. Der *B. subtilis* Wildtyp als Positivkontrolle, zeigt erwartungsgemäß eine starke PhoD und TatA_d Proteinbande. Die Expression der *tatA_dC_d*-Gene des durch das Plasmid pDGL48-*tatA_dC_d* komplementierten Deletionsstammes verlief erfolgreich, es konnte ein starkes TatA_d Signal in der Membranfraktion detektiert werden. Zudem sekretierte der Komplementationsstamm eine ausreichende Menge an PhoD für eine Immunodetektion. Der Deletionsstamm als Negativkontrolle (Δ TatA_dC_d) zeigt wie erwartet keine PhoD und TatA_d Bande, da hier die *tatA_dC_d*-Gene ausgeschaltet sind.

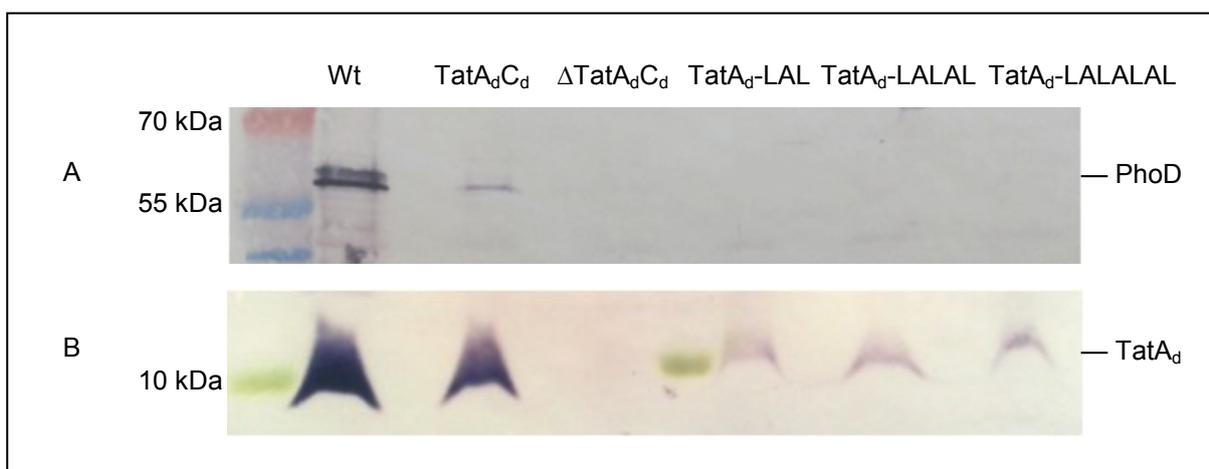


Abb. 27: Ergebnisse der PhoD Translokation von TatA_d Mutanten mit einer verlängerten Transmembranhelix (TMH). Die *B. subtilis* Stämme wurden unter Phosphatmangel angezogen. A: Detektion des sekretierten PhoD Proteins im Kulturüberstand mittels Western Blot. B: Western Blot von TatA_d aus der Membran. Wt: Wildtyp als Positivkontrolle, Δ TatA_dC_d: *tatA_dC_d*-Deletionsstamm als Negativkontrolle, TatA_dC_d: Deletionsstamm komplementiert durch das Plasmid pDGL48-*tatA_dC_d*, TatA_d-LAL: Insertion von Leucin-Alanin-Leucin in die TMH, TatA_d-LALAL: Insertion von fünf Aminosäuren (LALAL) in die TMH, TatA_d-LALALAL: Insertion von sieben Aminosäuren (LALALAL) in die TMH.

Für die drei TatA_d Mutanten mit einer verlängerten TMH konnte kein PhoD Signal im Western Blot detektiert werden (Abb. 27 A). In der Membran konnten jedoch die mutierten TatA_d Proteine nachgewiesen werden, was beweist, dass diese nicht zum PhoD Transport fähig sind. Zwar ist hier eine geringere TatA_d Proteinmenge als im Wt und TatA_dC_d zu verzeichnen (Abb. 27 B), diese sollte jedoch für einen PhoD Export ausreichen. Nimmt man

beispielsweise die TatA_d-F2A Mutante (Abb. 26) zum Vergleich, so zeigt diese ein noch schwächeres TatA_d Signal, dennoch konnte eine PhoD Bande detektiert werden.

Diese Ergebnisse belegen, dass die PhoD Sekretion sowohl durch eine Ladung am TatA_d N-Terminus als auch durch eine verlängerte TMH blockiert wird. Alle TatA_d Mutanten waren nicht mehr in der Lage PhoD durch die Tat-Translokase zu sekretieren. Die TatA_d-Transmembranhelix scheint demnach eine wichtige Rolle im Tat-Prozess zu spielen.

3.3. Entwicklung eines *in vitro* Tat-Translokationsassays basierend auf TatA_dC_d aus *B. subtilis*

Um den Mechanismus der Tat-abhängigen Translokation aufzuklären, wäre ein *in vitro* Translokationsassay, bei dem man den Tat-abhängigen Transportvorgang beobachten und beeinflussen könnte, von entscheidendem Vorteil. Zu diesem Zweck sollte ein neuer *in vitro* Translokationsassay basierend auf rekonstituierten TatA_dC_d aus *Bacillus subtilis* entwickelt werden, dessen Prinzip in Abb. 28 illustriert ist.

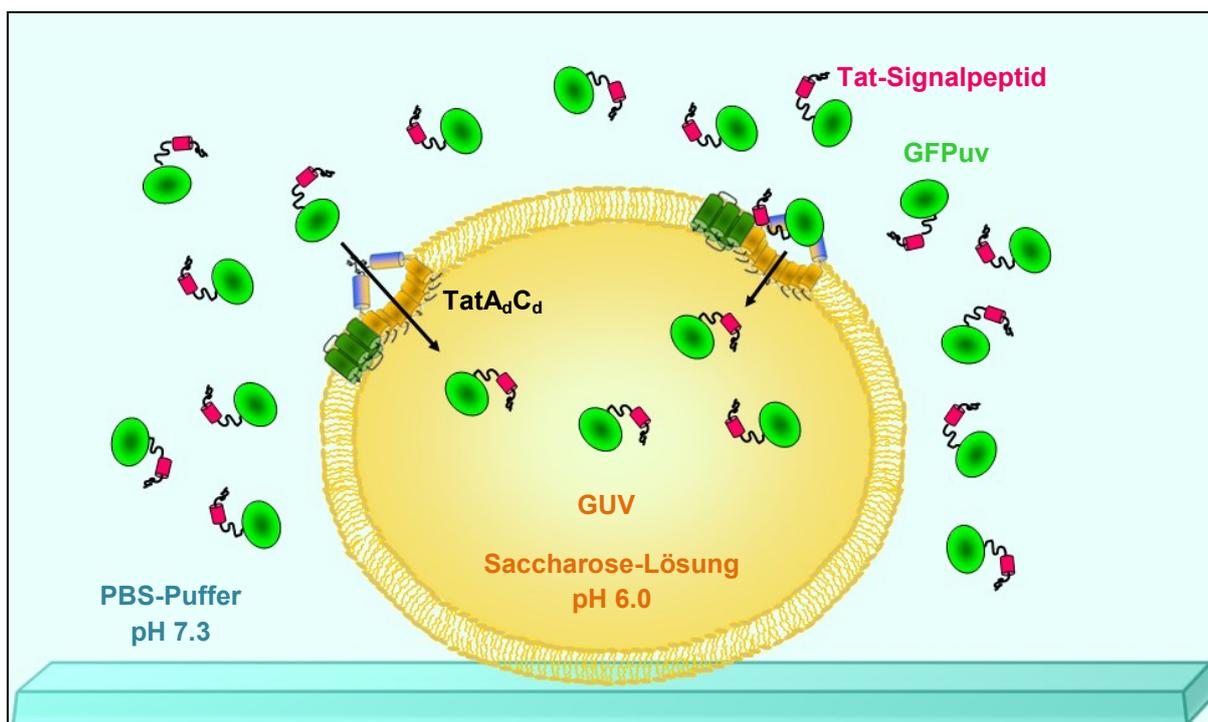


Abb. 28: Schematische Illustration des *in vitro* Translokationsassays. In große unilamellare Vesikel (GUV: *Giant Unilamellar Vesicle*) wird die TatA_dC_d-Translokase funktionsfähig rekonstituiert. Als Substrat dient das SP-GFPuv, welches durch die TatA_dC_d-Pore in das Lipidvesikel transportiert werden kann. Ein durch den Puffer generierter pH-Gradient sorgt für die Antriebskraft der Translokase. Findet ein aktiver Tat-Transport statt, so wird das SP-GFPuv in dem Vesikel akkumuliert, was zu einem verstärkten Fluoreszenzsignal im Inneren führt.

Der Tat-Transport soll durch Fluoreszenzmikroskopie detektierbar sein, weshalb sowohl das fluoreszierende SP-GFPuv Proteinkonstrukt als Substrat, als auch fluoreszenzmarkiertes TatA_d verwendet wird. Die aufgereinigten TatA_d und TatC_d Membranproteine werden in große unilamellare Vesikel (GUV = *Giant Unilamellar Vesicle*) aus DMPC rekonstituiert. Das DMPC wurde als Lipidkomponente gewählt, da bereits gute Rekonstitutionsergebnisse in Bizellen erzielt werden konnten [56]. Die in Saccharose-Lösung hergestellten GUVs werden in äquiosmolaren PBS-Puffer gegeben. Durch eine höhere Dichte der Saccharose-Lösung im Inneren des GUV wird ein Absinken auf den Boden der Objektkammer, die mit PBS-Puffer (pH 7.3) gefüllt ist, ermöglicht und zudem eine Immobilisierung der GUVs erreicht, die für eine Beobachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop unerlässlich ist. Durch das Vorhandensein des Puffers außerhalb und der Saccharose-Lösung innerhalb des Vesikels wird ein pH-Gradient generiert, der von der Tat-Translokase als protonenmotorische Kraft genutzt werden kann.

3.3.1. Darstellung von SP-GFPuv

Um ein *in vitro* Translokationsassay für das TatA_dC_d-System zu generieren, bedarf es zuerst der Herstellung und Aufreinigung der einzelnen Tat-Komponenten. Der Translokationsprozess soll durch Fluoreszenzspektroskopie visualisierbar sein, weshalb als Tat-abhängiges Substrat das SP-GFPuv Konstrukt gewählt wurde, welches von Dr. Marco Jan Klein während seiner Diplomarbeit kloniert wurde [95]. In Abb. 29 ist das SP-GFPuv Konstrukt dargestellt, das aus dem N-terminalen Tat-abhängigen Signalpeptid aus prePhoD und dem fluoreszierenden GFPuv Protein zusammengesetzt ist. Für die Aufreinigung des Konstrukts wurde C-terminal ein His-Tag fusioniert.

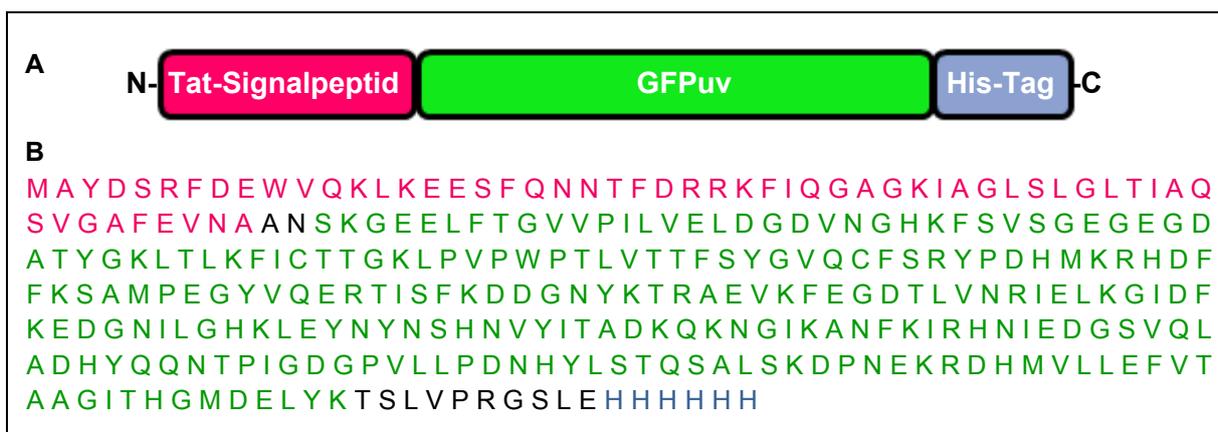


Abb. 29: Das Tat-abhängige Substrat SP-GFPuv für den *in vitro* Translokationsassay.

A: Schematische Darstellung des Signalpeptid-GFPuv Konstrukts. Das fluoreszierende Protein GFPuv ist mit einem N-terminalen Signalpeptid und einem C-terminalen His-Tag fusioniert ist. B: Aminosäuresequenz des SP-GFPuv. Rosa: Signalpeptid von prePhoD, grün: GFPuv, hellblau: His-Tag. Entnommen aus [95].

Der C-terminal fusionierte His-Tag erlaubte die Proteinaufreinigung von SP-GFPuv mittels Nickel-Affinitätschromatografie. Das Protein wurde in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen exprimiert, danach wurden die Zellen geerntet (Abb. 30 A) und mit Ultraschall aufgeschlossen. Die exprimierten Proteine wurden durch Nickel-Affinitätschromatografie aufgereinigt, danach einkonzentriert und in Lösung gehalten (Abb. 30 B).

Anschließend wurde das SP-GFPuv auf die Größe und Reinheit mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 30 C). Im SDS-Gel konnte die SP-GFPuv Proteinbande mit der Masse von 35 kDa auf der entsprechenden Markerhöhe zwischen 30 und 40 kDa detektiert werden, zudem konnten keine starken Proteinverunreinigungen beobachtet werden.

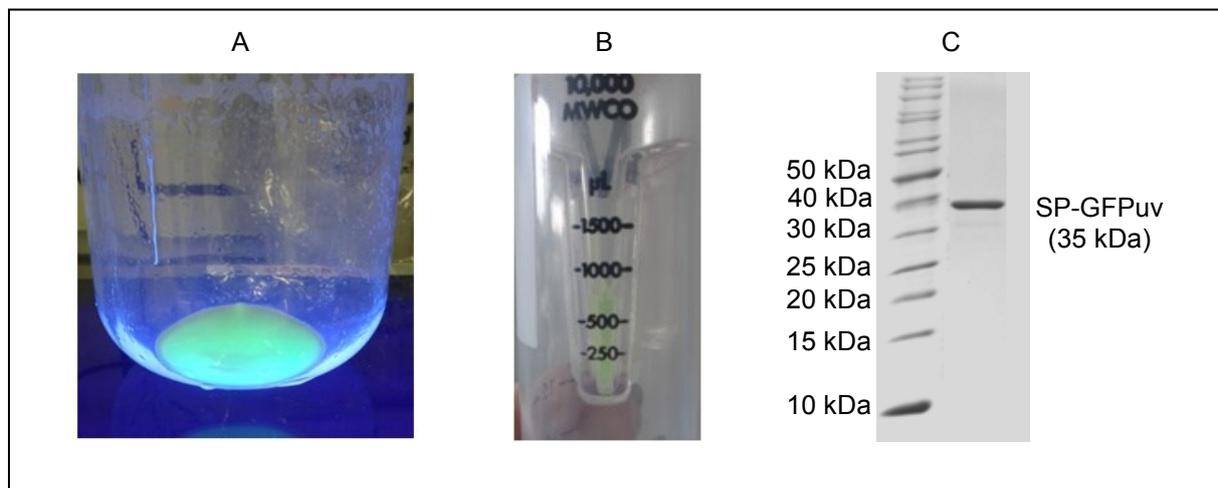


Abb. 30: Aufreinigung von SP-GFPuv. A: *E. coli* BL21 (DE3) Zellen mit exprimierten SP-GFPuv unter UV-Licht → das SP-GFPuv fluoresziert in den Zellen B: Einkonzentriertes SP-GFPuv Protein im Elutionspuffer. C: SDS-PAGE vom aufgereinigten SP-GFPuv (35 kDa).

3.3.2. Darstellung von fluoreszenzmarkiertem TatA_d

Für eine TatA_d Fluorophor-Markierung wurde die TatA_d-G70C Mutante verwendet, welche während meiner Diplomarbeit hergestellt und aufgereinigt wurde (Abb. 31) [96]. Diese Mutante trägt C-terminal ein Cystein, an das ein Maleimid-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden kann.

Für die Markierung wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Atto647N-Maleimid und Alexa568-Maleimid verwendet. Das Maleimid geht mit der Thiolgruppen des Cysteins über einen nukleophilen Angriff eine Thioetherbindung ein. Die Kopplungsreaktion erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

Das TatA_d-G70C Protein ist im reduzierenden PBS-Puffer löslich, fällt jedoch nach der Kopplungsreaktion aus. Der Niederschlag wurde abgetrennt und durch Zugabe von Detergens (NLS) wieder in Lösung gebracht. Danach konnte das markierte TatA_d Protein vom unmarkierten TatA_d-G70C und freiem Farbstoff mittels phasenumkehr HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) aufgereinigt werden. In Abb. 32 wird als Beispiel für

die HPLC Aufreinigung die Chromatogramme von TatA_d-Atto647N gezeigt. Aus den Absorptionsspektren ist zu erkennen, dass ein mit Farbstoff gekoppeltes TatA_d-G70C Protein mit einer Retentionszeit von 13.5 min von der Säule eluierte (Abb. 32 B), wohingegen das unmarkierte Protein bei 10.5 min eluierte (Abb. 32 A). Das NLS, mit dem das markierte TatA_d Protein in Lösung gebracht wurde, eluierte zur selben Zeit von der Säule wie das unmarkierte TatA_d-G70C (Abb. 32 B). Um den Fluoreszenzfarbstoff während der Aufreinigung zu detektieren, wurde auch ein Absorptionsspektrum bei 650 nm aufgenommen, welches in Abb. 32 C dargestellt ist. In diesem Spektrum erkennt man einen deutlichen Peak bei 13.5 min, der dem proteingekoppelten Fluorophor entspricht. Die vorderen Peaks stellen wahrscheinlich die ungebundenen Fluorophore sowie dessen hydrolysierte Derivate dar. Diese unterschiedlichen Elutionszeiten vom gekoppelten und ungekoppelten Protein ermöglichten eine Aufreinigung der fluorophormarkierten TatA_d Proteine.

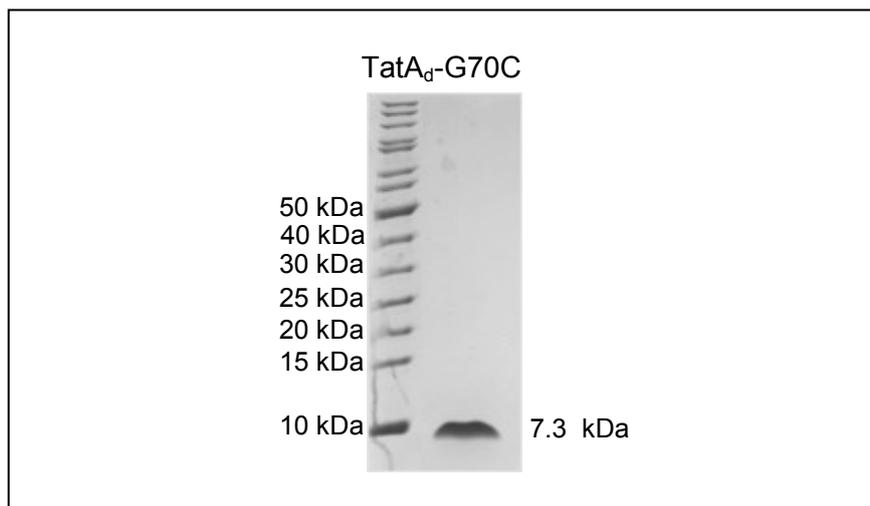


Abb. 31: SDS-PAGE von TatA_d-G70C. Das TatA_d-G70C wurde bereits von mir in meiner Diplomarbeit exprimiert und aufgereinigt [96]. Diese Cysteinmutante wurde für die Fluorophor-Kopplung verwendet.

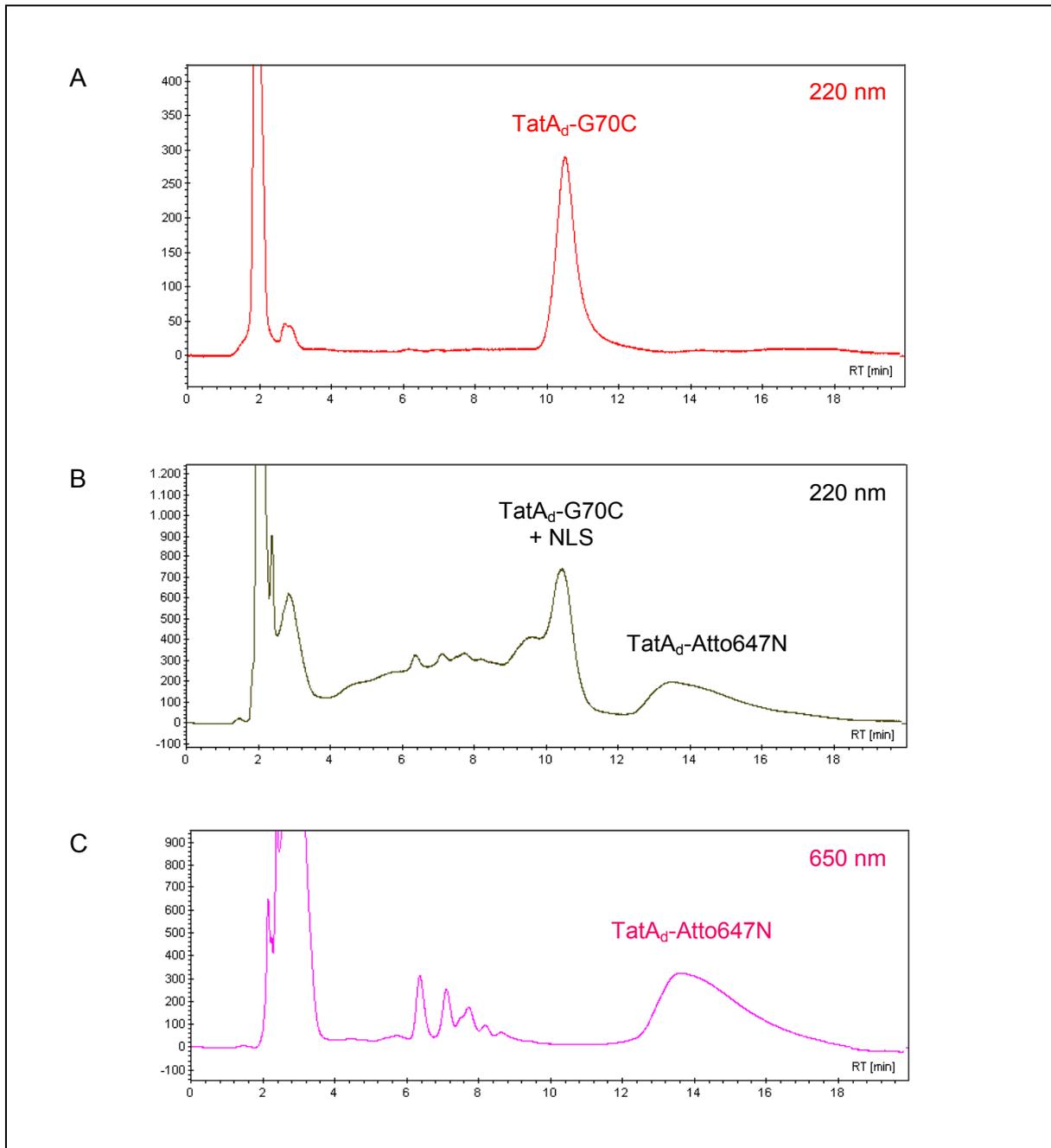


Abb. 32: HPLC-Chromatogramme der TatA_d-Atto647N Aufreinigung. A: TatA_d-G70C in PBS Puffer aufgetragen. Retentionszeit des Proteins beträgt 10.5 min. B: Auftrennung des TatA_d-G70C Reaktionsgemischs nach Atto647N-Kopplung (gelöst in PBS-Puffer mit 1% NLS). Die Retentionszeit von TatA_d-Atto647N beträgt 13.5 min, von NLS und TatA_d-G70C 10.5 min C: Detektion des Atto647N Farbstoffs während der Aufreinigung bei 650 nm. Bei 13.5 min konnte der proteingebundene Fluorophor detektiert werden.

Nach der Fluoreszenzkopplung wurde die Masse der aufgereinigten TatA_d-Atto647N und TatA_d-Alexa568 Proteine mit MALDI-TOF überprüft (Abb. 33). Sowohl für TatA_d-Atto647N als auch für TatA_d-Alexa568 konnte die richtige Masse bestimmt werden:

Aufgereinigtes Protein	Berechnete Masse in Da	Ermittelte Masse in Da
TatA _d -Atto647N	8213.6	8213
TatA _d -Alexa568	8226.5	8206

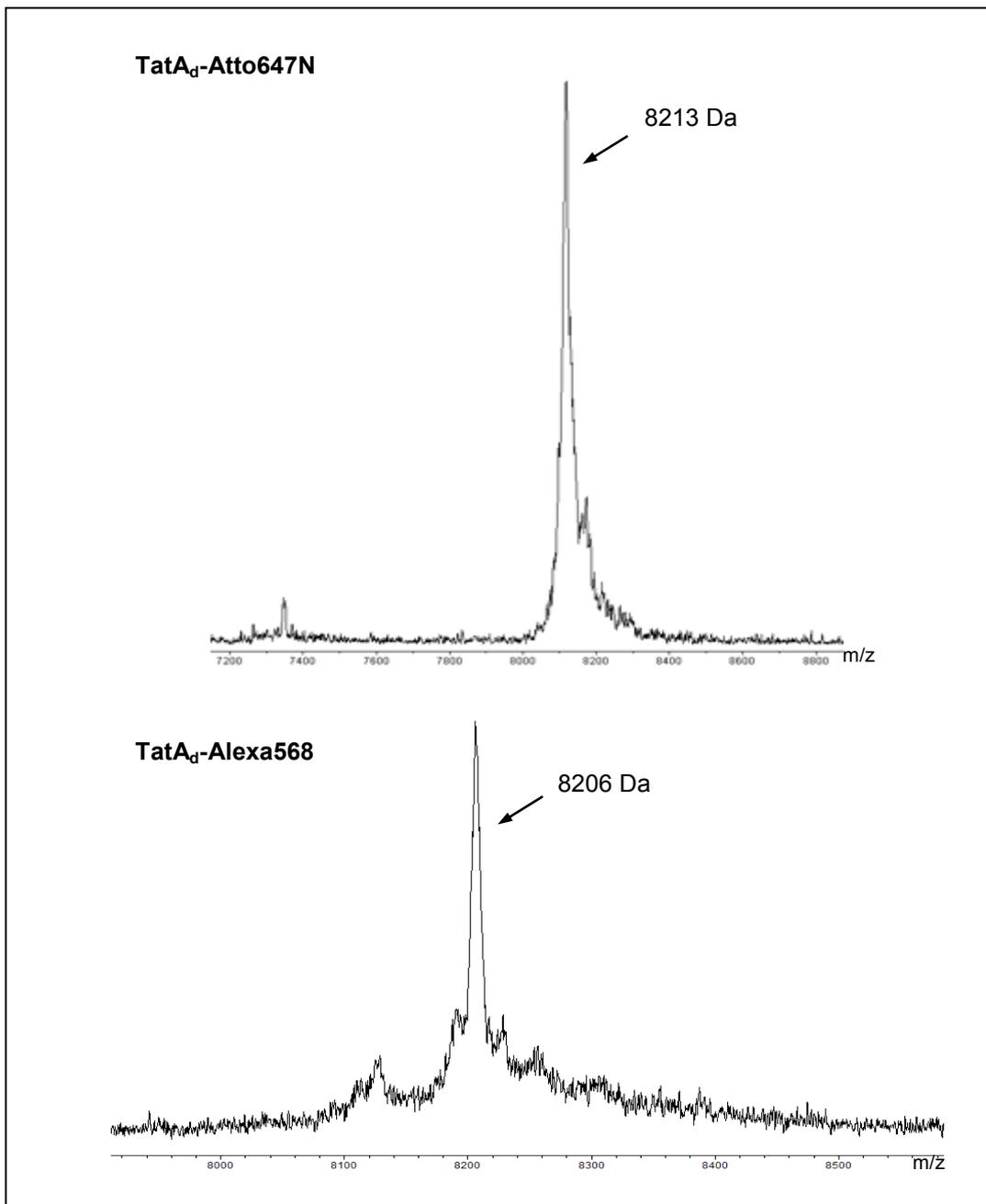


Abb. 33: MALDI-TOF Spektrum vom aufgereinigten TatA_d-Atto647N und TatA_d-Alexa568. Für TatA_d-Atto647N konnte eine Masse von 8213 Da bestimmt werden und für das TatA_d-Alexa568 eine Masse von 8206 Da.

3.3.3. Darstellung von TatC_d

Für die TatC_d Expression und Aufreinigung wurde das Plasmid pQE60 mit dem einklonierten *tatC_d*-Gen verwendet. TatC_d trägt C-terminal einen His-Tag, der die Proteinaufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatografie ermöglicht. Das Protein wurde analog dem Protokoll von Dr. Olga Nolandt aufgereinigt [97].

TatC_d wurde in *E. coli* M 15 Zellen exprimiert, danach wurden die Zellen geerntet, mit Ultraschall aufgeschlossen und die Membranfraktion isoliert. Das hydrophobe Protein wurde aus der Membranfraktion mit einem Detergens (NLS) solubilisiert und durch Nickel-Affinitätschromatografie aufgereinigt. Anschließend wurde das Membranprotein einer Dialyse unterzogen, um das Detergens wieder zu entfernen. Nach der Aufreinigung wurde das Protein mittels SDS-PAGE auf die Reinheit untersucht (Abb. 34). Im SDS-Gel erkennt man nur eine starke TatC_d Proteinbande bei 28.6 kDa. Somit konnte das Membranprotein erfolgreich exprimiert und aufgereinigt werden.

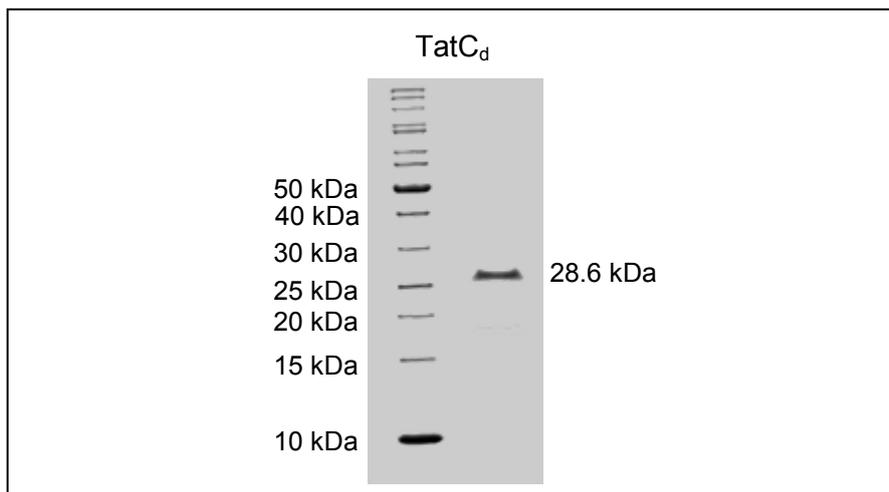


Abb. 34: SDS-PAGE vom aufgereinigten TatC_d. Das TatC_d Protein ist C-terminal mit einem His-Tag fusioniert und hat eine Masse von 28.6 kDa.

3.3.4. Tat-abhängiger Transport von SP-GFPuv in GUVs

Nachdem alle Tat-Komponenten für den *in vitro* Translokationsassay hergestellt werden konnten, musste eine geeignete Methode gefunden werden, die zum einen die Herstellung von GUVs erlaubt und zum anderen eine Rekonstitution der Tat_{A_d}C_d Proteine in die Vesikel ermöglicht. Dafür wurde die Methode der GUV Produktion durch die Elektroformation gewählt (Abb. 35) [98]. Zuerst musste nach einem Lösungsmittel gesucht werden, indem sowohl die Tat_{A_d} und Tat_{C_d} Proteine als auch das DMPC Lipid löslich sind. Hierfür stellte sich das Hexafluoroisopropanol (HFIP) als geeignet dar. In HFIP konnten alle Komponenten in gewünschter Zusammensetzung gelöst und gemischt werden.

Die Protein/Lipid/HFIP Mischung wurde auf ein mit Indiumzinnoxid (ITO = *indium tin oxide*) beschichtetes Glasplättchen aufgetragen und eingetrocknet. Um Reste des organischen Lösungsmittels zu entfernen, wurde diese über Nacht bei vermindertem Druck gelagert. Danach wurden die Glasplättchen in ein mit Saccharose-Lösung gefülltes Eppendorfgefäß gegeben und eine Spannung (5 Hz, 3V für 2 h) angeschlossen. Durch die Wechselspannung wird ein Anschwellen der multilamellaren Lipidschichten auf dem leitfähigen ITO-Glas induziert, wobei sich die Lipidschichten zu lösen beginnen und sich meist in Form von unilamellaren Vesikeln abkapseln (siehe Abb. 35). Durch diesen Prozess werden Tat_{A_d}C_d-Vesikel generiert, in denen die Saccharose-Lösung (pH 6.0) eingeschlossen ist.

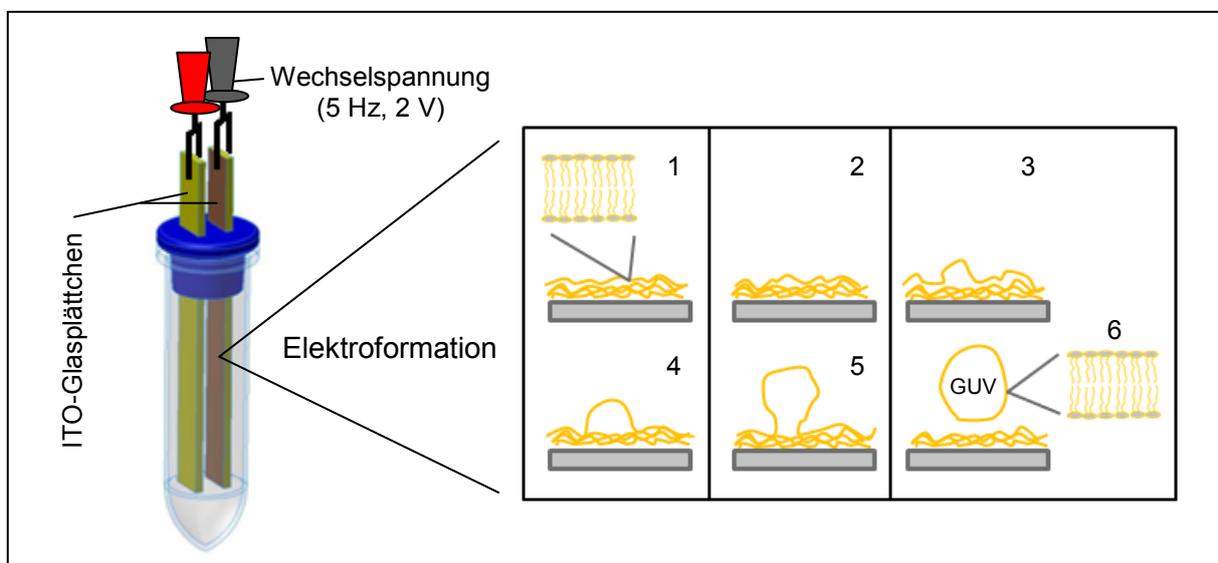


Abb. 35: GUV-Ausbildung durch Elektroformation. Auf ein ITO-Glasplättchen (ITO: *indium tin oxide*) wird die Protein/Lipid/HFIP Mischung aufgetragen und eingetrocknet (HFIP: Hexafluoroisopropanol). Die ITO-Glasplättchen werden in ein Eppendorfgefäß gegeben, das mit Saccharose-Lösung gefüllt ist. Durch das Anlegen einer Wechselspannung (5 Hz, 2V) an die Glasplättchen, beginnen die Lipide an zu schwellen (1-5) und lösen sich von den multilamellaren Lipidschichten als große unilamellare Vesikel ab (6). In diesen GUVs (GUV: *giant unilamellar vesicle*) sind auch die Tat_{A_d}C_d Proteine insertiert. Im Inneren eines GUV befindet sich die Saccharose-Lösung.

Als Tat-abhängiges Substrat wurde das natürliche prePhoD durch ein SP-GFPuv Konstrukt ersetzt (Abb. 29). Hier wurde das grünfluoreszierende GFPuv Protein mit dem N-terminalen Tat-Signalpeptid aus prePhoD fusioniert. Das exprimierte und aufgereinigte SP-GFPuv wurde von außen in den PBS-Puffer der präparierten GUV-Lösung zugegeben. Nach ca. 10 bis 15 Minuten konnte unter dem Laser-Spinning-Disc-Konfokalmikroskop ein aktiver SP-GFPuv Transport in die TatA_dC_d-GUVs beobachtet werden.

In Abb. 36 wurden GUVs mit folgender Zusammensetzung präpariert:

TatA _d -Atto647N	1 : 32.000	DMPC	} Protein zu Lipidverhältnis: 11: 32.000
TatA _d	5 : 32.000	DMPC	
TatC _d	5 : 32.000	DMPC	

In den Mikroskopaufnahmen (Abb. 36) wird eine Überlagerung von zwei Kanälen gezeigt. In grün ist die Fluoreszenz von SP-GFPuv dargestellt und in rot die Fluoreszenz von TatA_d-Atto647N. In den Aufnahmen erkennt man einige GUVs, die im Inneren ein stärkeres GFPuv Fluoreszenzsignal aufweisen als die äußere Pufferumgebung. Hier wurde das Substrat eindeutig durch die TatA_dC_d-Translokase aktiv ins Innere des Vesikels transportiert. GUVs in denen kein Tat-Transport stattgefunden hat erscheinen dunkler, da die GFPuv Fluoreszenzintensität des äußeren Milieus stärker ist.

Die Proteinverteilung in den Vesikeln scheint inhomogen zu sein, das erkennt man anhand des TatA_d-Atto647N Fluoreszenzsignals. Jedoch kann keine genaue Aussage über die Verteilung von unmarkierten TatA_d und TatC_d Proteinen getroffen werden, da diese keine Fluorophor-Markierung tragen. Warum nicht alle GUVs einen aktiven Tat-Transport aufweisen muss noch geklärt werden.

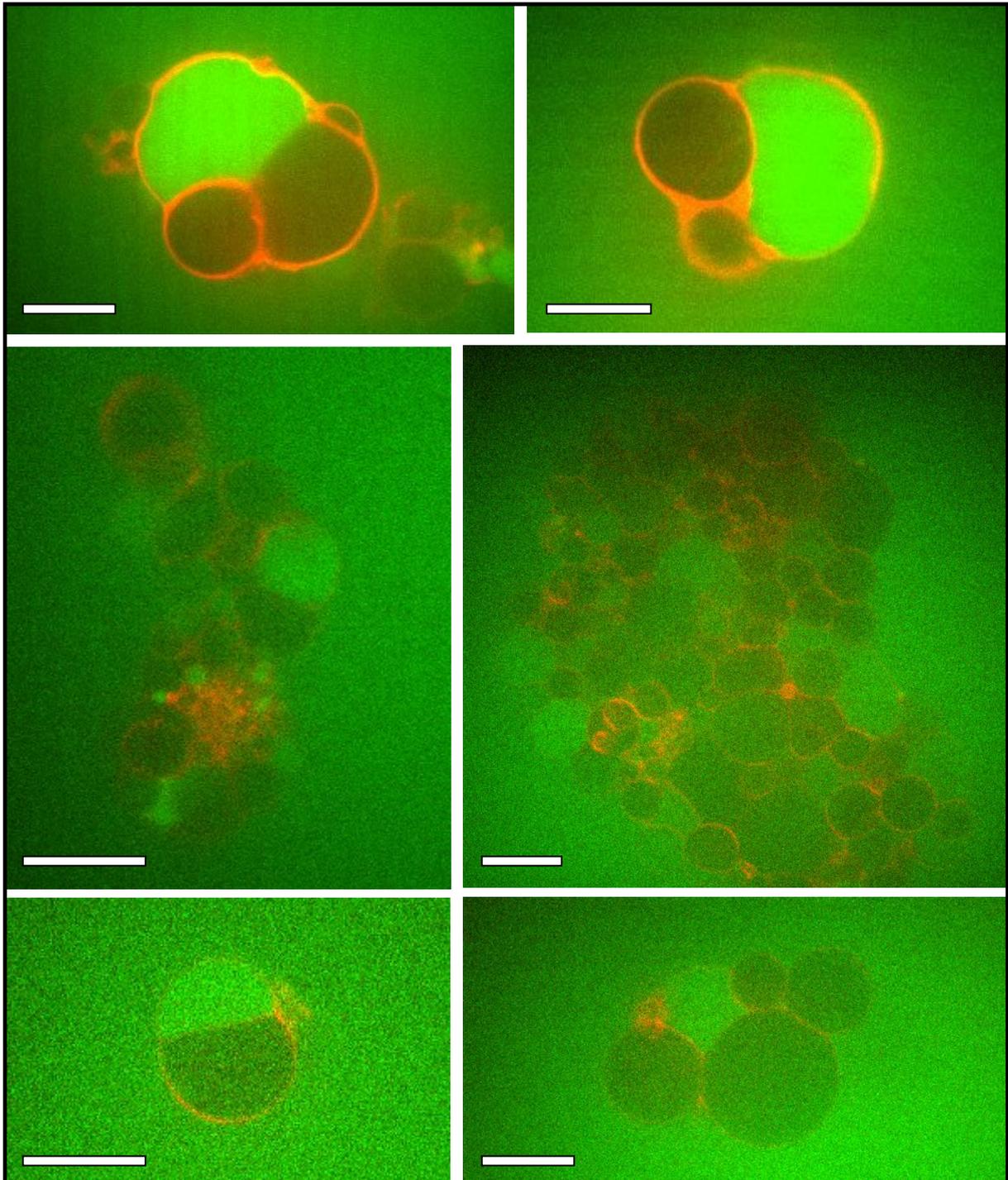


Abb. 36: GUVs mit rekonstituierten TatA_d-Atto647N, TatA_d und TatC_d nach Zugabe von SP-GFPuv. Einige Vesikel weisen im Inneren eine stärkere SP-GFPuv Fluoreszenzintensität (in grün) auf, als die äußere Pufferumgebung. Hier wurde das Substrat durch die TatA_dC_d-Pore aktiv ins Innere befördert. In einigen GUVs fand kein SP-GFPuv Transport statt, diese erscheinen dunkler als das äußere Milieu. In rot ist die Fluoreszenz von TatA_d-Atto647N dargestellt. Laser-Spinning-Disc-Konfokalmikroskopaufnahmen, Maßstabsbalken: 20 µm.

Damit sichergestellt werden kann, dass das SP-GFPuv Substrat nur aktiv durch die TatA_dC_d-Translokase in die Vesikeln transportiert wird, wurden Negativkontrollen präpariert und auf den SP-GFPuv Transport getestet. Da für diese Testreihe keine fluorophormarkierten TatA_d Proteine verwendet wurden, wurde die Vesikelmembran durch die Inkorporation eines Lipofluorophors (Dil) sichtbar gemacht.

Zuerst wurde der *in vitro* Translokationsassay nur mit DMPC-Lipidvesikel ohne Protein (Abb. 37) durchgeführt. In keinem Lipidvesikel konnte ein aktiver SP-GFPuv Transport beobachtet werden. Alle Vesikel zeigten eine geringere SP-GFPuv Intensität als die umgebende Pufferlösung.

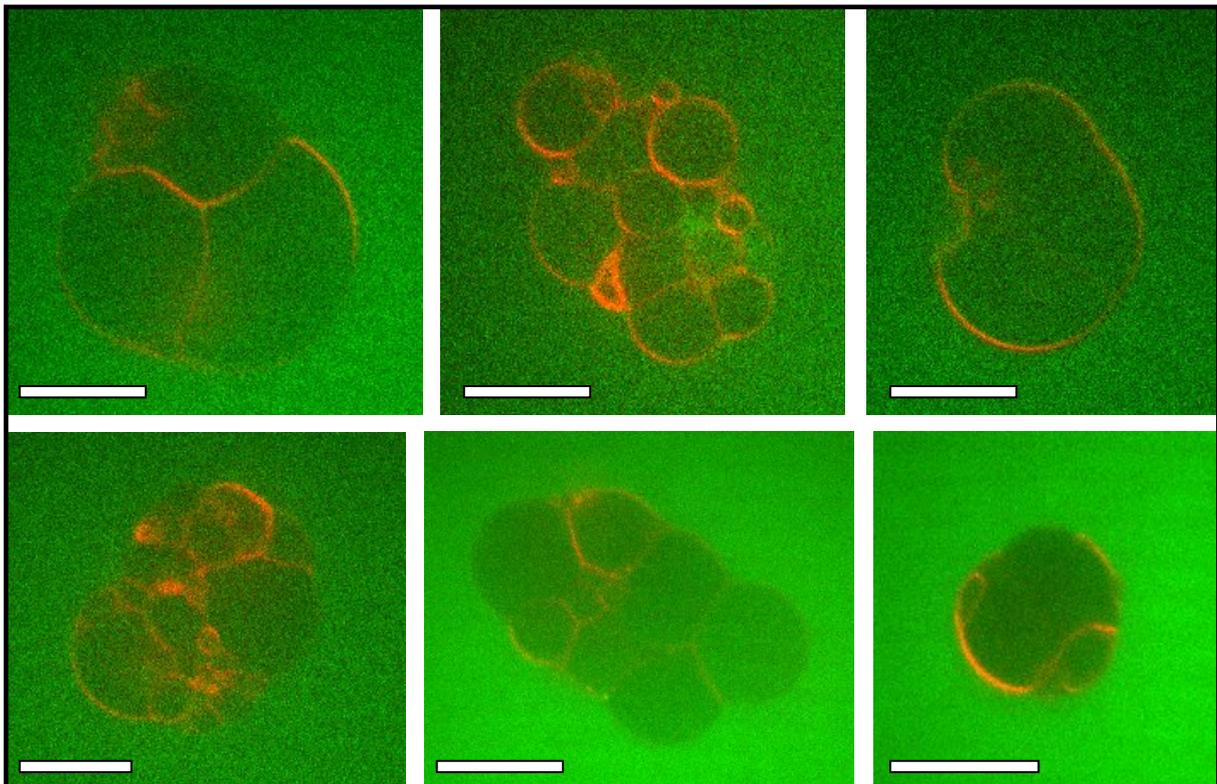


Abb. 37: GUVs ohne TatA_d und TatC_d. Diese GUVs bestehen nur aus Lipiden, sie stellen eine Negativkontrolle für den TatA_dC_d-Transport dar. Wie erwartet wurden keine GUVs beobachtet, die eine höhere SP-GFPuv Intensität als das umgebende Medium zeigten. In rot ist die Fluoreszenz von Lipofluorophor Dil gezeigt und in grün von SP-GFPuv. Laser-Spinning-Disk-Konfokalmikroskopaufnahmen, Maßstabsbalken: 20 µm.

Des Weiteren wurden zum einen GUVs nur mit TatC_d (TatC_d 5: 32.000 DMPC in Abb. 38) und zum anderen nur mit TatA_d (TatA_d 10: 32.000 DMPC in Abb. 39) präpariert und anschließend auf SP-GFPuv Translokation untersucht. Diese GUVs sollten keinen SP-GFPuv Transport in die Vesikel zeigen, da sich keine funktionsfähige TatA_dC_d-Translokase ausbilden kann.

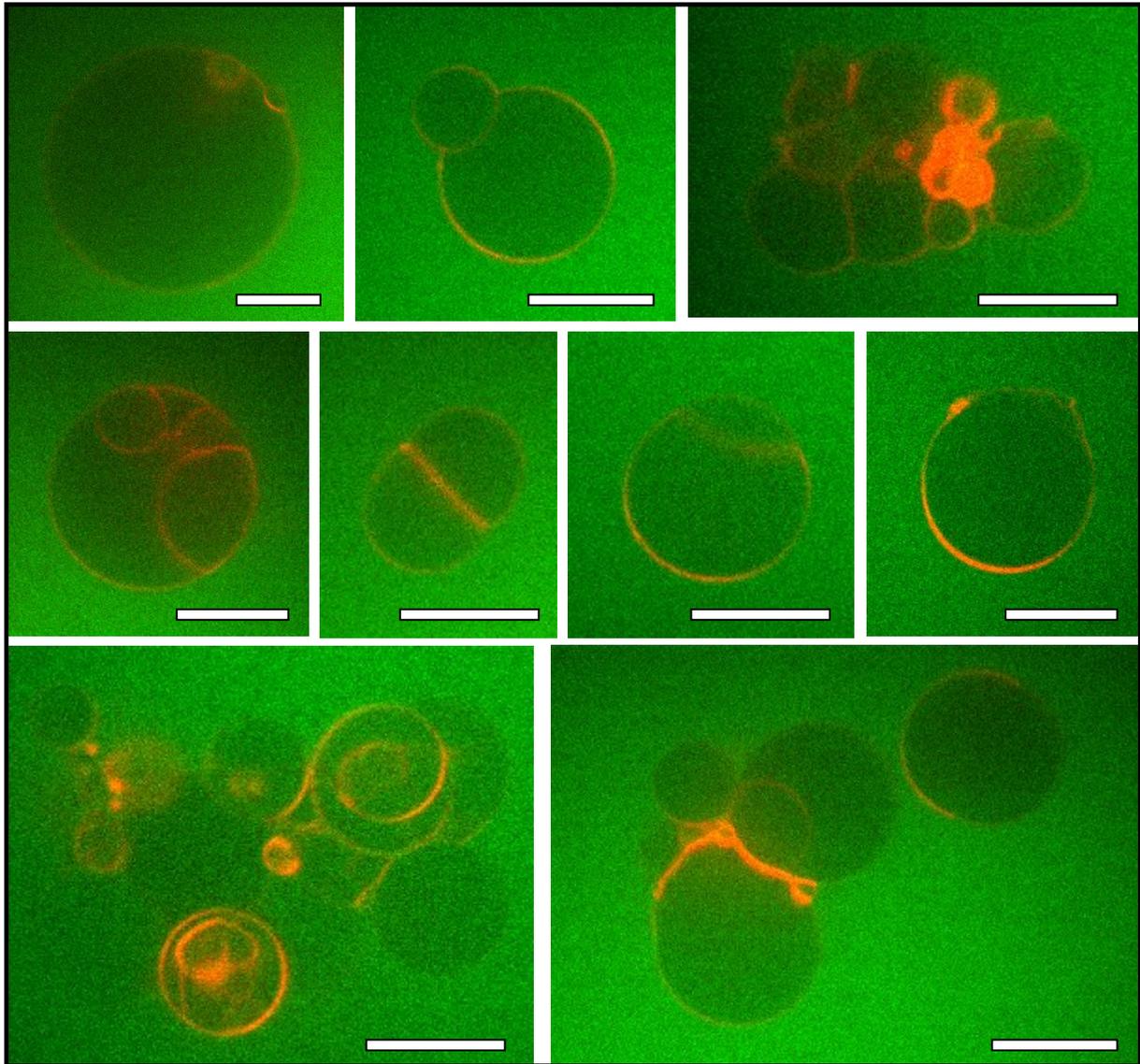


Abb. 38: GUVs mit rekonstituierten TatC_d. Diese GUVs setzen sich aus dem DMPC-Lipid und TatC_d zusammen. Für eine Visualisierung wurde das Lipofluorophor Dil inseriert. Diese GUVs dienen als Negativkontrolle, denn ohne die porenbildende TatA_d Untereinheit sollte kein SP-GFPuv Transport stattfinden. Das bestätigen auch diese Aufnahmen. Es konnten keine Vesikel beobachtet werden, die mit SP-GFPuv gefüllt waren. In rot ist die Fluoreszenz von Dil und in grün die von SP-GFPuv dargestellt. Laser-Spinning-Disc-Konfokalmikroskopaufnahmen, Maßstabsbalken: 20 µm.

In TatC_d-GUVs ohne TatA_d fand kein aktiver Transport von SP-GFPuv statt (Abb. 38). Die Aufnahmen zeigen, dass ohne den porenbildenden TatA_d Untereinheiten, sich keine funktionsfähige Tat-Translokase ausbilden kann. Auch in TatA_d-GUVs ohne Rezeptorprotein TatC_d konnte keine Substrattranslokation beobachtet werden (Abb. 39). Die Pufferumgebung weist hier eine höhere SP-GFPuv Fluoreszenzintensität auf, als das Innere der Vesikeln. Somit wird die Annahme bestätigt, dass TatA_d alleine keine funktionsfähige Pore ausbilden kann, dafür wird ebenfalls TatC_d benötigt.

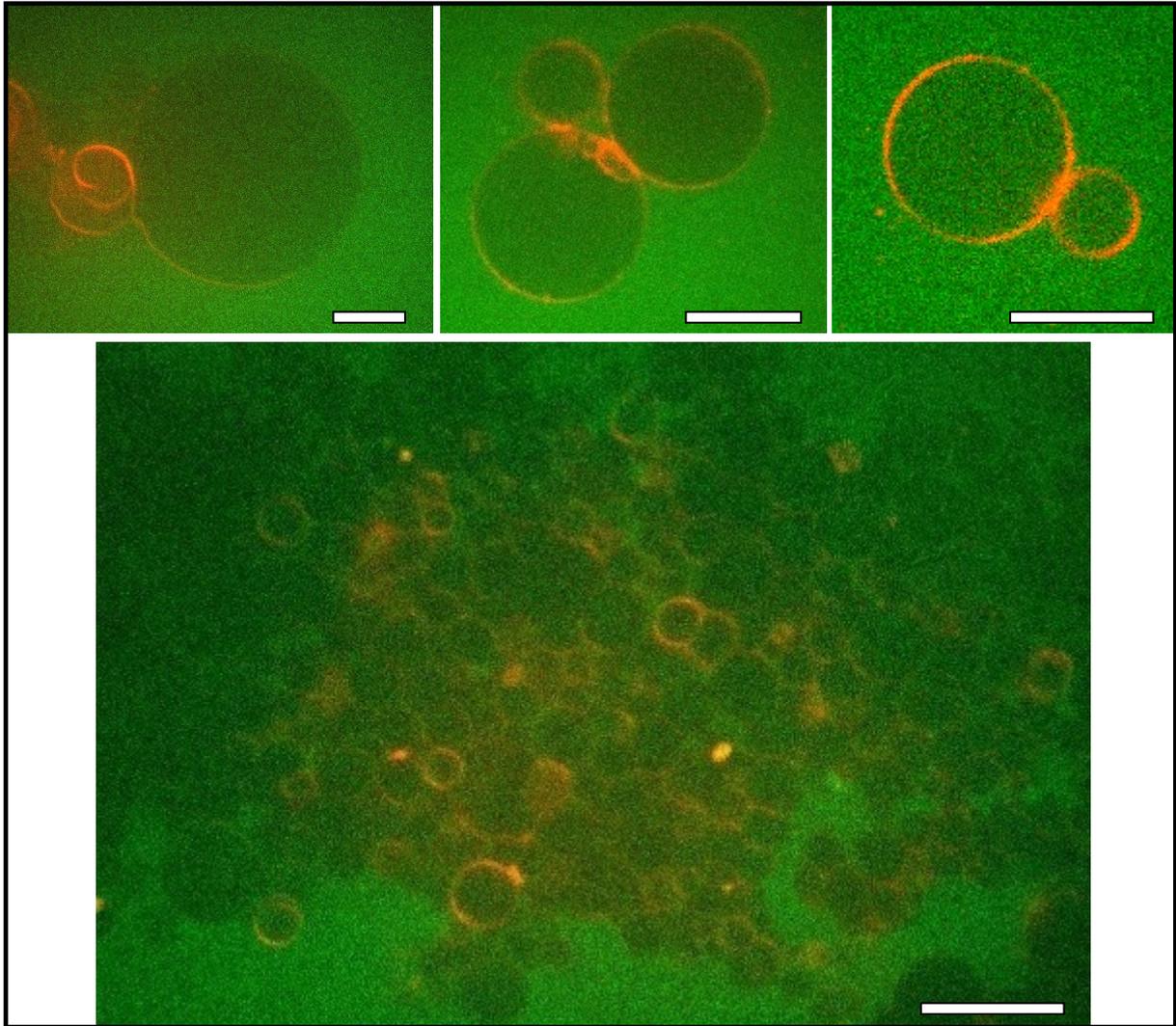


Abb. 39: GUVs mit rekonstituierten TatA_d. Diese GUVs setzten sich aus dem DMPC-Lipid und TatA_d zusammen. Für eine Visualisierung wurde das Lipofluorophor Dil inseriert. Diese GUVs wurden als Negativkontrolle hergestellt, denn ohne das TatC_d ist die Tat-Translokase nicht komplett, sodass kein SP-GFPuv Transport stattfinden sollte. Dies zeigte sich auch in den Aufnahmen, es konnten keine Vesikel beobachtet werden, die mit SP-GFPuv gefüllt waren. In rot ist die Fluoreszenz von Dil und in grün die von SP-GFPuv dargestellt. Laser-Spinning-Disc-Konfokalmikroskopaufnahmen, Maßstabsbalken: 20 µm.

Als weitere Negativkontrolle wurde das verkürzte TatA₂₋₄₅ Proteinfragment verwendet, bei welchem die C-terminalen Aminosäuren ab Position 46 nicht mehr vorhanden sind. Dieser Mutante fehlt die DCR-Region, welche für die Selbstassemblierung nach dem Charge Zipper Modell benötigt wird (siehe Kapitel 3.1). Demnach sollte die Mutante die Fähigkeit zur Homooligomerisierung verloren haben. Um das zu überprüfen, wurde das Oligomerisierungsmuster von aufgereinigten TatA_d und TatA₂₋₄₅ Proteine im BN-Gel verglichen (Abb. 40).

Wie erwartet zeigte das TatA₂₋₄₅ Protein im BN-Gel keine Oligomerbanden, wohingegen im direkten Vergleich hierzu der TatA_d Wildtyp sehr stark zur Homooligomerisierung neigte. Beim verkürzten Proteinfragment konnte nur ein Monomer nachgewiesen werden. Somit stützt das BN-PAGE Ergebnis die Vermutung, dass ohne die DCR-Region keine TatA_d Assemblierung mittels Charge Zipper Mechanismus möglich ist, was die Disassemblierung der TatA₂₋₄₅ Mutante erklärt.

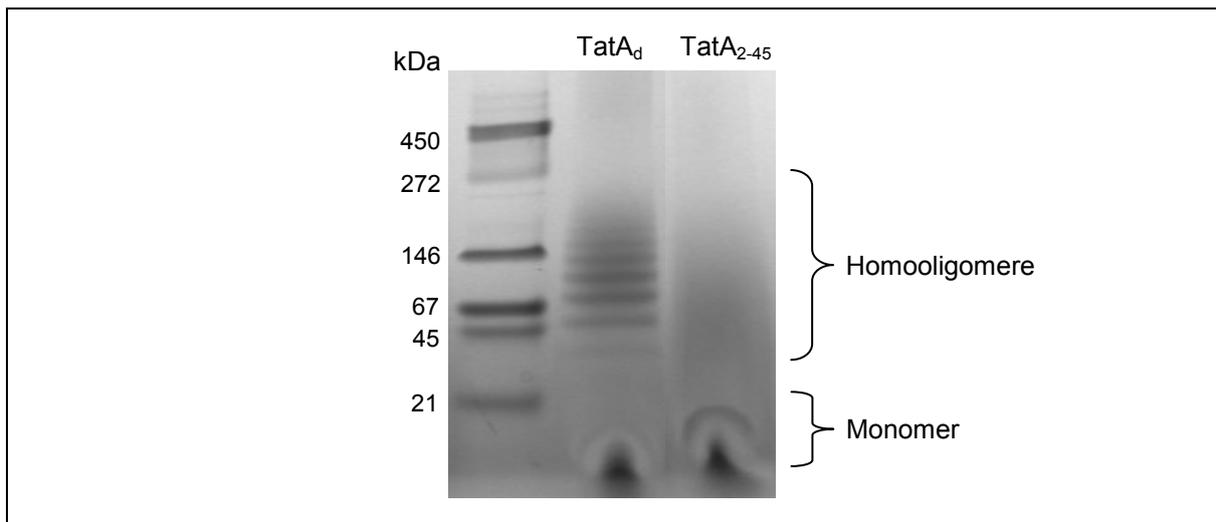


Abb. 40: BN-PAGE von TatA_d und TatA₂₋₄₅. Die aufgereinigten Proteine wurden auf ein BN-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Das TatA_d zeigt eine Homooligomerisierung durch mehrere Proteinbanden. Das verkürzte TatA₂₋₄₅ zeigt dagegen nur eine Monomerbande. Durch die C-terminale Verkürzung der DCR-Region hat das Protein die Tendenz zur Selbstassemblierung verloren.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass TatA₂₋₄₅ nicht selbstassemblieren kann, sollte sich auch keine intakte Tat-Pore mit TatC_d ausbilden können. Deshalb wurde die TatA₂₋₄₅ Mutante zusammen mit TatC_d in GUVs rekonstituiert und auf den Substrattransport getestet. Die Ergebnisse des *in vitro* Translokationsassays zeigen deutlich, dass diese Mutante nicht funktionsfähig ist. In den Mikroskopaufnahmen (Abb. 41) konnten keine Vesikel beobachtet werden, die aktiv SP-GFPuv ins Innere translozierten. Das zeigt deutlich, dass die fehlende DCR-Region für die Funktion des TatA_d Proteins wichtig ist.

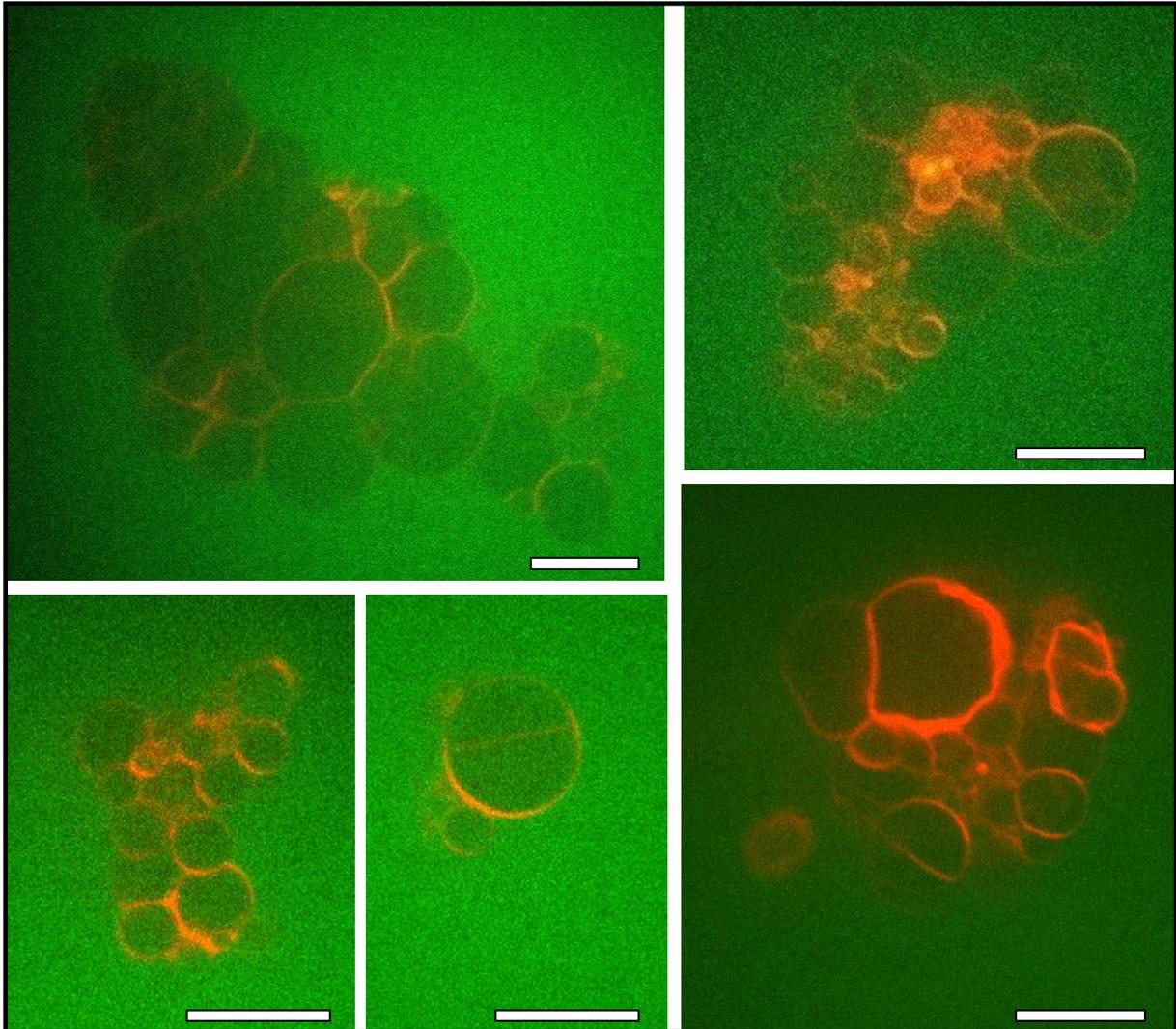


Abb. 41: GUVs mit rekonstituierten $TatA_{2-45}$ und $TatC_d$. Es wurde anstatt dem $TatA_d$ Wildtyp ein verkürztes $TatA_{2-45}$ Proteinfragment in die GUVs rekonstituiert, bei dem der C-terminale Bereich und die DCR-Region fehlen. Die Tat-Translokase ist mit dem $TatA_{2-45}$ Protein inaktiv. Es wurden keine GUVs gesichtet, die mit SP-GFPuv gefüllt waren. In rot ist die Fluoreszenz von Lipofluorophor Dil gezeigt und in grün von SP-GFPuv. Laser-Spinning-Disc-Konfokalmikroskopaufnahmen, Maßstabsbalken: 20 μm .

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass alle Ergebnisse der Negativkontrollen den Beweis erbringen konnten, dass ein SP-GFPuv Transport nur durch die intakte $TatA_dC_d$ -Pore in die Vesikel erfolgen kann. Der neu entwickelte *in vitro* Translokationsassay erlaubt die Detektion eines Substrattransports durch die $TatA_dC_d$ -Translokase in die Vesikel. Diese Methode stellt ein neues Instrument für die Analyse der Tat-Translokase dar, wodurch viele Mutanten getestet werden können, um mehr Erkenntnisse über das Tat-System zu gewinnen. Dadurch ergeben sich vielfältige Möglichkeiten zur Erforschung des Tat-abhängigen Translokationsprozesses.

3.3.5. Untersuchung der TatA_d–TatA_d Interaktion in GUVs mittels Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie

Um eine TatA_d Assemblierung in den GUVs nachzuweisen, die aufgrund der TatA_dC_d Porenbildung während des Translokationsprozesses stattfinden soll, wurde die zwei Farben, zwei Fokus Scanning-Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie (2c2f-sFCCS: *Dual-color dual-focus scanning fluorescence cross-correlation spectroscopy*) genutzt. Die 2c2f-sFCCS-Messungen wurden in Kooperation mit Prof. G. Ulrich Nienhaus (KIT) durchgeführt.

Mit dieser Technik kann die Interaktion von zwei TatA_d Proteinen, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, in einem GUV detektiert werden. Dabei wird die Diffusion in der Lipiddoppelschicht von beiden Fluorophoren gemessen und kreuzkorreliert [99-100]. Kommt es zu einer Assemblierung der TatA_d Proteine, so weisen die zwei assoziierten Fluorophore eine Co-Diffusion auf. Diese Fluorophorinteraktion spiegelt sich in der Kreuzkorrelationskurve wieder. Das Prinzip der 2c2f-sFCCS-Messung besteht darin, dass zwei separate Laser mit einem definierten Abstand die Vesikelmembran in vertikaler Richtung, bei zwei verschiedenen Wellenlängen, abwechselnd anregen können (Abb. 42 A). Die von den Fluorophoren emittierten Photonen werden mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels aufgeteilt und von zwei Lawinenphotodioden detektiert. Die Fluoreszenzfluktuationen der beiden Fluorophore werden als Funktion der Zeit aufgenommen und die Fluoreszenz-Zeitspur aus jedem Kanal extrahiert. Anschließend können daraus die Auto- und Kreuzkorrelationskurven berechnet werden (Abb. 42 B). Im Gegensatz zu FCS (*fluorescence correlation spectroscopy*) ist hier keine Kalibrationsmessung für die Berechnung des Detektionsvolumens nötig, da der Abstand d zwischen den beiden Laserstrahlen bekannt ist. Die Kreuzkorrelationsfunktion für zweidimensionale Diffusion ist wie folgt definiert:

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1/2} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D S^2}\right)^{-1/2} \exp\left(-\frac{d_r^2}{1 + \tau/\tau_D}\right)$$

- $N = \langle C \rangle \pi w_0 z_0$ → Mittlere Anzahl an Fluorophore im Detektionsbereich
 → $\langle C \rangle$ = Konzentration der Fluorophore im Detektionsbereich
 → w_0 = laterale Fokusbereich, z_0 = axiale Fokusbereich
 $S = z_0/w_0$ → Fit-Parameter, der die Elipsizität des Detektionbereichs beschreibt
 $\tau_D = w_0^2/4D$ → Mittlere Diffusionszeit der Fluorophore im Detektionsbereich
 → D = Diffusionskoeffizient
 $d_r = d/w_0$ → Fixer Abstand zwischen den beiden Anregungslaser

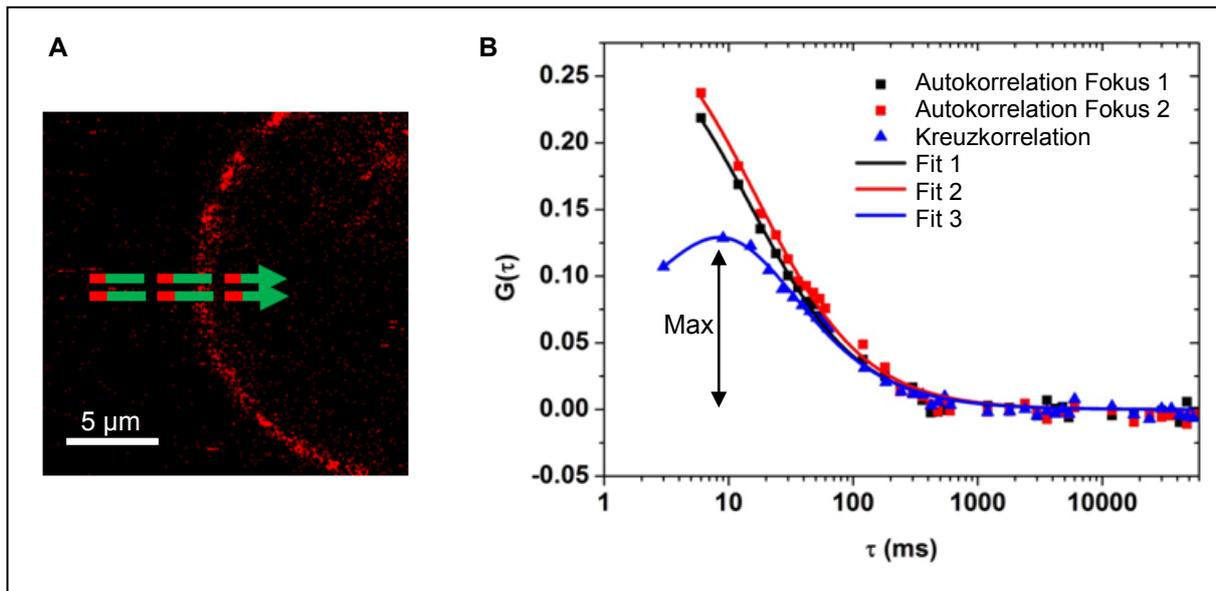


Abb. 42: Das Prinzip der 2c2f-sFCCS. A) Zwei in GUV rekonstituierte Membranproteine, die jeweils mit einem anderen Fluorophor gekoppelt sind, können mit 2c2f-sFCCS auf eine Interaktion getestet werden. Dabei wird die vertikale Vesikelmembran von zwei Laserstrahlen, in zwei verschiedenen Wellenlängen, abwechselnd angeregt. Die von beiden Fluorophoren ausgestrahlte Fluoreszenz wird mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels aufgeteilt und von zwei Lawinendiioden detektiert. Aus den Fluoreszenzfluktuationen wird die Auto- und Kreuzkorrelationsfunktion berechnet. B) 2c2f-sFCCS Auto- und Kreuzkorrelationskurven von zwei unterschiedlich fluorophormarkierten Membranproteinen. Das Maximum (Max) der Kreuzkorrelationskurve gibt die durchschnittliche Anzahl an assoziierten Fluorophoren im Fokus an. Hier zeigt die Kreuzkorrelation die Interaktion beider Membranproteine an.

In folgenden Abbildungen (Abb. 43/ Abb. 44) sind präparierte TatA_dC_d - GUV s dargestellt, die für eine TatA_d Interaktionsstudie hergestellt wurden. Um die Interaktion zwischen TatA_d während des Tat -Transports mittels Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie zu messen, wurden beide fluorophormarkierten TatA_d -Atto647N und TatA_d -Alexa568 Proteine, zusammen mit TatC_d und dem TatA_d Wildtyp, in die GUV s rekonstituiert.

Die Zusammensetzung der GUV s bestand aus:

TatA_d -Atto647N	1 : 32.000	DMPC	} Protein zu Lipidverhältnis: 17: 32.000
TatA_d -Alexa568	1 : 32.000	DMPC	
TatA_d	10 : 32.000	DMPC	
TatC_d	5 : 32.000	DMPC	

Die präparierten GUV s wurden zuerst unter dem Spinning-Disc-Fluoreszenzmikroskop auf einen aktiven SP-GFPuv Transport untersucht. Die Aufnahmen in Abb. 43 zeigen eine erfolgreiche Inkorporation beider fluorophormarkierten TatA_d Proteine in die GUV s. Hier wurde das Fluoreszenzsignal von TatA_d -Atto647N (Abb. 43 A) und TatA_d -Alexa568 (Abb. 43 B) in denselben Vesikeln gegenübergestellt.

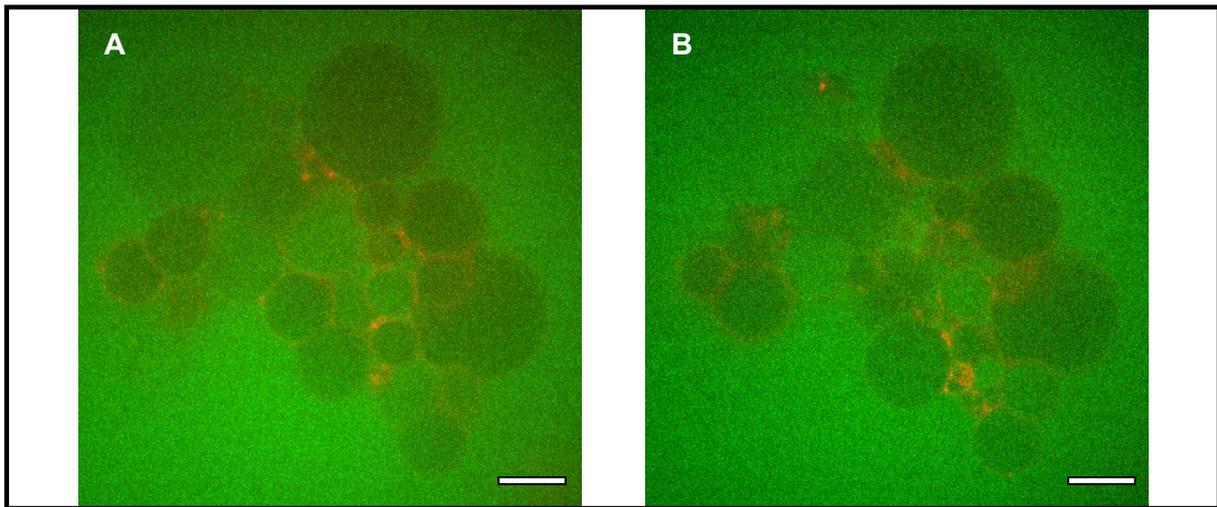


Abb. 43: TatA_dC_d-GUVs mit rekonstituierten TatA_d-Atto647N und TatA_d-Alexa568. A: Fluoreszenz von TatA_d-Atto647N (in rot). B: Fluoreszenz von TatA_d-Alexa568 (in rot). Auf beiden Bildern sind die gleichen GUVs abgebildet. Einige von ihnen haben damit begonnen sich mit dem Substrat SP-GFPuv (in grün) zu füllen. Laser-Spinning-Disc-Konfokalmikroskopaufnahmen, Maßstabsbalken: 20 µm.

Nach Zugabe von SP-GFPuv zu den TatA_dC_d-GUVs konnten Vesikel gesichtet werden, die eine deutlich höhere GFPuv Fluoreszenz aufwiesen, als die umgebende Lösung. Von hundert gezählten Vesikel waren vierzig mit SP-GFPuv gefüllt. Die Ergebnisse der Mikroskopaufnahmen sind aus Abb. 44 zu entnehmen. Hier wurden die Fluorophore von SP-GFPuv und TatA_d-Atto647N angeregt, da nur zwei Detektionskanäle für eine gleichzeitige Fluoreszenzanregung zur Verfügung standen. Nachdem eine erfolgreiche Rekonstitution beider fluorophormarkierten TatA_d Proteinen in die TatA_dC_d-GUVs bestätigt werden konnte und ein aktiver SP-GFPuv Transport in die Vesikel nachweisbar war, wurden im nächsten Schritt die Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsmessungen durchgeführt.

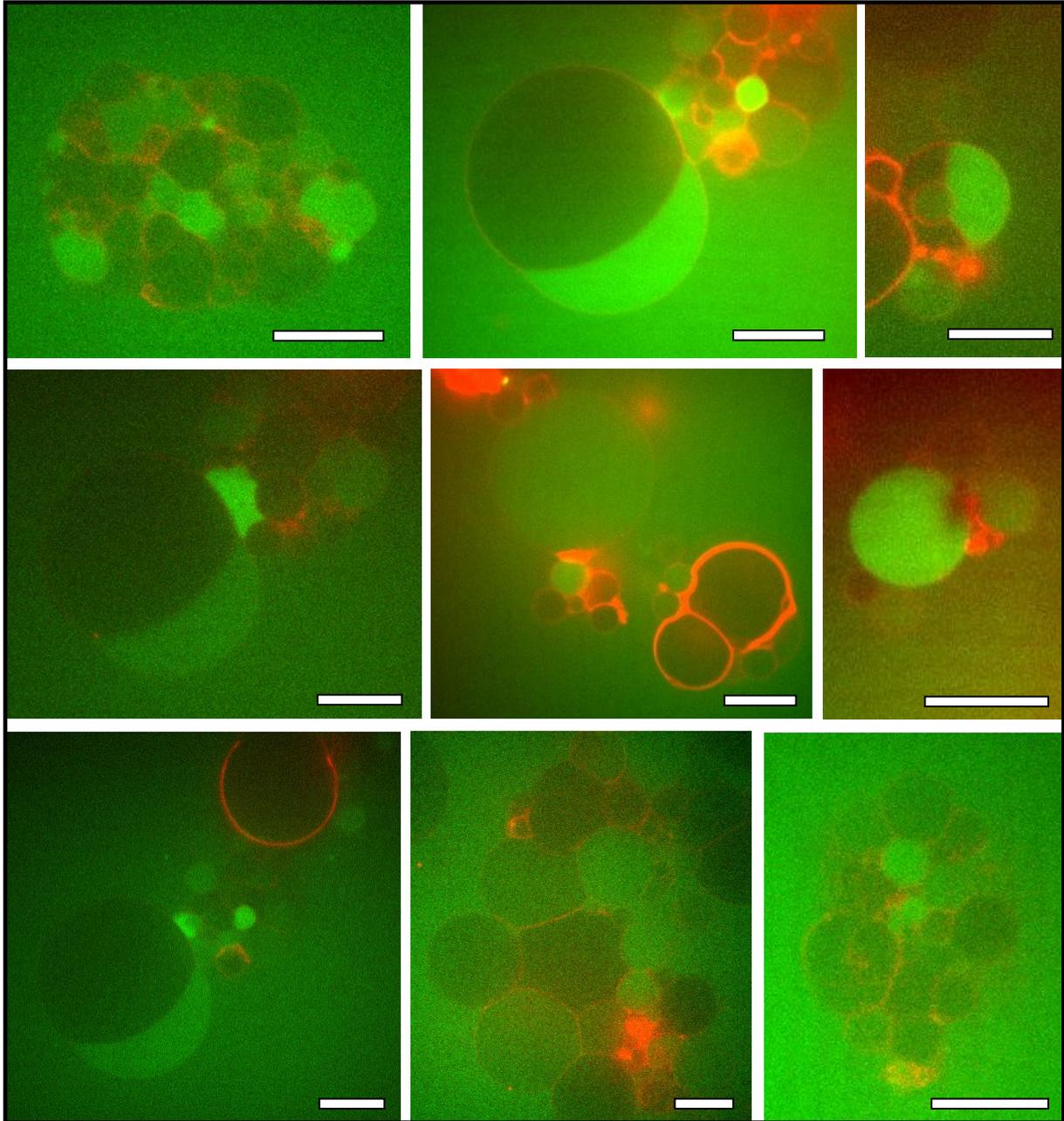


Abb. 44: GUVs mit rekonstituierten TatA_d-Atto647N, TatA_d-Alexa568, TatA_d und TatC_d nach Zugabe von SP-GFPuv. Einige Vesikel zeigen eine stärkere GFPuv Fluoreszenzintensität (in grün), als die äußere Pufferumgebung. Hier wurde das Substrat durch die TatA_dC_d-Pore aktiv ins Innere transloziert. In einigen GUVs fand kein SP-GFPuv Transport statt, diese erscheinen dunkler. Von den zwei markierten TatA_d Proteinen ist hier die Fluoreszenz von TatA_d-Atto647N in rot dargestellt, da nur mit zwei Kanälen gleichzeitig angeregt werden konnte. Laser-Spinning-Disc Konfokalmikroskopaufnahmen, Maßstabsbalken: 20 µm.

Mittels konfokalem STED-Mikroskop wurden die 2c2f-sFCCS-Messungen sowohl an leeren als auch an mit SP-GFPuv gefüllten Vesikel durchgeführt. Nach Auswertung der 2c2f-sFCCS Ergebnisse konnten eine $TatA_d$ Assemblierung nur in den mit SP-GFPuv gefüllten Vesikel detektiert werden. Vergleicht man die Kreuzkorrelationskurve eines gefüllten (Abb. 45) und leeren GUV (Abb. 46) so erkennt man nur im gefüllten GUV einen leichten Amplitudenanstieg. Dieser Amplitudenanstieg deutet auf eine Interaktion der beiden fluorophormarkierten $TatA_d$ Proteine hin. Im leeren GUV verläuft die Kreuzkorrelationskurve flach, hier konnte keine Interaktion von fluoreszenzmarkierten $TatA_d$ Proteinen nachgewiesen werden.

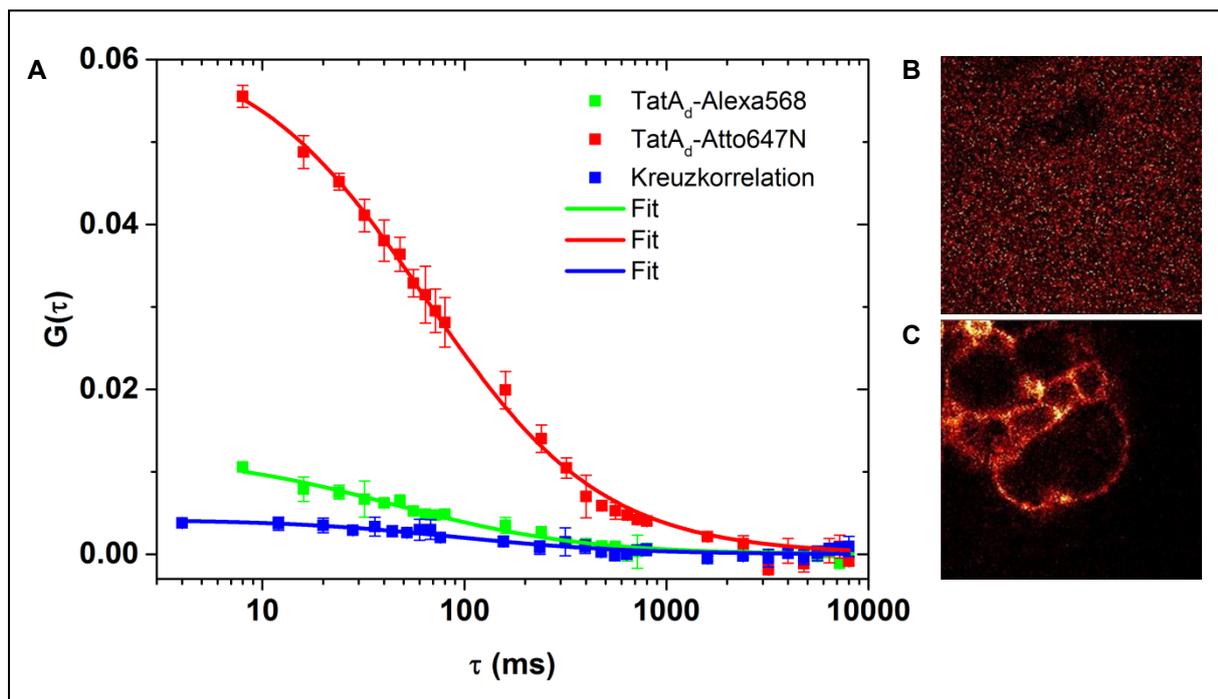


Abb. 45: Kreuz-Korrelationsmessung von $TatA_d$ -Atto647N und $TatA_d$ -Alexa568 in einem aktiven $TatA_dC_d$ -GUV. A: Berechnete Kreuzkorrelationskurve (in blau) von $TatA_d$ -Atto647N und $TatA_d$ -Alexa568 aus einem SP-GFPuv gefüllten Vesikel. In A ist ein leichter Amplitudenanstieg zu verzeichnen, was die Interaktion von beiden fluorophormarkierten $TatA_d$ Proteinen bestätigt. B: Fluoreszenzaufnahme von SP-GFPuv, C: Fluoreszenzaufnahme von $TatA_d$ -Atto647N im untersuchten GUV. Anhand der SP-GFPuv Fluoreszenz erkennt man im Inneren des Vesikel die gleiche SP-GFPuv Verteilung wie in der äußeren Pufferumgebung.

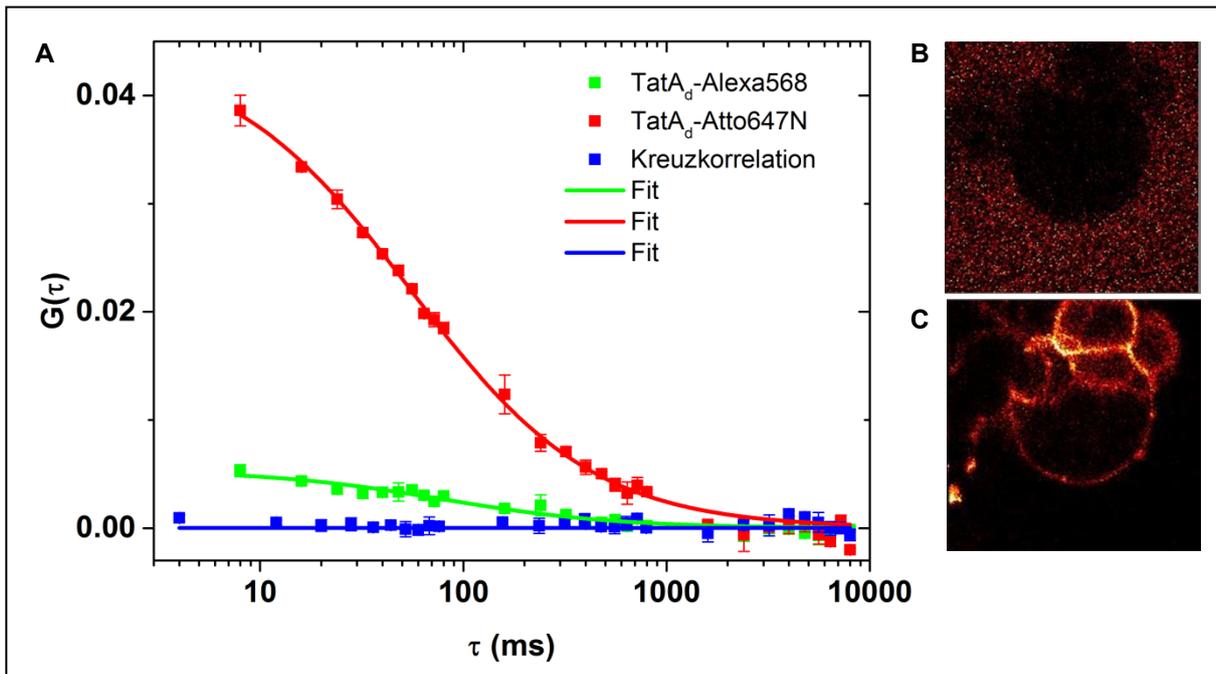


Abb. 46: Kreuz-Korrelationsmessung von TatA_d-Atto647N und TatA_d-Alexa568 in einem inaktiven TatA_dC_d-GUV. A: Berechnete Kreuzkorrelationskurve (in blau) von TatA_d-Atto647N und TatA_d-Alexa568 aus einem substratleeren Vesikel. Ein Amplitudenanstieg ist nicht zu erkennen. Hier konnte keine TatA_d Interaktion detektiert werden. B: Fluoreszenzaufnahme von SP-GFPuv, C: Fluoreszenzaufnahme von TatA_d-Atto647N im untersuchten GUV. Die SP-GFPuv Fluoreszenzverteilung zeigt deutlich, dass kein SP-GFPuv ins Innere des Vesikel transportiert wurde.

In Abb. 47 wurden TatA_d Kreuzkorrelationsmessungen von jeweils drei gefüllten und drei leeren GUVs zusammengefasst. Auch hier ist ein Amplitudenanstieg nur in den gefüllten Vesikel zu beobachten. Diese Messungen konnten die Annahme bestätigen, dass es nur in transportfähigen TatA_dC_d-GUVs zu einer TatA_d Assemblierung kommt.

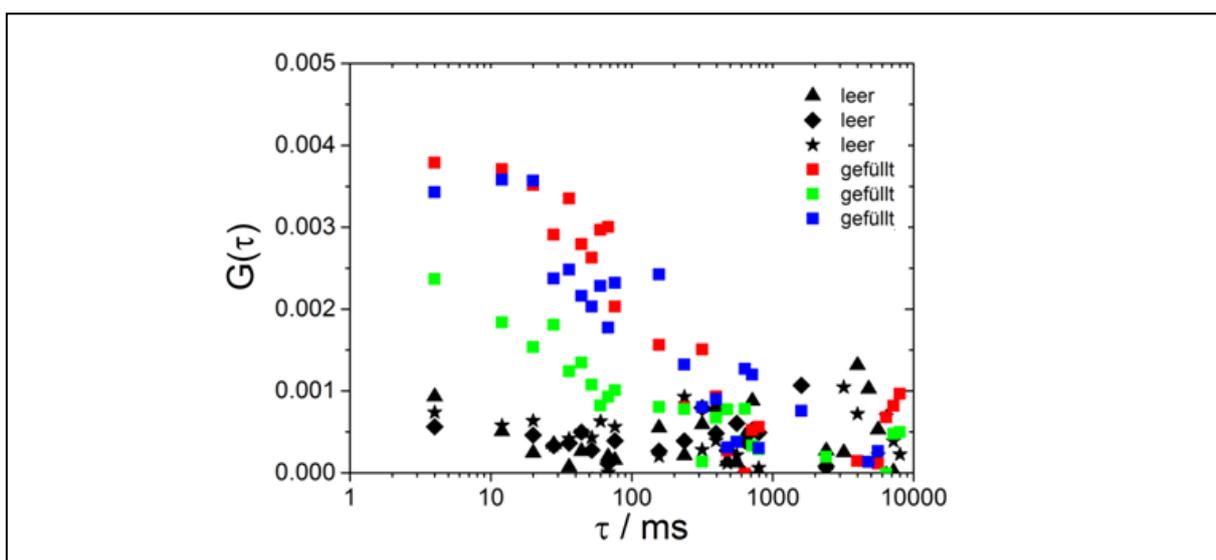


Abb. 47: Kreuzkorrelationsdaten aus drei substratgefüllten und drei leeren GUVs. Eine Kreuzkorrelation von TatA_d-Atto647N und TatA_d-Alexa568 konnte nur in den mit SP-GFPuv gefüllten Vesikel beobachtet werden. In leeren Vesikel ist kein Amplitudenanstieg zu sehen, somit kann eine TatA_d Assemblierung ausgeschlossen werden.

4. Diskussion

4.1. TatA_d Assemblierung aufgrund des Charge Zipper Mechanismus

Zu Beginn dieser Studie wurde im Arbeitskreis von Prof. Anne S. Ulrich ein neuer Assemblierungsmechanismus für Membranproteine, der als „Charge Zipper Mechanismus“ bezeichnet wird, postuliert [91]. Dieses Modell beschreibt die Assoziation von Membranproteinen durch die Ausbildung von Salzbrücken in hydrophober Umgebung, wobei die intrinsische, komplementäre Ladungsverteilung innerhalb der Primärsequenz eine entscheidende Rolle spielt. So weist die amphiphile Helix (APH) im TatA_d Protein aus *B. subtilis* komplementäre Ladungen zur benachbarten hochgeladenen Region, der „densely charged region“ (DCR) auf, die eine Ausbildung von sieben Salzbrücken zwischen den beiden Segmenten erlauben würde (Abb. 10). Somit könnte die APH zusammen mit der DCR-Region einen „Hairpin“ ausbilden, der durch intramolekulare Salzbrücken stabilisiert wird. Mehrerer solcher Hairpins könnten durch die Ausbildung von fünf intermolekularen Salzbrücken die TatA_d Monomere zu einer Palisade anordnen (Abb. 48). Das Erstaunliche an diesem Modell ist die Tatsache, dass durch die Salzbrückenausbildung eine Kompensierung der Ladungen erreicht wird, wodurch die assoziierten APH-DCR Hairpins in die hydrophobe Membranumgebung eintauchen könnten, was letztendlich zum Öffnen der Pore führen würde. Dieser Charge Zipper Mechanismus beschreibt erstmals eine mögliche Assemblierung der porenbildenden TatA Untereinheit zur Translokationspore. Wie in Abb. 11 gezeigt wird, scheint das komplementäre Ladungsmuster zwischen der APH und DCR-Region in allen TatA Proteinen aus diversen Organismen konserviert vorzuliegen [91]. In verschiedenen Studien wurde bereits berichtet, dass bestimmte geladene Aminosäuren innerhalb der APH und der DCR-Region für die Funktion von TatA wichtig sind. So wurde für das *E. coli* TatA gezeigt, dass eine K41A Mutation die Insertion in die Membran beeinträchtigt [50] und ein TatA-D31G Austausch die Oligomerisierung destabilisiert [101]. In der angrenzenden DCR-Region konnte ein azidisches DDE-Motiv identifiziert werden, das für die Funktion und TatA Selbstassemblierung von hoher Bedeutung ist [54]. Einen weiteren wichtigen Hinweis auf eine Salzbrückenausbildung zwischen TatA Homooligomere liefern Studien, in denen der Einfluss hoher Salzkonzentrationen im Wachstumsmedium auf die Tat-Translokation getestet wurde. Es konnte beobachtet werden, dass bei hohen Salzkonzentrationen die Sekretion von Tat-abhängigen Proteinen gestört war und dass sogar ein Teil des Substrats durch den Sec-abhängigen Transportweg transloziert wurde [88-90]. Anhand des Charge Zipper Modells würde sich der Effekt dadurch erklären, dass eine hohe Salzkonzentration die elektrostatischen Wechselwirkungen schwächt und somit die Ausbildung der Salzbrücken erschwert.

Die nach dem Charge Zipper Mechanismus postulierte TatA_d Assemblierung wurde in dieser Arbeit getestet, um einen experimentellen Beweis für die Charge Zipper Hypothese zu erbringen. Dafür wurden TatA_d Ladungsabstoßungsmutanten hergestellt, bei denen jede der postulierten Salzbrücken zerstört wurde, indem innerhalb eines Salzbrückenpaars eine Aminosäure durch eine Aminosäure mit entgegengesetzter Ladung ausgetauscht wurde. Zur Wiederherstellung der Salzbrücken, wurden die beiden Aminosäuren eines Salzbrückenpaars vertauscht, wodurch die Ausbildung einer Salzbrücke weiterhin ermöglicht sein sollte. Das Oligomerisierungsverhalten aller Ladungsmutanten wurde unter nativen Bedingungen mittels Blue-Native PAGE analysiert und mit dem Wildtyp verglichen. Die Blue-Native PAGE verifiziert sich bereits in anderen Studien als eine geeignete Methode für die Detektion der TatA_d Homooligomere, welche ein charakteristisches Bandenmuster aufweisen [38, 66].

Wie erwartet, sind die intermolekularen Ladungsabstoßungsmutanten stärker zum Monomer zerfallen, wohingegen die intramolekularen Ladungsabstoßungsmutanten das gleiche Assemblierungsmuster wie der Wildtyp zeigten, da diese nur zur Stabilisierung eines *Hairpins* benötigt werden und nicht die TatA_d Monomere miteinander verbrücken. Vier der fünf postulierten intermolekularen Salzbrücken konnten durch die Wiederherstellungsmutanten wieder aufgebaut werden. Sie wiesen alle eine dem Wildtyp entsprechende Oligomerisierung auf, was zeigt, dass der Vertausch zweier Aminosäuren innerhalb eines Ladungspaars die Salzbrückenausbildung nicht stört. Die fünfte intermolekulare K25:E59 Salzbrücke konnte aufgrund einer geringen Expressionsrate nicht validiert werden.

Zudem wurden intra- und intermolekulare Komplettabstoßungsmutanten hergestellt, sowie die Nachbarschaftsumkehrmutanten, bei denen zwei benachbarten Salzbrückenpaare zerstört wurden, ohne die Nettoladung des Proteins zu verändern. Eine starke Veränderung der Proteinnettoladung kann einen negativen Effekt auf die Assemblierung der TatA Proteine ausüben. Dieser Effekt konnte zum Beispiel bei der intramolekularen Komplettabstoßungsmutante D51K-E52K beobachtet werden. Obwohl hier nur die intramolekularen Salzbrücken zerstört wurden, zerfielen die Oligomere stark zum Monomer, wohingegen die andere K41E-K45D Mutante das gleiche Oligomerisierungsmuster wie der Wildtyp aufwies. Dies lässt sich dadurch begründen, dass die D51K-E52K Mutante eine sehr hohe Nettoladung trägt, was letztendlich zur starken elektrostatischen Abstoßung zwischen den TatA_d Monomeren führen kann. Die intermolekulare Komplettabstoßungsmutante, sowie sieben von acht Nachbarschaftsumkehrmutanten zeigten wie erwartet eine starke Disassemblierung zum Monomer, da in diesen Mutanten viele intermolekulare Salzbrücken zerstört wurden. Durch die Untersuchung des Einflusses aller TatA_d Ladungsmutanten auf

die Selbstassemblierung, konnte der erste experimentelle Hinweis für einen Charge Zipper in TatA_d gefunden werden [91].

Weiterhin erlaubten die experimentellen Ergebnisse die Anordnung der postulierten Salzbrücken zu bestimmen. Der *Hairpin* wird zwischen APH und DCR durch zwei intramolekulare Salzbrücken stabilisiert, wohingegen die fünf intermolekularen Salzbrücken zur Verbrückung der TatA_d Monomere beitragen (siehe Abb. 48). Die über den Charge Zipper verbrückten TatA_d Proteine werden durch die Transmembranhelix in der Membran verankert, wobei sie eine Art Palisadenstruktur ausbilden. Wie letztendlich die geöffnete TatA_d Pore ausgebildet wird, ist noch nicht abschließend geklärt.

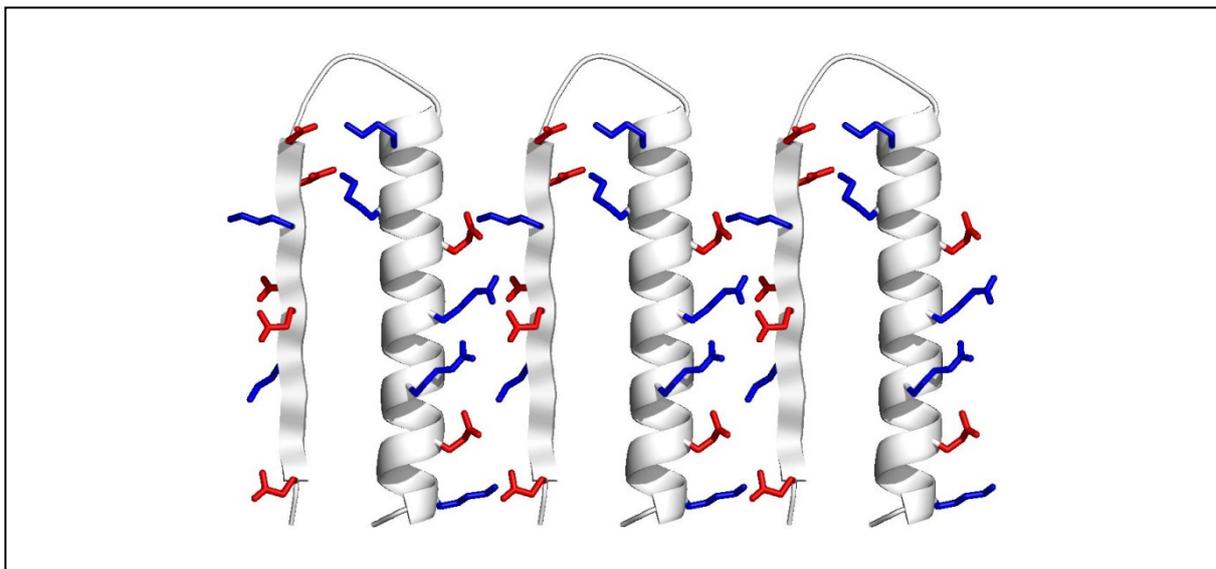


Abb. 48: Assemblierung von drei TatA_d Hairpins. Darstellung der postulierten Salzbrücken zwischen der APH und DCR. Die positiv geladene Aminosäurereste sind in blau markiert und die negativen in rot. Abb. übernommen aus [91].

Einen Einblick in eine mögliche TatA_d Porenbildung gewähren uns molekulardynamische Simulationen, die in Kooperation mit Prof. Wolfgang Wenzel erstellt wurden. In Abb. 49 A ist eine TatA_d-Pore gezeigt, welche aus einer Gō-Simulation in einer hydrophoben Membrenumgebung aus zwölf TatA_d Proteinen, die über den Charge Zipper assembliert sind, erhalten wurde [91]. Das Ergebnis dieser MD-Simulation zeigt eine zirkuläre TatA_d-Pore mit einem äußeren hydrophoben Ring, bestehend aus den Transmembransegmenten und einer inneren hydrophilen Porenöffnung, die mit den APH-DCR Segmenten ausgekleidet ist. Der Innendurchmesser dieser simulierten Pore beträgt 40 Å, was sehr gut mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen von detergenssolubilisierten *E. coli* TatA Proteinkomplexen mit einem Innendurchmesser von 30 bis 35 Å übereinstimmt (Abb. 49 B) [38].

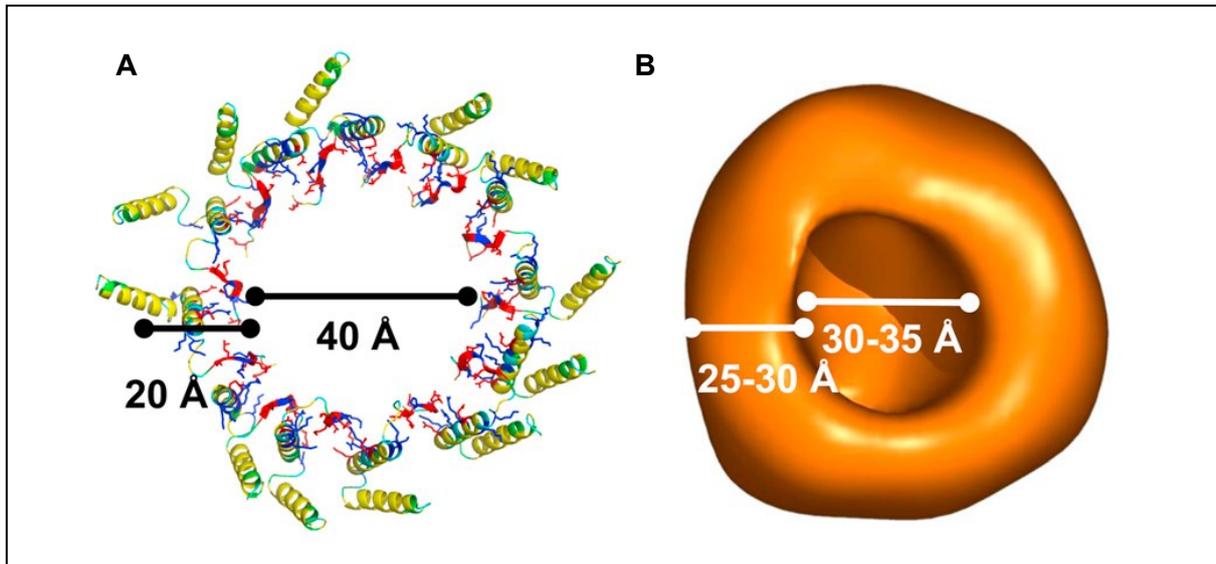


Abb. 49: TatA_d Porenmodell. A: MD-Simulation einer TatA_d-Pore, bestehend aus zwölf Proteinen, die sich aufgrund des Charge Zippers zirkulär verknüpfen. B: 3D-Porenmodell generiert aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen von detergenssolubilisierten TatA Komplexen aus *E. coli*. Abb. übernommen aus [91].

Wie bereits zuvor erwähnt, ist es möglich, dass sich die TatA_d Monomere zu Beginn über den Charge Zipper verbrücken und eine Art TatA_d Palisade in der Membran ausbilden. Einen wichtigen experimentellen Hinweis auf eine mögliche TatA Palisadenbildung geben die 10 nm großen wurmähnlichen TatA_d Aggregate, die sich nach der Rekonstitution von TatA_d in Lipidvesikel ausgebildet hatten, sowie *in vivo* detektierte lösliche tubuläre TatA Strukturen aus *E. coli* [71-72]. Die Palisade könnte sich wie bereits erwähnt zur ringförmigen TatA_d-Pore ausbilden, indem sie sich um das Substrat spiralisiert. Eine andere Möglichkeit wäre die Ausbildung eines hydrophilen Spaltes, indem zwei Palisaden, entweder in einer *front-to-front* oder *back-to-back* Ausrichtung aufeinander treffen. Sowohl die Ausbildung einer TatA_d-Pore als auch eines TatA_d-Spaltes ermöglicht den assemblierten *Hairpins* durch einen Einklappmechanismus in die Membran zu insertieren und somit die Pore bzw. den Spalt zu öffnen (*trapdoor mechanism*), vorausgesetzt die *Hinge*-Region zwischen der APH und DCR-Region würde eine flexible Konformationsänderung erlauben [59-60]. Im Falle einer rigiden *Hinge*-Struktur würde ein passiver Kippvorgang in Frage kommen, bei dem die kurzen Transmembransegmente in die Kippbewegung mit einbezogen wären. In jedem Fall ließe sich durch den Einklapp- oder Kippmechanismus die beobachtete Dual-Topologie von TatA Proteinen erklären, das vermuten ließ, eine transiente Membraninsertion der APH könnte für den Transportmechanismus wichtig sein [59-60, 102].

Ob sich in der Membran eine zirkuläre TatA-Pore oder doch eher ein TatA-Spalt ausbildet, muss noch genauer untersucht werden. In beiden Fällen würde eine große hydrophile Öffnung generiert werden, durch die Tat-abhängige Substrate transportiert werden könnten. Damit ließe sich auch erklären, weshalb Proteine auch im ungefalteten Zustand

Tat-abhängig transportiert werden können, solange sie keine übermäßig hydrophoben Bereiche auf der Oberfläche besitzen. Brüser konnte zeigen, dass für einen Tat-Transport die Substrate an ihrer Oberfläche hydrophil sein müssen [103].

In dieser Studie konnte erstmals am Beispiel von TatA_d ein experimenteller Beweis für den Charge Zipper Mechanismus geliefert werden. Die Ergebnisse deuten auf die postulierte Salzbrückenausbildung zwischen der APH und DCR hin, die für eine TatA_d Selbstassemblierung verantwortlich sein können, wodurch die Ausbildung der TatA_d-Pore erklärt werden kann.

4.2. Die Rolle der kurzen TatA_d-Transmembranhelix bei der Tat-abhängigen Translokation

Zeitgleich mit dem Charge-Zipper Modell, welches die Verknüpfung der TatA Monomere zu einer Pore erklären könnte, wurde von Rollauer et al. die Kristallstruktur von TatC aus *Aquifex aeolicus*, der zweiten wichtigen Komponente bei der Tat-Translokation, veröffentlicht [63]. Dies ermöglicht nun erstmals detaillierte strukturelle Überlegungen für den Tat-abhängigen Translokationsmechanismus. Untypisch für ein Membranprotein ist die konkave TatC-Seite, welche mit geladenen Aminosäuren ausgekleidet ist (siehe Abb. 50 A). Diese geladenen Aminosäuren sind wahrscheinlich für die Interaktion mit anderen Tat-Komponenten wichtig, da das Auftreten von geladenen Aminosäuren in einer hydrophoben Lipiddoppelschicht energetisch ungünstig ist.

Rollauer et al. postulieren ein Modell über eine mögliche Interaktion von Tat-Komponenten untereinander (Abb. 50 B). Dabei bindet das Tat-Signalpeptid an den zytoplasmatischen N-Terminus von TatC. Die TatB-Transmembranhelix interagiert mit dem fünften TatC Transmembransegment, wobei die amphiphile Helix zum N-Terminus ragt und mit dem Signalpeptid und dem Tat-Substrat eine Wechselwirkung eingehen kann. Als Interaktionspartner für die geladene konkave TatC-Seite wird die TatA-Transmembranhelix (TMH) vorgeschlagen. Dabei sollten vor allem die konservierten polaren Aminosäuren im vorderen Segment der TatA-TMH mit der konkaven TatC-Einkerbung eine Wechselwirkung eingehen können.

Um diesem Tat-Interaktionsmodell nachzugehen, wurde in Kooperation mit Prof. Wolfgang Wenzels Arbeitsgruppe basierend auf den TatC Strukturdaten von *Aquifex aeolicus* Homologiemodelle für TatC aus *B. subtilis* und *E. coli* erstellt. Die homologen TatC Proteinstrukturen konnten zeigen, dass die geladenen Aminosäuren in der konkaven TatC-Seite strukturell konserviert sind (Abb. 24). Somit sollte die TatA_d-TMH ebenfalls eine Wechselwirkung mit der TatC_d-Einkerbung eingehen können.

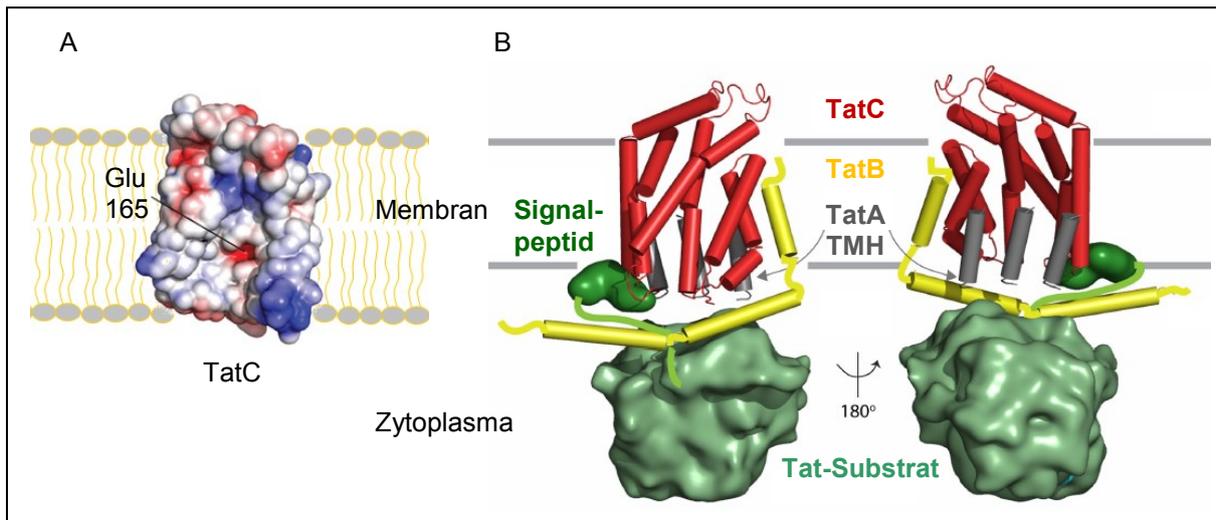


Abb. 50: Interaktionsmodell von Tat-Komponenten in *Aquifex aeolicus*. A: TatC-Kristallstruktur von *A. aeolicus* mit dargestellter Oberflächenladung (blau: positive Ladung, rot: negative Ladung). B: Interaktionsmodell der Tat-Komponenten nach Rollauer et al. Links: Perspektive auf die konvexe TatC-Seite. Rechts: Perspektive auf die konkave TatC-Seite. Postuliert wird eine Interaktion der TatA-Transmembranhelix (TMH) mit der konkaven TatC-Einkerbung. Abb. verändert nach [63].

Rodriguez et al. veröffentlichten kürzlich einen möglichen Transportmechanismus der Tat-abhängigen Translokation basierend auf der kurzen TataA-TMH. Sie postulierten, dass durch die TatA Assoziation, die kurzen TataA-Transmembranhelices die geordnete Lipidumgebung stören könnten, wodurch eine Deformation und Ausdünnung der Lipiddoppelschicht entsteht [92]. Die dünne, deformierte Membran würde das Durchdringen des Substrats erleichtern. Die Idee einer Schwächung der Membran aufgrund einer TatA/TatB Assoziation hatte bereits zuvor Brüser in seinem Modell *membrane weakening and pulling* Mechanismus postuliert [103-104].

In Abb. 51 ist der postulierte Tat-Translokationsmechanismus von Rodriguez et al. dargestellt. Das Modell besagt, dass durch die Interaktion von TatA mit dem TatBC/Sustrat Komplex zu einer TatA Oligomerisierung kommen kann, wodurch die kurzen Transmembransegmente verstärkt in die hydrophobe Membranschicht gezogen werden und die amphiphile Helix sich flach auf der zytoplasmatischen Membranoberfläche ausrichtet. Dieses Eintauchen der kurzen TMH in die hydrophobe Membranschicht könnte durch TatC vermittelt werden, indem die TatA-TMH mit der geladenen TatC-Einkerbung wechselwirkt und dadurch in die Membran gezogen wird. Dieser Prozess führt zu einer Ausdünnung der Lipiddoppelschicht und zur Ausbildung einer hydrophilen Pore, die von Transmembransegmenten umringt wird. Dabei stehen sich die konservierten Glutamine (Gln 8) auf den Transmembranhelices gegenüber. Diese Pore könnte sich weiter ausdehnen, indem das Substrat mithilfe der amphiphilen Helices durch die Pore geschleust wird.

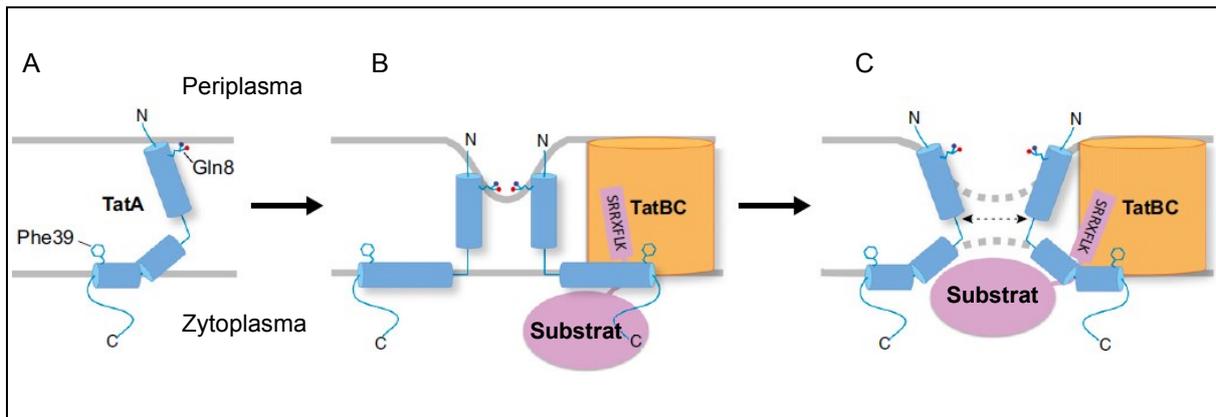


Abb. 51: Modell des Tat-Mechanismus nach Rodriguez et al. A: Konformation eines einzelnen TatA Proteins in der Membran. Die kurze Transmembranhelix ragt mit dem N-Terminus aus der Membranschicht. B: Die TatA Porenausbildung wird durch die Interaktion mit dem TatBC/Substrat induziert, dabei tauchen die TatA-Transmembranhelices verstärkt in die hydrophobe Lipiddoppelschicht ein. Es kommt zu einer Einstülpung der oberen Lipidschicht und somit zu einer Ausdünnung der Membran. Die konservierten polaren Glutamine (Gln 8) stehen sich auf der Transmembranhelix gegenüber. C: Durch die Beförderung des Substrats ins Innere der Pore, diffundieren die TatA Proteine auseinander und die deformierte, fragile Lipiddoppelschicht erleichtert den Durchtritt des Substrats ins äußere Milieu. Abb. verändert nach [92].

Ein solcher Mechanismus ist durchaus auch kompatibel mit unserem Charge Zipper Modell der TatA Homooligomerisierung. Kombiniert man sowohl das postulierte Tat-Interaktionsmodell von Rollauer et al. als auch das Translokationsmodell von Rodriguez et al., so ergibt sich folgende Hypothese zum möglichen Tat-Translokationsmechanismus:

Die TatA_d-TMH dient zunächst als Anker für die Membraninsertion des Proteins. In der Membran verankert, könnten sich die TatA_d Proteine aufgrund der Charge Zipper Ausbildung zwischen APH und DCR zu Oligomeren assoziieren. Die TatA_d Palisade könnte nun mit TatC_d interagieren, wobei jede TMH nach und nach eine Wechselwirkung mit der konkaven TatC-Seite eingeht. Diese Wechselwirkung wird durch die Beschaffenheit und der kurzen Länge der TMH ermöglicht und führt zu einem verstärkten Eintauchen des Transmembransegments in die Membran. Dadurch wird eine Membranausdünnung und Lipidstörung induziert, das entweder einen Einklappmechanismus von assemblierten *Hairpins*, bestehend aus APH und DCR, oder einen passiven Kippvorgang der TatA_d Palisade erleichtert. In jedem Fall würde sich eine hydrophile Pore bzw. Spaltöffnung ausbilden, die die Passage eines Substrats erlaubt.

Nachdem postulierten Tat-Translokationsmodell sollte ein geladener TatA N-Terminus den Transport stören, da die TMH durch die Ladung nicht mehr in die Membran eintauchen könnte und weiterhin die Interaktion mit TatC stören könnte. Ebenso sollte eine Verlängerung der TatA-TMH den Tat-Transport verhindern, da ein verlängertes Transmembransegment die Membranschicht komplett durchspannen würde. Das Eintauchen und die damit verbundene

Lipiddoppelschicht-Ausdünnung wären nicht mehr gewährleistet, wodurch die Porenbildung und der Substrattransport zum Erliegen kommen würden.

Um den Einfluss der TatA-TMH auf den Tat-abhängigen Transport zu testen, wurden TatA_d Proteine hergestellt, in denen systematisch das Transmembransegment verlängert bzw. eine Ladung am N-Terminus eingefügt wurde. Diese TatA_d Mutanten wurden auf die Transportfähigkeit mittels eines *in vivo* TatA_dC_d-Translokationsassays in *B. subtilis* getestet [94].

Die Ergebnisse des Translokationsassays zeigen deutlich, dass durch eine Verlängerung der TMH, als auch das Einführen einer positiven oder negativen Ladung an den N-Terminus, die TatA_dC_d-Translokase das Substrat nicht mehr transportieren kann und somit funktionsunfähig ist.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass in dieser Studie die Wichtigkeit der kurzen TatA_d-Transmembranhelix für den Tat-Translokationsprozess bestätigt werden konnte. Sowohl der N-Terminus als auch die Länge der TatA_d-Transmembranhelix ist für die Funktion des TatA_d Proteins enorm wichtig. Eine starke Ladung am N-Terminus sowie eine Verlängerung der kurzen Transmembranhelix führen zur Störung der Tat-Translokation.

4.3. Der *B. subtilis* *in vitro* Translokationsassay

Der Tat-abhängige Proteintransport wurde hauptsächlich mit Hilfe von Translokationsassays erforscht. Dabei wurden in verschiedenen Organismen *in vivo* Translokationsassays entwickelt, wie zum Beispiel der TatA_dC_d-Translokationsassay in *B. subtilis*, welcher auch in dieser Studie angewandt wurde [44, 84, 105]. Das Prinzip der *in vivo* Transportassays basiert auf der Untersuchung exportierter Proteine, die mittels Elektrophorese aufgetrennt und per Immunoblot detektiert werden. Diese Transportassays erlauben die Untersuchung von verschiedenen Mutanten auf die Sekretionsfähigkeit der Tat-Translokase.

Um die Lokalisation der Tat-Komponenten in lebenden Zellen zu untersuchen, wurden *in vivo single-molecule fluorescence imaging* Analysen durchgeführt [80]. Dafür wurden Tat-Proteine mit Fluoreszenzproteinen wie YFP fusioniert und in der Zelle exprimiert. In der *E. coli* Membran konnte beobachtet werden, dass der TatBC Komplex für die Tata Assoziation zu großen Komplexen benötigt wird.

Damit der Einfluss der protonenmotorischen Kraft auf das Tat-Translokation näher untersucht werden kann, wurden *in vitro* Translokationsassays mit invertierten Membranvesikel (IMV) entwickelt, die eine Detektion von translozierten Tat-Substraten ins Innere der IMV erlauben, nachdem die Tat-Substrate zur Membranvesikelsuspension gegeben wurden [9, 11, 106].

Dafür werden zuerst die Tat-Komponenten in lebenden Zellen exprimiert und anschließend die IMV aus der Zellmembran gewonnen, in denen die Tat-Proteine inseriert sind. Der

Vorteil bei diesem Assay liegt darin, dass man die Möglichkeit besitzt die Ausbildung des protonenmotorischen Gradienten zu beeinflussen.

Diesen *in vitro* Transportassay nutze Whitaker et al. für kinetische Interaktionsstudien zwischen Tat-abhängigen Substraten und der Tat-Translokase mittels *real-time* Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) [107]. In dieser Interaktionsstudie wurde eine Tat-Komponente mit dem Fluoreszenzprotein mCherry (Akzeptor) fusioniert und exprimiert. Das aufgereinigte Tat-Substrat wurde mit einem Donorfarbstoff markiert und zu den IMV dazugegeben. Kam es zu einer Interaktion von Akzeptor und Donor, konnte ein FRET-Signal detektiert werden. Dies ist die erste Interaktionsstudie zwischen Tat-Komponenten, die in Echtzeit gemessen wurde. Bisher wurden für Interaktionsstudien der Tat-Komponenten meist Blue-Native PAGE, Co-Immunopräzipitation, Gelfiltrations- oder Affinitätschromatographie angewandt, bei denen die Tat-Komplexe aus der Zelle isoliert und per Immunoblot detektiert wurden [38, 41, 66, 108].

Für weitere Strukturaufklärung der Tat-Pore sowie kinetische Interaktions- oder Funktionsstudien der Tat-Translokase in Echtzeit, wäre ein funktionierender *in vitro* Tat-Translokationsassay von Vorteil, in dem nur die Tat-Hauptkomponenten involviert sind und mögliche äußere Einflussfaktoren ausgeschlossen werden. Die bisher entwickelten *in vitro* Tat-Transportassays bestehen aus invertierten Membranvesikel, in denen neben den Tat-Komponenten auch andere Proteine inseriert sind.

Daher wurde in dieser Arbeit erstmals ein *in vitro* Translokationsassay generiert, der nur aus den Tat-Proteinen besteht. Die TatA_d und TatC_d Proteine werden dabei in große unilamellare Lipidvesikel (GUV) rekonstituiert. Als Tat-abhängiges Substrat dient das grün-fluoreszierende SP-GFPuv Proteinkonstrukt, dessen Fluoreszenz die Detektion des Transports mittels Fluoreszenzspektroskopie erlaubt. Das GFPuv wurde als Substrat gewählt, da bereits in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass ein gefaltetes GFP Protein in *E. coli* sowohl durch die eigene Tat-Translokase als auch durch das rekombinant exprimierte TatA_dC_d-Translokon ins Periplasma exportiert wird [109-110]. Um auch die Homooligomerisierung von TatA_d und somit die Porenbildung beobachten zu können, wurde TatA_d mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert.

Dieser *in vitro* TatA_dC_d-Transportassay ermöglicht die Beobachtung eines Tat-abhängigen Substrats ins Innere eines Vesikel durch die Tat-Translokase mittels Fluoreszenzspektroskopie. Des Weiteren lassen sich hiermit wichtige Interaktionsstudien von Tat-Komponenten durchführen. So konnte die Interaktion zwischen TatA_d Proteinen sowohl in transportfähigen als auch in inaktiven TatA_dC_d-GUVs mit Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsmessungen untersucht und verglichen werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass es nur bei transportfähigen Vesikel zu einer TatA_d Interaktion kam, wohingegen in substratleeren Vesikel keine TatA_d Interaktion detektiert werden konnte.

Um sicher zu gehen, dass der Transport des Substrats Tat-abhängig erfolgt, wurden Kontrollexperimente durchgeführt, in denen Lipidvesikel ohne Tat-Proteine sowie mit jeweils nur einem der beiden Tat-Proteine auf Transportfähigkeit getestet wurden. Alle Kontrollen zeigten keinen aktiven Tat-Transport. Nur wenn sowohl TatA_d als auch TatC_d in Vesikel rekonstituiert waren, konnte ein Substrattransport, aufgrund einer stärkeren GFPuv-Fluoreszenzintensität im Inneren des Vesikels, detektiert werden. Jedoch zeigten im Durchschnitt nur ein Drittel der Vesikel einen aktiven SP-GFPuv Transport. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Rekonstitution der Tat-Proteine ungerichtet erfolgt und womöglich die Zusammensetzung, Orientierung sowie die Verteilung der Proteine in aktiven TatA_dC_d-GUVs am günstigsten für die Ausbildung einer funktionsfähigen Translokase ist. Die Verteilung von fluorophormarkiertem TatA_d war in den Vesikel oft inhomogen, jedoch kann keine Aussage über die TatC_d Verteilung getroffen werden, da das Protein nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wurde. Ein weiterer Grund liegt vermutlich an der Aufrechterhaltung des Protonengradienten. Obwohl auf die Einhaltung der Temperatur oberhalb des Phasenübergangs von DMPC-Lipiden geachtet wurde, könnten durch mögliche Temperaturschwankungen kleine Risse in der DMPC-Vesikelmembran entstanden sein, durch die Protonen passieren können und den Protonengradienten dadurch degenerieren. Der Protonengradient ist jedoch für die Tat-Translokation wichtig. Ohne einen Protonengradienten kann die Tat-Translokase das Substrat nicht transportieren. Es müssen deshalb weitere Lipide mit einem niedrigen Phasenübergang getestet werden, wie zum Beispiel POPC, dessen Fluidität selbst bei niedrigen Temperaturen gewährleistet ist, was die Wahrscheinlichkeit von Rissen in der Lipiddoppelschicht verringert.

Damit die Transporteffizienz des *in vitro* TatA_dC_d-Translokationsassays gesteigert werden kann, bedarf es noch weiterer Optimierungen wie zum Beispiel das Protein-zu-Lipidverhältnis sowie der Lipidzusammensetzung der Vesikel anzupassen.

In dieser Arbeit konnte die Basis für ein funktionierendes *in vitro* Tat-Translokationsassay gezeigt werden, das die Beobachtung und Beeinflussung eines Tat-Systems ermöglicht und mit dem viele Tat-Mutanten auf die Transportfähigkeit, sowie Interaktion getestet werden können. Dies konnte am Beispiel des verkürzten TatA₂₋₄₅ Proteinfragments erfolgreich demonstriert werden. In Verbindung mit der Blue-Native PAGE konnte gezeigt werden, dass ohne die DCR-Region keine TatA_d Assemblierung zur TatA_d-Pore möglich ist und der *in vitro* Translokationsassay bestätigte, dass mit diesem Konstrukt auch kein Tat-Transport stattfinden kann.

Es existiert bislang kein vergleichbarer *in vitro* Translokationsassay, der auf rekonstituierten Proteintranslokasen in GUVs basiert und dessen Substrattransport mittels Fluoreszenzspektroskopie detektiert werden kann. Bisher wurde mit Fluoreszenzkorrelationsmessungen nur die Diffusion von diversen Membranproteinen

gemessen oder die Interaktion von zwei oder mehreren Proteinkomponenten in Vesikel durch Kreuz-Korrelationsmessungen analysiert [99, 111-112], jedoch wurde dabei kein aktiver Translokationsvorgang von Proteinen untersucht.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte erstmals der postulierte Charge Zipper Mechanismus durch einen experimentellen Beweis am TatA_d Protein validiert werden. Das Charge Zipper Modell beschreibt die Verbrückung von Transmembransegmenten über eine Reihe von Salzbrücken in einer hydrophoben Umgebung, das im Fall von TatA_d auf einem hochkonservierten Motiv komplementärer Ladungen zwischen der amphiphilen Helix (APH) und dem stark geladenen C-Terminus (DCR) basiert. TatA_d stellt die porenbildende Einheit der Tat-abhängigen TatA_dC_d-Translokase aus *B. subtilis* dar, welches das gefaltete Protein prePhoD über die Zytoplasmamembran transloziert. Durch die Ausbildung postulierter intra- und intermolekularen Salzbrücken zwischen der APH und DCR-Region könnten sich die TatA_d Proteine selbstassemblieren und somit die TatA_d Porenbildung induzieren.

Ein erster Beweis für die Charge Zipper Hypothese wurde in dieser Studie durch die Untersuchung von diversen TatA_d Ladungsmutanten mittels Blue-Native PAGE erbracht. Diese Mutanten wurden durch Mutagenese hergestellt, in *E. coli* exprimiert und auf das Oligomerisierungsverhalten unter nativen Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Dabei zeigte sich, dass durch die Zerstörung einer postulierten intermolekularen Salzbrücke, die TatA_d Oligomere verstärkt zum Monomer disassemblierten, wohingegen die Zerstörung einer intramolekularen Salzbrücke keinen negativen Effekt auf die Selbstassemblierung bewirkte. Mittels der Ladungswiederherstellungsmutanten konnten vier von fünf postulierten intermolekularen Salzbrücken wieder ausgebildet werden, indem die zwei Aminosäuren innerhalb eines Ladungspaares vertauscht wurden. Die fünfte intramolekulare K25:E59 Salzbrücke konnte aufgrund geringer Expression nicht validiert werden. Die Ergebnisse aller Ladungsmutanten sowie molekulardynamischen Simulationen sprechen für eine TatA_d Assemblierung via Charge Zipper, indem eine *Hairpin*-Struktur durch zwei intramolekulare Salzbrücken stabilisiert wird und fünf intermolekulare Salzbrücken die TatA_d Monomere verbrücken. Dieses neuartige Assemblierungsmodell, das auf elektrostatische Wechselwirkungen in einer hydrophoben Umgebung beruht, erlaubt ein Eintauchen der assoziierten APH-DCR Segmente in die Membran, womit die Ausbildung und Öffnung der TatA_d-Pore erklärt werden könnte. Dieses völlig neuartige Faltungsmotiv könnte auch in weiteren Proteinen eine entscheidende Rolle spielen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der kurzen TatA_d-Transmembranhelix (TMH) im Translokationsprozess näher untersucht. Es wurde postuliert, dass die TatA-TMH in die Membran eintauchen könnte wobei sie mit TatC interagiert und für eine Ausdünnung der Lipiddoppelschicht verantwortlich ist. Um darüber mehr Aufschluss zu gewinnen, wurden zum einen TatA_d Mutanten mit einer N-terminal geladenen TMH und zum anderen TatA_d Mutanten mit einer zunehmend verlängerten TMH hergestellt und mittels einem *in vivo* TatA_dC_d-Translokationsassay in *B. subtilis* auf die Translokationsfähigkeit analysiert. Nach

den postulierten Modellen sollte die mutierte TMH aller TatA_d-Mutanten nicht mehr in der Lage sein in die Membran eintauchen zu können, wodurch der Translokationsprozess inhibiert wäre. Tatsächlich war keine der Mutanten zur PhoD Sekretion befähigt. Diese Ergebnisse beweisen die Wichtigkeit der kurzen TatA_d-Transmembranhelix im Translokationsprozess.

Im letzten Teil dieser Studie wurde ein *in vitro* Translokationsassay generiert, welcher auf der minimalen TatA_dC_d-Translokase aus *B. subtilis* beruht. Zum ersten Mal ist es hier gelungen eine funktionsfähige Translokationsmaschinerie *in vitro* zu rekonstituieren. Dafür wurden aufgereinigte TatA_d und TatC_d Proteine in große unilamellare Lipidvesikel (GUV) rekonstituiert sowie ein fluoreszierendes Tat-abhängiges SP-GFPuv Substratkonstrukt exprimiert und aufgereinigt. Mittels Fluoreszenzspektroskopie konnte ein aktiver Tat-abhängiger Substrattransport in die Vesikel beobachtet werden. Negativkontrollen mit unvollständiger Tat-Translokase schlossen eine willkürliche Substratinsertion in ein GUV aus. Des Weiteren wurde das TatA_d Protein mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und auf die Selbstassoziation in den Vesikeln mittels Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie getestet. Wie erwartet konnte eine Interaktion zwischen TatA_d Proteinen nur in transportaktiven GUVs beobachtet werden. Dieser Translokationsassay stellt somit ein wichtiges Instrument für weitere kinetische und strukturelle Analysen sowie Interaktionsstudien der Tat-Translokase dar.

6. Material und Methoden

6.1. Material

6.1.1. Geräte

Autoklav	Varioklav , H + P Labortechnik GmbH Sanoclav S-ECZ, Wolf
Brutschrank	Incucell, MMM Medcenter Einrichtungen GmbH
Funktionsgenerator	3 MHz DDS 4055, Peak Tech
Gasbrenner	Schütt flammy S, Schütt Labortechnik GmbH
Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	Mini-Protean 3 Cell, BioRad
Halbmikro-Osmometer Typ M	Knauer
Heizblock	HB-2, Wealtec Corp.
<i>HisTrap</i> FF 5 ml Säule	GE Healthcare Life Sciences
Inkubationsschüttler	G25, New Brunswick Scientific GmbH Minitron AI 72, HT Infors AG
HPLC	Jasco
HPLC Säule	Polymer C18 Analytical Column Vydac
Kühlschrank	
4°C bzw. - 20°C	Siemens
- 80°C	Herafreeze, Heraeus Instruments
Lyophilisator	Alpha I-6, Christ
Magnetrührer	MR 80, Heidolph RCT, IKA Labortechnik
Massenspektrometer (MALDI-TOF)	Bruker Daltonics
pH-Messgerät	QpH 70, VWR International GmbH
Pipetten	
0,5 - 10 µl, 2 - 20 µl, 10 - 100 µl,	Reference, Eppendorf
50 - 200 µl, 100 - 1000 µl	
1 - 5 ml	Digital, Finnpiquette
1 - 5 ml, 2 - 10 ml	Finnpiquette
Reinraumbank	Herasafe, Heraeus Instruments
Reinstwasseranlage	Millipore
Superdex 75 10/300 GL Säule	GE Healthcare Life Sciences
Schüttler	KS 250 basic, IKA Labortechnik

STED(= Stimulated Emission Depletion)-Konfokalmikroskop bestehend aus:

Argon-Laser (488 nm)	Stabilite 2017, Spectra-Physics, Mountain View, CA
<i>diode-pumped solid state laser</i> (561 nm)	Jive, Cobolt AB, Sweden
540 nm <i>longpass dichroic mirror</i> Q 540 LP	Chroma, Bellow Falls, VT, USA
555 nm <i>longpass dichroic mirror</i> Q 555 LP	Chroma, Bellow Falls, VT, USA
<i>acousto-optic tunable filter</i> AOTFnc-400.650	A-A Opto-Electronic, Orsay Cedex, France
<i>quarter-wave plate</i> RAC 4.4.15	B-Halle, Berlin
Ölimmersionsobjektiv HCX PL APO CS x100/1.46	Leica, Wetzlar
<i>quad band dichroic mirror</i>	zt405/488/561/640rpc Chroma, Bellow Falls, VT, USA
<i>multimode fiber</i> M31L02	Thorlabs, München
Filter 525/50 nm Brightline HC 525/50	Semrock, Rochester, NY, USA
Filter 600/37 nm Brightline HC 600/37	Semrock, Rochester, NY, USA
<i>avalanche photodiode</i> tau-SPAD-50	PicoQuant, Berlin
<i>data acquisition card</i> PCI-6259	National Instruments, München
<i>laser scanner</i> Yanus V	Till Photonics, Gräfelfing
<i>time-correlated single photon counting</i> (TCSPC) system Simple-Tau 152	Becker und Hickl GmbH, Berlin
Laser-Spinning-Disk-Mikroskop	
Andor Revolution XD	Bfi OPTiLAS, München
spinning disk laser scanning microscopy system	
<i>inverted microscope</i> Olympus IX81S1F-ZDC	Olympus, Tokyo
<i>numerical aperture</i> NA = 1.49,	
<i>oil immersion objective</i> APON 60XOTIRF	
<i>temperature control</i>	Tokai Hit, Shizuoka-ken
CSU-X1 scan head	Yokogawa, Tokyo
DU897 EMCCD camera	Andor, Belfast
Thermozykler	PCR Express, Hybaid Progene, Techne
Trockenschrank	600, Memmert GmbH + Co.KG
Ultraschallgeräte	Branson Sonifier 250, G. Heinemann Ultraschall und Labortechnik Sonorex super RK510, Bandelin electronic

Ultrazentrifuge	L8-M, Beckmann
UV/VIS-Spektrophotometer	SmartSpec Plus, BioRad
UV/VIS-Spektrophotometer	ND-1000, NanoDrop®
UV/VIS-Spektrophotometer	Cary 3E
Vortexer	Genie K-550-GE, Bender und Hobein AG
Waagen	
Ablesbarkeit 0,1 g	PB 3001, Mettler Toledo
Ablesbarkeit 0,0001 g	A 200 S, Sartorius analytic
	CP 64, Sartorius
Ablesbarkeit 0,001 mg	M2P
Western Blot Apparatur, PerfectBlue Semi-Dry Electro Blotter	peQlab
XYZ-beweglicher Tisch P-517.3CL	Physik Instruments GmbH (Karlsruhe)
Zentrifugen	3-18 K, Sigma
	Avanti Centrifuge J-25, Beckmann
	Biofuge fresco, Heraeus Instruments
	Centrifuge 5415 C, Eppendorf
	Centrifuge 5417 R, Eppendorf
	RC 2-B, Sorvall
	RC 5B Plus, Sorvall
Zentrifugenrotoren	19776-H, Sigma
	50Ti, Beckmann
	45Ti, Beckmann
	J-Lite Series Rotor, Beckmann
	SLA-3000 Super-Lite GS-3, Sorvall

6.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien

Aceton 100% EM Grade	Polyscience
Acetonitril	Fisher Chemicals
Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (37,5:1)	Roth
6-Amino-hexansäure (ACA)	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Ammoniumsulfat	Roth
Ammoniumchlorid	Fluka
L-Arginin	Sigma Aldrich
Bactotrypton	AppliChem

BisTris	Roth
BCIP/NBT	Invitrogen
Benzamidin-Hydrochlorid	Merck
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Roth
Casaminosäuren	Difco
Chloramphenicol	Fluka
Chloroform	Roth
Coomassie Brilliant Blau G-250	Serva
Dikaliumhydrogenphosphat	AppliChem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dikaliumhydrogenphosphat	AppliChem
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)	AppliChem
Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka
FeCl ₃	AppliChem
Glucose	Fluka
Glycerin	Roth
Hefeextrakt	AppliChem
Hexafluoroisopropanol	Roth
Imidazol	Roth
IPTG	Roth
Isopropanol	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kanamycin	AppliChem
Magnesiumchlorid	Fluka
MgCl ₂ x6H ₂ O	Sigma Aldrich
MgSO ₄ x7H ₂ O	Roth
Methanol	Fisher Chemicals
Milchpulver	Roth
MnCl ₂ x4H ₂ O	Fluka
Natriumazid	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid	Riedel - de Haën
Natriumlauroylsarcosin	Fluka
Natriumphosphat	Fluka
Nickelsulfat	Fluka
Pefabloc	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem
Salzsäure	Roth
Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
Trichloressigsäure (TCA)	Roth
Tricin	Roth
Trinatriumcitrat	Fluka
Tris	Roth
Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)	Sigma
Tween 20	Roth
Trypton	Roth
L-Tryptophan	Sigma Aldrich
ZnCl ₂	Riedel-de Haën

Verbrauchsmaterialien

Autoklavierband	Comply Indicator Tape, 3M
Centricon® (MWCO = 10 kDa)	Millipore
Dialyseschläuche aus regenerierter Zellulose (1 kDa MWCO)	Spectra/Por
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann
Cryoröhrchen	Roth
Glaskolben Duran	Schott
Küvetten	Sarstedt
Membranfilter 0,45 µm	Schleicher & Schuell
Nitrozellulosemembran Protean	Whatman
Nunc™ Lab-Tek™ Chambered Coverglass	Thermo Scientific
Parafilm	American National Can
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße	Sarstedt
Rotilabo-Spritzenfilter (Ø 0,22 µm) steril	Roth
PVDF-Membran	Roth

6.1.3. Verwendete Stämme und Plasmide

Stämme

<i>E. Coli</i> BL21(DE3)	New England Biolabs
<i>E. Coli</i> XL1-Blue und XL10Gold	Agilent Technologies
<i>E. coli</i> M15	Qiagen
<i>B. Subtilis</i> 168	Robyn Eijlander [94]
<i>B. Subtilis</i> Δ <i>tatA_dC_d</i>	Chloramphenicol resistant, <i>tatA_dC_d-knockout</i> [85]

Plasmide

pGDL48- <i>tatA_dC_d</i>	Kanamycin resistant, beinhaltet <i>tatA_dC_d</i> [94]
pET-28a(+) <i>tatA_d</i>	Kanamycin resistant, beinhaltet <i>tatA_d</i> [48]
pET-28a(+) <i>tatA₁₋₄₅</i>	Kanamycin resistant, beinhaltet <i>tatA₁₋₄₅</i> [48]
pQE60- <i>tatC_d</i>	Ampicillin resistant, beinhaltet <i>tatC_d</i> [97]
pET-28a(+) <i>SP-GFPuv</i>	Kanamycin resistant, beinhaltet <i>SP-GFPuv</i> [95]

Zudem wurden Plasmide verwendet, welche durch Mutagenese hergestellt wurden (siehe unten).

6.1.4. Primer

Alle Primer wurden von der Firma Eurofins MWG synthetisiert.

TatA _d Mutanten Plasmid	Template Plasmid	Forward Primer	Reverse Primer
(A) Ladungsabstoßungsmutanten			
pET28TatA_dK53E	pET28TatA _d	5'-GTGTCTGGTGAT GAAGAAGAAGAGAA ATCAGCTGAG-3'	5'-CTCAGCTGATTC TCTTCTTCTTCATCA CCAGACAC-3'
pET28TatA_dE54R	pET28TatA _d	5'-GTGTCTGGTGAT GAAAACGTGAGAA ATCAGCTGAGCTG- 3'	5'-CAGCTCAGCTGA TTTCTCACGTTTTTC ATCACCAGACAC-3'
pET28TatA_dE55R	pET28TatA _d	5'-GTGATGAAAAGA ACGTAAATCAGCTG AGCTGACAG-3'	5'-CTGTCAGCTCAG CTGATTTACGTTCTT TTTCATCAC-3'
pET28TatA_dK56E	pET28TatA _d	5'-GATGAAAAGAAG AGGAATCAGCTGAG CTGACAGCG-3'	5'-CGCTGTCAGCTC AGCTGATTCCTCTT CTTTTTCATC-3'
pET28TatA_dK25E	pET28TatA _d	5'-CCCTTCCGAAGT CCGGAATCGG-3'	5'-CCGATTTCCGGC AGTTCGGAAGGG-3'

pET28TatA_dK45D	pET28TatA _d	5'-GAATTTAAAAGCG CCACAGATTCACCTTG TGTCTG-3'	5'-CAGACACAAGTG AATCTGTGGCGCTT TTAAATTC-3'
pET28TatA_dE52K	pET28TatA _d	5'-CTTGTGTCTGGTG ATAAAAAGAAGAGA AATCAGCTGAGCTG ACAG-3'	5'-CTGTCAGCTCAG CTGATTTCTCTTCTT TTTTATCACCAGACA CAAG-3'
(B) Ladungswiederherstellungsmutanten			
pET28TatA_dE39KK53E	pET28TatA _d K53E	5'-GGACGGACACTG CTGAAATTTAAAAGC GCCAC-3'	5'-GTGGCGCTTTTA AATTCAGCAGTGT CCGTCC-3'
pET28TatA_dR35EE54R	pET28TatA _d E54R	5'-CGTGCCGCCGGA GAAACACTGCTGGA ATTTAAAAG-3'	5'-CTTTTAAATTCCA GCAGTGTTTCTCCG GCGGCACG-3'
pET28TatA_dR31EE55R	pET28TatA _d E55R	5'-GAAATCGGGGAA GCCGCCGGAC-3'	5'-GTCCGGCGGCTT CCCCGATTC-3'
pET28TatA_dE28KK56E	pET28TatA _d K56E	5'-CAAGCTGCCGAA AATCGGGCGTG-3'	5'-CACGCCCGATTT TCGGCAGCTTG-3'
pET28TatA_dK45DD51K	pET28TatA _d K45D	5'-CAGATTCACCTTGT GTCTGGTAAAGAAA AAGAAGAGAAATCA G-3'	5'-CTGATTTCTCTTC TTTTTCTTTACCAGA CACAAGTGAATCTG- 3'
pET28TatA_dK41EE52K	pET28TatA _d E52K	5'-CGGACACTGCTG GAATTTGAAAGCGC CACAAAATCAC-3'	5'-GTGATTTTGTGG CGCTTTCAAATTCCA GCAGTGTCGG-3'
(C) Komplettabstoßungsmutanten			
pET28TatA_dK41EK45D	pET28TatA _d K45D	5'-CGGACACTGCTG GAATTTGAAAGCGC CACAGATTCAC-3'	5'-GTGAATCTGTGG CGCTTTCAAATTCCA GCAGTGTCGG-3'
pET28TatA_dD51KE52K	pET28TatA _d E52K	5'-CAAATCACTTGT GTCTGGTAAAAAAA AGAAGAGAAATCAG- 3'	5'-CTGATTTCTCTTC TTTTTTTTTACCAGA CACAAGTGATTTTG- 3'
pET28TatA _d K56EE59K	pET28TatA _d K56E	5'-GAAGAGGAATCA GCTAAACTGACAGC GGTAAAGCAG-3'	5'-CTGCTTTACCGCT GTCAGTTTAGCTGA TTCCTCTTC-3'
pET28TatA_dK53EE54R E55RK56EE59K	pET28TatA _d K56EE59K	5'-GTGTCTGGTGAT GAAGAACGTCTGTA ATCAGCTAAACTG-3'	5'-CAGTTTAGCTGAT TCACGACGTTCTTC ATCACCAGACAC-3'

(D) Nachbarschaftsumkehrmutanten			
pET28TatA_dK25EE28K	pET28TatA _d K25E	5'-CGAACTGCCGAAA ATCGGGCGTG-3'	5'-CACGCCCATTTC GGCAGTTCG-3'
pET28TatA _d R31E	pET28TatA _d	5'-GAAATCGGGGAAG CCGCCGGAC-3'	5'-GTCCGGCGGCTTCC CCGATTTC-3'
pET28TatA_dE28RR31E	pET28TatA _d R31E	5'-CAAGCTGCCGCGT ATCGGGGAAG-3'	5'-CTTCCCCGATACGC GGCAGCTTG-3'
pET28TatA _d R35E	pET28TatA _d	5'-CGTGCCGCGGA GAAACTGCTGGAA TTTAAAAG-3'	5'-CTTTTAAATTCCAGC AGTGTTCCTCCGGCGG CACG-3'
pET28TatA_dR35EE39R	pET28TatA _d R35E	5'-GGAGAAACTGTC TGCGTTTTAAAAGCG CCAC-3'	5'-GTGGCGCTTTTAAA CGCAGCAGTGTTCCTC C-3'
pET28TatA _d E39K	pET28TatA _d	5'-GGACGGACTGTC TGAAATTTAAAAGCGC CAC-3'	5'-GTGGCGCTTTTAAAT TTCAGCAGTGCCGTC C-3'
pET28TatA_dE39KK41E	pET28TatA _d E39K	5'-CGGACTGCTGA AATTTGAAAGCGCCA CAAATCAC-3'	5'-GTGATTTGTGGCG CTTCAAATTCAGCAG TGTCCG-3'
pET28TatA_dE52KK53E	pET28TatA _d E52K	5'-GTGTCTGGTGATAA AGAAGAAGAGAAATC AGCTGAG-3'	5'-CTCAGCTGATTTCTC TTCTTCTTATCACCAG ACAC-3'
pET28TatA_dK53EE54K	pET28TatA _d K53E	5'-GTGTCTGGTGATG AAGAAAAGAGAAAT CAGCTGAGCTG-3'	5'-CAGCTCAGCTGATTT CTCTTTTCTTCATCAC CAGACAC-3'
pET28TatA_dE55KK56E	pET28TatA _d K56E	5'-GTGTCTGGTGATG AAAAAGAAAAGAATC AGCTGAGCTGACAGC GGTAAAG-3'	5'-CTTTACCGCTGTCAG CTCAGCTGATTTCTTTT CTTTTTCATCACCAGAC AC-3'
pET28TatA_dK56EE59K	pET28TatA _d K56E	5'-GAAGAGGAATCAG CTAACTGACAGCGG TAAAGCAG-3'	5'-CTGCTTTACCGCTGT CAGTTTAGCTGATTCCT CTTC-3'
TatA_d-Transmembranhelix Mutanten für PhoD-Translokationsassay			
pDGL48TatA_dF2E	pDGL48TatA _d C _d	5'-CGAATTAAGGAGTG AAATTATGGAATCAAAC ATTGGAATACCGGGC- 3'	5'-GCCCGGTATTCCAAT GTTTGATTCCATAATTC CACTCCTTAATTCG-3'
pDGL48TatA_dF2K	pDGL48TatA _d C _d	5'-CGAATTAAGGAGTG GAAATTATGAAATCAAA CATTGGAATACCGGGC -3'	5'-GCCCGGTATTCCAAT GTTTGATTTCCATAATTC CACTCCTTAATTCG-3'

pDGL48TatA_dF2A	pDGL48TatA _d C _d	5'-CGAATTAAGGAGT GGAAATTATGGCCTC AAACATTGGAATACC GGGC-3'	5'-GCCCGGTATTCCAAT GTTTGAGGCCATAATTT CCACTCCTTAATTCG-3'
pDGL48TatA_dLAL	pDGL48TatA _d C _d	5'-GGCTTGATTCTCCT GGCGTTGATCTTCGT CATC-3'	5'-GATGACGAAGATCA ACGCCAGGAGAATCAA GCC-3'
pDGL48TatA_dLALAL	pDGL48TatA _d C _d	5'-GGCTTGATTCTCCT GGCGTTGGCCCTGAT CTTCGTCATC-3'	5'-GATGACGAAGATCA GGCCAACGCCAGGA GAATCAAGCC-3'
pDGL48TatA_dLALALAL	pDGL48TatA _d C _d	5'-GGCTTGATTCTCCT GGCGTTGGCCCTGGC GTTGATCTTCGTCATC -3'	5'-GATGACGAAGATCA ACGCCAGGGCCAACGC CAGGAGAATCAAGCC- 3'

6.1.5. Proteinmarker

PageRuler Protein Ladder

Thermo-Scientific

Prestained und unstained

Native Marker, Liquid Mix for BN/CN

SERVA

6.1.6. Enzyme

Pfu DNA-Polymerase

Agilent Technologies

DpnI

Agilent Technologies

Benzonase Nuclease

Sigma Aldrich

Lysozym

Merck

6.1.7. Fluoreszenzfarbstoffe

Atto647N-Maleimid

Atto-Tec GmbH

λ_{abs} bei 644 nm

λ_{fl} bei 669 nm

Atto488

Atto-Tec GmbH

λ_{abs} bei 501 nm

λ_{fl} bei 523 nm

Alexa Fluor® 568 Maleimid

Invitrogen, Life Technologies

λ_{abs} bei 578 nm

λ_{fl} bei 603 nm

DilC₁₈ Invitrogen, Life Technologies
 λ_{abs} bei 549 nm
 λ_{fl} bei 565 nm

Fluoreszenzprotein SP-GFPuv Referenz [95]
 λ_{abs} bei 395 nm
 λ_{fl} bei 509 nm

6.1.8. Verwendete Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit Qiagen
 QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit Agilent Technologies

6.1.9. Puffer, Medien und Lösungen

6.1.9.1. Medien und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

LB-Medium	10 g Trypton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen pH = 7,4 einstellen, autoklavieren
LB-Platten	500 ml LB-Medium 8 g Agar pH = 7,4 einstellen, autoklavieren nach Abkühlen Antibiotikum zugeben in Petrischalen gießen
SOC-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,6 g NaCl 0,2 g KCl mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen, pH = 7,0 einstellen, autoklavieren nach Abkühlen zugeben: 10 ml MgCl ₂ (1 M), steril filtriert 10 ml MgSO ₄ (1 M), steril filtriert 10 ml Glucose (2 M), steril filtriert bei -20 °C lagern

Spizizen Salze	14,8 g K_2HPO_4 5,4 g KH_2PO_4 2,0 g $(NH_4)_2SO_4$ 1,9 g Trinatriumcitrat x $2H_2O$ 0,2 g $MgSO_4 \times 7H_2O$ mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen, pH = 7,0 einstellen, autoklavieren
Spizizen Minimalmedium	0,02 % Casaminosäuren, sterilfiltriert 0,5 % Glucose, sterilfiltriert 0,5 ml Tryptophan (1 mg/ml), steril filtriert Mit Spizizen Salze auf 50 ml auffüllen
Starvation Medium	Spizizen Salze 0,5 % Glukose, sterilfiltriert
Kanamycin-Lösung (25 mg/ml)	25 mg Kanamycin 1 ml ddH ₂ O steril filtrieren Lagerung bei -20°C
Chloramphenicol-Lösung (5 mg/ml)	5 mg Chloramphenicol 1 ml ddH ₂ O steril filtrieren Lagerung bei -20°C
IPTG-Lösung (200 mM)	47,6 mg IPTG/ml ddH ₂ O steril filtrieren Lagerung bei -20°C
Glucose (40 %)-Lösung	20 g Glucose auf 50 ml mit ddH ₂ O auffüllen steril filtrieren Lagerung bei 4°C
Glycerin (50 %)-Lösung	20 ml Glycerin 20 ml ddH ₂ O Steril filtrieren Lagerung bei 4°C

PMSF-Lösung (100 mM)	0,17 g PMSF mit DMSO auf 10 ml auffüllen Lagerung bei - 20°C
Pefabloc-Lösung (20 mM)	4,8 mg Pefabloc mit ddH ₂ O auf 1 ml auffüllen Lagerung bei - 20°C
Benzamidin-Lösung (478,8 mM)	75 mg Benzamidin-Hydrochlorid mit ddH ₂ O auf 1 ml auffüllen Lagerung bei - 20°C
6.1.9.2. Puffer für SDS-PAGE	
Anodenpuffer	121,1 g Tris mit ddH ₂ O auf 5 l auffüllen pH = 8,9 einstellen
Kathodenpuffer	12,11 g Tris 17,92 g Tricin 1 g SDS mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen
4x Tris-HCl-Lösung	6,05 g Tris 100 ml ddH ₂ O pH = 6,8 mit HCl (1M) einstellen, steril filtrieren (0,45 µm Membran) 0,4 g SDS
Tris-Cl-Lösung	182 g Tris 500 ml ddH ₂ O pH = 8,45 mit HCl (1M) einstellen, sterilfiltrieren (0,45 µm Membran) 1,5 g SDS
2x SDS-PAGE Probenpuffer	1,75 ml 1 M Tris-Base, pH = 6,8 1,5 ml Glycerin 5 ml SDS (10%) 0,24 g DTT 1 kl. Spatelspitze Bromphenolblau mit ddH ₂ O auf 10 ml auffüllen

	Lagerung bei 4°C
Färbe-Lösung	1g Coomassie G-250 50 ml Essigsäure 450 ml Ethanol mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen
Fixier-Lösung	500 ml Ethanol 100 ml Essigsäure mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen
Entfärber-Lösung	250 ml Ethanol 50 ml Essigsäure mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen
APS-Lösung (100 mg/ml)	100 mg Ammoniumpersulfat mit ddH ₂ O auf 1 ml auffüllen Lagerung bei 4°C

6.1.9.3. Puffer für Western Blot

Anodenpuffer I	36,34 g Tris 200 ml Methanol mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen pH = 10,4 einstellen
Anodenpuffer II	3,03 g Tris 200 ml Methanol mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen pH = 10,4 einstellen
Kathodenpuffer	5,24 g 6-Amino-hexansäure 0,1 g SDS mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen pH = 7,6 einstellen
Puffer A	0,36 g NaH ₂ PO ₄ 1,37 g Na ₂ HPO ₄ 0,94 g NaCl mit ddH ₂ O auf 1l auffüllen pH = 7,2 einstellen

Puffer B	1 l Puffer A 500 µl Tween 20
Milchpulverlösung	2,5 g Milchpulver in 50 ml Puffer B lösen
Puffer C	6,1 g Tris 2,9 g NaCl 5,1 g MgCl ₂ mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen pH = 9,5 einstellen

6.1.9.4. Puffer für Blue-Native PAGE

ACA750	49,2 g 6-Amino-hexansäure (ACA) 5,23 g Bis-Tris 0,1 g EDTA mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen pH = 7,0 einstellen
1 x BN-Probenpuffer	750 µl ACA750 150 µl n-Dodecylmaltosid 10 % 150 µl 5 % Serva Blue G
5 x Kathodenpuffer	44,8 g Tricine 15,7 g Bis-Tris 1 g Coomassie 250 G mit ddH ₂ O auf 1l auffüllen pH = 7,0 einstellen
6 x Anodenpuffer	62,75 g Bis-Tris mit ddH ₂ O auf 1l auffüllen pH = 7,0 einstellen
5 % Serva Blue G	9,84 g ACA 5 g Coomassie 250 G mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen
BN-PAGE Western Blot Puffer	8,96 g Tricine 15,7 g Bis-Tris

	mit ddH ₂ O auf 1l auffüllen pH = 7,0 einstellen
Stripping-Puffer	4 g NaOH 2 % SDS 0.5 % DTT mit ddH ₂ O auf 1l auffüllen

6.1.9.5. Puffer für Proteinisolierung

Alle Puffer werden vor der Verwendung steril filtriert und im Ultraschallbad unter vermindertem Druck für 20 min entgast.

PBS-Puffer	0,19 g KH ₂ PO ₄ 0,77 g Na ₂ HPO ₄ 8 g NaCl 2 g KCl mit ddH ₂ O auf 1l auffüllen pH = 7,3 einstellen
Nickelsulfat-Lösung (100 mM)	0,15 g NiSO ₄ mit ddH ₂ O auf 10 ml auffüllen
Bindungspuffer	2,84 g Na ₂ HPO ₄ 29,22 g NaCl 1,36 g Imidazol (20 mM) mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen pH = 7,4 einstellen
Elutionspuffer	2,84 g Na ₂ HPO ₄ 29,22 g NaCl 34,04 g Imidazol (500 mM) mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen pH = 7,4 einstellen
Regenerierungspuffer	2,84 g Na ₂ HPO ₄ 29,22 g NaCl 14,61 g EDTA mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen pH = 7,4 einstellen

HPLC Lösungsmittel A
 100 ml Acetonitril
 5 mM HCl
 mit ddH₂O auf 1 l auffüllen

HPLC Lösungsmittel B
 900 ml Acetonitril
 5 mM HCl
 mit ddH₂O auf 1 l auffüllen

6.1.9.6. Medien und Puffer für PhoD-Translokationsassay

Hulett's Salze
 6,06 g Tris
 0,4 g (NH₄)₂SO₄
 2,0 g Trinatriumcitrat x 2H₂O
 0,82 g FeCl₃ x 6H₂O
 0,2 g MnCl₂ x 4H₂O
 8,63 g MgSO₄ x 7H₂O
 14 mg ZnCl₂
 auf 1L mit ddH₂O auffüllen
 pH = 7,0

HPDM (3,5 mM Phosphat)
 1250 µl 20 % Glukose
 3500 µl 50 mM KH₂PO₄ (pH = 7,0)
 1250 µl 2 % Casaminosäuren
 500 µl 1 M L-Arginin
 500 µl 100x Tryptophan (2 mg/ml)
 auf 50 ml mit Hulett's Salze auffüllen

LPDM (0,42 mM Phosphat)
 1250 µl 20 % Glukose
 420 µl 50 mM KH₂PO₄ (pH = 7,0)
 1250 µl 2 % Casaminosäuren
 500 µl 1 M L-Arginin
 500 µl 100x Tryptophan (2 mg/ml)
 auf 50 ml mit Hulett's Salze auffüllen

Aufschlusspuffer
 2,84 g Na₂HPO₄
 8,76 g NaCl
 pH = 7,0 einstellen
 mit ddH₂O auf 1 l auffüllen
 pro 10 ml Puffer Zugabe von

100 µl Pefabloc (20 mM)
 100 µl Benzamidin (478,8 mM)
 100 µl PMSF (100 mM)

6.1.10. Software

PeptideMass	www.expasy.org
ProtParam	www.expasy.org
ND-1000 V3.3.0	NanoDrop®
ImageJ	Ref. [113]
ImageJ 1.47v	Hersteller Wayne Rasband
TCSPC system Simple-Tau 152 + software	Becker und Hickl GmbH, Berlin

6.2. Methoden

6.2.1. Mikrobiologische Methoden

6.2.1.1. Steriltechnik

Unter der Reinraumbank wurden alle Arbeitsmaßnahmen durchgeführt, die eine sterile Umgebung erfordern. Alle verwendeten Glaskolben wurden mit Alufolie abgedeckt und im Trockenschrank bei 200°C für 3 h sterilisiert. Verbrauchsmaterialien wie Spitzen und Medien wurden im Autoklaven bei einer Temperatur von 120°C und einem Wasserdampfüberdruck von 1 bar für 20 min sterilisiert. Lösungen, die hitzeempfindlich sind, wurden sterilfiltriert.

6.2.1.2. Animpfen einer Übernachtskultur

Ein steriler Erlenmeyerkolben wurde mit 1/5 des Kolbenvolumens mit Medium gefüllt und das Antibiotika in der entsprechenden Konzentration hinzugegeben. Eine Impföse wurde unter einer Bunsenbrenner-Flamme ausgeglüht. Mit der sterilen Impföse wurde eine Kolonie auf der Agar-Platte gepickt und das Medium damit beimpft. Die angesetzte Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 220 rpm im Schüttler inkubiert.

6.2.1.3. Ansetzen eines Glycerin-Stocks

Zu Ansetzen eines Glycerin-Stocks, wurde die Übernachtskultur im Verhältnis eins zu eins mit einer 50 %igen sterilen Glycerinlösung vermischt und sofort bei -80 °C gelagert.

6.2.1.4. Gießen von Agar-Platten

Zu 500 ml LB-Medium wurden 8 g Agar gegeben und ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert und auf 40-50 °C abkühlen gelassen. Unter der Reinraumbank wurde das Antibiotikum in der entsprechenden Konzentration dazugegeben. Sofort wurde die

Lösung gleichmäßig in Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren des Mediums wurden die Agar-Platten verschlossen und bei 4 °C im Kühlhaus gelagert.

6.2.2. Molekularbiologische Methoden

6.2.2.1. Mutagenese

Zur Herstellung der TatA_d Mutanten wurde das *Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit* oder das *Quick Change II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* verwendet. Hierbei wurde die gewünschte Mutation durch einen mutagenen Primer mittels PCR eingeführt. Das *tatA_d*-Gen lag bereits auf einem Plasmid im Expressionsvektor pET-28a(+) bzw. pDGL48-*tatA_dC_d* vor, welches als Matrize für die PCR verwendet wurde. Die methylierte, parentale DNA wurde nach Abschluss der PCR durch einen *Dpn I* Verdau entfernt und der Ansatz direkt in chemisch superkompetenten *E. coli* XL1-Blue oder in XL10Gold Zellen transformiert.

Die Primer wurden nach dem *Stratagene Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit* Protokoll designt. Sie sollten eine Länge von 23-45 Nukleotiden besitzen, einen GC-Gehalt von mindestens 40 % aufweisen und der Schmelzpunkt bei 78 °C oder drüber liegen. Die gewünschte Mutation sollte sich dabei in der Mitte der Sequenz befinden. Alle Primer mit der gewünschten Punktmutation wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert.

Für die PCR sollte nach Angaben des Herstellers in einem 50 µl Ansatz die Plasmid Menge 5-50 ng und die Menge der mutierten Primer jeweils ca. 125 ng betragen. Bei den Mutagenesen in dieser Arbeit wurde das Endvolumen des PCR-Ansatzes auf 25 µl reduziert. Der 25 µl PCR-Ansatz wurde wie folgt zusammen pipettiert:

Komponente	Volumen	Menge/ Endkonzentration
Plasmid	1 µl	20 ng
Primer forward	x µl	62,5 ng
Primer reverse	x µl	62,5 ng
dNTP Mix (10 mM)	0,5 µL	0,2 mM
10x Reaktions-Puffer mit MgSO ₄	2,5 µl	1x
PfuTurbo™ DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	0,5 µl	1,25 U
DMSO	2 µl	
ddH ₂ O	auf 25 µl Gesamtvolumen auffüllen	

Für die PCR wurde der Thermozykler wie folgt programmiert:

Vorgang für pET28a- <i>tatA_d</i>	Zeit	Temperatur	Wiederholung
Denaturierung	30 s	95°C	1 x
Denaturierung	30 s	95°C	18 x
Annealing	1 min	55°C	
Elongation	5:40 min	68°C	
Lagerung des PCR Produktes		4°C	
Vorgang für pDGL48- <i>tatA_dC_d</i>	Zeit	Temperatur	Wiederholung
Denaturierung	1 min	95°C	1 x
Denaturierung	50 s	95°C	18 x
Annealing	50 s	60°C	
Elongation	8 min	68°C	
Elongation	7 min	68°C	1x
Lagerung des PCR Produktes		4°C	

Um die methylierten Parentalplasmide abzubauen, wurde der Reaktionsmischung nach Ablauf des PCR-Programms 1 µl *DpnI* zugegeben und für 1h bei 37 °C verdaut. Das *DpnI* Enzym gehört zu dem Typ II-Restriktionsendonukleasen, es erkennt und schneidet methyliertes Adenin im Sequenzmotiv GATC.

6.2.2.2. Transformation

Nach Herstellung der *TatA_d* Mutanten mittels Mutagenese wurden die pET28a-*tatA_d* Plasmide in den hitzekompetenten *E. coli* XL1-Blue Stamm transformiert und die pDGL48-*tatA_dC_d* Plasmide in die *E. coli* XL10Gold Zellen.

Für die Expression der *TatA_d* Ladungsmutanten wurde die Plasmide in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 transformiert. Für die Hitzetransformation wurden die Zellen zuerst langsam auf Eis aufgetaut. Pro Transformationsansatz wurden 50 µl Zellen mit 12,5 µl Plasmid gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurde 1 ml SOC-Medium im Wasserbad auf 42 °C vorgewärmt. Für den Hitzeschock wurden die Zellen für 45 sec ins 42 °C warme Wasserbad gesetzt. Danach wurden die Zellen wieder für 2 min auf Eis gestellt. Schließlich wurde das vorgewärmte SOC-Medium hinzugegeben und 1 h bei 37 °C im Schüttler (220 rpm) inkubiert. Die transformierten Zellen wurden anschließend auf Agarplatten unter entsprechender Antibiotika-Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Von den erhaltenen Bakterienkolonien wurde eine Übernachtskultur angeimpft und Glycerol-Stocks angefertigt.

Die Transformation in *B. subtilis* erfolgte nach der Methode von John Spizizen. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Schüttler bei 37 °C und 220 rpm. In 10 ml Spizizen

Minimalmedium (SMM) wurde eine Übernachtskultur von *B. subtilis* Δ *tatA_dC_d*-Deletionsstamm angesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen 1:10 in vorgewärmten SMM verdünnt und für 3 h im Schüttler wachsen gelassen. Danach erfolgte eine 1:1 Verdünnung im vorgewärmten *Starvation* Medium und eine weitere Inkubation für 2 h. 100 μ l Zellen wurden mit 10 μ l Plasmid DNA für 45 min inkubiert. Nach Zugabe von 300 μ l LB-Medium erfolgte eine weitere Wachstumsphase für 45 min, bevor die Zellen auf LB-Agar Platten mit entsprechender Antibiotika-Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurden.

6.2.2.3. Plasmidisolierung

Für die Isolierung der Plasmid-DNA wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit verwendet. Hierfür wurden 4 ml einer Übernachtskultur von XL1-Blue (pET28a-*tatA_d*) Zellen und 15 ml XL10Gold (pDGL48-*tatA_dC_d*) Zellen für 15 min bei 6000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die weitere Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Das Bakterienpellet wurde in EDTA-haltigen Aufschlusspuffer resuspendiert. EDTA komplexiert Magnesium und Calcium, die für die Stabilität der Bakterienzellwände wichtig sind. Dadurch wird die Zellwand destabilisiert. Die im Puffer enthaltene RNase A degradiert bakterielle RNA. Durch Zugabe einer SDS-NaOH Mischung wurde die Bakteriensuspension vollständig lysiert (alkalische Lyse). Das Detergenz SDS löst Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellwände und NaOH denaturiert DNA und Proteine. Mit Kaliumacetatpuffer wurde das Lysat neutralisiert. Denaturierte Proteine, RNA, chromosomale DNA und bakterielle Zelldebris wurden abzentrifugiert. Die Plasmide blieben in Lösung und wurden über eine Silikasäulchen aufgereinigt. Die Plasmidkonzentration und dessen Reinheit wurde mit einem UV/VIS-Spektrophotometer ND-1000 von *NanoDrop*® bestimmt. Dabei wurde die UV-Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Ein Quotient A_{260}/A_{280} von 1,8 bis 2 zeigt eine hohe Reinheit an. Die Sequenzierung wurde von der Firma GATC Biotech durchgeführt.

6.2.3. Proteinbiochemische Methoden

6.2.3.1. Proteinexpression

Für eine Proteinexpression wurde eine 20 ml Übernachtskultur der transformierten *E. coli* Zellen angesetzt. In einem 2 L Kolben wurde 500 ml LB-Medium autoklaviert, danach mit 2,5 ml steriler Glucose-Lösung (40 %), einem Antibiotikum in der entsprechender Konzentration und 5 ml der Übernachtskultur beimpft. Die Zellkulturen wurden bei 37 °C im Schüttler (220 rpm) inkubiert. Nachdem die Zellkulturen einen OD_{600} Wert von 0,6 AU erreicht hatten, wurde die Expression mit IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert. Nach 18-22 h Inkubationszeit erfolgte die Zellernte.

6.2.3.2. Zellaufschluss

Um die exprimierten *E. coli* Zellen zu ernten, wurde die Expressionskultur für 20 min bei 6.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 40 ml *HisTrap*-Bindungspuffer resuspendiert. Der *HisTrap*-Bindungspuffer besitzt eine 20 mM Imidazolkonzentration, um unspezifische Bindungen an die *HisTrap*-Säule zu vermeiden. Zu der Zellsuspension wurde jeweils 400 µl Pefabloc (20 mM), Benzamidin (478,8 mM), PMSF (100 mM) zugegeben. Diese Proteaseinhibitoren hemmen den proteolytischen Abbau. Zudem wurde 40 µl Lysozym-Lösung zugesetzt, um die bakterielle Zellwand abzubauen. Danach wurden 2 µl Benzonase hinzugefügt, welche eine Endonuklease ist und alle Art von DNA und RNA abbaut. Jeweils 20 ml der Zellsuspension wurde in ein Ultraschallgefäß geben und 4 x 4 min sonifiziert (bei 67 % Power). Nach dem Zellaufschluss mittels Ultraschall wurde die vereinte Lösung 30 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Um unaufgeschlossene Zellen, *inclusion bodies* und Zelltrümmer (Zelltrümmerfraktion) abzutrennen, wurde der gewonnene Überstand, welcher noch die Membranen und die löslichen Proteine des Zytoplasma enthält, für 1 h bei 40.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Für die Blue-Native PAGE wurden die isolierten Membranen weiterverwendet. Für die Aufreinigung von SP-GFPuv wurde die Zytoplasmafraktion sowie Zelltrümmerfraktion und für TatC_d Aufreinigung Zellmembran- und Zelltrümmerfraktion verwendet. Die Membran- und Zelltrümmerpellets wurden dafür in 25 ml *HisTrap*-Bindungspuffer mit 2 % NLS aufgenommen, mittels Ultraschall resuspendiert und über Nacht in der Kühlzelle solubilisiert.

6.2.3.3. Nickel-Affinitätschromatographie

Durch die Nickel-Affinitätschromatographie wurde sowohl das exprimierte SP-GFPuv als auch TatC_d aufgereinigt. Dies war möglich, da die exprimierten Proteine mit einem Hexahistidin-Anhang (*His-Tag*) fusioniert sind. Dabei bindet der *His-Tag* des Proteins an die Nickel-Sepharose der *HisTrap*-Säule (5 ml Säulenvolumen). Vor der Aufreinigung wurde die *HisTrap*-Säule mit Nickelionen neu beladen. Hierfür wurden zuerst die noch gebundenen Nickelionen entfernt, indem mit 10 Säulenvolumen EDTA haltigen Regenerierungspuffer, anschließend mit Bindungspuffer und ddH₂O gewaschen wurde. Danach wurde die Säule mit 2,5 ml einer 0,1 M NiSO₄-Lösung wieder neu beladen. Bevor die Probe über eine Probenschleife aufgetragen wurde, wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen ddH₂O und 10 Säulenvolumen Bindungspuffer gespült. Die Detektion erfolgte über ein Photometer bei 280 nm und die verschiedenen Fraktionen wurden von einem Fraktionssammler gesammelt. Nach dem Auftragen der Probe wurde solange mit Bindungspuffer gespült bis alle ungebundenen Proteine herausgewaschen wurden. Durch eine Erhöhung der Imidazol-Konzentration (von 20 mM auf 500 mM) wurde das gebundene Protein eluiert.

Für die Aufreinigung der Membranproteine TatA_d und TatC_d wurde zusätzlich 0,2 % NLS zum Bindungs- und Elutionspuffer zugegeben. Nach der Aufreinigung wurde das TatC_d bzw. TatA_d Eluat in einen Dialyseschlauch (*Spectrapor Float-A-Lyzer*, 1 kDa MWCO) überführt und im 5 l Becherglas gegen ddH₂O dialysiert. Nach mehrmaligen Wasserwechseln präzipitierte das Protein als weißer Niederschlag. Das Protein wurde bei 10.000 rpm für 30 min abzentrifugiert und anschließend lyophilisiert.

Im Gegensatz zu TatC_d wurde das SP-GFPuv Eluat nicht dialysiert. Das Protein Eluat wurde in einem Centricon von Millipore (10 kDa MWCO) einkonzentriert und in Lösung bei 4 °C gelagert.

6.2.3.4. Kovalente Fluoreszenzmarkierung von TatA_d

Die TatA_d-G70C Cysteinmutante wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff kovalent gekoppelt. Dafür wurde der Fluoreszenzfarbstoff Atto647N und Alexa568, welches mit einem Maleimid verbunden ist gewählt. Maleimide bilden mit Thiolgruppen bei einem pH-Wert zwischen 7,0 und 7,5 über einen nukleophilen Angriff eine Thioetherbindung.

Für die Kopplungsreaktion wurde 1,5 mg Protein in 500 µl PBS-Puffer (+ 5 mM TCEP) mit Hilfe von Ultraschall in Lösung gebracht. Der Maleimid Farbstoff wurde in DMSO gelöst und im 2-fach molaren Überschuss zur Proteinlösung gegeben. Die Reaktionszeit betrug 2 h im Dunkeln bei Raumtemperatur. Danach wurde Gluthathion in einem 10-fach molaren Überschuss zugegeben, um den restlichen ungebundenen Farbstoff abzusättigen. Das fluorophormarkierte Protein fiel nach der Reaktion aus und wurde durch Zugabe von 1% NLS wieder in Lösung gebracht. Die Trennung des markierten Proteins vom freien Farbstoff und ungekoppelten TatA_d-G70C erfolgte über die HPLC.

6.2.3.5. HPLC

Die fluorophorgekoppelten TatA_d Proteine wurden mittels *Reversed-Phase HPLC (High Performance Liquid Chromatography)* vom freien Farbstoff, sowie unmarkiertem Protein aufgereinigt. Dabei wurde das Reaktionsgemisch mit einem polaren Laufmittel durch eine analytische C18-Polymersäule gepumpt. Die Probenbestandteile wechselwirken spezifisch mit der stationären Phase und verbleiben daher unterschiedlich lange auf der Säule, wodurch es zur Auftrennung des Probengemisches kommt. Der Nachweis der einzelnen Substanzen erfolgte anhand eines UV-Detektors. Das TatA_d Protein wurde bei 220 nm detektiert und der Fluoreszenzfarbstoff bei 650 nm. Die Aufreinigung erfolgte bei 33 °C unter Benutzung der Gradienten die in Abb. 52 dargestellt sind.

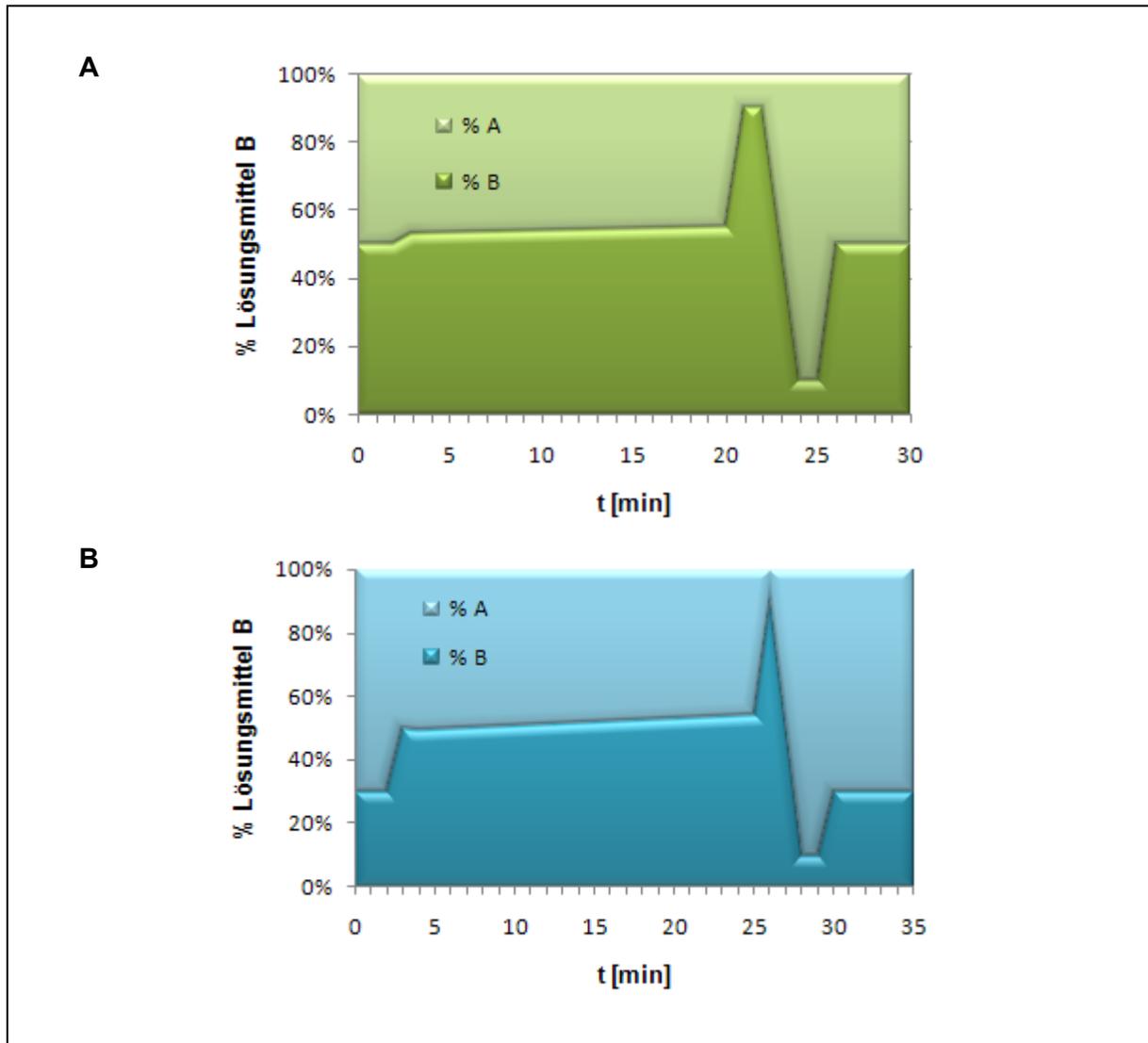


Abb. 52: HPLC-Gradienten der TatA_q-Atto647N (A) und TatA_q-Alexa568 (B) Aufreinigung. A steht für Lösungsmittel A und B für Lösungsmittel B.

6.2.4. Analytische Methoden

6.2.4.1. SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) dient der Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld. Die Eigenladung der Proteine wird durch das anionische Detergens SDS überdeckt und das Verhältnis von Ladung zu Größe ist für jedes Protein annähernd gleich. Das Polyacrylamidgel wirkt dabei wie ein Sieb, kleine Moleküle können die „Maschen“ des Gels relativ leicht passieren. Größere Moleküle werden eher zurückgehalten und wandern langsamer durch das Gel.

Für die SDS-PAGE wurden 15 % und ein 12 %ige Polyacrylamidgele verwendet:

15 % Trenngel (2 Gele)	Sammelgel (2 Gele)
600 µl H ₂ O	3,2 ml H ₂ O
3,3 ml Tris-HCl-Puffer	1,29 ml 4 x Tris-HCl-Puffer
1,5 ml Glycerin	-
5,2 ml 30 % Acrylamidmix (37,5:1)	680 µl 30 % Acrylamidmix (37,5:1)
35 µl 20 % APS	25 µl 20 % APS
3,5 µl TEMED	2,5 µl TEMED
12 % Trenngel (2 Gele)	
1,6 ml H ₂ O	
3,3 ml Tris-HCl-Puffer	
1,5 ml Glycerin	
4,2 ml 30 % Acrylamidmix (37,5:1)	
35 µl 20 % APS	
3,5 µl TEMED	

Zunächst wurde das Trenngel in die Minigelkammer der Firma Bio-Rad gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser aus der Gelkammer entfernt, das Sammelgel gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Die zu analysierende Proteinprobe wurde in 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels 5 min bei 95 °C erhitzt und abzentrifugiert (maximale Geschwindigkeit, 1 min). Nachdem die Elektrophorese-Kammer mit Kathoden- und Anoden-Puffer befüllt wurde, wurden 7-10 µl von den Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel. Die Elektrophorese wurde gestoppt, als der blaue Farbstoff (Bromphenolblau) des SDS-Ladepuffers die Unterkante des Gels erreicht hatte. Das Sammelgel wurde abgetrennt und verworfen.

Für das Anfärben der Proteinbanden wurde das Trenngel für 15 min in Fixierlösung und anschließend über Nacht in Coomassie-Färbelösung geschüttelt. Danach wurde das Gel in Entfärber-Lösung solange entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden.

Für die Expressionsreihe der TatA_d Ladungsmutanten wurden 100 µl Zellkultur abgenommen, der OD₆₀₀-Wert bestimmt und die Zellen abzentrifugiert. Das isolierte Zellpellet wurde mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Menge an Probenpuffer wurde hierbei nach folgender Formel berechnet:

$$(\text{OD}_{600} \text{ Wert} / 0,2) \cdot 7,5 = x \text{ µl } 2 \text{ x SDS-Probenpuffer}$$

6.2.4.2. Blue-Native PAGE

Die Blue-Native PAGE erlaubt die Auftrennung und Detektion von Membranproteinkomplexen unter nativen Bedingungen [114-115]. Hierzu wurde zuerst die Membranfraktion isoliert (wie im Kapitel 6.2.4.3 beschrieben), danach wurden 2,5 mg Membranpellet in 200 μ l BN-Probenpuffer mittels schwachen Ultraschall solubilisiert (15-30 min) und bei 13.000 rpm für 20 min abzentrifugiert. Die BN-Proben (10-20 μ l) wurden auf ein kommerzielles Gradientengel (5-20 % Roti-PAGE Gradient, Roth) aufgetragen. Nach Befüllen der Kammer mit BN-Kathoden- und Anodenpuffer wurde eine konstante Spannung von 50 V für 30 min angelegt, bis die Proteine ins Gel gewandert sind. Danach erfolgte eine Auftrennung der Membrankomplexe bei max. 125 V und max. 15 mA, bis die Coomassie-Farbstofffront aus dem Gel gelaufen ist (3-5 h, bei Raumtemperatur). Anschließend wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot übertragen (Stromstärke 3 mA/cm²). Als Puffer für die Filterpapiere der Anode, als auch Kathode wurde der BN-Western Blot Puffer verwendet. Um den blauen Coomassie-Farbstoff von der PVDF-Membran zu entfernen, wurde die Membran im Stripping-Puffer für 5 min bei 55 °C entfärbt und mit PBS-Puffer gewaschen.

Danach wurde das TatA_d Protein, wie im Kapitel 6.2.4.3. beschrieben, mit anti-TatA_d Antikörper (von Dr. Jörg Müller, Friedrich Schiller Universität Jena) detektiert.

Um das Monomer-zu-Oligomer Verhältnis zu bestimmen, wurde mit Hilfe der Software ImageJ ein Intensitätsprofil der Proteinbanden angelegt und daraus der M/O Wert von jeder Mutante berechnet [113].

6.2.4.3. Western Blot

Der immunologische Nachweis von PhoD und TatA_d erfolgte mittels dem *semi-dry* Western Blot Verfahren. Der Western Blot wurde im Anschluss an die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Um die Proteine vom SDS Gel auf eine Nitrocellulosemembran zu überführen, wurde auf die Anodenfläche der Reihe nach ein Stapel gelegt aus:

1. 6 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer I
2. 3 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer II
3. Nitrocellulosemembran mit Anodenpuffer II
4. SDS-Gel
5. 9 Lagen Filterpapier mit Kathodenpuffer

Geblottet wurde bei einer Stromstärke von 3 mA/cm² für 45 min. Danach wurde die Nitrocellulosemembran an der Luft getrocknet (keine Trocknung bei PVDF-Membran, die für Blue-Native PAGE verwendet wurde) und entweder für 1 h oder über Nacht in Milchpulverlösung geblockt. Für die Immundetektion wurde die Membran zuerst im

Primärantikörper (1:1000 in Milchpulverlösung) für eine Stunde inkubiert, danach im Puffer B gewaschen (3 x 5 min) und in die Sekundärantikörper-Lösung für 45 min überführt. Nachdem mit Puffer B (3 x 5 min) und Puffer C (2 x 5 min) gewaschen wurde, konnte die Detektion der Proteinbanden durch die Zugabe von 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) erfolgen (BCIP/NBT Substrat Kit, Invitrogen). Dabei setzt die am Sekundärantikörper konjugierte alkalische Phosphatase katalytisch BCIP und NBT zu einem violetten Farbstoffpräzipitat um. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges waschen mit Wasser gestoppt. Die polyklonalen Primärantikörper gegen TatA_d und PhoD wurden von Dr. Jörg Müller aus der Universität Jena zur Verfügung gestellt.

6.2.4.4. Massenbestimmung mittels MALDI-TOF

Für ein MALDI-TOF Massenspektrum (*matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight*) wurde etwas Protein mit 5 µl der Matrix-Lösung (gesättigte 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Acetonitril/Wasser (1:2) mit 0,1% TFA) vermischt. Danach wurde 1 µl von der Proteinmischung auf eine MALDI-Proben Platte aufgetragen und getrocknet. Nach auskristallisieren der Probe wurde die Messung an einem MALDI-TOF-Massenspektrometer von Dr. Sergiy Afonin (KIT) durchgeführt.

6.2.4.5. Konzentrationsbestimmung von SP-GFPuv mittels FCS

Die Konzentration von SP-GFPuv wurde mit Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS von *Fluorescence Correlation Spectroscopy*) bestimmt. Die FCS-Messungen wurden in Kooperation mit Prof. G. Ulrich Nienhaus (KIT) durchgeführt. Mit dieser Technik können Fluorophore, die in ein bestimmtes Detektionsvolumen hinein- und herausdiffundieren, durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Anzahl an ausgestrahlten Photonen wird von einem Detektor erfasst und in Abhängigkeit der Zeit aufgezeichnet. Die Photonencountzahl wird als Funktion der Zeit autokorreliert und die Autokorrelationsfunktion mathematisch ermittelt [111, 116].

Für eine freie dreidimensionale Diffusion wird die Autokorrelationsfunktion angepasst und ist wie folgt definiert:

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}}$$

$$\langle N \rangle = V \cdot \langle C \rangle$$

$\langle N \rangle$ → Mittlere Anzahl an Fluorophore im Anregungsvolumen

V → Detektionsvolumen

$\langle C \rangle$ → Konzentration der Fluorophore

$\frac{\tau_0}{z_0} = S \rightarrow$ Fitparameter für dreidimensionale Diffusion

$\tau_D \rightarrow$ mittlere Aufenthaltsdauer der Fluorophore im Anregungsvolumen

Wurde die Funktion $G(\tau)$ bestimmt, so kann aus ihr der Wert für die durchschnittliche Diffusionszeit (τ_D) aus dem Wendepunkt entnommen werden. In Abwesenheit von photochemischen Effekten der Fluorophore kann aus der reziproken Amplitude bei lag time $\tau = 0$ die Konzentration der Moleküle im Detektionsvolumen bestimmt werden. Steigt die Konzentration der Fluorophore an, so sinkt die Amplitude $G(\tau)$ proportional zur Anzahl der Teilchen im Detektionsvolumen.

Bevor die Konzentration von SP-GFPuv durch die Autokorrelation ermittelt werden konnte, musste zuerst das Detektionsvolumen durch eine Kalibrationsmessung bestimmt werden. Hierfür wurde die Autokorrelation von freiem Atto488 Fluorophor in Lösung experimentell gemessen und mittels $G(\tau)$ für dreidimensionale Diffusion angepasst.

Aus den gewonnenen Daten konnten die durchschnittliche Aufenthaltsdauer und die mittlere Anzahl an Fluorophore im Detektionsvolumen bestimmt werden:

$$\tau_D = 0.0488 (\pm 6.5 \cdot 10^{-4}) \text{ ms}$$

$$\langle N \rangle = 7.428 (\pm 0.026)$$

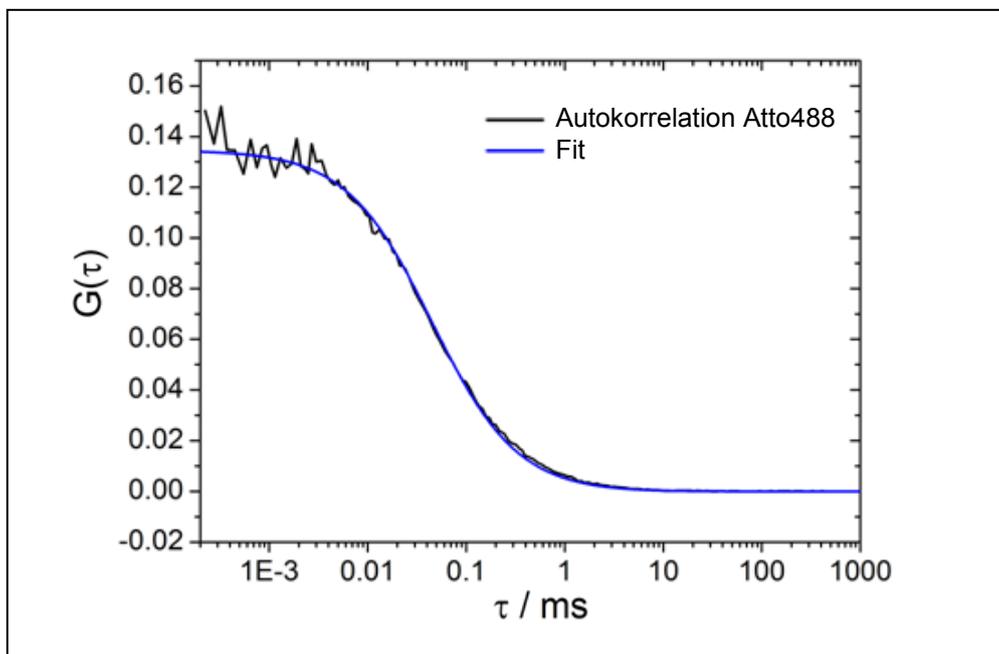


Abb. 53: Autokorrelationsfunktion von Atto488. $G(0) = 1/\langle N \rangle$. $\langle N \rangle = 7.428 \rightarrow$ mittlere Anzahl an Fluorophore im Anregungsvolumen. $\tau_D = 0.0488 \text{ ms} \rightarrow$ mittlere Aufenthaltsdauer der Fluorophore im Anregungsvolumen.

Aus den ermittelten Parametern der Atto488-Autokorrelation und des bekannten Atto488-Diffusionskoeffizienten (D) konnte das Detektionsvolumen berechnet werden:

$$D_{\text{Atto488}} = 4.0 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s} \text{ (in wässriger Lösung)}$$

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4 \cdot D}$$

$$\rightarrow r_0 = \sqrt{4 \cdot D \cdot \tau_D}$$

$$S = 0.1 = \frac{r_0}{z_0}$$

$$\rightarrow z_0 = \frac{r_0}{S}$$

$$\rightarrow \text{Das Detektionsvolumen betrug: } V = \pi^{3/2} \cdot r_0^2 \cdot z_0 = 1.1 \cdot 10^{-15} \text{ l} = 1.1 \text{ fl}$$

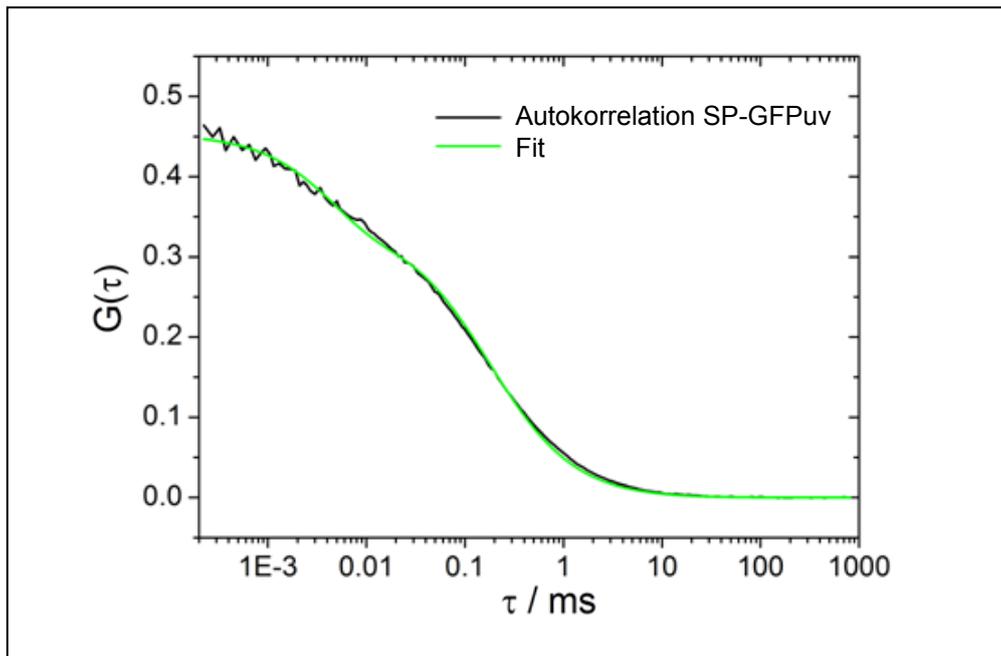


Abb. 54: Autokorrelationsfunktion von SP-GFPuv. $G(0) = 1/\langle N \rangle$. $\langle N \rangle = 2.968 \rightarrow$ mittlere Anzahl an Fluorophore im Anregungsvolumen. $\tau_D = 0.177 \text{ ms} \rightarrow$ mittlere Aufenthaltsdauer der Fluorophore im Anregungsvolumen.

Nachdem das Detektionsvolumen bekannt war, wurde die Autokorrelation von SP-GFPuv ermittelt. Für die Messung wurde die Stammlösung 1:1000 verdünnt. Aus den gewonnenen Parametern und dem Detektionsvolumen konnte die Konzentration der SP-GFPuv-Stammlösung berechnet werden:

$$\langle N \rangle = 2.968 (\pm 0.016)$$

$$\langle N \rangle = V \cdot \langle C \rangle \leftrightarrow \langle C \rangle = \frac{\langle N \rangle}{V}$$

Mit Hilfe der Avogadro-Konstante lässt sich die Konzentration von der gemessenen SP-GFPuv Lösung im Anregungsvolumen bestimmen: $\langle C \rangle = 4.5 \text{ nM}$

\rightarrow Die SP-GFPuv Stammlösung hatte eine Konzentration von $45 \mu\text{M}$.

6.2.4.6. Konzentrationsbestimmung von fluoreszenzmarkiertem TatA_d

Die Konzentration des aufgereinigten TatA_d-Atto647N wurde durch Absorptionmessungen bestimmt. Als Referenz diente das Absorptionsspektrum von freiem Atto647N Farbstoff, dessen Konzentration bekannt war (1 μM). Das Absorptionsspektrum des HPLC-Eluats der markierten TatA_d Proteine ist in Abb. 55 gezeigt. Aus dem gemessenen Absorptionsspektrum der Referenz und TatA_d-Atto647N konnte die Konzentration von TatA_d-Atto647N Stammlösung von 1.4 μM bestimmt werden.

Für weitere Messungen wurde das Eluat in 1 ml Aliquote aufgeteilt, lyophilisiert und bei -80 °C gelagert.

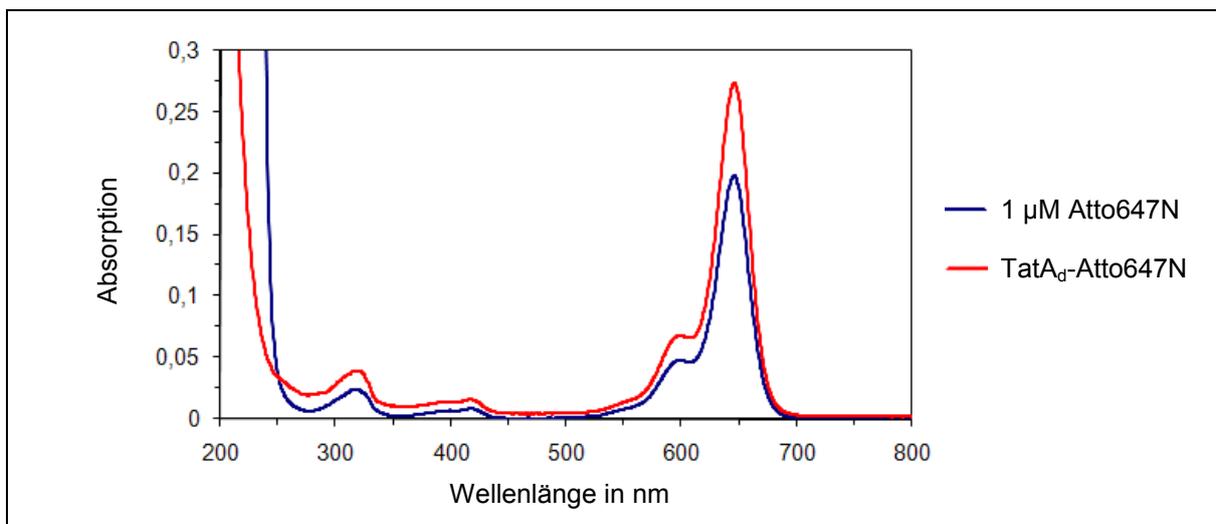


Abb. 55: Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten TatA_d-Atto647N durch Absorptionsspektroskopie. Für ein Referenzspektrum wurde der freie Atto647N Farbstoff im HPLC-Lösungsmittel verwendet, dessen Konzentration von 1 μM bekannt war.

Die TatA_d-Alexa568 Konzentration wurde wie das SP-GFPuv mittels FCS ermittelt (in Kooperation mit Prof. G. Ulrich Nienhaus, KIT). Das Protein lag nach der Aufreinigung zu verdünnt im HPLC-Lösungsmittel vor, um die Konzentration mit Absorptionsspektroskopie zu bestimmen. Deswegen wurde die Lösung aliquotiert und lyophilisiert. Ein Aliquot wurde in 50 μl 1 %iger NLS-Lösung aufgenommen, verdünnt und die Autokorrelation von TatA_d-Alexa568 gemessen.

Für die Kalibrationsmessung des Detektionsvolumens wurde der freie Alexa568-Farbstoff verwendet. Der Diffusionskoeffizient (D) von Alexa568 in wässriger Lösung ist bekannt und beträgt:

$$D_{\text{Alexa568}} = 4.0 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$$

Aus den ermittelten Parametern der Alexa568-Autokorrelationsfunktion (Abb. 56) und des bekannten Diffusionskoeffizienten konnte das Detektionsvolumen berechnet werden:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4 \cdot D} = 143 (\pm 5) \mu\text{s}$$

$$\rightarrow r_0 = \sqrt{4 \cdot D \cdot \tau_D}$$

$$S = 0.1 = \frac{r_0}{z_0}$$

$$\rightarrow z_0 = \frac{r_0}{S}$$

Das Detektionsvolumen betrug:

$$V = \pi^{3/2} \cdot r_0^2 \cdot z_0 = 5 \cdot 10^{-15} \text{ l} = 5 \text{ fl}$$

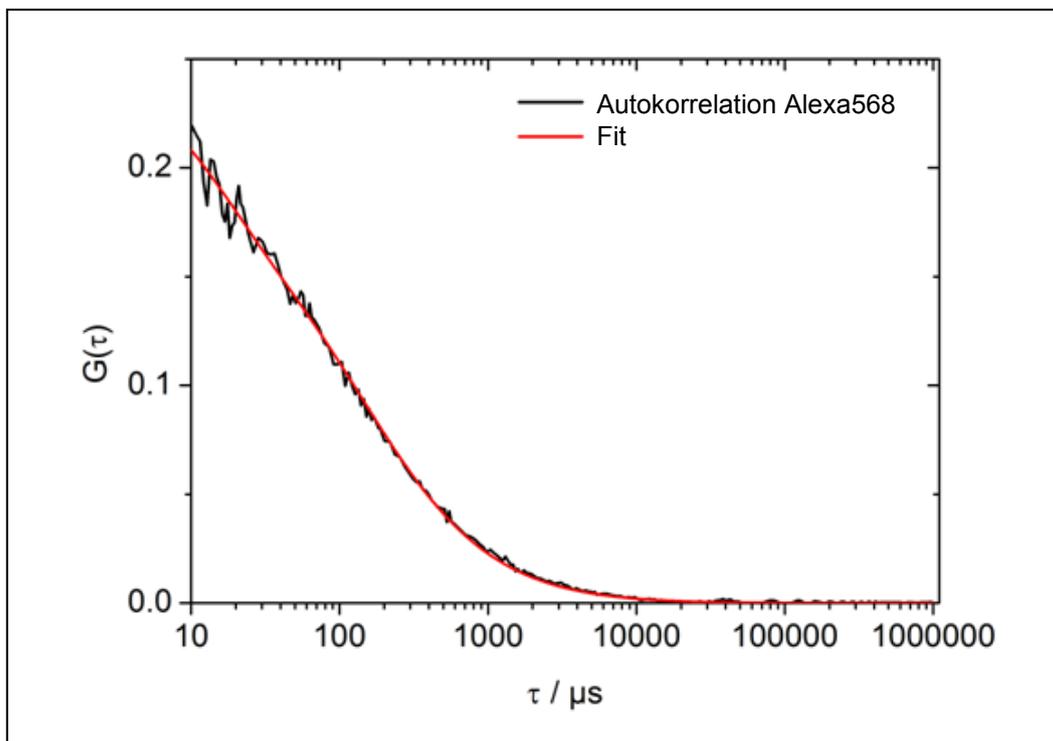


Abb. 56: Autokorrelationsfunktion von Alexa568. $G(0) = 1/\langle N \rangle$. $\langle N \rangle = 5.3 \rightarrow$ mittlere Anzahl an Fluorophore im Anregungsvolumen. $\tau_D = 143 (\pm 5) \mu\text{s} \rightarrow$ mittlere Aufenthaltsdauer der Fluorophore im Anregungsvolumen.

Nach der Berechnung des Detektionsvolumens, wurde die Autokorrelationsfunktion von TatA_d-Alexa568 bestimmt (Abb. 57). Aus den ermittelten Parametern und dem Detektionsvolumen konnte die Konzentration von TatA_d-Alexa568 berechnet werden:

$$\langle N \rangle = 1.86 (\pm 0.03)$$

$$\langle N \rangle = V \cdot \langle C \rangle \leftrightarrow \langle C \rangle = \frac{\langle N \rangle}{V}$$

Mit Hilfe der Avogadro-Konstante lässt sich die Konzentration von der gemessenen TatA_d-Alexa568 Lösung, welche 1:10.000 verdünnt war, im Anregungsvolumen bestimmen:

$$\langle C \rangle = 0.61 \text{ nM}$$

\rightarrow Die TatA_d-Alexa568 Stammlösung hatte eine Konzentration von 6.1 μM .

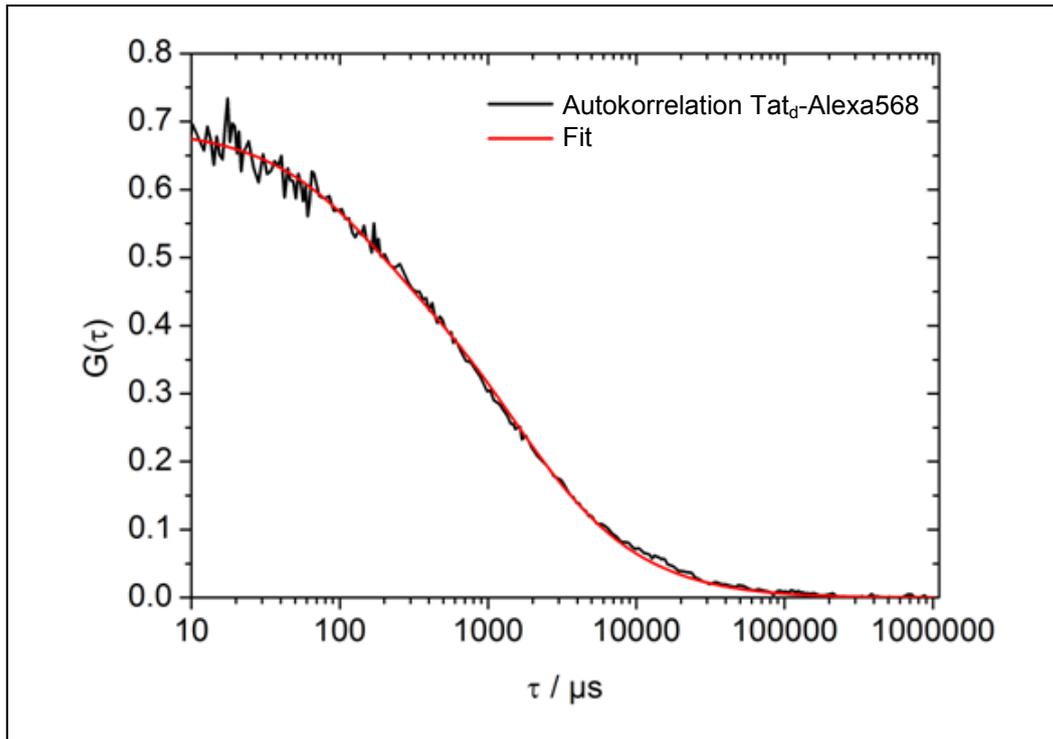


Abb. 57: Autokorrelationsfunktion von TatA_d-Alexa568. $G(0) = 1/\langle N \rangle$. $\langle N \rangle = 1.86 \rightarrow$ mittlere Anzahl an Fluorophore im Anregungsvolumen. $\tau_D = 1423 (\pm 50) \mu\text{s} \rightarrow$ mittlere Aufenthaltsdauer der Fluorophore im Anregungsvolumen.

6.2.5. PhoD-Translokationsassay

Es wurde eine Übernachtskultur in 10 ml *high phosphate defined medium* (HPDM) bei 37 °C angesetzt. Bei *B. subtilis* $\Delta\text{tatA}_d\text{C}_d$ wurde das Antibiotikum Chloramphenicol (5 $\mu\text{g/ml}$) zugegeben, bei dem mit pDGL- tatA_dC_d komplementierten *B. subtilis* Stamm sowie den Mutanten wurde sowohl Chloramphenicol als auch Kanamycin (10 $\mu\text{g/ml}$) zugegeben. Die Zellen wurden in 20 ml *low phosphate defined medium* (LPDM) mit dem entsprechenden Antibiotikum auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,1 verdünnt und für 6 h bei 37 °C inkubiert. Bei einem Phosphatmangel im Medium wird die Expression von PhoD und TatA_dC_d induziert. Das PhoD wird durch die TatA_dC_d-Pore transloziert und ins Medium sekretiert. Um PhoD im Medium nachzuweisen wurden 4 x 2 ml der jeweiligen Kultur entnommen und bei 9000 rpm für 8 min abzentrifugiert. Jeweils 1,5 ml Überstand wurde in ein neues 2 ml Eppi überführt. Durch Zugabe von 150 μl Trichloressigsäure-Fällungslösung (100 g TCA auf 100 ml mit ddH₂O auffüllen) wurden die Proteine im Überstand über Nacht auf Eis gefällt. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.500 rpm (2 °C) für 20 min. Das gewonnene Proteinpellet wurde in 750 μl eiskaltem 80 % Aceton gewaschen und für 15 min bei 13.500 rpm (2 °C) abzentrifugiert. Das Proteinpellet wurde anschließend 20 min bei 60 °C getrocknet. Alle vier Proteinpellets wurden in insgesamt 60 μl 2 x SDS Probenpuffer aufgenommen und vereint, für 5 min gekocht und auf ein 12 %iges SDS-Gel geladen. Der

Nachweis von PhoD erfolgte mittels Western Blot. Um TatA_d in den Zellen nachzuweisen, wurden die Zellpellets im Aufschlusspuffer vereint und mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 6000 rpm (4 °C, 15 min) abzentrifugiert. Anschließend wurde die Membran durch Zentrifugation bei 13.500 rpm (4 °C, 30 min) geerntet. Das Membranpellet wurde in 2 x SDS Probenpuffer solubilisiert, 5 min gekocht und auf ein 15 %iges SDS-Gel geladen und die Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt. Das TatA_d wurde anschließend per Western Blot nachgewiesen.

6.2.6. GUV Präparation für den *in vitro* Translokationsassay

Die TatA_d und TatC_d Proteine wurden in HFIP aufgenommen und zusammen mit der DMPC/HFIP Lipidmischung (10 mg/ml) in der gewünschten Zusammensetzung gemischt und jeweils 15 µl (0.15 mg) auf ein ITO-Glasplättchen aufgetragen. Um das HFIP zu entfernen, wurden die Glasplättchen über Nacht unter Vakuum getrocknet. Danach wurden die Glasplättchen in ein 2 ml Eppi hineingesetzt (siehe Abb. 35), welche mit 1,5 ml einer 280 mosmol Saccharose-Lösung befüllt war. Anschließend wurde bei 42 °C, für 2 h, eine Wechsellspannung (2 V, 5 Hz) angelegt. Währenddessen wurde die GUV-Kammer (Nunc™ Lab-Tek™ *Chambered Coverglass*) mit BSA-Lösung (2 mg/ml) für 30 min inkubiert und mit ddH₂O vorsichtig gewaschen. Nach der Elektroformation wurden die GUVs aus der Saccharose-Lösung (100 µl) in die vorgewärmte GUV-Kammer pipettiert, in welcher sich bereits der PBS-Puffer (250 µl, pH 7.3), mit der gleichen Osmolarität wie die Saccharose-Lösung, befand. Nach 5 min setzten sich die GUVs auf den Boden der Kammer ab. Danach wurde die SP-GFPuv-Lösung (3-5 µl) in die Kammer gegeben und anschließend Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Nach ca. 10 bis 15 min konnten die ersten TatA_dC_d-GUVs beobachtet werden, die sich mit dem Substrat SP-GFPuv füllten. Sowohl die Präparation als auch die Messungen erfolgten bei 33°C.

Mit diesen Proben wurden sowohl Fluoreszenzmessungen am Laser-Spinning-Disk-Mikroskop als auch Kreuzkorrelationsmessungen am STED-Konfokalmikroskop, von René Dörlich und Florian Stockmar aus dem Arbeitskreis von Prof. G. Ulrich Nienhaus, durchgeführt.

Die Osmolarität der verwendeten Lösungen wurden am Halbmikro-Osmometer gemessen. Für die Saccharose-Lösung wurden 5 g Saccharose in 50 ml ddH₂O gelöst, die Osmolarität bestimmt und auf den gewünschten Wert mit ddH₂O weiter verdünnt.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Streyer, L. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag (1996).
- [2] Fekkes, P. and Driessen, A. J. *Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999. 63(1): p. 161-73.
- [3] Natale, P., Brüser, T. and Driessen, A. J. *Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1778(9): p. 1735-56.
- [4] Robinson, C. and Bolhuis, A. *Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts*. Biochim Biophys Acta, 2004. 1694(1-3): p. 135-47.
- [5] Palmer, T. and Berks, B. C. *The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway*. Nature reviews. Microbiology, 2012. 10(7): p. 483-96.
- [6] Park, E. and Rapoport, T. A. *Mechanisms of Sec61/SecY-Mediated Protein Translocation Across Membranes*. Annual Review of Biophysics, 2012. 41: p. 21-40.
- [7] Fuchs, G. *Allgemeine Mikrobiologie*. 8. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart.
- [8] Berks, B. C., Sargent, F. and Palmer, T. *The Tat protein export pathway*. Mol Microbiol, 2000. 35(2): p. 260-74.
- [9] Alder, N. N. and Theg, S. M. *Energetics of protein transport across biological membranes: A study of the thylakoid Delta pH-dependent/cpTat pathway*. Cell, 2003. 112(2): p. 231-242.
- [10] Mould, R. M. and Robinson, C. A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem*, 1991. 266(19): p. 12189-12193.
- [11] Yahr, T. L. and Wickner, W. T. *Functional reconstitution of bacterial Tat translocation in vitro*. EMBO J, 2001. 20(10): p. 2472-9.
- [12] Lüke, I., Handford, J. I., Palmer, T. and Sargent, F. *Proteolytic processing of Escherichia coli twin-arginine signal peptides by LepB*. Arch. Microbiol., 2009. 191(12): p. 919-925.
- [13] Dilks, K., Rose, R. W., Hartmann, E. and Pohlschröder, M. *Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey*. J Bacteriol, 2003. 185(4): p. 1478-83.
- [14] Pohlschröder, M., Gimenez, M. I. and Jarrell, K. F. *Protein transport in Archaea: Sec and twin arginine translocation pathways*. Curr Opin Microbiol, 2005. 8(6): p. 713-9.
- [15] Berks, B. C., Palmer, T. and Sargent, F. *The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology*. Adv Microb Physiol, 2003. 47: p. 187-254.
- [16] Palmer, T., Sargent, F. and Berks, B. C. *Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway*. Trends Microbiol, 2005. 13(4): p. 175-180.
- [17] Robinson, C., Matos, C. F., Beck, D., Ren, C., Lawrence, J., Vasisht, N. and Mendel, S. *Transport and proofreading of proteins by the twin-arginine translocation (Tat) system in bacteria*. Biochim Biophys Acta, 2011. 1808(3): p. 876-84.

- [18] Rose, R. W., Brüser, T., Kissinger, J. C. and Pohlschröder, M. *Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway*. Mol Microbiol, 2002. 45(4): p. 943-50.
- [19] Tottey, S., Waldron, K. J., Firbank, S. J., Reale, B., Bessant, C., Sato, K., Cheek, T. R., Gray, J., Banfield, M. J., Dennison, C. and Robinson, N. *Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding*. Nature, 2008. 455: p. 1138-1142.
- [20] Ranquet, C., Ollagnier-de-Choudens, S., Loiseau, L., Barras, F. and Fontecave, M. *Cobalt stress in Escherichia coli. The effect on the iron-sulfur proteins*. J. Biol. Chem., 2007. 282: p. 30442-30451.
- [21] Sauv e, V., Bruno, S., Berks, B. C. and Hemmings, A. M. *The SoxYZ complex carries sulfur cycle intermediates on a peptide swinging arm*. J. Biol. Chem., 2007. 282: p. 23194-204.
- [22] Albiniak, A. M., Baglieri, J. and Robinson, C. *Targeting of luminal proteins across the thylakoid membrane*. J Exp Bot, 2012. 63(4): p. 1689-98.
- [23] Berks, B. C., Sargent, F., De Leeuw, E., Hinsley, A. P., Stanley, N. R., Jack, R. L., Buchanan, G. and Tracy, P. *A novel protein transport system involved in the biogenesis of bacterial electron transfer chains*. BBA-Bioenergetics, 2000. 1459(2-3): p. 325-330.
- [24] Stanley, N. R., Findlay, K., Berks, B. C. and Palmer, T. *Escherichia coli strains blocked in Tat-dependent protein export exhibit pleiotropic defects in the cell envelope*. J Bacteriol, 2001. 183(1): p. 139-144.
- [25] Ochsner, U. A., Snyder, A., Vasil, A. I. and Vasil, M. L. *Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(12): p. 8312-7.
- [26] Ding, Z. and Christie, P. J. *Agrobacterium tumefaciens twin-arginine-dependent translocation is important for virulence, flagellation, and chemotaxis but not type IV secretion*. J Bacteriol, 2003. 185(3): p. 760-71.
- [27] Pickering, B. S. and Oresnik, I. J. *The Twin Arginine Transport System Appears To Be Essential for Viability in Sinorhizobium meliloti*. J Bacteriol, 2010. 192(19): p. 5173-5180.
- [28] Meloni, S., Rey, L., Sidler, S., Imperial, J., Ruiz-Argueso, T. and Palacios, J. M. *The twin-arginine translocation (Tat) system is essential for Rhizobium-legume symbiosis*. Mol Microbiol, 2003. 48(5): p. 1195-207.
- [29] Saint-Joanis, B., Demangel, C., Jackson, M., Brodin, P., Marsollier, L., Boshoff, H. and Cole, S. T. *Inactivation of Rv2525c, a substrate of the twin arginine translocation (Tat) system of Mycobacterium tuberculosis, increases beta-lactam susceptibility and virulence*. J Bacteriol, 2006. 188(18): p. 6669-79.
- [30] De Buck, E., Lammertyn, E. and Anne, J. *The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence*. Trends Microbiol, 2008. 16(9): p. 442-53.

- [31] Matos, C. F., Branston, S. D., Albiniak, A., Dhanoya, A., Freedman, R. B., Keshavarz-Moore, E. and Robinson, C. *High-yield export of a native heterologous protein to the periplasm by the tat translocation pathway in Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2012. 109(10): p. 2533-42.
- [32] Müller, J. P. *Export gefalteter Proteine – Tat-abhängige Proteintranslokation in Bakterien*. *Biospektrum*, 2002. 4/02 8.Jahrgang: p. 360-364.
- [33] Berks, B. C. *A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors?* *Mol Microbiol*, 1996. 22(3): p. 393-404.
- [34] Stanley, N. R., Palmer, T. and Berks, B. C. *The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2000. 275(16): p. 11591-6.
- [35] Cristobal, S., de Gier, J. W., Nielsen, H. and von Heijne, G. *Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in Escherichia coli*. *EMBO J*, 1999. 18(11): p. 2982-90.
- [36] Bogsch, E., Brink, S. and Robinson, C. *Pathway specificity for a delta pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein*. *EMBO J*, 1997. 16(13): p. 3851-9.
- [37] Sargent, F., Gohlke, U., De Leeuw, E., Stanley, N. R., Palmer, T., Saibil, H. R. and Berks, B. C. *Purified components of the Escherichia coli Tat protein transport system form a double-layered ring structure*. *Eur J Biochem*, 2001. 268(12): p. 3361-7.
- [38] Gohlke, U., Pullan, L., McDevitt, C. A., Porcelli, I., de Leeuw, E., Palmer, T., Saibil, H. R. and Berks, B. C. *The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(30): p. 10482-10486.
- [39] Jack, R. L., Sargent, F., Berks, B. C., Sawers, G. and Palmer, T. *Constitutive expression of Escherichia coli tat genes indicates an important role for the Twin-Arginine Translocase during aerobic and anaerobic growth*. *J. Bacteriol.*, 2001. 183(5): p. 1801-1804.
- [40] Cline, K. and Mori, H. *Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport*. *J Cell Biol*, 2001. 154(4): p. 719-29.
- [41] Bolhuis, A., Mathers, J. E., Thomas, J. D., Barrett, C. M. and Robinson, C. *TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2001. 276(23): p. 20213-9.
- [42] Barnett, J. P., Eijlander, R. T., Kuipers, O. P. and Robinson, C. *A Minimal Tat System from a Gram-positive Organism*. *J Biol Chem*, 2008. 283(5): p. 2534-2542.
- [43] Blaudeck, N., Kreutzenbeck, P., Müller, M., Sprenger, G. A. and Freudl, R. *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, 2005. 280(5): p. 3426-3432.
- [44] Sargent, F., Bogsch, E. G., Stanley, N. R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B. C. and Palmer, T. *Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway*. EMBO J, 1998. 17(13): p. 3640-50.
- [45] Yen, M.-R., Tseng, Y.-H., Nguyen, E., Wu, L.-F. and Saier, M. *Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system*. Arch Microbiol, 2002. 177(6): p. 441-450.
- [46] Wexler, M., Sargent, F., Jack, R. L., Stanley, N. R., Bogsch, E. G., Robinson, C., Berks, B. C. and Palmer, T. *TatD Is a Cytoplasmic Protein with DNase Activity*. J Biol Chem, 2000. 275(22): p. 16717-16722.
- [47] Palmer, T. and Berks, B. C. *Moving folded proteins across the bacterial cell membrane*. Microbiology, 2003. 149(3): p. 547-556.
- [48] Lange, C., Müller, S. D., Walther, T. H., Bürck, J. and Ulrich, A. S. *Structure analysis of the protein translocating channel TatA in membranes using a multi-construct approach*. Biochim Biophys Acta, 2007. 1768(10): p. 2627-2634.
- [49] Müller, S. D., De Angelis, A. A., Walther, T. H., Grage, S. L., Lange, C., Opella, S. J. and Ulrich, A. S. *Structural characterization of the pore forming protein TatA_d of the twin-arginine translocase in membranes by solid-state ¹⁵N-NMR*. Biochim Biophys Acta, 2007. 1768(12): p. 3071-9.
- [50] Hicks, M. G., de Leeuw, E., Porcelli, I., Buchanan, G., Berks, B. C. and Palmer, T. *The Escherichia coli twin-arginine translocase: conserved residues of TatA and TatB family components involved in protein transport*. FEBS Lett, 2003. 539(1-3): p. 61-67.
- [51] Fröbel, J., Rose, P. and Müller, M. *Twin-arginine-dependent translocation of folded proteins*. Philos T Roy Soc B, 2012. 367(1592): p. 1029-1046.
- [52] Sargent, F., Stanley, N. R., Berks, B. C. and Palmer, T. *Sec-independent protein translocation in Escherichia coli. A distinct and pivotal role for the TatB protein*. J Biol Chem, 1999. 274(51): p. 36073-82.
- [53] Lee, P. A., Buchanan, G., Stanley, N. R., Berks, B. C. and Palmer, T. *Truncation analysis of TatA and TatB defines the minimal functional units required for protein translocation*. J Bacteriol, 2002. 184(21): p. 5871-9.
- [54] Warren, G., Oates, J., Robinson, C. and Dixon, A. M. *Contributions of the transmembrane domain and a key acidic motif to assembly and function of the TatA complex*. J Mol Biol, 2009. 388(1): p. 122-32.
- [55] Hu, Y., Zhao, E., Li, H., Xia, B. and Jin, C. *Solution NMR structure of the TatA component of the twin-arginine protein transport system from Gram-positive bacterium Bacillus subtilis*. J Am Chem Soc, 2010. 132(45): p. 15942-15944.

- [56] Walther, T. H., Grage, S. L., Roth, N. and Ulrich, A. S. *Membrane alignment of the pore-forming component TatA_d of the twin-arginine translocase from Bacillus subtilis resolved by solid-state NMR spectroscopy.* J Am Chem Soc, 2010. 132(45): p. 15945-15956.
- [57] Porcelli, I., de Leeuw, E., Wallis, R., van den Brink-van der Laan, E., de Kruijff, B., Wallace, B. A., Palmer, T. and Berks, B. C. *Characterization and Membrane Assembly of the TatA Component of the Escherichia coli Twin-Arginine Protein Transport System.* Biochemistry, 2002. 41(46): p. 13690-13697.
- [58] Greene, N. P., Porcelli, I., Buchanan, G., Hicks, M. G., Schermann, S. M., Palmer, T. and Berks, B. C. *Cysteine scanning mutagenesis and disulfide mapping studies of the TatA component of the bacterial twin arginine translocase.* J Biol Chem, 2007. 282(33): p. 23937-45.
- [59] Gouffi, K., Gérard, F., Santini, C.-L. and Wu, L.-F. *Dual topology of the Escherichia coli TatA Protein.* J Biol Chem, 2004. 279(12): p. 11608-11615.
- [60] Chan, C. S., Zlomislic, M. R., Tieleman, D. P. and Turner, R. J. *The TatA subunit of Escherichia coli twin-arginine translocase has an N-in topology.* Biochemistry, 2007. 46(25): p. 7396-404.
- [61] Behrendt, J., Standar, K., Lindenstrauss, U. and Brüser, T. *Topological studies on the twin-arginine translocase component TatC.* FEMS Microbiol Lett, 2004. 234(2): p. 303-8.
- [62] Punginelli, C., Maldonado, B., Grahl, S., Jack, R., Alami, M., Schröder, J., Berks, B. C. and Palmer, T. *Cysteine scanning mutagenesis and topological mapping of the Escherichia coli twin-arginine translocase TatC Component.* J Bacteriol, 2007. 189(15): p. 5482-94.
- [63] Rollauer, S. E., Tarry, M. J., Graham, J. E., Jaaskelainen, M., Jager, 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., Palmer, T., Høgbom, M., Berks, B. C. and Lea, S. M. *Structure of the TatC core of the twin-arginine protein transport system.* Nature, 2012. 492(7428): p. 210-4.
- [64] Holzapfel, E., Eisner, G., Alami, M., Barrett, C. M., Buchanan, G., Luke, I., Betton, J. M., Robinson, C., Palmer, T., Moser, M. and Müller, M. *The entire N-terminal half of TatC is involved in twin-arginine precursor binding.* Biochemistry, 2007. 46(10): p. 2892-8.
- [65] Zoufaly, S., Fröbel, J., Rose, P., Flecken, T., Maurer, C., Moser, M. and Müller, M. *Mapping precursor-binding site on TatC subunit of twin arginine-specific protein translocase by site-specific photo cross-linking.* J Biol Chem, 2012. 287(16): p. 13430-41.
- [66] Oates, J., Barrett, C. M., Barnett, J. P., Byrne, K. G., Bolhuis, A. and Robinson, C. *The Escherichia coli twin-arginine translocation apparatus incorporates a distinct form of TatABC complex, spectrum of modular TatA complexes and minor TatAB complex.* J Mol Biol, 2005. 346(1): p. 295-305.

- [67] McDevitt, C. A., Buchanan, G., Sargent, F., Palmer, T. and Berks, B. C. *Subunit composition and in vivo substrate-binding characteristics of Escherichia coli Tat protein complexes expressed at native levels*. FEBS J, 2006. 273(24): p. 5656-5668.
- [68] De Leeuw, E., Porcelli, I., Sargent, F., Palmer, T. and Berks, B. C. *Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway*. FEBS Lett, 2001. 506(2): p. 143-8.
- [69] Dabney-Smith, C., Mori, H. and Cline, K. *Oligomers of Tha4 organize at the thylakoid Tat translocase during protein transport*. J Biol Chem, 2006. 281(9): p. 5476-83.
- [70] Dabney-Smith, C. and Cline, K. *Clustering of C-terminal stromal domains of Tha4 homo-oligomers during translocation by the Tat protein transport system*. Mol Biol Cell, 2009. 20(7): p. 2060-9.
- [71] Westermann, M., Pop, O. I., Gerlach, R., Appel, T. R., Schlormann, W., Schreiber, S. and Müller, J. P. *The TatAd component of the Bacillus subtilis twin-arginine protein transport system forms homo-multimeric complexes in its cytosolic and membrane embedded localisation*. Biochim Biophys Acta, 2006. 1758(4): p. 443-51.
- [72] Berthelmann, F., Mehner, D., Richter, S., Lindenstrauss, U., Lunsdorf, H., Hause, G. and Brüser, T. *Recombinant expression of tatABC and tatAC results in the formation of interacting cytoplasmic TatA tubes in Escherichia coli*. J Biol Chem, 2008. 283(37): p. 25281-9.
- [73] Lee, P. A., Orriss, G. L., Buchanan, G., Greene, N. P., Bond, P. J., Punginelli, C., Jack, R. L., Sansom, M. S., Berks, B. C. and Palmer, T. *Cysteine-scanning mutagenesis and disulfide mapping studies of the conserved domain of the twin-arginine translocase TatB component*. J Biol Chem, 2006. 281(45): p. 34072-85.
- [74] Tarry, M. J., Schafer, E., Chen, S., Buchanan, G., Greene, N. P., Lea, S. M., Palmer, T., Saibil, H. R. and Berks, B. C. *Structural analysis of substrate binding by the TatBC component of the twin-arginine protein transport system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(32): p. 13284-9.
- [75] Ma, X. and Cline, K. *Multiple precursor proteins bind individual Tat receptor complexes and are collectively transported*. EMBO J, 2010. 29(9): p. 1477-88.
- [76] Gerard, F. and Cline, K. *The thylakoid proton gradient promotes an advanced stage of signal peptide binding deep within the Tat pathway receptor complex*. J Biol Chem, 2007. 282(8): p. 5263-72.
- [77] Alami, M., Luke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H. G., Brunner, J. and Müller, M. *Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in Escherichia coli*. Mol Cell, 2003. 12(4): p. 937-46

- [78] Gerard, F. and Cline, K. *Efficient twin arginine translocation (Tat) pathway transport of a precursor protein covalently anchored to its initial cpTatC binding site*. J Biol Chem, 2006. 281(10): p. 6130-5.
- [79] Maurer, C., Panahandeh, S., Jungkamp, A. C., Moser, M. and Muller, M. *TatB functions as an oligomeric binding site for folded Tat precursor proteins*. Mol Biol Cell, 2010. 21(23): p. 4151-61.
- [80] Leake, M. C., Greene, N. P., Godun, R. M., Granjon, T., Buchanan, G., Chen, S., Berry, R. M., Palmer, T. and Berks, B. C. *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, 2008. 105(40): p. 15376-81.
- [81] Mori, H. and Cline, K. *A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid [Delta]pH/Tat translocase*. J Cell Biol, 2002. 157(2): p. 205-10.
- [82] Jongbloed, J. D. H., Grieger, U., Antelmann, H., Hecker, M., Nijland, R., Bron, S. and Dijl, J. M. v. *Two minimal Tat translocases in Bacillus*. Mol Microbiol, 2004. 54(5): p. 1319-1325.
- [83] Pop, O., Martin, U., Abel, C. and Müller, J. P. *The twin-arginine signal peptide of PhoD and the TatAd/Cd proteins of Bacillus subtilis form an autonomous Tat translocation system*. J Biol Chem, 2002. 277(5): p. 3268-73.
- [84] Eijlander, R. T., Jongbloed, J. D. and Kuipers, O. P. *Relaxed specificity of the Bacillus subtilis TatAdCd translocase in Tat-dependent protein secretion*. J Bacteriol, 2009. 191(1): p. 196-202.
- [85] Jongbloed, J. D., Antelmann, H., Hecker, M., Nijland, R., Bron, S., Airaksinen, U., Pries, F., Quax, W. J., van Dijl, J. M. and Braun, P. G. *Selective contribution of the twin-arginine translocation pathway to protein secretion in Bacillus subtilis*. J Biol Chem, 2002. 277(46): p. 44068-78.
- [86] Eder, S., Shi, L., Jensen, K., Yamane, K. and Hulett, F. M. *A Bacillus subtilis secreted phosphodiesterase/alkaline phosphatase is the product of a Pho regulon gene, phoD*. Microbiology, 1996. 142: p. 2041-2047.
- [87] Barnett, J. P., van der Ploeg, R., Eijlander, R. T., Nenninger, A., Mendel, S., Rozeboom, R., Kuipers, O. P., van Dijl, J. M. and Robinson, C. *The twin-arginine translocation (Tat) systems from Bacillus subtilis display a conserved mode of complex organization and similar substrate recognition requirements*. FEBS J, 2009. 276(1): p. 232-43.
- [88] van der Ploeg, R., Barnett, J. P., Vasisht, N., Goosens, V. J., Poether, D. C., Robinson, C. and van Dijl, J. M. *Salt-sensitivity of Minimal Twin-arginine Translocases*. J Biol Chem, 2011. 286(51): p. 43759-70.

- [89] van der Ploeg, R., Mader, U., Homuth, G., Schaffer, M., Denham, E. L., Monteferrante, C. G., Miethke, M., Marahiel, M. A., Harwood, C. R., Winter, T., Hecker, M., Antelmann, H. and van Dijk, J. M. *Environmental salinity determines the specificity and need for Tat-dependent secretion of the YwbN protein in Bacillus subtilis*. PLoS ONE, 2011. 6(3): p. e18140.
- [90] van der Ploeg, R., Monteferrante, C. G., Piersma, S., Barnett, J. P., Kouwen, T. R., Robinson, C. and van Dijk, J. M. *High-salinity growth conditions promote Tat-independent secretion of Tat substrates in Bacillus subtilis*. Appl Environ Microbiol, 2012. 78(21): p. 7733-44.
- [91] Walther, T. H., Gottselig, C., Grage, Stephan L., Wolf, M., Vargiu, Attilio V., Klein, Marco J., Vollmer, S., Prock, S., Hartmann, M., Afonin, S., Stockwald, E., Heinzmann, H., Nolandt, Olga V., Wenzel, W., Ruggerone, P. and Ulrich, Anne S. *Folding and self-assembly of the TatA translocation pore based on a charge zipper mechanism*. Cell, 2013. 152(1-2): p. 316-326.
- [92] Rodriguez, F., Rouse, S. L., Tait, C. E., Harmer, J., De Riso, A., Timmel, C. R., Sansom, M. S. P., Berks, B. C. and Schnell, J. R. *Structural model for the protein-translocating element of the twin-arginine transport system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(12): p. 1092-101.
- [93] Richter, S. and Brüser, T. *Targeting of unfolded PhoA to the TAT translocon of Escherichia coli*. J Biol Chem, 2005. 280(52): p. 42723-30.
- [94] Eijlander, R. T. *Protein secretion via the Twin-arginine translocation pathway of Bacillus subtilis*. Thesis, 2009.
- [95] Klein, M. J. *Das Tat-abhängige Signalpeptid von prePhoD*. Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, 2008.
- [96] Gottselig, C. *Herstellung von TatAd-Proteinfragmenten für Fluoreszenz-Korrelations-spektroskopische Untersuchungen* Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, 2010.
- [97] Nolandt, O. V., Walther, T. H., Roth, S., Bürck, J. and Ulrich, A. S. *Structure analysis of the membrane protein TatC(d) from the Tat system of B. subtilis by circular dichroism*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1788(10): p. 2238-2244.
- [98] García-Sáez, A. J., Carrer, D. C. and Schwille, P. *Fluorescence correlation spectroscopy for the study of membrane dynamics and organization in giant unilamellar vesicles*. Methods Mol Biol. , 2010. 606: p. 493-508.
- [99] Ries, J. and Schwille, P. *Studying Slow Membrane Dynamics with Continuous Wave Scanning Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Biophysical Journal, 2006. 91: p. 1915-1924.
- [100] Bacia, K. and Schwille, P. *Practical guidelines for dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy*. Nat Protoc., 2007. 2(11): p. 2842-56.

- [101] Hicks, M. G., Lee, P. A., Georgiou, G., Berks, B. C. and Palmer, T. *Positive Selection for Loss-of-Function tat Mutations Identifies Critical Residues Required for TatA Activity*. J. Bacteriol., 2005. 187(8): p. 2920-2925.
- [102] Sargent, F., Berks, B. C. and Palmer, T. *Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins*. Fems Microbiology Letters, 2006. 254(2): p. 198-207.
- [103] Brüser, T. *Tat-abhängiger Transport von Proteinen über biologische Membranen*. Habilitationsschrift, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, 2006.
- [104] Brüser, T. and Sanders, C. *An alternative model of the twin arginine translocation system*. Microbiol Res, 2003. 158(1): p. 7-17.
- [105] Jongbloed, J. D., Martin, U., Antelmann, H., Hecker, M., Tjalsma, H., Venema, G., Bron, S., van Dijl, J. M. and Müller, J. *TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway*. J Biol Chem, 2000. 275(52): p. 41350-7.
- [106] Moser, M., Panahandeh, S., Holzapfel, E. and Müller, M. *In vitro analysis of the bacterial twin-arginine-dependent protein export*. Methods Mol Biol, 2007. 390: p. 63-79.
- [107] Whitaker, N., Bageshwar, U. K. and Musser, S. M. *Kinetics of precursor interactions with the bacterial Tat translocase detected by real-time FRET*. J Biol Chem, 2012. 287(14): p. 11252-60.
- [108] Pop, O. I., Westermann, M., Volkmer-Engert, R., Schulz, D., Lemke, C., Schreiber, S., Gerlach, R., Wetzker, R. and Müller, J. P. *Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatAd indicates protein-mediated targeting of the Tat export in Bacillus subtilis*. J Biol Chem, 2003. 278(40): p. 38428-36.
- [109] Thomas, J. D., Daniel, R. A., Errington, J. and Robinson, C. *Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2001. 39(1): p. 47-53.
- [110] Albinia, A. M., Matos, C. F., Branston, S. D., Freedman, R. B., Keshavarz-Moore, E. and Robinson, C. *High-level secretion of a recombinant protein to the culture medium with a Bacillus subtilis twin-arginine translocation system in Escherichia coli*. FEBS J., 2013. 280(16): p. 3810–3821.
- [111] Schwille, P. *Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications*. Cell Biochem. Biophys., 2001. 34: p. 383–408.
- [112] Doeven, M. K., Folgering, J. H. A., Krasnikov, V., Geertsma, E. R., Bogaart, G. v. d. and Poolman, B. *Distribution, Lateral Mobility and Function of Membrane Proteins Incorporated into Giant Unilamellar Vesicles*. Biophys J., 2005. 88(2): p. 1134–1142.
- [113] Abramoff, M. D., Magalhães, P. J. and Ram, S. J. *Image processing with ImageJ*. Biophotonics international, 2004. 11(7): p. 36 - 42.

- [114] Schagger, H. and von Jagow, G. *Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form*. Anal Biochem, 1991. 199: p. 223-231.
- [115] Wittig, I., Braun, H. P. and Schagger, H. *Blue native PAGE*. Nat Protoc., 2006. 1: p. 418-428.
- [116] Haustein, E. and Schwille, P. *Fluorescence Correlation Spectroscopy: Novel Variations of an Established Technique*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 2007. 36: p. 151–169.

Publikationsliste

Fachartikel

“Folding and self-assembly of the TatA translocation pore based on a novel charge zipper mechanism”

Walther, T.H.; Gottselig, C.; Grage, S.L.; Wolf, M.; Vargiu, A.V.; Klein, M.J.; Vollmer, S.; Prock, S.; Hartmann, M.; Afonin, S.; Stockwald, E.; Heinzmann, H.; Nolandt, O.V.; Wenzel, W.; Ruggerone, P.; Ulrich, A.S.,
Cell, 2013. 152 (1-2): p. 316-326.

Tagungsbeiträge

- (1) „ *Structure-function analysis of the twin arginine translocase: self-assembly of TatA_d into a pore via salt bridges*“

Gottselig, C.; Walther, T.H.; Grage, S.L.; Stockmar, F.; Wolf, M.; Vargiu, A.V.;
Vollmer, S.; Wenzel, W.; Ruggerone, P.; Nienhaus, G.U.; Ulrich, A.S.

Gordon Research Conference on Membrane Transport Proteins, Les Diablerets,
Juli 01-06, 2012 (Poster).

- (2) „ *Structure-function analysis of the Tat translocase: oligomerization of TatA_d into a pore*“

Gottselig, C.; Walther, T.; Vollmer, S.; Ulrich, A.S.

Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)
2012, Tübingen, März 18-21, 2012 (Poster).

- (3) „ *Investigation of TatA_d oligomerization to a pore complex*“

Gottselig, C.; Walther, T. H.; Vollmer, S.; Ulrich, A.S.

CFN Summer School 2011 on Nano-Biology, Bad Herrenalb, September 7-10, 2011
(Poster)

- (4) „ *Pore formation of the twin arginine translocase probed by fluorescence correlation spectroscopy*“

Gottselig, C.; Klein, M.J.; Perez, J.; Grage, S.; Naber, A.; Ulrich, A.S.

Biophysics of Membrane-Active Peptides : 455th WE-Heraeus-Seminar, Bad Honnef,
April 11-14, 2010 (Poster).